



ARAŞTIRMA MAKALESİ
RESEARCH ARTICLE
CBU-SBED, 2021, 8(3): 524-533

Böbrek Hücrelerinin Elde Edilmesinde Üç Farklı Primer Kültür Yönteminin Karşılaştırılması

Comparison of Three Different Primary Culture Methods for Obtaining Kidney Cells

Melek Pehlivan¹, H.Seda Vatansever^{2,3}, Burcu Çerçi⁴, Damla Akoğulları², Yusuf Özlem İlbay⁵, İbrahim Pirim^{4*}

¹İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İzmir, Türkiye.

²Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji AD, Manisa, Türkiye.

³Yakın Doğu Üniversitesi, DESAM Araştırma Enstitüsü, Lefkoşa, KKTC.

⁴İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, İzmir, Türkiye.

⁵Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İzmir Tepecik EAH, Üroloji Kliniği, İzmir, Türkiye.

e-mail: pehlivanmlk@gmail.com, hsedavatansever@gmail.com, burcucerci35@gmail.com, daakogullari@gmail.com, ozlemyusufilbey@hotmail.com, İbrahim.pirim@gmail.com

ORCID: 0000-0001-8755-4812

ORCID: 0000-0002-7415-9618

ORCID:0000-0002-7477-1073

ORCID:0000-0001-9778-8532

ORCID:0000-0002-1483-9160

ORCID:0000-0001-8485-3286

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: İbrahim Pirim

Gönderim Tarihi / Received: 02.03.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 17.05.2021

DOI: 10.34087/cbusbed.886995

Öz

Giriş ve Amaç: Böbrek hücrelerinin elde edilmesinde kullanılan primer kültür yöntemi, böbrek hastalıklarının hücre düzeyinde değerlendirilmesi ve hücre fonksiyonlarının incelenmesi için olanak sağlamaktadır. Bu çalışmanın amacı böbrek primer kültürü için kullanılabilecek üç farklı izolasyon yönteminin hücre sağkalımı ve protokol etkinliği açısından birbirleriyle karşılaştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntemler: Nefrektomi ile çıkarılan böbrek dokusu steril şartlarda mekanik, tripsin ve kollajenaz yöntemi ile ayrımlanarak podosit vasatı içerisinde kültüre edildi. Kültüre edilen hücrelerin podosin, vimentin, E-kaderin, TGF- β 1, CD133, ZO-1 ve Nefrin dağılımlarının analizi immünohistokimyasal yöntem ile yapıldı.

Bulgular: Kollajenaz enzimatik yöntemi sonrasında hücrelerin kültürün 7. gününden itibaren, mekanik yöntemde ise 13. günden itibaren epiteloit karakter aldıkları gözlenirken, tripsin enzimatik yönteminde 13. günde kültürde artan fuziform yapıdaki hücreler gözlemlendi. Her üç yöntem ile böbrek dokusundan elde edilen podosit hücrelerin immünohistokimyasal analizi sonrasında, elde edilen hücrelerde vimentin, E-kaderin, TGF- β 1, CD133, ZO-1 immünoaktiviteleri farklılık gösterir iken, podosin ve nefrin immünoaktivitelerinin kollajenaz enzimatik yöntemi ile elde edilen hücrelerde kuvvetli olduğu saptandı.

Sonuç: Bu çalışmada, farklı proteinlerin immünohistokimyasal boyamaları ile kontrol edilen böbrek hücreleri için üç farklı primer kültür teknikleri karşılaştırıldığında, kollajenaz ile muamele edilen böbrek dokusundan daha yüksek verimle hücre saflaştırılabildiği gözlemlendi. Podosit hücrelerinin kültüre edilmesinde hücre sağkalım verimi ve protokol etkinliği açısından kollajenaz yönteminin en uygun yöntem olduğu gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Böbrek primer kültürü, Kollajenaz, Mekanik, Tripsin.

Abstract

Objective: The primary culture method used to obtain kidney cells provides an opportunity for evaluating kidney diseases at the cellular level and examining cell functions. The aim of this study is to compare three different isolation methods that can be used for kidney primary culture in terms of cell survival and protocol effectiveness.

Materials and Methods: Renal tissue removed by nephrectomy was separated by mechanical, trypsin and collagenase method in sterile conditions and cultured in podocyte medium. The distribution of podocin, vimentin, E-cadherin, TGF- β 1, CD133, ZO-1 and Nephryn analysis of the cultured cells was done by immunocytochemical method.

Results: It was observed that after the collagenase enzymatic method, the cells acquired epithelioid character from the 7th day of the culture and after the mechanical method from the 13th day of culture. In the trypsin enzymatic method, the cells with increased fusiform structure were observed in the culture on the 13th day. After the immunocytochemical analysis of podocyte cells obtained from kidney tissue with all three methods, it was detected that the immunoreactivities of vimentin, E-cadherin, TGF- β 1, CD133, ZO-1 differ in the cells obtained. In addition, podocin and nephryn had strong immunoreactivities in cells obtained by collagenase enzymatic method.

Conclusion: In this study, it was observed that when three different primary culture techniques were compared for kidney cells controlled by immunocytochemical staining of different proteins, cells could be purified with higher yields from collagenase treated kidney tissue. Collagenase method was shown to be the most suitable method in terms of cell survival and protocol efficiency in culturing podocyte cells.

Keywords: Collagenase, Kidney primary culture, Mechanics, Trypsin.

1. Giriş

Akut böbrek hasarı, son dönem böbrek hastalığına doğrudan sebep olabilmekte, kronik böbrek hasarının gelişme riskini de arttırmaktadır. Her yıl dünyada 2 milyon kişi akut böbrek hasarının neden olduğu hastalıklardan ötürü hayatını kaybetmektedir [1]. Bunun yanı sıra kronik böbrek hastalıkları ve son dönem böbrek yetmezliği olan hastaların çoğu için diyaliz gereklidir ve en kesin tedavi yöntemi organ naklidir [2].

İnsan böbrek hücrelerinin kültüre edilmesi, böbrek hastalıkları ve böbrek hücre fonksiyonlarındaki biyokimyasal ve patolojik değişimlerin belirlenebilmesi için çok önemlidir [3]. Böbrekler karın duvarında bulunurlar. Her bir böbrek, yaklaşık 1 milyon nefrondan meydana gelmektedir. Nefronlar temel olarak filtrasyonun gerçekleştiği renal korüpkül ve tübül kısmından oluşmaktadır. Renal korüpkülleri oluşturan kapiller kıvrım glomerulus bowman kapsülünün içine yerleşmiş durumdadır. Glomerulustaki kan, bowman kapsülünden gelen sıvıyla bir filtrasyon bariyeri sayesinde ayrılır. Bu filtrasyon bariyeri tek hücreli kapiller endoteli, hücresiz, protein içeren bazal lamina ve Bowman kapsülünde uzanan tek sıralı epitel hücrelerden oluşur. Bowman kapsülündeki epitel hücreler podositler olarak isimlendirilirler. Kapiller, endotel ve podosit hücrelerine ek olarak glomerular kapilleri saran ve mezangiyal hücre adı verilen düz kas hücreleri de bulunmaktadır [4].

