

## KÖK HÜCRE KÜLTÜR LABORATUVARI: TEMEL PRENSİPLER

Gökçen DİNÇ<sup>1</sup>

## GİRİŞ

Hücre kültürü, ökaryotik veya prokaryotik hücrelerin *in vitro* koşullarda yaşaması ve çoğalmasını sağlayan laboratuvar yöntemlerini ifade eder. Hücre kültür çalışmalarının geçmişi doku kültürü, virüs biyolojisi ve aşı geliştirilmesi, hastalık ve sağlıkta genlerin rolü ve biyofarmasötik üretmek için büyük ölçekli hibrit hücre hatlarının kullanımını üzerine çalışmalar yapılması ile birlikte 20. yüzyılın başlarına dayanmaktadır. Yaklaşık 100 yıl kadar önce, hayvan hücrelerinin *in vivo* sistemik varyasyonlardan bağımsız olarak davranışlarını incelemek için *in vitro* doku kültürü yöntemleri geliştirilmiştir.<sup>1-3</sup> Doku kültürü yöntemleri, o dönemde tek kaynak olan birincil eksplantları içeren uygulamalarla sınırlı kalmış, 1916'da dokuların enzimatik ayrışması Rous & Jones<sup>4</sup> tarafından gösterilmiş ve hücre çoğaltılması metodolojisi mümkün hale gelmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında bir diğer önemli adım ise ilk insan hücre hattının serviks adenokarsinomundan (HeLa) izole edilmesidir. Bu gelişme kanser ve poliomiyelitler gibi diğer hastalıklarda deneysel çalışmaların yapılmasına olanak sağlamıştır. Son yıllarda ise araştırmacılar hücre kültürü prosedürlerinin odağını değiştirmiştir. Viral davranış ve farma-

kolojik ajanlara yönelik hücre çalışmalarına ek olarak mevcut hedef *ex-vivo* hücre ekspansiyonu olmuştur. Bu yaklaşım da, klinik tedavilerde hücrelerin kullanılmasına olanak sağlamıştır.<sup>5</sup>

Hücre kültür çalışmaları alanında kök hücreler, çeşitli doku ve sistemlerde gösterdikleri transdiferansiyasyon, kendini yenileme ve parakrin etkileri nedeniyle ilgi odağı haline gelmiştir. Ancak, uygun kök hücreler, organları ve hasarlı dokuları onarmaya yetecek miktarda mevcut değildir. Dolayısıyla kök hücreleri terapötik kullanım için yeterli miktarda elde etmek amacıyla sınırlı sayıda hücreyi çoğaltmanın yöntemleri üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen ilerlemeler, rejeneratif tedavilerin geliştirilmesine katkıda bulunmuştur.<sup>6</sup> Fakat, yeni teknolojilerin karmaşıklığı klinik uygulamaları zorlaştırmaktadır. Çünkü bu teknolojiler yeterli tesisleri, kalifiye personeli, hücre kalitesini değerlendirme tekniklerini ve hücre üretimi için iyi tanımlanmış protokolleri gerektirir. İlgili alanlarda yeterliliğin sağlanmasına yönelik kurallar "İyi Üretim Uygulamaları" na (Good Manufacturing Practices, GMP) ilişkin ulusal ve uluslararası standartlara dayanmaktadır. GMP altyapısının kurulması ise büyük yatırımlar yapılmasını gerektirmektedir. Özellikle

<sup>1</sup> Prof. Dr., Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., gokcendinc@erciyes.edu.tr, ORCID iD: 0000-0002-9184-5003

lanmasıdır. Kriyoprotektif maddeler besiyerinin donma noktasını yükseltir ve ayrıca daha yavaş bir soğuma hızına izin vererek hücrelere zarar verebilecek ve hücre ölümüne neden olabilecek buz kristali oluşumu riskini büyük ölçüde azaltır. Hücreler yüksek konsantrasyonda (örneğin %90 konflüente) ve mümkün olan en erken pasaj sayısında dondurularak saklanmalıdır.<sup>24,31</sup>

Kısaca, kriyoprezervasyon, hücrelerin yıkanmasını ve peletlenmesini, bunların DMSO (örn. %5 DMSO) ile tam besiyeri içinde yeniden süspansiyonunu ve hücre süspansiyonunun 1 mL steril kriyoviyallere aktarılmasını içerir. Kriyoviyaller, hücrelerin kontrollü bir şekilde dondurulması gerektiğinden özel bir kriyo-dondurucu konteynıra yerleştirilir. Bu kriyo-dondurucu konteynır -50 ila -80 °C'de 24 saat süreyle saklanır ve ardından kriyoviyaller buradan alınarak sıvı nitrojen/azot tankına aktarılır.<sup>24,31,32</sup>

Sıvı nitrojen tankındaki hücre hatlarını yeniden canlandırmak için kriyoviyaller, taşınabilir bir sıvı nitrojen kabı veya kuru buz içerisinde hücre kültür işleminin yapılacağı alana taşınır. Kriyoviyallerdeki DMSO, çözüldükten sonra hücreler için toksiktir, bu nedenle yüksek hücre canlılığını sağlamak için hücrelerin 37 °C'lik bir su banyosunda hızla çözülmesi ve hemen aynı sıcaklık derecesine getirilmiş besiyeri içeren bir kültür kabına aktarılması gerekir. Besiyeri, DMSO'yu dilü eder ve böylece DMSO toksik konsantrasyonda olmaz. Çözülmüş hücreler çoğaldıktan ve iki kez pasajlandıktan sonra çalışmalarda kullanılabilirler.<sup>32,33</sup>

