

Dondurma-Çözme İşleminin Ardından Uygulanan Santrifüjün Ortaya Çıkardığı Mekanik Stresin Karaciğer Kanseri Hücreleri İn Vitro Kültürü Üzerine Etkileri

The Effects of Mechanic Stress, Due to Centrifuge After Freezing–Thawing Process, on In Vitro Culture of Liver Cancer Cells

Hatice İsan¹, Kübra Tüfekçi², Meltem Elif Göklü², Ranan Gülhan Aktaş³

¹Msc., Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kanseri ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, İstanbul.

²Dönem III, Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul.

³Prof. Dr., Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kanseri ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, İstanbul.

İletişim: Msc. Hatice İsan, Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kanseri ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, Maltepe, İstanbul. E-posta: htcisn@gmail.com

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda; dondurma-çözme işleminin ardından direkt kültürü yapılmış ve santrifüj işlemi uygulandıktan sonra kültüre edilmiş HepG2 hücrelerinin in vitro ortamda karşılaştırmalı değerlendirilerek hücre çözme işlemi için en uygun yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: %10 DMSO (Dimethylsulfoxide) ve %1 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) den oluşan dondurma medyumuna içerisinde dondurulmuş HepG2 hücreleri, 37°C su banyosu içerisinde çözöldükten sonra iki gruba ayrıldı. I. Gruptaki hücreler direkt kültür metodu uygulanarak; II. Grup hücreler ise 3000 rpm de 3 dak. santrifüj edilmelerinin ardından hücre pelleti ayrıştırılarak eşit oranda besi yeri içerisinde kültüre edildi. Tüm örnekler; Zeiss PrimoVert invert mikroskopunda hergün karşılaştırmalı değerlendirildi. Ardından 7. Gün fikse edilerek Hematoksilen-Eozin ve Tripan Mavisi ile boyandı.

Bulgular: İki grup hücrenin morfolojik özellikleri arasında belirgin bir farklılık gözlenmedi. Ancak santrifüj uygulanan hücrelerin bulunduğu kültür kaplarında kültürün her döneminde ölü hücre sayısının daha yüksek olduğu dikkati çekti.

Sonuçlar: Çalışmamız; karaciğer kanseri hücrelerinin morfolojisi üzerinde dondurma-çözme işlemleri sonrasında uygulanan santrifüj işleminin belirgin bir farklılığa yol açmadığını göstermektedir. Ancak santrifüj sonrası yapılan kültürlerde, ölü hücre sayısının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle hücre sayısının az olduğu çalışmalarda çözme sonrası direkt kültürün yapılmasının daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: HepG2, dondurma-çözme, santrifüj, direkt kültür, dimetilsülfoksit

ABSTRACT

Aim: The study aims to examine the effects of centrifuging of HepG2 cells after freezing-thawing process and to clarify the best way for thawing he cells for in vitro culture.

Materials And Methods: HepG2 cells were frozen in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) containing 10 %DMSO (Dimethylsulfoxide) and 1% FBS (Fetal Bovine Serum) . They were thawed in 37°C water-bath immediately and then seperated into two experimental groups: Group I: Cells were cultured directly. Group II: The thawed cell pellet were cultured in the same conditions after centrifuging in 3000 rpm for 3 minutes. All specimens were comparatively examined under Zeiss PrimoVert invert microscope. Subsequently; the cells were fixed on 7th day and stained with Hematoxylene& Eosin and Trypan Blue.

Results: There were no significant morphological difference between two groups. However; the dead cell number on daily examinations were strikingly more in the culture of the thawed / centrifuged group.

Conclusions: The study demonstrates that centrifuge after thawing has no significant effect on the morphology of liver cancer cells. However, cells undergoes dying process increase after centrifuge. Those results show that direct culture method should be preferred if the cell number is limited in a study.