Temelde böbrek hücrelerini elde edebilmek için üç farklı kültür yöntemi bulunmaktadır. İlki, böbrek orjinli hayvan hücre hatlarının kullanılmasına dayanır. Çalışılması kolay olsa da insan fizyolojisini bire bir gösteremeyecek olması çalışmaları kısıtlamaktadır. İkinci yaklaşım diseksiyonla hücrelerin eldesidir. Primer kültür ile elde edilen hücreler klonlanarak tek bir hücre tipi elde edilir. Bu yöntemle, büyütülen hücre sayısında kayıplar yaşanmaktadır. Üçüncü yöntem ise, böbrek dokusunun çıkarılıp parçalanmasına, serumsuz,

hormonal olarak tanımlı ve kontrol altında tutulan bir kültür ortamında büyütülmesine dayanır. Bu yöntem sayesinde istenilen hücrelerin büyümesi sağlanırken, diğer hücre gruplarının gelişmesi engellenebilir [5]. Hücrelerin kültürlenmesi için, öncelikle hücrelerin hücre bazal membranından veya hücre matris bağlantılarından ayrılmaları gerekmektedir. Hücrelerin ayrılmasında, enzimatik, kimyasal sindirim yöntemleri veya mekanik ayırma yöntemleri kullanılmaktadır [6].

Bu yöntemlerin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Örn: Mekanik yöntem, ilk yıkama aşamalarında kırmızı kan hücrelerinin ortamdaki uzaklaştırılması için iyi bir yöntemdir ancak her ne kadar doku küçük parçalara bölünse de tek hücre süspansiyonu haline getirmek zordur. Ayrıca mekanik yöntem sonrasında kültüre edilen parçalardaki hücre çeşitliliği tek tip hücre elde edilmesinde ekstra ortamlar gerektirebilir. Kollajenazlar, kas hücre dışı matrisinin ana bileşeni olan kollajen içindeki peptid bağlarını hedefler. Çeşitli kollajenaz alt tipleri mevcuttur ve bunlar kazeinaz, klostripain veya tripsin gibi birkaç proteolitik yan aktivite içerebilirler. Tripsinizasyon ise kültürde hücre yüzeyi antijenlerini, hücre yüzeyi topografisini, hücre iskeleti bileşenlerini etkileyebilir bu da birincil kültürde, izolasyonda başarısızlığa neden olabilir. Bu ve benzeri etkiler, enzim partileri arasındaki litik aktivitenin değişkenliği, dokuların farklı kaynaklardan olması nedeniyle kollajenazlara ya da diğer enzimlere olan değişken duyarlılıkları, her izolasyon çalışmasında farklı doku örnekleri için değişmektedir; bu nedenle klinik kullanım için enzimatik izolasyon yönteminin doğrulanması zordur [7].

Bu çalışmada nefrektomi sonucunda çıkartılan böbrek dokusunda mekanik ve enzimatik yöntem ile kültür kurulmuştur. Enzimatik yöntem olarak tripsin ve kollajenaz ile mekanik yöntem olarak dokunun bistüri ile küçük parçalara ayrılması prosedürleri kullanılmış, 3 farklı izolasyon yönteminin primer

kültür sonuçları karşılaştırılmıştır. Kültüre edilen hücrelerin karakterizasyonu immünositokimya ile gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

Böbrek dokusu nefrektomi ile çıkarıldıktan sonra steril şartlar korunarak podosit kültür vasatı [%20 fetal sığır serumu (FBS-11B, Capricorn), %1 L-glutamin (GLN-B, Capricorn), %1 penisilin-streptomisin (PS-B, Capricorn) içeren RPMI1640 (R8758; Sigma) içerisine alınarak 1 saat içerisinde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD hücre kültürü laboratuvarına ulaştırıldı.

2.1 Mekanik yöntem:

Kültür vasatı içerisinden steril koşullar korunarak örnek, steril fosfat tampon solüsyonu (PBS, Merck) içeren petri içerisine alındı. Bistüri yardımıyla korteks ve medullası ayrıldıktan sonra hücre debris ve kanın uzaklaştırılması için 2 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Temizlenen doku parçaları podosit kültür vasatı bulunan 6 gözlü kültür kabının 3 gözüne aktarıldı ve %5 CO₂ 37°C'de inkübasyona kaldırıldı.

2.2 Tripsin Yöntemi:

Dokunun korteks ve medullası ayrıldıktan sonra, bistüri yardımı ile küçük parçalara ayrılan örnekler, içerisinde 5 ml tripsin-EDTA (SH30042.01, HyClone) bulunan petrilere alındı ve 1 gece +4 °C'de inkübe edildi. Ertesi sabah soğuk tripsin uzaklaştırıldı ve dokuların üzerine 2 ml 37°C'ye ısıtılmış tripsin-EDTA eklendi. Tüm örnekler 30 dakika %5 CO₂ 37°C'de inkübasyonun ardından tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı ve örnekler üzerine 5'er ml podosit kültür vasatı ilave edilerek 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Yıkama işlemi 2 kere tekrarlandıktan sonra supernatant atıldı ve hücreler podosit kültür vasatı bulunan 6 gözlü kültür kabının 3 gözüne aktarıldı ve %5 CO₂ 37°C'de inkübasyona kaldırıldı.

2.3 Kollajenaz Yöntemi:

Bu yöntem için %0,075mg/ml olacak şekilde kollajenaz Tip I (C0130, Sigma) podosit kültür vasatı içerisinde hazırlandı ve 0.22 µm lik filtreden geçirildi. Doku parçalarının üzerine 15 ml olacak şekilde eklendi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Üzerine yaklaşık 1ml taze podosit kültür vasatı eklenerek kollajenaz inaktive edildi ve 15 ml'lik tüpe alınan sıvı kısım 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Supernatant atıldı, 5 ml podosit kültür vasatı eklendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi tamamlandı. Hücreler podosit kültür vasatı bulunan 6 gözlü kültür kabının 3 gözüne aktarıldı ve %5 CO₂ 37°C'de inkübasyona kaldırıldı.

2.4 Hücrelerin Pasajlanması

Her üç yöntem ile 6 gözlü kültür kaplarında kültüre edilen örnekler her 2 günde bir kültür vasatları değiştirilerek %80 konfluent olduklarında pasajlandı. Bu amaç için tüm örneklerdeki kültür vasatları alındı ve her bir gözde 1'er ml olacak şekilde tripsin-EDTA (SH30042.01, HyClone) ilavesi yapıldı ve hücreler %5 CO₂ 37°C'de 10 dk inkübe edildi. Ardından her bir göze 1'er ml podosit kültür vasatı ilave edilerek

hücreler toplandı, 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek hücrelerin bir kısmı stoklama amacı için 9 birim FBS ile 1 birim Dimetil Sülfoksit (DMSO) (A3672, AppliChem) kullanılarak hazırlanan dondurma vasatı içerisine alındı. Hücreler eş zamanlı olarak sıvı azot tankı ve -80°C' de saklandı. Toplanan diğer hücreler immünositokimya analizi için 12 mm lik FBS ile kaplanmış yuvarlak lamel içeren 24 gözlü kültür kaplarına her bir gözde 1x10³ hücre olacak şekilde ekilerek kültür işlemine devam edildi.

