

**ÇEŞİTLİ DONDURMA YÖNTEMLERİNİN HEP-2 VE TAVŞAN BÖBREK HÜCRELERİNİN
KRİYOPREZERVASYONUNDA HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ**Nizami DURAN¹Fügen YARKIN¹Adil M. ALLAHVERDİYEV¹**ÖZET**

Bu çalışmada bovin serum albumininin, primer tavşan böbrek hücre kültürü ile HEP-2 devamlı hücre kültürlerinin kriyoprezervasyonunda hücre canlılığı üzerindeki rolü araştırıldı. Öncelikle hücrelerin yavaş, orta hızlı ve hızlı dondurma metodlarıyla kriyoprezervasyonu yapıldı. Kriyoprotektan madde olarak dimetil sülfoksit, gliserol ve Rowe karışımı kullanıldı. Hücreler %5 ve %10'luk kriyoprotektan madde ve 0, 5, 10, 20 ve 30g/mL bovin serum albumin içeren dondurma solüsyonları ile donduruldu. Deneylerde en yüksek hücre canlılığı yavaş dondurma metodunda elde edilirken, bu metotta dondurma solüsyonuna katılan bovin serum albuminin konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak hem primer tavşan böbrek hem de HEP-2 devamlı hücrelerinin canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdiği tespit edildi ($p < 0.001$). En yüksek hücre canlılığı %10 dimetil sülfoksit ve 30g/mL albumin içeren dondurma solüsyonunda elde edildi. Hücre canlılığı tavşan böbrek hücreleri için 93 ± 1.1 , HEP-2 hücreleri için de 96 ± 1.7 olarak bulundu. Her iki kültür arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak bir fark görülmedi ($p > 0.05$).

Anahtar kelimeler: Kriyoprezervasyon, hücre kültürü, bovin serum albumin, kriyoprotektan ajanlar

**THE EFFECT OF THE VARIOUS FREEZING METHODS ON THE CELL VIABILITY
OF CRYOPRESERVED HEP-2 AND RABBIT KIDNEY CELLS****SUMMARY**

In this study, the role of bovine serum albumin on the viability of cryo-preserved primary rabbit kidney cell- and HEP-2 continuous cell cultures was studied. Firstly, the cryopreservations of cells were done via slow, intermediate and rapid freezing methods. Dimethyl sulfoxide, glycerol and Rowe mix were used as cryoprotectant agents. The cells were frozen with the solutions containing 5% and 10% cryoprotectant agents and 0, 5, 10, 20, 30g/mL bovine serum albumin, separately. While the highest cell viability was obtained with slow freezing method, in this method, it has been determined that the concentration of bovine serum albumin in the freezing solution proportionally increased the cell viability both on primary rabbit kidney cells and HEP-2 continuous cells ($p < 0.001$). The highest cell viability was obtained with freezing solution containing 10% dimethyl sulfoxide and 30g/mL bovine serum albumin. Viability was found $93 \pm 1.1\%$ for primary rabbit kidney cells and $96 \pm 1.7\%$ for HEP-2 cells. There was no difference between both cell cultures according to the cell viability statistically ($p > 0.05$).

Key words: Cryopreservation, cell culture, bovine serum albumin, cryoprotectant agents

GİRİŞ

Kriyobiyolojide hücrelerin dondurma ve soğutma prosedürleri organizmadan organizmaya hatta hücreden hücreye değişmekte, kriyoprotek-
tan maddelerin değişik hücre dizileri için kriyoprezervatif özellikleri de farklılıklar göstermektedir (1, 2). Çeşitli ökaryotik hücrelerin in-vitro

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balcalı, ADANA

Geliş tarihi : 24.08.2000 Kabul edilmiş tarihi : 22.10.2001

Yazışma adresi: Nizami DURAN, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Balcalı, ADANA

şartlarda devam ettirilmesi için sürekli olarak pasajlarının yapılması hücrelerin biyolojik özelliklerinin fenotipik ve genotipik açıdan devamlı değişmesine ve deneysel çalışmalarda istenmeyen farklılıklara da neden olmaktadır (2).