Keywords: HepG2, freeze-thaw, centrifuge, dimethylsulfoxide

GİRİŞ

İn vitro hücre kültürü çalışmaları kanser araştırmalarında önemli yer tutmaktadır. Kanserli hastalardan alınan dokulardan hücreler üretilmekte, incelenmekte ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere dondurulmaktadır. Dondurup çözme sonrası bu hücrelerin en uygun şekilde kültürlerinin yapılmasının bilimsel araştırmaların başarısı açısından önemi büyüktür. Bu işlemler hücre için önemli bir stres kaynağıdır. Çözme işleminin ardından hücrelerin oldukça kırılgan olduğu bildirilmiştir. Kriyoprezervasyon işlemi gerçekleşirken çevresel soğumanın sebep olduğu hücresel hasarların çoğuna donma sırasında dehidrasyon, çözme esnasında ise rehidrasyon neden olmaktadır. Hem dehidrasyon hem de rehidrasyon biyomoleküller ve hücresel zarlara mekanik stres oluşturmaktadır. Bunun sonucunda da hücrede oluşan donma ve çözme tahribatıyla ilişkilendirilen pek çok problemler ortaya çıkmaktadır (1, 2). Son zamanlarda hücre ve dokuların kriyoprezervasyonunun sağlanabilmesi için, çok farklı dondurma metodları ve amaca göre değişen kriyoprotektif ajanlar kullanılmaktadır. Bu kriyoprotektif ajanlardan en sık kullanılanları DMSO (dimethylsulfoxide) ve gliseroldür. Gliserol DMSO ile kıyaslandığında hücreler için daha düşük toksik etkiye sahiptir. Fakat yapılan çalışmalarda DMSO daha sık kullanılmaktadır. DMSO hücre içine daha çabuk diffüze olur bu nedenle de kriyoprotektif oranı daha yüksektir (3, 2, 4). Bu yüzden gliserole göre daha avantajlıdır. DMSO'nun hücreler için toksik olabileceği saptanmıştır. Bu nedenle bazı bilim adamları, çözme işleminin hemen ardından hücreleri santrifüj ederek, dondurma medyumunun içerisindeki DMSO'ya maruz kalma süresini minimuma indirmek gerektiğini savunmaktadır. Bazı araştırmacılar ise; zaten çözme sonrası kırılgan hale gelen hücrelere santrifüj ile yeni bir mekanik stres uygulamanın doğru olmadığını, dondurma medyumunun besi yeri ile seyreltilerek DMSO'nun toksik etkilerinin minimuma indirilebileceğini düşünmektedirler.

Mekanik stres hücrelerin gelişiminde merak edilen çevresel bir faktördür. Bu gücün hücreler üzerindeki etkisini iyi bir şekilde aydınlatılması in vivo ve in vitro hücre gelişimini daha yakından tanımamızı sağlayacaktır. Uygulanan stres hücreler üzerinde deformasyon, migrasyon, proliferasyon ve farklılaşma açısından önemli bir role sahiptir. Mekanik stresin hücreler üzerinde etkisini gösteren farklı çalışmalar mevcuttur (5-13, 14). Santrifüjün farklı hücre tipleri üzerine etkileri konusunda ise oldukça kısıtlı sayıda araştırma mevcuttur.

Çalışmamızda hepatosellüler karsinoma tanısı konulmuş bir hastadan izole edilen HepG2 hücrelerinin bu işlemlerden nasıl etkilendiğini incelemeyi ve çözme işlemi için en uygun yöntemi belirlemeyi hedefledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

%10 DMSO (Dimethylsulfoxide) ve %1 Fetal Bovine Serum (FBS) (Capricorn Scientific) içeren Dulbecco's Modified Ea-

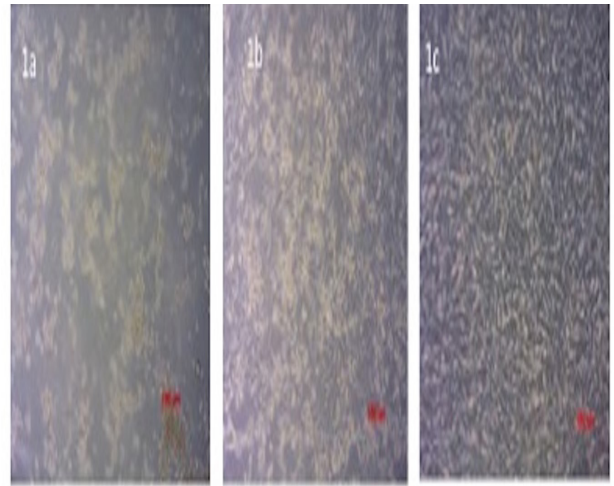
gle's Medium (DMEM) (Pan Biotech) den oluşan dondurma medyumunu içerisinde dondurulmuş HepG2 hücreleri 37°C su banyosu içerisinde çözüldükten sonra iki gruba ayrıldı.