2.5 İmmünositokimyasal Boyama

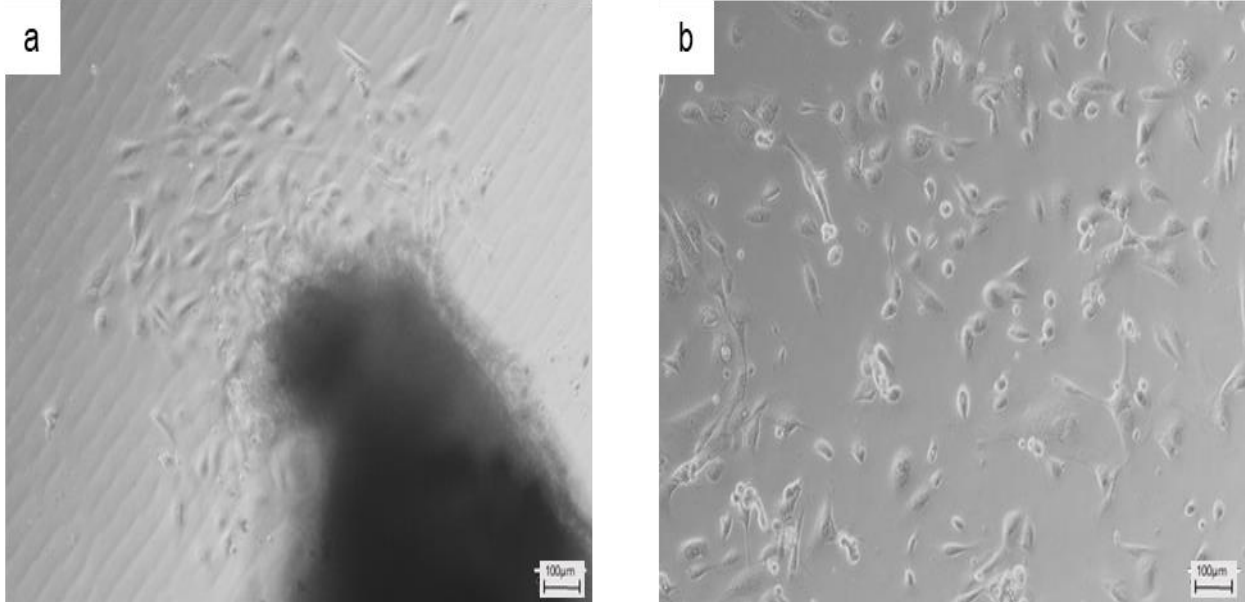
Böbrek hücreleri 24 gözlü kültür kaplarına ekimlerinden %60-70 konfluent oldukları 48. saatte %4 paraformaldehit (1.04004.0800, Merck, Darmstadt, Germany) ile 30 dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Hücreler fosfat tamponunda (PBS, PBS404.100, Bioshop, Ontario, Canada) 30 dakika boyunca iki kez yıkandıktan sonra hücre permeabilizasyonu için +4°C'de 15 dakika %0,1 Triton X-100 (A4025, Biotomatic) ile muamele edildi. PBS ile 3 defa yıkanan hücreler endogen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için %3 H₂O₂ (1.08597.2500, MERCK) ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Tüm hücreler sekonder kit (AEN080, ScyTek) içinde kullanıma hazır olarak gelen bloklama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından direkt çekilerek primer antikorlar; anti-vimentin (rabbit polyclonal, 10366-1-AP, Proteintech, CHINA, dilution:1/50), anti-E-kaderin (rabbit polyclonal, 20874-1-AP, Proteintech, CHINA, dilution:1/50), anti-TGF-β1 (rabbit polyclonal, LS-B655, LifeSpan Biosciences, WA, USA, dilution:1/50), anti-CD133 (rabbit polyclonal, STJ20168, St John's Laboratory Ltd, London, UK, dilution:1/50), anti-ZO-1 (rabbit polyclonal, 61-7300, ThermoFisher Scientific, MA, USA dilution:1/10), anti-Nefrin (mouse monoclonal, 66970-1-Ig, Proteintech, CHINA, dilution: 1/2000) ve anti-NPHS2 (podosin, rabbit polyclonal, 20384-1-AP, Proteintech, CHINA, dilution: 1/200) ilave edildi ve 4°C'de bir gece inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanan hücrelere sekonder kit içinde kullanıma hazır halde gelen biotinlenmiş goat anti rabbit/mouse IgG ve peroksidaz ile konjuge streptavidin ile 30'ar dakika inkübe edildi. İki sekonder kit arasında PBS ile yıkama gerçekleştirildi. İmmünositokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak için hücreler diaminobenzidin (DAB, TA-125-HD, ThermoFisher Scientific) ile 5 dakika boyandı ve ardından PBS ile 15 dakika yıkama işlemi gerçekleştirildi. Artalan boyaması için hücreler Mayer's hematoksilen (TA-125-MH, ThermoFisher Scientific) ile 1 dakika boyandı ve distile su ile 30 dakika yıkama işleminden sonra her bir gözde bulunan yuvarlak lameller 20 µl kapatma solüsyonu (K002, Diagnostic Biosystems) bulunan lamalar üzerine alınarak ışık mikroskopunda (Olympus BX43, Tokyo, JAPAN) gözlemlendi. İki bağımsız araştırmacı tarafından fotoğrafları çekilerek immün

işaretleme yarı kantitatif olarak boyanma yoğunluğu negative (-), hafif (+), orta (++) ve güçlü (+++) olarak yorumlandı. Kontrol immunositokimyasal analiz için primer antikorlar basamağı yerine uygun IgG ilavesi yapılarak tüm protokol basamağı aynı şekilde uygulandı.