Hücrelerin başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonunun yapılması; hazırlanması oldukça zor olan primer hücre kültürleri ve devamlı hücre dizilerinin kontaminasyonuna veya bozulmasına fırsat vermeden saklanabilmesi, kontaminasyona diğer hücre dizilerinden çok daha duyarlı olan HEP-2 (insan larinks epitelyal karsinoma), HeLa (insan servikal epitelyal karsinoma) ve WI-38 (insan akciğer fibroblast kültürü) gibi hücre dizilerinin devamlılığının sağlanması, bakteri ve mantar kontaminasyonlarının yanısıra farklı hücreler arasında olması muhtemel çapraz kontaminasyonun önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (3, 4). Kriyobiyolojide kriyoprotektanların keşfiyle hücre ve dokuların dondurularak saklanması önemli gelişme kaydedilmiş olsa da günümüzde rutin olarak kullanılan semen, embriyo, insan ve hayvan kaynaklı hücre ve dokular için problemler tam olarak giderilememiştir. Özellikle kriyoprezervasyon sonrası hücre canlılığında ve hücrelerin in vitro şartlara adaptasyonunda halen bazı sorunlar vardır (4).

Kriyoprotektan maddeler hücre içine hızlı bir şekilde diffüze olup su dengesini sağlayarak hücreleri osmotik şoktan korumaktadırlar. Ayrıca bu ajanların, dondurma ve çözme sırasında suyu bağlayarak hücre içinde elektrolit miktarını ve aynı zamanda mevcut suyun buz kristallerine dönüşmesini azalttığı da bilinmektedir (5, 6). Son yıllarda hücrelerin kriyoprezervasyonunu optimize etmek amacıyla sukroz, trehaloz ve bovin serum albumini (BSA) gibi, hücre hasarını ve hücre kaybını azaltan çeşitli şekerler ve proteinler, dondurma solüsyonlarına, membran stabilizatörü olarak katılmaktadır. Yapılan bazı araştırmalarda özellikle BSA'nın çeşitli hücre dizilerinin kriyoprezervasyonundaki rolü araştırılmış ve hücre türüne bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir (7,8,9).

Bu çalışmada; primer tavşan böbrek hücre kültürü ile HEP-2 devamlı hücre kültürünün kriyoprezervasyonunda bir membran stabilizatörü

olan BSA'nın, dimetil sülfoksit, gliserol ve Rowe karışımı gibi farklı kriyoprotektanların varlığında hücre canlılığı üzerindeki rolü araştırılmıştır. Ayrıca model olarak seçilen bu kültür hücrelerinin kriyoprezervasyonunda soğuma hızının hücre canlılığı üzerindeki etkisi de incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan HEP-2 devamlı hücre kültürü Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Viroloji Bölümü'nden temin edildi. Primer tavşan böbrek hücre kültürünün yapılması için ise Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden sağlanan iki haftalık albino tavşanlar kullanıldı. Primer hücre kültürünün yapılması için enzimatik ve mekanik metod uygulandı (5). Dokudan izole edilen hücreler, içerisinde %20 oranında BSA bulunan EMEM besiyerinde, 100.000 hücre/mL olacak şekilde ayarlanarak 37°C'de inkübasyona kaldırıldı. Hücreler şişe yüzeyini tamamen kaplayıncaya kadar her gün invert mikroskopta kontrol edildi; hücre kültürlerinin pasajı için %0.25 versen-tripsin (Sigma, ABD) solüsyonu kullanıldı. Hücre canlılığının tespiti amacıyla tripan mavisini boyama yöntemi uygulandı (10). Deneylerde kriyoprotektan madde olarak gliserol (Sigma, ABD), dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD) ve Rowe karışımı (içeriği %4.2 w/v sorbitol, %35 v/v gliserol) kullanıldı.

Çalışmada üç farklı dondurma metodu uygulandı. Hücrelerin kriyoprezervasyonu %10 BSA bulunan EMEM besiyeri içinde DMSO, Rowe karışımı, ve gliserolün %5 ve %10'luk konsantrasyonları kullanılarak yapıldı. Her deney 5-9 kez tekrarlanarak gerçekleştirildi.

Yavaş Dondurma Metodu: Hücreler, %10 BSA içeren EMEM besiyeri ile süspanse edilerek 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde kriyotüplere dağıtıldı. Bu karışıma kriyoprotektan madde olarak %5-10 oranında DMSO, Rowe karışımı ve gliserol eklendi. Bu metotta hücreler, +4°C'de 30 dakika, -20°C'de 30 dakika ve -70°C'de bir gece tutulduktan sonra sıvı azota konuldu.