I. Gruptaki hücreler direkt kültür metodu uygulanarak; II. Grup hücreler ise 3000 rpm de 3 dakika santrifüj edilmelerinin ardından hücre pelleti ayrıştırılarak eşit oranda besi yeri (10% FBS ve 1% Streptomisin ve Penisilin (Multicell) içeren 89% DMEM) içerisinde kültürleri yapıldı. İki gruptaki hücreler de; 37 °C'de 5% CO2 içeren inkübatörlerde (Panasonic, İstanbul) kültüre edildi. Tüm gruplara ait hücreler aynı saatte gün aşırı beslenerek bir hafta süre ile gözlemlendi. Hücrelerin PrimoVert Invert faz kontrast (Zeiss) mikroskobu ile farklı büyütmelerde canlı görüntüleri kaydedildi. Bir haftalık kültürün ardından hücreler fikse edildi. Hematoksilen-Eozin ve Tripkan Mavis ile boyandı. Gruplardaki tüm örnekler karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

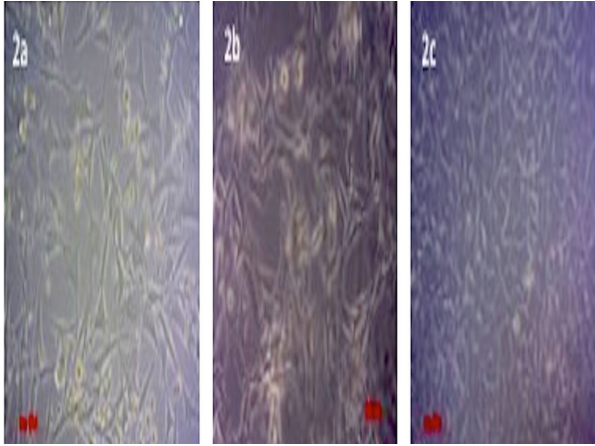
BULGULAR

Hücrelerin günlük faz kontrast mikroskobu altındaki takipleri sırasında; birinci ve ikinci grup hücrelerinin morfolojik özellikleri karşılaştırmalı değerlendirildi. Her iki grupta da; HepG2 hücrelerinin bilinen morfolojik özelliklerini taşıyan poligonal, gruplar halinde çoğalmaya eğilimli, kültür yüzeyine yapışmış, merkezi çekirdeklere sahip hücreler gözlemlendi.

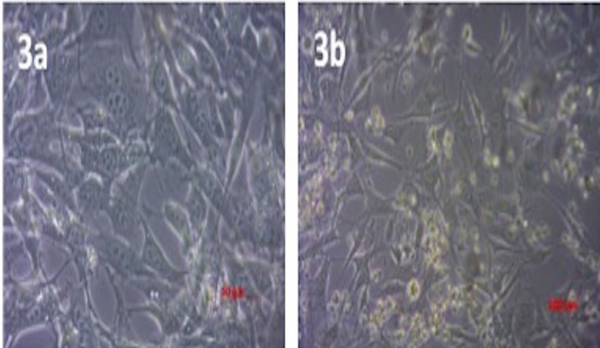
Ancak; santrifüjün ardından kültüre edilen hücreler arasında ölü hücre sayısının çokluğu dikkati çekti. Bir hafta boyunca günlük takipler sırasında elde edilen canlı hücre görüntüleri incelendiğinde; santrifüj sonrası kültürlerde her gün ölü hücre sayısının dikkati çeken bir oranda daha fazla olduğu saptandı (Resim 1 a,b, c., Resim 2 a, b, c, Resim 3 a, b., Resim 4 a, b)



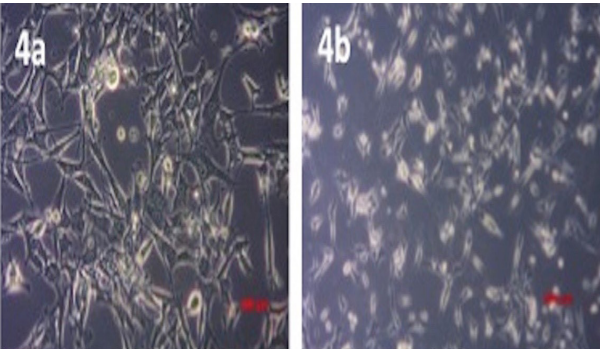
Resim 1 a, b, c. Çözümlerinin ardından santrifüj uygulanarak kültüre edilen HepG2 hücrelerinin 24., 48., 72. saatlerde faz kontrast mikroskop altında çekilen fotoğrafları.



Resim 2 a, b, c.Çözümlerinin ardından direkt kültüre edilen HepG2 hücrelerinin, 24., 48., 72. saatlerde faz kontrast mikroskop altında çekilen fotoğrafları.