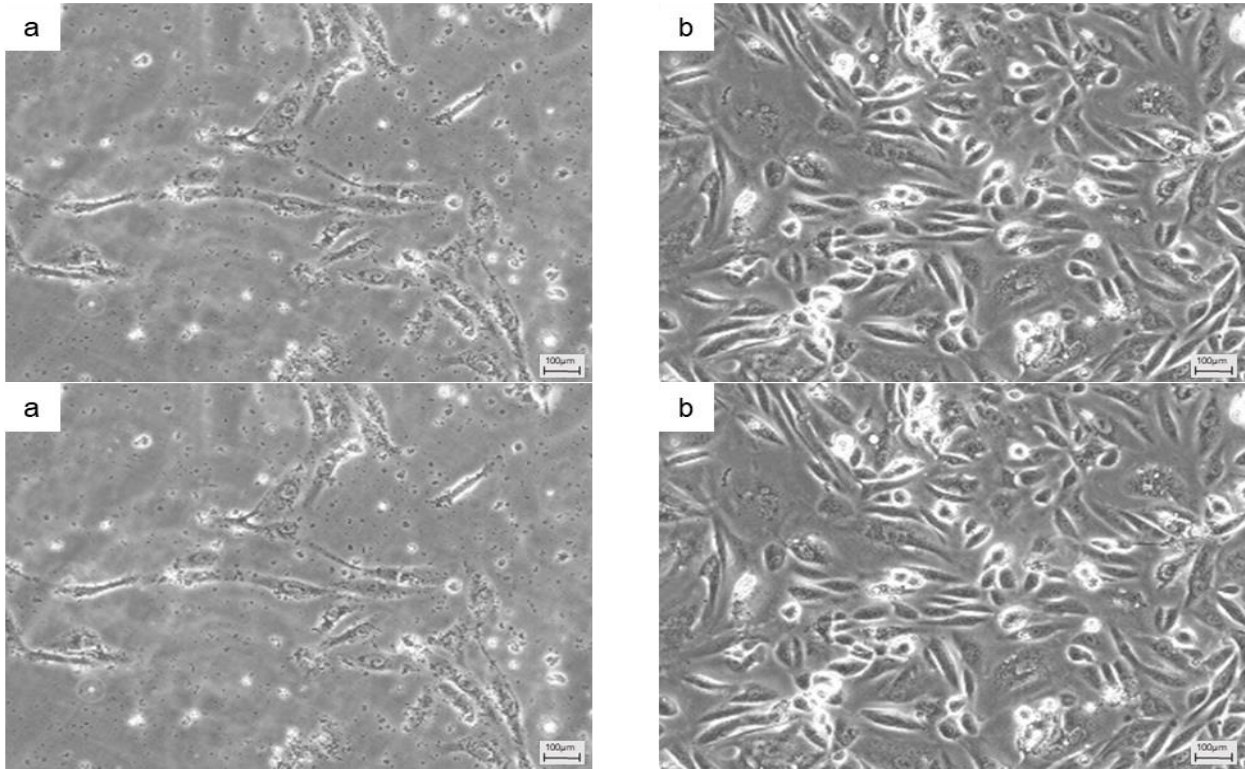
3. Bulgular ve Tartışma

3.1 Hücre Kültürü

Podosit hücre eldesi amacı için mekanik ve enzimatik (kollajenaz ve tripsin) yöntem uygulamaları sonrasında kültüre edilen örnekler incelendiğinde, mekanik yöntem sonrasında kültürün 7. gününde hücreler dokuların kenarlarında gözlemlendi (Şekil 1a). Kültürün 13. gününde doku parçaları steril pens ile ortamdan alınarak kültüre devam edildiğinde hücrelerin epiteloid karakterde oldukları belirlendi (Şekil 1b).

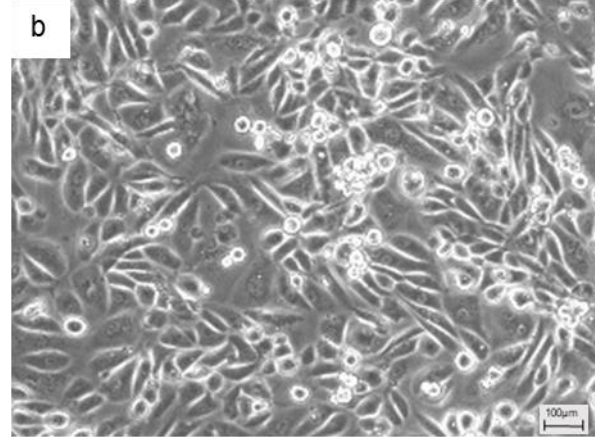
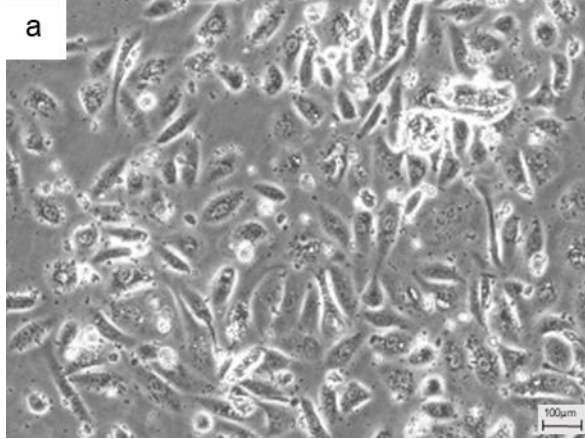


Şekil 1. Mekanik yöntem sonrasında Podosit Hücre kültürü a: 7. Gün, b: 13. Gün. Ölçek 100 µm



Şekil 2. Tripsin-EDTA enzimatik yöntemi sonrasında Podosit Hücre kültürü a: 7. Gün, b: 13. Gün. Ölçek 100 µm

Tripsin-EDTA enzimatik yöntemi sonrasında kültürün tripsinden kaynaklı kirli olduğu, fakat kültüre devam edildiğinde kültür vasatının temizlendiği (Şekil 2), fusiform yapıdaki hücrelerin kültürün 7. gününde az iken (Şekil 2a), kültürün 13. gününde arttığı gözlemlendi (Şekil 2b).



Şekil 3. Kollajenaz enzimatik yöntemi sonrasında Podosit Hücre kültürü a: 7. Gün, b: 13. Gün. Ölçek 100 µm

3.2 İmmunositokimya Bulguları

Her üç yöntem ile böbrek dokusundan elde edilen podosit hücrelerin immunositokimyasal analizi sonrasında, mekanik yöntem ile elde edilen hücrelerde vimentin immunoreaktivitesi orta şiddette (++) ve yer yer güçlü (+++) iken (Şekil 4a), E-kaderin immunoreaktivitesinin zayıf (+) ama yer yer orta şiddette (++) olduğu gözlemlendi (Şekil 4b). Aynı grup hücrelerde TGF-β1 immunoreaktivitesi zayıf şiddette iken (Şekil 4c), CD133 immunoreaktivitesi orta (++) ve yer yer güçlü (+++) (Şekil 4d), ZO-1 immunoreaktivitesi orta şiddette (++) (Şekil 4e) pozitif idi. Kontrol immunoreaktivite örneklerinde boyanma gözlenmedi (Şekil 4f).