Orta Hızda Dondurma Metodu: Hücreler +4°C'de 30 dakika tutulduktan sonra, kristalizas-

yonun başlaması için -20°C 'de 30 dakika bekletilip sıvı azota konuldu (soğuma oranı -20°C 'ye kadar yaklaşık olarak $8^{\circ}\text{C}/\text{dk}$).

Hızlı Dondurma Metodu: Hücreler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika tutulduktan sonra doğrudan sıvı azota konuldu.

Bovine serum albuminin hücre canlılığı üzerindeki etkisi yavaş dondurma metodunda %10 kriyoprotektan varlığında araştırıldı. Bu metotta hücreler 0, 5, 10, 20 ve 30 g/mL BSA içeren dondurma solüsyonları ile donduruldu.

Kriyoprezervasyon sonrası hücreler sıvı azottan alınarak 37°C 'lik su banyosunda 30-60 saniye içinde hızlı bir şekilde çözüldü. Sonra kriyotüpteki numune bir santrifüj tüpüne alınarak, üzerine 5 ml EMEM besiyeri konup 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atıldıktan sonra dibeye çökmüş olan hücrelerin canlılıkları %1'lik tripan mavisi ile tespit edildi. Canlılıkları tespit edilen hücreler %20 BSA içeren EMEM besiyerinde 100.000 hücre/mL olacak şekilde kültür şişelerine inoküle edilerek 37°C 'de %5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

BULGULAR

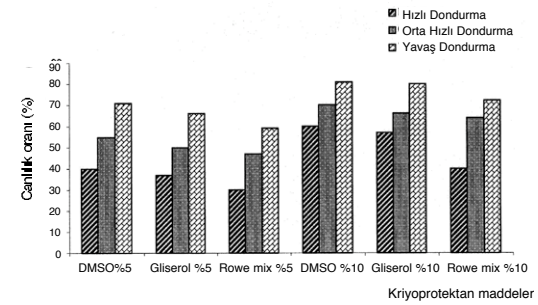
Primer tavşan böbrek hücreleri ile HEp-2 devamlı hücrelerinin kriyo-prezervasyonunda uygulanan üç farklı dondurma ve soğutma metodunda en yüksek hücre canlılığı yavaş dondurma metoduyla elde edildi. Kriyoprotektan maddeler dondurma solüsyonunda %5 ve %10'luk konsantrasyonlarda kullanıldı. Her iki hücre tipi için de hücre canlılığı açısından kriyoprotektanların %10'luk konsantrasyonlarının %5'lik konsantrasyonlardan daha başarılı olduğu bulundu (Tablo 1 ve 2). Yavaş dondurma metodunda dondurma solüsyonunda %10 oranında kriyoprotektan bulunan hücrelerin kriyoprezervasyondan sonra canlılığı HEp-2 hücreleri için: DMSO ile 84 ± 3.5 , gliserol ile 78 ± 0.9 , Rowe karışımıyla 75 ± 2.5 , tavşan böbrek hücreleri için: DMSO ile 81 ± 2.1 , gliserolle 80 ± 1.9 , Rowe karışımıyla ise 72 ± 0.9 olarak tespit edildi (Şekil 1, 2).

Şekil 1'de primer tavşan böbrek hücrelerinin üç farklı dondurma metoduyla elde edilen hücre canlılıkları görülmektedir. Burada %10'luk kriopro-

tektan madde katılarak yapılan kriyoprezervasyonda %5'lik konsantrasyonlara nazaran daha yüksek hücre canlılığı elde edilmiştir ($p<0.001$). Ayrıca kriyoprotektanların %5'lik konsantrasyonlarının kullanıldığı yavaş, orta hızlı ve hızlı dondurma metodlarıyla kriyoprezervasyondan sonra, hücre canlılıkları açısından dondurma metodları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark meydana geldiği ($p<0.001$), ancak %10'luk kriyoprotektan varlığında sadece hızlı ve orta hızlı dondurma metodları arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.001$), orta hızlı ve yavaş dondurma metodları arasında ise hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark meydana gelmediği gözlemlendi ($p>0.05$).