## KAYNAKLAR

- Phelan K, May KM. Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture. *Curr Protoc Toxicol*. 2016;70:A.3B.1-A.3B.22.
- Smit Sibinga CT, Seghatchian J. Cell culture - Fact and fiction. *Transfus Apher Sci*. 2020;59(4):102860.
- Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AFF, redberg J, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*. 2017;32(4):266-277.
- Rous P, Jones FS. A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells. *J Exp Med*. 1916;23(4):549-55
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*. 1953;97(5):695-710.
- Coutinho LH, Testa NG, Chang J, Morgenstern G, Harrison C, Dexter TM. The use of cultured bone marrow cells in autologous transplantation. *Prog Clin Biol Res*. 1990;333:415-32; discussion 433.
- Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kaschofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*. 2007;47(8):1436-46.
- Sensebé L, Bourin P. Producing MSC according GMP: process and controls. *Biomed Mater Eng*. 2008;18(4-5):173-177.
- Sensebé L, Gadelorge M, Fleury-Cappellesso S. Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):66.
- Hunt CJ. Cryopreservation of Human Stem Cells for Clinical Application: A Review. *Transfus Med Hemother*. 2011;38(2):107-123.
- Borowski M, Giovino-Doherty M, Ji L, Shi MJ, Smith KP, authors. Laning J, editor. Basic pluripotent stem cell culture protocols. 2012 Jun 10. In: *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008-. PMID: 23658979.
- Verma A. Animal Tissue Culture: Principles and Applications. *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. Elsevier Inc.; 2013:211-231.
- Clarke S, Dillon J. The Cell Culture Laboratory. *Animal Cell Culture: Essential Methods*. John Wiley and Sons; 2011:1-31.
- Merten OW. Advances in cell culture: Anchorage dependence. *Philos Trans R. Soc B Biol Sci*. 2015;370(1661):20140040.
- Yamamoto R, Wilkinson AC, Nakauchi H. In vivo and ex vivo haematopoietic stem cell expansion. *Curr Opin Hematol*. 2020 Jul;27(4):273-278.
- Audet J, Zandstra PW, Eaves CJ, Piret JM. Advances in hematopoietic stem cell culture. *Curr Opin Biotechnol*. 1998 Apr;9(2):146-51.
- Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. 2018 Jan;93(1):19-31.
- Wesselschmidt RL, Schwartz PH. The stem cell laboratory: design, equipment, and oversight. *Methods Mol Biol*. 2011;767:3-13. doi: 10.1007/978-1-61779-201-4\_1.
- Inamdar MS, Healy L, Sinha A, Stacey G. Global solutions to the challenges of setting up and managing a stem cell laboratory. *Stem Cell Rev Rep*. 2012 Sep;8(3):830-43.
- Lyons I, Tan D, Schwartz PH, Rao M (2007). Setting up a facility for human embryonic stem cell research. *Human Stem Cell Manual: A Laboratory Guide*. First edition. Edited by Loring JF, Wesselschmidt RL, and Schwartz PH. New York, Elsevier, pp. 389-413.

21. Sandell L, Sakai D. Mammalian Cell Culture. *Curr Protoc Essent Lab Tech.* 2011;5(1):4.3.1-4.3.32.
22. Yao T, Asayama Y (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology* 16(2): 99–117.
23. Piletz JE, Drivon J, Eisenga J, Buck W, Yen S, McLin M, Meruvia W, Amaral C, Brue K (2018). Human cells grown with or without substitutes for fetal bovine serum. *Cell Medicine* 10: 1–11.
24. Warner DR, Sakai D, Sandell LL. Mammalian Cell Culture. *Curr Protoc Essent Lab Tech.* 2015;10(1):4.3.1-4.3.33.
25. Hassan SN, Ahmad F (2020). The relevance of antibiotic supplements in mammalian cell cultures: Towards a paradigm shift. *Gulhane Medical Journal* 62(4): 224–230.
26. Coté RJ. Aseptic Technique for Cell Culture. *Curr Protoc Cell Biol.* 1998;00(1):1.3.1-1.3.10.
27. Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 2002;39:75–90.
28. Nims RW, Price PJ. Best practices for detecting and mitigating the risk of cell culture contaminants. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2017 Dec;53(10):872-879.
29. Merten O. Virus contaminations of cell cultures – A biotechnological view. *Cytotechnology* 2002;39:91–116.
30. Patil R, Kale A, Mane D, Patil D. Isolation, culture and characterization of primary cell lines of human buccal mucosal fibroblasts: A combination of explant enzymatic technique. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2020;24(1):68-75.
31. Freshney RI. Primary culture Willey-Liss Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques. 2005, 5th ed Hoboken NJ Wiley-Liss:176–197.
32. Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant.* 2021;30:963689721999617.
33. Hunt C.J. Technical Considerations in the Freezing, Low-Temperature Storage and Thawing of Stem Cells for Cellular Therapies. *Transfus. Med. Hemother.* 2019;46:134–149.