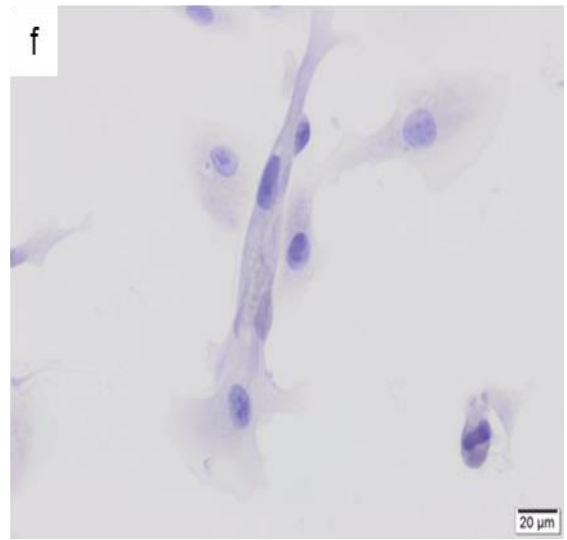
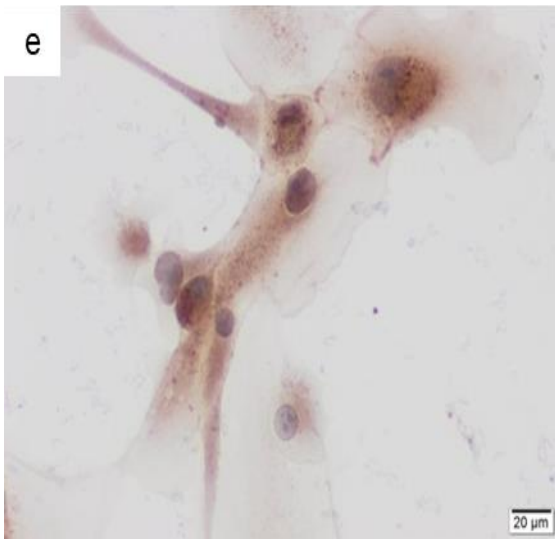
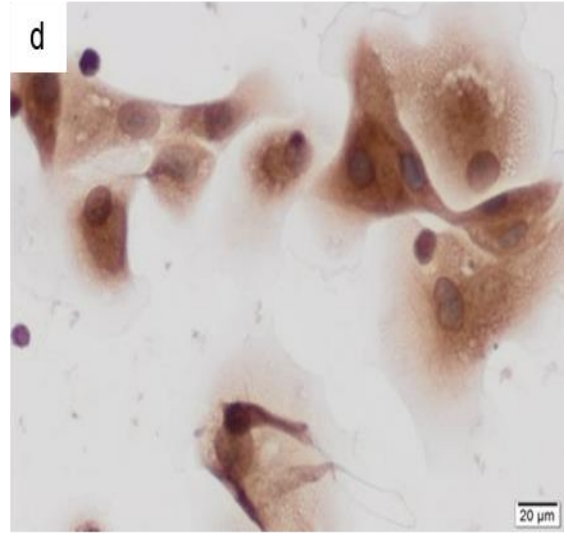
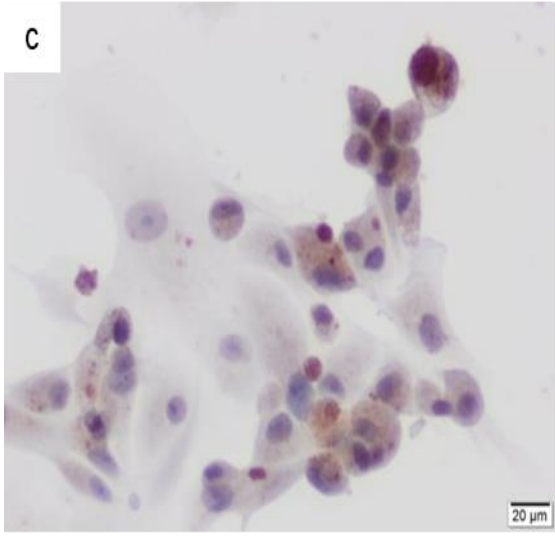
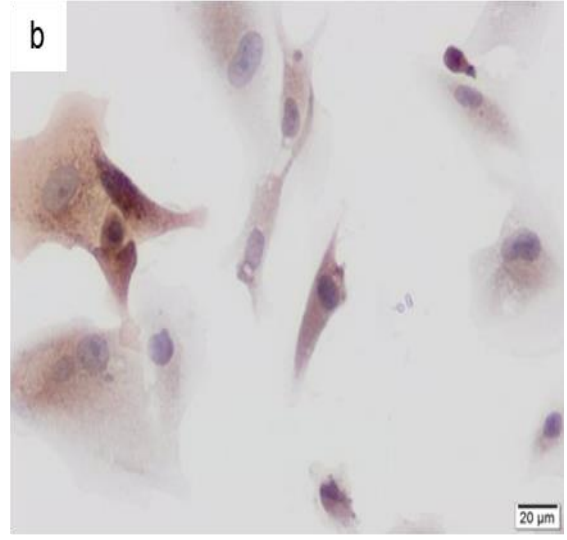
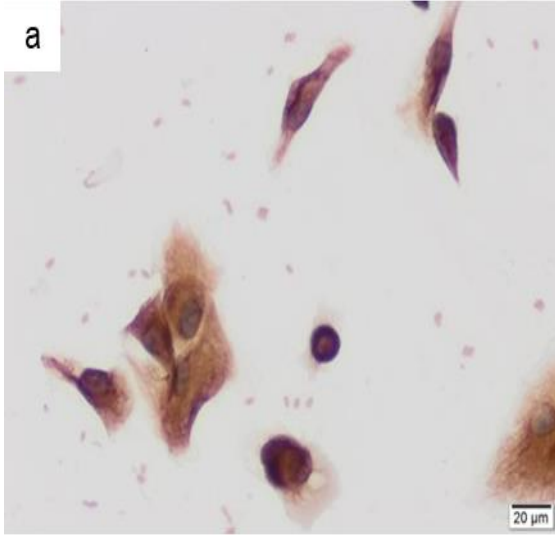
Podosit hücrelerin immunositokimyasal analizi sonrasında, tripsin-EDTA enzimatik yönteminde vimentin (Şekil 5a) ve CD133 (Şekil 5d) immunoreaktiviteleri orta şiddette (++) iken, E-kaderin (Şekil 5b), TGF-β1 (Şekil 5c), ZO-1 (Şekil 5e) ve kontrol (Şekil 5f) boyamalarında immunoreaktivite gözlenmedi. Podosit hücrelerin immunositokimyasal analizi sonrasında, kollajenaz ile enzimatik yöntem sonrasında vimentin immunoreaktivitesi orta şiddette (++) ve yer yer güçlü (+++) iken (Şekil 6A), E-kaderin immunoreaktivitesinin de orta (++) ve yer yer güçlü (+++) şiddette olduğu gözlemlendi (Şekil 6B). TGF-β1 immunoreaktivitesi ise bu grup hücrelerde yer yer zayıf şiddette (+) idi (Şekil 6C). CD133 immunoreaktivitesi ise güçlü (+++) olarak saptandı iken (Şekil 6D), ZO-1 (Şekil 6E) ve kontrol (Şekil 6F) boyamalarda immunoreaktivite gözlenmedi.

Kollajenaz enzimatik yöntemi sonrasında hücrelerin kültürün 7. gününden itibaren epiteloïd karakterde oldukları (Şekil 3a), bu özelliklerini kültürün 13. gününde de devam ettirdikleri (Şekil 3b) gözlemlendi.