Tablo 1: Primer tavşan böbrek hücrelerinin farklı kriyoprotektanlar ve metodlarla kriyoprezervasyonu

Kriyoprotektan	Hızlı dondurma metodu	Orta hızlı dondurma metodu		Yavaş dondurma metodu			
		Deney Konstr.	Canlılık (%)	Deney Konstr.	Canlılık (%)	Deney Konstr.	Canlılık (%)
		DMSO %5	5	40	6	55	7
Gliserol %5	6	37	5	50	6	66	
Rowe mix %5	5	30	7	47	7	59	
DMSO %10	6	60	8	70	6	81	
Gliserol %10	7	57	5	66	8	80	
Rowe mix %10	6	40	7	74	6	72	



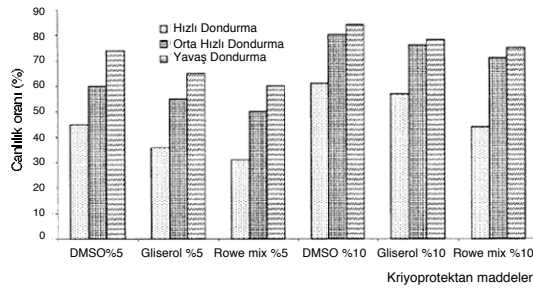
Şekil 1: Primer tavşan böbrek hücrelerinin değişik kriyoprotektanlar ve farklı metodlarla kriyoprezervasyonu

Şekil 2'de ise HEp-2 hücrelerinin DMSO, gliserol ve Rowe karışımının %5 ve %10'luk konsantrasyonlarının kullanıldığı üç farklı dondurma

metoduyla yapılan kriyoprezervasyonuna ilişkin hücre canlılıkları görülmektedir. HEp-2 hücrelerinde olduğu gibi primer tavşan böbrek hücrelerinde de en yüksek hücre canlılığı yavaş dondurma metoduyla elde edilmiştir. Dondurma solüsyonlarında %5 kriyoprotektan ihtiva eden hücrelerin kriyoprezervasyon sonrası hücre canlılıklarının DMSO ile %74, gliserol ile %65 ve Rowe karışımıyla %60 iken kriyoprotektan madde konsantrasyonu %5'den %10'a çıkarıldığında hücre canlılıklarının DMSO ile %74'den %84, Gliserol ile %65'den %78'e ve Rowe karışımıyla da %60'dan %75'e çıktığı tespit edilmiştir. Burada kriyoprotektan miktarının %5'den %10'a çıkarılmasının hücre canlılığında anlamlı bir artış meydana getirdiği görülmektedir ($p>0.001$).

Tablo 2: HEp-2 hücrelerinin değişik kriyoprotektanlar ve farklı metodlarla kriyoprezervasyonu

Kriyoprotektan	Hızlı dondurma metodu		Orta hızlı dondurma metodu		Yavaş dondurma metodu		
	Deney Canlılık		Deney Canlılık		Deney Canlılık		
	Konstr.	sayısı (%)	sayısı (%)	sayısı (%)	sayısı (%)	sayısı (%)	
DMSO	%5	6	45	5	60	6	74
Gliserol	%5	8	36	5	55	5	65
Rowe mix	%5	5	31	7	50	5	60
DMSO	%10	7	61	7	80	6	84
Gliserol	%10	6	57	5	76	7	78
Rowe mix	%10	5	44	5	71	6	75



Şekil 2: HEp-2 hücrelerinin değişik kriyoprotektanlar ve farklı metodlarla kriyoprezervasyonu

Ayrıca üç kriyoprotektanın %5'lik konsantrasyonunun kullanıldığı hızlı, orta hızlı ve yavaş dondurma metodlarıyla elde edilen hücre canlılığı arasında soğutma hızına bağlı olarak anlamlı fark görülürken ($p<0.001$), kriyoprotektan oranı %10'a çıkarıldığında hızlı dondurma metoduyla orta hızlı dondurma metodlarında elde edilen hücre canlılığı arasında anlamlı bir fark bulunduğu ancak orta hızlı dondurma metodu ile yavaş dondurma metodu arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Tablo 3: Primer tavşan böbrek hücrelerinin kriyoprezervasyonunda BSA'nın hücre canlılığı üzerindeki etkisi