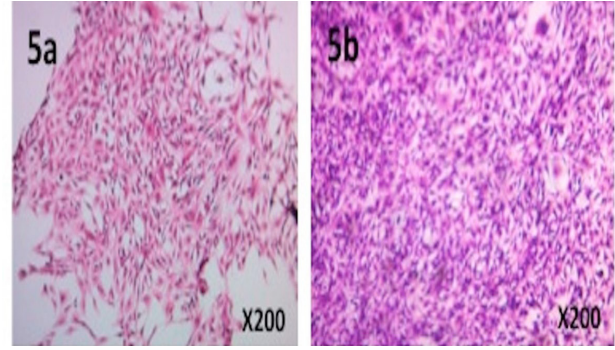


Resim 3 a, b. Santrifüj uygulanarak kültüre edilen HepG2 hücrelerinin faz kontrast mikroskop altında çekilen fotoğrafları.

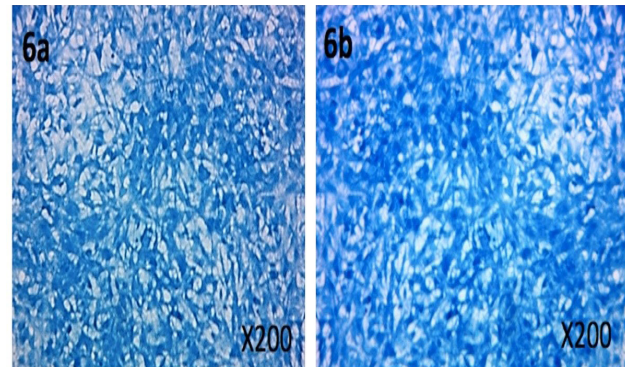


Resim 4 a, b. Direkt kültüre edilen HepG2 hücrelerinin faz kontrast mikroskop altında çekilen fotoğrafları.

Bir haftalık kültürün ardından fikse edilen hücreler Hematoksilen ve Eozin ile boyandı. Karşılıklı değerlendirildiklerinde; sitoplazmik yapılarının çok benzer olduğu görüldü. Hücre hacimlerinde, uzantılarında, çekirdek yapılarında hücreler üzerinde stresin arttığını gösterecek belirgin bir farklılık yoktu. Sitoplazmaların benzer şekilde boyanmış olması; sitoplazmik organeller ve sitozol içeriğinin de benzer olduğunu düşündürdü. Canlı incelemelerde karşılaşılan çok sayıda ölü hücre miktarının boyama sürecinde ortamdan temizlenmiş olduğu dikkati çekti (Resim 5a, b). Tripan mavisi ile yapılan boyamalarda da; hücrelerde çekirdek / sitoplazma oranı, çekirdeğin ve sitoplazmanın boyanma özellikleri, hücre şekilleri arasında belirgin bir farklılık gözlenmedi (Resim 6 a, b).



Resim 5 a)Santrifüj uygulanarak kültüre edilen HepG2 hücrelerinin Hematoksilen ve Eozin ile boyanmış görüntüleri. **b)**Direkt kültüre edilen HepG2 hücrelerinin Hematoksilen ve Eozin ile boyanmış görüntüleri.



Resim 6 a) Santrifüj uygulanarak kültüre edilen HepG2 hücrelerinin Tripan mavisini ile boyanmış görüntüleri. **b)** Direkt kültüre edilen HepG2 hücrelerinin Tripan mavisi ile boyanmış görüntüleri.

TARTIŞMA

Mekanik etkiler; hücrelerin büyüme, gelişme ve farklılaşmasında önemli role sahip olmakta iskelet yapının gelişimini de aktif olarak etkilemektedirler. Lee ve ark.'ları MC3T3-E1 fare osteoblast hücrelerinin santrifüj sonrası DNA sentezini, ALP aktivitesini ve osteokalsin üretimini araştırmışlardır. Hücreler önce %10'luk, 24 saat sonra %0, 1 ve 10'luk FBS içeren α -MEM'de kültüre edilmişlerdir. HM-2 micro titer rotorda günde 3 kere 10 dakika boyunca 400g'de santrifüj edilmişlerdir. Bunun sonucunda DNA sentezi ve ALP aktivitesi en yüksek santrifüj uygulanan ve %1'lik FBS içeren hücre grubunda bulunmuştur. %0 FBS içeren grupta santrifüjün DNA ve ALP üzerine anlamlı bir etkisi bulunamamıştır. Ayrıca santrifüjün serum konsantrasyonlarından bağımsız olarak osteokalsin üretimini etkilemediği belirtilmiştir (15).Mekanik güçlerin etkilerinin araştırıldığı bir diğer hücre grubu; adipoz kök hücrelerdir. Yağ hücre purifikasyonunda santrifüj hızlarının ve zamanlarının farklı sonuçlar ortaya çıkardığı belirtilmiştir. Coleman ve ark. (16) 3000 rpm de 3 dakika önerirken,Boschert ve ark. (17) 100g üzerindeki tüm kuvvetlerin hücre hasarına yol açacağını belirtmiş ve 50g de 2 dakika önermişlerdir. 2 dakikada 500g uygulanan yağ hücrelerinde santrifüj uygulanmayanlara kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır (18).