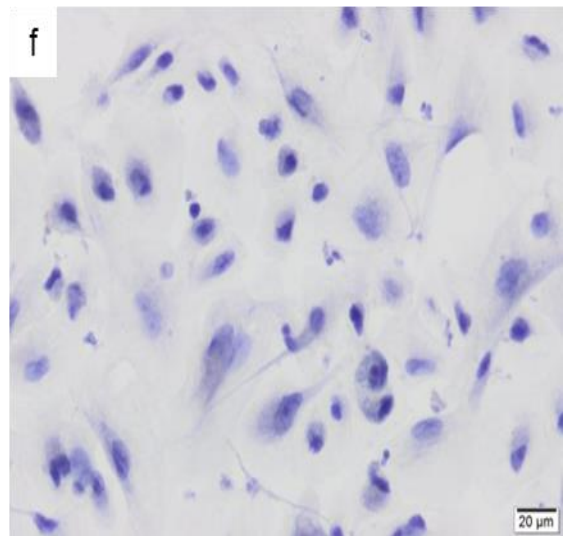
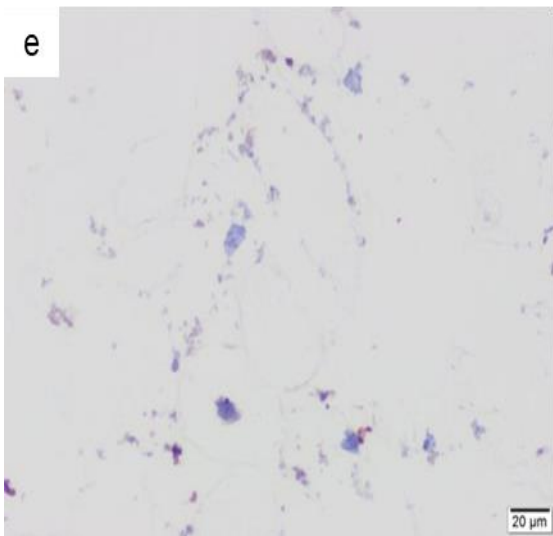
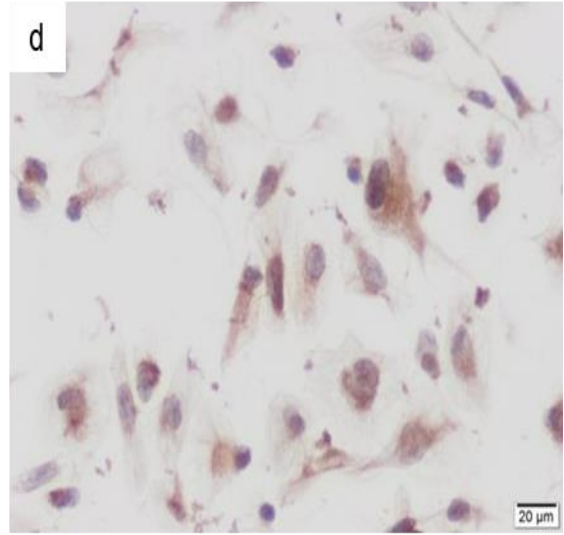
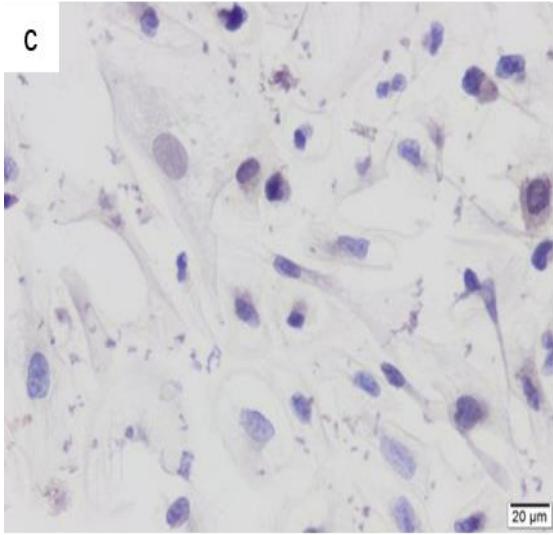
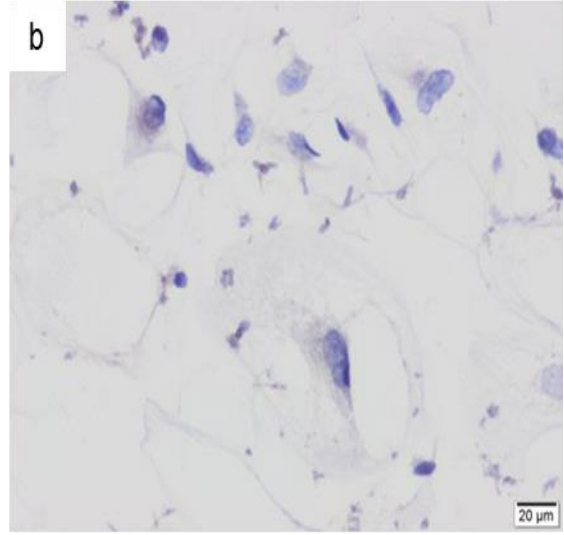
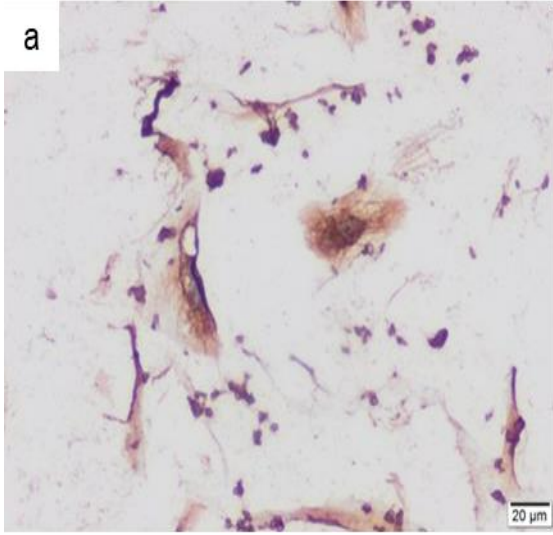
Kültüre edilen hücrelerin hücresel ve immunositokimyasal boyanma özelliklerine göre kollajenaz enzimatik yöntemi uygulanan hücrelerde daha iyi olması üzerine bu hücrelerde yapılan NPHS2 ve Nephryn podosit belirteçlerinin immunositokimyasal analizi sonrasında her iki antikora ait boyamanın güçlü (+++) pozitif olduğu ve kontrol immunositokimyasal boyamada da boyamanın olmadığı gözlemlendi (Şekil 7).