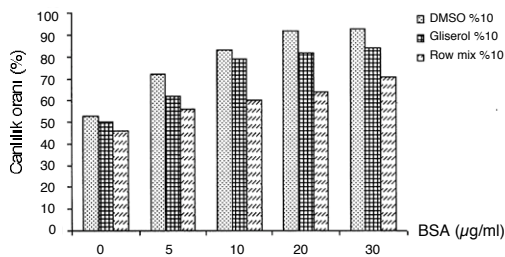
Kriyoprotektan	Bovın serum albumin									
	0 g/mL		5 g/mL		10 g/mL		20 g/mL		30 g/mL	
	deney sayısı	canlılık (%)	deney sayısı	canlılık (%)	deney sayısı	canlılık (%)	deney sayısı	canlılık (%)	deney sayısı	canlılık (%)
%10 DMSO	7	53	6	72	5	89	7	92	7	93
%10 Gliserol	5	50	6	62	6	79	6	82	5	84
%10 Rowe mix	8	46	5	56	5	60	8	64	6	71

Tablo 4: HEp-2 hücrelerinin kriyoprezervasyonunda BSA'nın hücre canlılığı üzerindeki etkisi

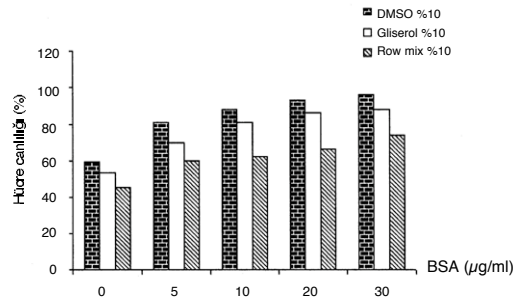
Kriyoprotektan	Bovın serum albumin									
	0 g/mL		5 g/mL		10 g/mL		20 g/mL		30 g/mL	
	deney sayısı	canlılık (%)	deney sayısı	canlılık (%)	deney sayısı	canlılık (%)	deney sayısı	canlılık (%)	deney sayısı	canlılık (%)
%10 DMSO	5	59	6	81	5	88	6	93	5	96
%10 Gliserol	5	53	6	70	6	81	7	86	6	88
%10 Rowe mix	6	45	5	60	5	62	7	66	7	74

Primer tavşan böbrek hücrelerinin kriyoprezervasyonunun %5 ve %10'luk konsantrasyonlarda kriyoprotektan madde ve 0, 5, 10, 20 ve 30 g/mL BSA içeren dondurma solüsyonları ile yapılan deneylerde, BSA'nın hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdiği tespit edilmiştir. Tablo 3 ve 4'te görüldüğü gibi dondurma solüsyonlarında BSA bulunmayan hücrelerin kriyoprezervasyon sonrası hücre canlılığı tavşan böbrek hücreleri için: DMSO ile %53±4.0, gliserol ile %50±0.5 ve Rowe karışımıyla %46±2.0, HEp-2 hücreleri için: DMSO ile %59±2.8, gliserol ile %53±1.5, Rowe karışımıyla %45±1.5 olarak bulundu. Dondurma

solüsyonundaki BSA oranı 30 g/mL düzeyine çıkarıldığında ise hücre canlılığı primer tavşan böbrek hücreleri için: DMSO ile 93 ± 3.5 , gliserol ile 84 ± 3.6 ve Rowe karışımıyla da 71 ± 4.3 olarak tespit edildi (Şekil 3). Benzer şekilde HEP-2 hücrelerinin kriyoprezervasyonunda da hücre canlılığı üzerinde BSA'nın olumlu etkileri görülmektedir (Şekil 4).



Şekil 3: Primer tavşan böbrek hücrelerinin kriyoprezervasyonunda BSA'nın hücre canlılığı üzerindeki etkisi



Şekil 4: Hep-2 hücrelerinin kriyoprezervasyonunda BSA'nın hücre canlılığı üzerindeki etkisi

Kriyoprezervasyon sonrası tavşan böbrek hücrelerinin canlılığında BSA konsantrasyonuna bağlı olarak bir artış meydana geldiği, hücre canlılığındaki bu artışın BSA'nın dondurma solüsyonundaki konsantrasyonunun 20 g/mL düzeyine kadar istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.001$), bu konsantrasyondan sonra ise anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Primer

tavşan böbrek hücrelerinde olduğu gibi HEP-2 hücrelerinin kriyoprezervasyonunda da dondurma solüsyonuna katılan BSA'nın 5, 10, 20 g/mL düzeyine kadar hücre canlılığında anlamlı bir artış meydana getirdiği görülürken ($p<0.001$), 20 g/mL'nin üzerinde BSA miktarının hücre canlılığında anlamlı bir artış meydana getirmedeği tespit edilmiştir ($p>0.05$).