Yapılan son çalışmalar histolojik açıdan 100g üzerindeki kuvvetlerin adipozit hasarına yol açtığını açıkça gösterememekte ve 1200g uygun değer olarak önerilmektedir (19).

Mekanik stres hücre çalışmalarında yaygın olarak maruz kalınan bir faktör olmaktadır. Özellikle yardımla üreme tekniklerinde kaliteli sperm elde edilmesinde kullanılan metodlardan biri de santrifüjdür. Yapılan çalışmalarda santrifüjün insan spermatozoa hücrelerinde ömrü kısalttığı ve motiliteyi azalttığı (20), DNA bütünlüğünü etkilediği (21, 22) belirtilmiştir.

Santrifüj stresine karşı yüksek duyarlılığı bilinen kemirgen epididimal spermatozoalarda santrifüj kuvvetinin progresif hareketlilik ve yüksek mitokondriyal zar potansiyeline sahip spermatozoa sayısı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (23, 24).

Mekanik stres hücrelerin gelişiminde merak edilen çevresel bir faktördür. Bu gücün hücreler üzerindeki etkisinin iyi bir şekilde aydınlatılması in vivo ve in vitro hücre gelişimini daha yakından tanımamızı sağlayacaktır. Mekanik stres hücreler üzerinde deformasyon, migrasyon, proliferasyon ve farklılaşma açısından önemli bir role sahiptir. Mekanik stresin hücreler üzerinde etkisini göstermek amacıyla pek çok yöntem kullanılmıştır.

Çalışmamızda; bir hafta boyunca günlük takipler sırasında elde edilen canlı hücre görüntüleri incelendiğinde; her iki deney grubunda HepG2 hücrelerinin morfolojik özelliklerinin değişmediği, her iki grupta da benzer olduğu gözlemlendi. Ancak; santrifüjün ardından kültüre edilen hücrelerde her gün ölü hücre sayısının arttığı saptandı.

Bir haftalık kültürün ardından fikse edilen hücrelerde hematoksilen eozin boyama sonrasında, karşılıklı değerlendirmelerde; hücrelerin sitoplazmik yapılarının çok benzer olduğu görüldü. Hücre hacimlerinde, uzantılarında, çekirdek yapılarında hücreler üzerinde stresin arttığını gösterecek belirgin bir farklılık yoktu. Metilen mavisi ile yapılan boyamalarda da; hücrelerde çekirdek / sitoplazma oranı, çekirdeğin ve sitoplazmanın boyanma özellikleri, hücre şekilleri arasında belirgin bir farklılık gözlenmedi. Santrifüj edilen grupta; kültürün her aşamasında ölü hücrelerin çokluğu; santrifüjün ortaya çıkardığı mekanik stresin hücrelerin programlı ölümünü stimüle etmiş olduğunu düşündürdü.

SONUÇLAR

Çalışmamız; karaciğer kanser hücrelerinin morfolojisi ve fonksiyonları üzerinde dondurma-çözme işlemleri sonrasında uygulanan santrifüj işleminin morfolojik açıdan belirgin bir farklılığa yol açmadığını göstermektedir. Ancak santrifüj sonrası yapılan kültürlerde, kültürün her aşamasında ölüme giden hücre sayısının arttığı saptanmıştır. Sonuçlarımız; hücre sayısının az olduğu çalışmalarda çözme sonrası direkt kültürün yapılmasının daha uygun olacağını düşündürmektedir.