Tartışma

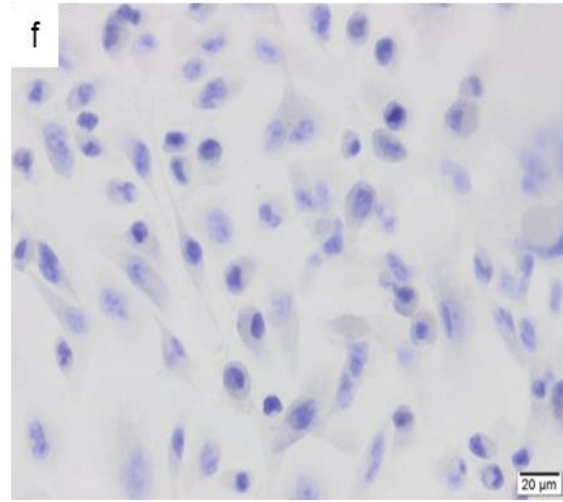
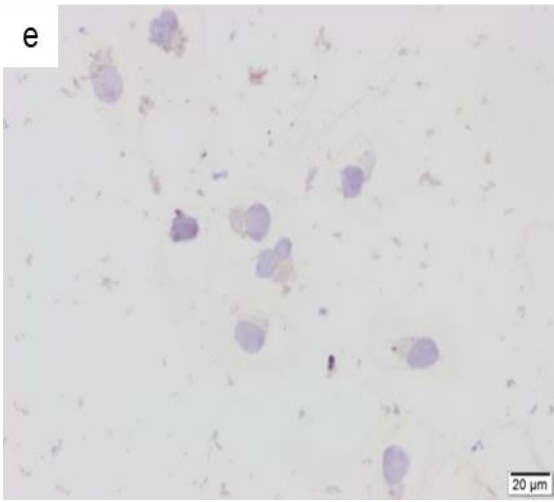
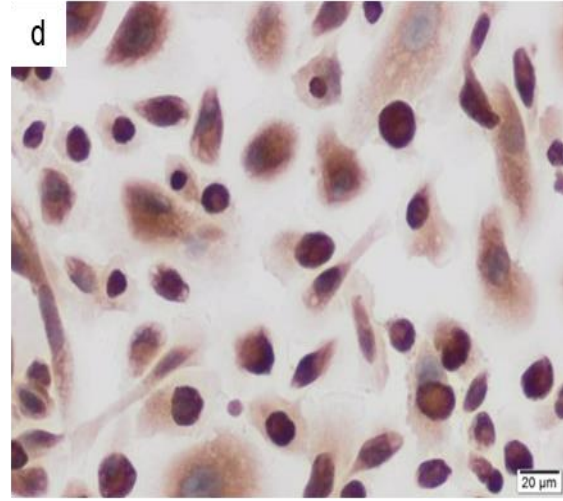
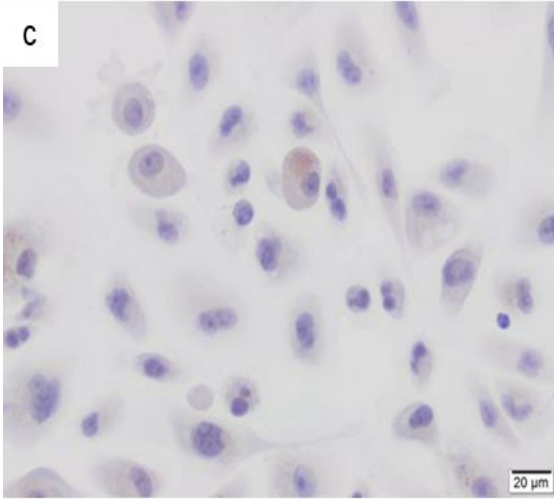
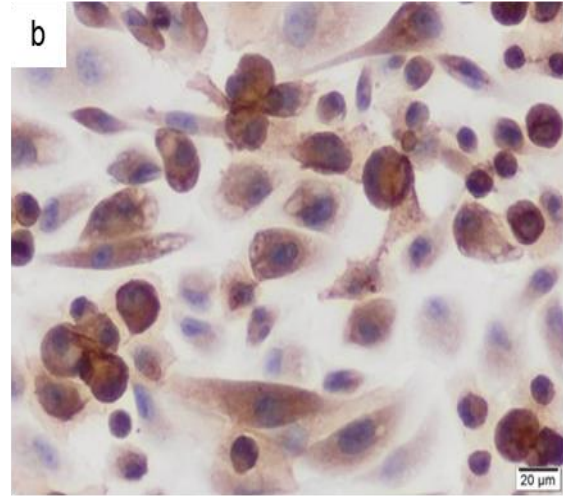
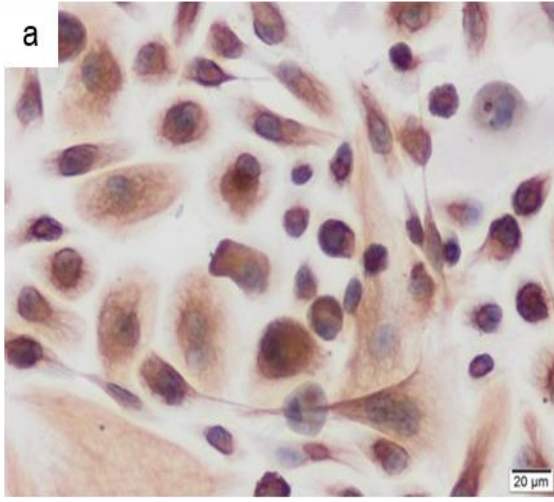
Hücre kültürü, hücrelerin çok sayıda elde edilebilmesine ve tekrarlayan çalışmaların yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Fizyolojik ve toksikolojik çalışmalar için doku kesitleri, hücre hatları ve primer kültürler gibi birçok farklı yöntemle böbrek hücreleri incelenmektedir. Bunların arasında toksikoloji gibi bazı çalışma alanlarında hücre hatlarının kullanılması uygun olmamaktadır. İmmortalize hücre hatları pasajlamalar sonucunda farklılaşabilmekte ve orijinal karakteristikleri değişebilmektedir. Bu sebeple deney sonuçları etkilenebilmektedir. Primer hücre kültürleri ise fenotipik olarak orijinal dokunun fenotipik ve fizyolojik özelliklerini taşırlar. Bu sebeple gen çalışmaları, ilaç testleri ve biyobelirteç geliştirilmesi için primer kültürler en uygun modellerdir [8]. Farklı böbrek hücrelerinin ideal primer kültürleri için yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır [9,10].



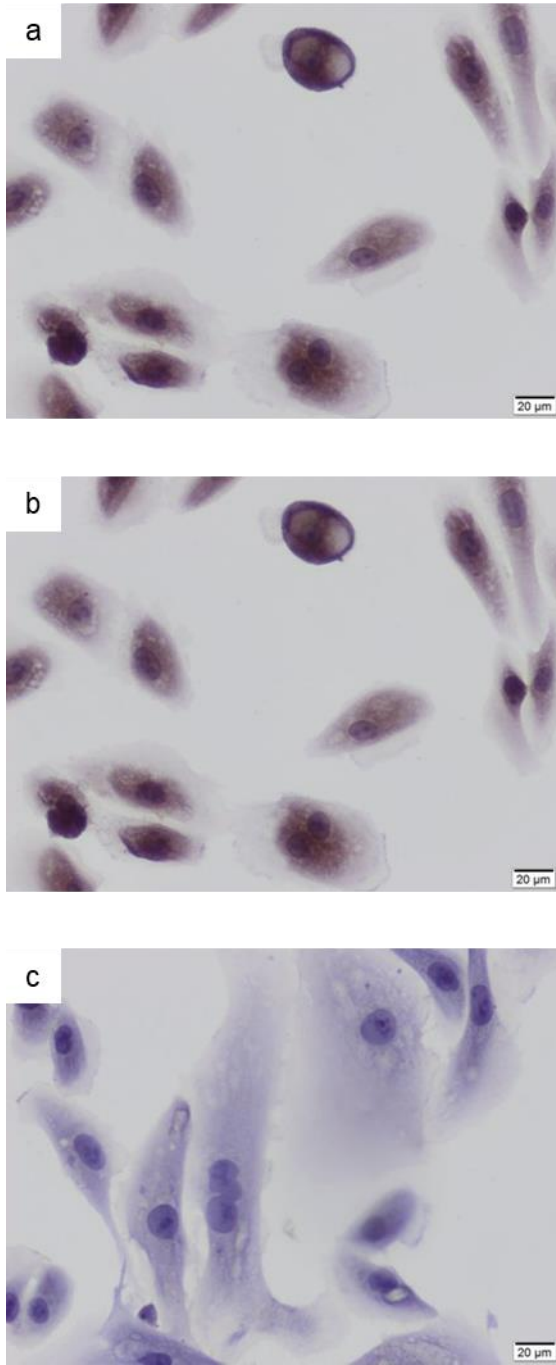
Şekil 4. Mekanik yöntem sonrasında Podosit Hücre kültürü hücrelerinde Vimentin (a), E-kaderin (b), TGF- β 1 (c), CD133 (d), ZO-1 (e) ve kontrol immunositokimya (f) boyamaları. Ölçek 20 μ m



Şekil 5. Tripsin-EDTA enzimatik yöntemi sonrasında Podosit Hücre kültürü hücrelerinde Vimentin (a), E-kadherin (b), TGF- β 1 (c), CD133 (d), ZO-1 (e) ve kontrol immunositokimya (f) boyamaları. Ölçek 20 μ m