TARTIŞMA

Kriyobiyojoloji biliminde en büyük gelişme 1900'lü yılların ortalarında kriyoprotektan maddelerin keşfiyle kaydedilmiştir. Kriyoprotektan maddeler, hücreleri ve membranlarını dondurma prosesleri sırasında meydana gelebilecek hasarlardan korumaktadırlar. Bu maddeler hücrelerin ölümüne sebep olan veya hücrelerde hasar meydana getiren hücre içi buz kristallerinin oluşmasını hücre içerisindeki suyu alarak (hücrelerin su kaybetmesini sağlayarak) önlemektedirler (1, 11).

Kriyoprezervasyon sırasında çevresel soğumayla oluşan hücresel hasarların çoğuna donma sırasında dehidrasyon, çözme sırasında da rehidrasyon sebep olmaktadır. Hem dehidrasyon hem de rehidrasyon makromolekül ve membranlar üzerinde mekanik stres oluşturmakta ve bunun neticesinde de hücresel donma ve çözme hasarlarıyla ilişkili çeşitli sorunlar ortaya çıkmaktadır (5,12). Günümüzde hücre ve dokuların kriyoprezervasyonunun yapılması için çeşitli dondurma metodları ve farklı kriyoprotektan maddeler kullanılmaktadır. Bu kriyoprotektanlar içinde DMSO, Rowe karışımı ve gliserol en sık kullanılanlar arasındadır. DMSO ve gliserol intraselüller kriyoprotektan maddeler sınıfında yer almaktadır. Gliserol hücreler için DMSO'dan daha az toksik olmasına rağmen çalışmalarda daha çok DMSO tercih edilmektedir. Çünkü DMSO, gliserole göre hücre içine daha hızlı diffüze olabildiğinden daha yüksek kriyoprezervatif özelliğe sahiptir (6,12,13). Rowe karışımı ise bir ekstraselüller kriyoprotektan madde olan sorbitol ile bir intraselüller kriyoprotektan madde olan gliserolün karışımından hazırlanan ve özellikle eritrositlerin kriyoprezervasyonunda başarılı bir şekilde kullanılan kriyoprotektan maddedir (14).

Bugün modern viroloji laboratuvarlarında kullanılan etkili ve önemli kriyoprezervasyon yöntemleri hücrelerin sıvı azotta (-196°C'de) dondurulup saklanması esasına dayanır. Hücrelerin dondurulmaları ve çözülmesi sırasında hücre içerisinde oluşan buz kristallerinin ve osmotik dengenin hücreler üzerinde öldürücü etkisinin olduğu bilinmektedir. Hücreler üzerindeki bu öldürücü etkiyi ortadan kaldırabilmek veya azaltabilmek amacıyla DMSO, gliserol, etilen glikol ve sorbitol gibi kriyoprotektan maddelerin kullanılmasının yanısıra uygun bir dondurma ve çözme metodunun da izlenmesi gerekmektedir (3, 6).

Hücrelerin kriyoprezervasyonunun yavaş veya hızlı dondurma metodlarıyla yapılması hücreler için öldürücü olabilmektedir. Çünkü ekstra ve intraselüller solüsyonda önemli değişiklikler dondurma sırasında suyun uzaklaşmasına sebep olduğundan, bu sırada meydana gelen ısı transferleri hücrelerin canlılığını önemli ölçüde etkilemektedir. Kriyoprezervasyon sonrası hücrelerin çözülmesinde ise mümkün olduğunca hızlı bir çözme hücre canlılığı açısından son derece önemlidir. Hızlı çözme sırasında hücre ölümlerinin ve hasarlarının meydana geldiği kritik rekristalizasyon fazı çabuk bir şekilde geçildiğinden bu safhada oluşabilecek hücre kaybı veya hasarları minimuma indirilebilmektedir (8, 11, 15).