TEŞEKKÜR

Projeyi destekleyen Sağlık ve Sosyal Yardım Vakfı'na ve sevgili öğrencimiz Egzona Qipa' ya teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Auwera Van Der I, Cornillie F. Cryopreservation of pronucleate mouse ova: slow versus ultrarapid freezing. *Hum Reprod* 1990; 5 (5): 619-21.
2. Anchordoguy TJ, Cechini CA, Crowee JH, Crowee LM. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayer. *Cryobiology* 1991; 28: 467-73.
3. McGann LE. Optimal temperature ranges for control of coding rate. *Cryobiology* 1991; 28: 467-73.
4. Rinkes IH, Toner M, Ezzel RM, Tompkins RG, Yarmush ML. Effect of dimethyl sulfoxide on cultured rat hepatocytes in sandwich configuration. *Cryobiology* 1992; 29 (4): 443-53.
5. Akiyama Y, Terada R, Hashimoto M, et al. Rod-shaped Tissue Engineered Skeletal Muscle with Artificial Anchors to Utilize as a Bio-Actuator. *Journal of Biomechanical Science and Engineering* 2010; 5 (3): 236-244.
6. Nakagawa K, Morishima N, Matsumoto T. Effect of Three-Dimensional Culture and Cyclic Stretch Stimulation on Expression of Contractile Protein in Freshly Isolated Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Journal of Biomechanical Science and Engineering* 2009; 4 (2): 286-297.
7. Terracio L, Miller B, Borg T. Effects of Cyclic Mechanical Stimulation of the Cellular Components of the Heart: in Vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 1988; 24 (1): 53-58.
8. Wang J.H.-C, Yang G, Li Z, Shen W. Fibroblast Responses to Cyclic Mechanical Stretching Depend on Cell Orientation to the Stretching Direction. *Journal of Biomechanics* 2004; 37: 573-576.
9. Hashimoto S, Hino H, Iwagawa T. Effect of Excess Gravitational Force on Cultured Myotubes in Vitro. *Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics* 2013; 11(3):50-57.
10. Hashimoto S, Okada M. Orientation of Cells Cultured in Vortex Flow with Swinging Plate in Vitro. *Journal of Systemics Cybernetics and Informatics* 2011; 9 (3): 1-7.
11. Hashimoto S, Sato F, Hino, et al. Responses of Cells to Flow in Vitro. *Journal of Systemics Cybernetics and Informatics* 2013; 11(5): 20-27.
12. Sugaya Y, Sakamoto N, Ohashi T, et al. Elongation and Random Orientation of Bovine Endothelial Cells in Response to Hydrostatic Pressure: Comparison with Response to Shear Stress. *JSME International Journal, Series C*, 2003; 46(4):1248-1255.
13. Uttayarat P, Chen M, Li M, et al. Microtopography and Flow Modulate the Direction of Endothelial Cell Migration. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2008; 294:

H1027-H1035.

14. Azuma N, Duzgun S.A, Ikeda M, et al. Endothelial Cell Response to Different Mechanical Forces. *Journal of Vascular Surgery* 2000; 32(4): 789-794.
15. Lee DH, Park JC, Suh H. Effect of centrifugal force on cellular activity of osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *Yonsei medical journal* 2001; 42 (4): 405-10.
16. Coleman SR. Structural fat grafts - The ideal filler? *Clin Plast Surg* 2001; 28 (1):111.
17. Boschert MT, Beckert BW, Puckett CL, et al. Analysis of lipocyte viability after liposuction. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109: 761Y765; discussion 766Y767.
18. Rohrich RJ, Sorokin ES, Brown SA. In search of improved fat transfer viability: A quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plast Reconstr Surg* 2004; 113 (1): 391-5.
19. Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, et al. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: Optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plast Reconstr Surg* 2008; 121(3): 1033-41.
20. Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, et al. Centrifugation of Human Spermatozoa Induces Sublethal Damage - Separation of Human Spermatozoa from Seminal Plasma by a Dextran Swim-up Procedure without Centrifugation Extends Their Motile Lifetime. *Human reproduction* 1993; 8 (7) :1087-92.
21. Aitken RJ, Finnie JM, Muscio L, et al. Potential importance of transition metals in the induction of DNA damage by sperm preparation media. *Human reproduction* 2014; 29 (10): 2136-47.
22. Zini A, Mak V, Phang D, et al. Potential adverse effect of semen processing on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and sterility* 1999;72 (3): 496-9.
23. Katkov II & Mazur P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatozoa. *J Androl* 1988; 19: 232-241.
24. Kim S, Agca C, Agca Y. Effects of various physical stress factors on mitochondrial function and reactive oxygen species in rat spermatozoa. *Reprod Fert Develop* 2013; 25 (7): 1051-64.