Bu çalışmada hücre kültürü modeli olarak seçilen primer tavşan böbrek hücreleri ile HEP-2 devamlı hücrelerinin kriyoprezervasyonu üç farklı kriyoprotektanın iki farklı konsantrasyonu, üç farklı soğutma metodu kullanarak yapılmıştır. Kriyoprezervasyon sonrası hücrelerin çözülmesinde ise hızlı çözme metodu kullanılmıştır. Bunun yanında, özellikle son yıllarda bazı hücre dizilerinin kriyoprezervasyonunda hücre canlılığını arttırmak ve hücrelerin in vitro şartlara adaptasyonunu hızlandırmak için kullanılan membran stabilizatörlerinden BSA'nın etkisi bu iki hücre dizisi üzerinde incelenmiştir.

Deneylerde her iki hücre dizisi için de en düşük hücre canlılığı, üç kriyoprotektan maddenin farklı iki konsantrasyonlarıyla da hızlı dondurma metodunda elde edilmiştir. Burada hücreler hızlı bir şekilde dondurulduğu için hücrelerin hücre içi

sıvısının donarak geniş çapta buz kristallerinin oluştuğu ve bu geçiş fazının fiziksel olarak hücre membranlarının patlamasına ve ölümlere yol açtığı düşünülmektedir. Bu öldürücü etkinin düşük kriyoprotektan varlığında daha yüksek oranda ortaya çıktığı görülmektedir. Benzer etki orta hızlı dondurma metodunda da görülmekle birlikte, hücrelerin -20°C'de 30 dakika tutulmasının bu metotta intraselüler kristalizasyonun oluşmasını azalttığı, yavaş dondurma metodunda ise -20°C'den sonra -70°C'de tutulmanın bu kristalizasyonu minimuma indirdiği düşünülmektedir.

Günümüzde kriyobiyolojide kullanılan kriyoprotektan maddelerin pek çok çeşidi bulunmasına rağmen hücre ve dokuların kriyoprezervasyonunda özellikle dondurma ve çözme sırasında oluşan problemler tam olarak giderilememiştir. Bu sebeple kriyoprotektanların yanında dondurma solüsyonlarına hücre ölümlerini ve hasarları ortadan kaldırabilmek veya minimuma indirebilmek amacıyla sükroz, trehaloz, BSA gibi çeşitli membran stabilizatörleri de katılmaktadır. Bugüne kadar yapılan çeşitli çalışmalarda bu maddelerin bazı hücre dizilerinin kriyoprezervasyonunda olumlu etkilerinin olduğu görülürken bazılarının da hücre canlılığında önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (8, 9, 16).

Bu çalışmada, primer tavşan böbrek hücre kültürü ile HEP-2 devamlı hücre kültürünün kriyoprezervasyonunda BSA'nın hücre canlılığı üzerindeki rolü araştırılmıştır. Deneylerde her iki hücre dizisi için de en yüksek hücre canlılığı dondurma solüsyonuna 30 g/mL BSA katılarak elde edilmiştir. Ancak hem primer tavşan böbrek hem de HEP-2 devamlı hücreleri için optimal BSA konsantrasyonunun 20 g/mL olduğu, dondurma solüsyonuna daha yüksek oranda BSA katmanın hücre canlılığını anlamlı derecede etkilemediği tespit edilmiştir.

Hücre kriyoprezervasyonunda BSA ile yapılmış olan çalışmalar arasında bu çalışmayla uyumlu olarak Shaw ve ark. (9) fare embriyolarının kriyoprezervasyonunu DMSO ve albumin karışımıyla yapmışlar, albumin eksikliğinde dondurma ve çözme sırasında hücre canlılığında önemli kayıpların veya

hasarların meydana geldiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Ollero ve ark. (8) ise 1996 yılında koç sperm hücrelerinin kriyoprezervasyonunu değişik kri-yoprotektanlar kullanarak yapmışlar ve en yüksek hücre canlılığını seroalbumin ve laktalbumin kullanılmasıyla elde etmişlerdir. Dondurma solüsyonundaki seroalbumin ve laktalbuminin hücre canlılığını artırdığını tespit etmişlerdir. Kearney ve ark. (16) 1991 yılında insan deri keratinosit ve fibroblast hücrelerinin kriyoprezervasyonunu serum varlığında değişik kriyoprotektan maddeler ile farklı dondurma ve soğutma rejimlerinde yapmışlar ve en iyi neticeyi dondurma metoduna bağlı olarak yüksek serum konsantrasyonu ile elde etmişlerdir. Borderre ve ark. (7) ise 1998 yılında yaptıkları çalışmada insan kornea keratosit hücrelerinin kriyo-prezervasyonunda farklı iki metotta albuminin iki farklı konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisini araştırmışlar ve bu çalışmadaki bulgulardan farklı olarak %2'den %10'a kadar değişen albumin konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerinde etkili olmadığını tespit etmişlerdir.

Kriyoprotektanların dondurma prosesleri sırasında membran fosfolipitleri ile etkileştikleri bilinmektedir (15). Bu çalışmada BSA'nın hem

primer tavşan böbrek hem de HEp-2 hücrelerinin hücre canlılıkları üzerinde meydana getirdiği bu olumlu etkinin albuminin hücre membranına penetre olması sonucunda kriyoprotektan maddelerin membran fosfolipitleriyle etkileşimini artırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir: (i) Kriyoprotektan maddelerin dondurma solüsyonundaki konsantrasyonunun %10'a çıkarılması durumunda, her iki hücre dizisi için yavaş dondurma metodu kadar orta hızlı dondurma metodunun da başarılı olduğu, bu durumda iki metod arasında hücre canlılığı bakımından anlamlı bir fark olmadığı, (ii) Hem primer hem de devamlı hücre kültürünün kriyoprezervasyonunda BSA'nın kriyoprezervasyon sonrası hücre canlılığında anlamlı bir artış meydana getirdiği, (iii) Her iki hücre kültürü için de dondurma solüsyonunda BSA için en uygun konsantrasyonun 20 g/mL olduğu, (iv) Dondurma solüsyonunda BSA bulunan hücrelerin kriyoprezervasyon sonrası çözüldüklerinde, kültür kabına adezyonunun ve in vitro şartlara adaptasyonunun, dondurma solüsyonunda BSA bulunmayan hücrelere nazaran daha hızlı olduğu gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology* 1991; 28: 467-73.
2. Isenberg HD. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM, USA, 1992; 8:19.1-8. 20. 12.
3. Doyle A, Griffiths JB, Newell DG. *Cell and tissue culture. Laboratory procedures*. England: John Wiley and Sons Ltd, 1995; 3A: 1.1 - 3C: 1.1.
4. Mazur P. Freezing of living cells. Mechanism and implication. *Am J Physiol* 1984; 247: 125-42.
5. Auwera Van Der I, Cornillie F. Cryopreservation of pronucleate mouse ova: slow versus ultrarapid freezing. *Hum Reprod* 1990; 5 (5): 619-21.
6. McGann LE. Optimal temperature ranges for control of coding rate. *Cryobiology* 1991; 28: 467-73.
7. Borderie VM, Lopez M, Lombet A, Carvajal GS, Cywiner C. Cryopreservation and culture of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39 (8): 1511-9.
8. Ollero M, Blanco TM, Lopez Perez MJ, Cebrian Perez JA. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 680 (1-2): 154-64.
9. Shaw JM, Trounsen A. Effect of dimethyl sulfoxide and protein concentration on the viability of two-cell mouse embryos frozen with a rapid freezing technique. *Cryobiology* 1989; 26 (5): 413-21

10. Gürtürk S. Viroloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1977; 64-73.
11. Wolfe J, Yan Z, Pope J. Hydration forces and membrane stresses. cryobiological implication and a new technique for measurement. Biophys Chem 1994; 49: 51-8.
12. Anchordoguy TJ, Cechini CA, Crowee JH, Crowee LM. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayer. Cryobiology 1991; 28: 467-73.
13. 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.
14. Rowe AW, Cyster E, Kellner A: A liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion. A low glycerol rapid freeze prosedure. Cryobiology 1968; 5: 119-28.
15. Anchordoguy TJ, Rudolp AS, Carpenter JF, Crowee JH. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids durings freezing. Cryobiology 1987; 24: 324-31.
16. Kearney JN. Cryopreservation of cultured skin cells. Burns 1991; 17 (5): 380-3.