Şekil 6. Kollajenaz enzimatik yöntemi sonrasında Podosit Hücre kültürü hücrelerinde Vimentin (a), E-kaderin (b), TGF-β1(c), CD133 (d), ZO-1 (e) ve kontrol immunositokimya (f) boyamaları. Ölçek 20 µm



Şekil 7: Kollajenaz Enzimatik Yöntemi Sonrasında Podosit Hücre Kültürü hücrelerinde NPHS2 (a), Nefrin (b) ve kontrol immunositokimya (c) boyamaları. Ölçek 20 µm

Bu çalışmada, nefrektomi işlemi olan hastanın böbreğinin sağlıklı dokusundan alınan örnek ile, primer hücre kültürü için kullanılan üç farklı yöntem karşılaştırılarak podosit hücre eldesinde hangi yöntemin daha verimli olabileceği incelendi. Primer kültür aşamasında en önemli faktör örneğin olabilecek en kısa süre içerisinde kültüre alınmasıdır [11]. Bu sebeple nefrektomiden sonraki ilk 1 saat içinde böbrek dokusu laboratuvarında kültüre edildi. Kültür işlemi sırasında her

üç yöntem ile de hücrelerin elde edilebildiği gözlemlendi. Mekanik ve kollajenaz enzimatik yöntemi sonrasında epiteloid karakterde hücrelerin elde edilmesi üzerine bu iki yöntemin, tripsin-EDTA enzimatik yöntemine göre podosit hücre eldesinde daha uygun olduğu düşünüldü. Kollajenaz enzimatik yöntemi sonrasında kültürün erken dönemlerinde elde edilen hücre sayısının mekanik yöntem ile elde edilen hücrelere oranla daha fazla olmasından dolayı primer kültür aşamasında kollajenaz enzimatik yönteminin daha uygun olduğu sonucuna varıldı.

Böbrek hücrelerinin immünohistokimyasal analizi sonrasında öncelikli olarak hücreler arası bağlantı proteinlerinin varlığının analizi hedeflenmişti. Glomerulus fonksiyonunun bozukluğu ve filtrasyon kapasitesindeki azalış son dönem böbrek hasarının temel sebebidir. Otoimmün hastalıklar, bakteriyel endokardit, HIV, diyabet, hipertansiyon gibi birçok hastalıkta glomerulus fonksiyon bozukluğuna bağlı böbrek hasarı görülmektedir. Böbrekteki filtrasyon bariyeri, suda çözünebilir moleküllerin geçişine izin verirken büyük makromoleküllerin geçişine izin vermezler. Filtrasyon bariyerinin bu seçici geçirgenliği P-kaderin, okludin, ZO-1, nefrin, podosin ve CD2AP gibi hücreler arası bağlantı proteinleri ile düzenlenmektedir [12]. Vimentin ara filament proteinidir ve insanlarda normal mezankimal hücrelerde ifade edilir [13]. Uzun yıllardır yapılan çalışmalarda vimentin ve kaderin ailesi üyelerinden E-kaderin normal ve kanserli renal hücrelerin tanısında kullanılmıştır [14]. TGF- β , çok fonksiyonlu bir sitokindir ve büyüme, farklılaşma, apoptoz, yara onarımı gibi farklı hücresel süreçlerde görev almaktadır. Birçok böbrek hücresinde ekstraselüler matriks proteinlerinin üretimini indüklediği belirlenmiştir. Ayrıca renal inflamasyon ve renal fibrozda da rol oynadığı bilinmektedir [15]. CD133, sağlıklı yetişkin insan böbreğindeki renal progenitor hücrelerde ifade edilen bir yüzey belirteçidir. Bu hücreler endotel veya epitel hücrelere farklılaşabilir, kendini yenileyebilir. CD133+ olan hücreler renal korteks, intersitijyal bölge ve glomerulusta bulunabilir. Bu sebeple CD133 belirteci normal böbrek dokusundaki hücrelerin tanımlanması için kullanılabilir [16]. Çalışmamızda, immünohistokimyasal analiz sonrasında ZO-1 immunoreaktivitesi mekanik yöntem ile elde edilen hücrelerin her iki enzimatik yöntem ile elde edilen hücrelere nazaran daha fazla olması, enzimatik yöntem sırasında sıkı bağlantı komplekslerinin yapısında bozulmaya neden olabileceğini düşündürdü. Tripsin-EDTA enzimatik yöntemi sonrasında sadece vimentin ve CD133 immunoreaktiviteleri olduğu saptanmış ve bu iki proteine ait immunoreaktivitelerinde diğer yöntemler ile elde edilen hücrelerden daha az olması tripsin-EDTA enzimatik yönteminin podosit hücre eldesinde uygun olmayabileceği sonucuna varılmıştır. Kollajenaz enzimatik yöntemi sonrasında ZO-1 dışında diğer tüm proteinlere ait immunoreaktivitelerin mekanik yöntem ile elde edilen hücrelerden daha fazla olması, böbrekten primer kültür sonrasında hücre elde edilmesinde en

uygun yöntemin kollajenez enzimatik yöntemi olduğu sonucuna varılmıştır. Valente ve ark. yaptıkları çalışmada da kollajenez sindiriminin epitelyal hücreler için diğer enzimlerle (tripsin olarak) sindirimden daha az zararlı olduğu, normal ve kanserli renal primer hücre kültüründe, daha yüksek verim ve canlılığa sahip hücre süspansiyonları oluşturduğunu belirtmiştir [12]. Elde edilen sonuçlara göre, böbrek hücrelerinin kültüre edilebilmesi için kollajenez uygulanmasının, tripsin ve mekanik parçalamaya göre daha uygun bir yöntem olduğu belirlenirken, podosit hücrelerinin varlığının tespiti için yapılan NPHS2 (podosin) ve nefrin immunositokimya analizleri sonrasında her iki belirtecin de güçlü bir şekilde boyandığı ve kollajenez enzimatik yöntemi sonrasında primer böbrek kültüründe podositlerin elde edilebildiği sonucuna varıldı. Yapılan araştırmalarda primer hayvan podosit kültürlerinin kullanımı ile insandaki normal böbrek fonksiyonu ve glomerular hastalıklarla ilgili modeller oluşturulmaktadır. Fakat türler arasındaki farklılıklar insan podositlerinin fonksiyonel, yapısal ve moleküler hasarının belirlenmesinde kısıtlı kalmaktadır. Bu yüzden insan kaynaklı podositlerin çalışmalarda kullanılması böbrek araştırmalarında ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde oldukça önemlidir [12]. Ancak in vivoda podositler tipik olarak çoğalmazlar. Proliferatif olmayan terminal farklılaşmış ve oldukça özelleştirilmiş bir fenotipi çoğaltmak için, özel hücre kültürü şartları gereklidir. Çok sayıda podosit hücresi üretmek için, hücrelerin öncelikle büyümeye izin veren koşullar altında büyütülmesi gerekmektedir [17].

5. Sonuç

Primer hücre kültürleri, orijinal dokunun taklit edilmesindeki en uygun yöntemlerden biridir. Özellikle ticari hücre hatlarının pahalı olması yanı sıra böbreğin fonksiyonel kısımlarından elde edilen primer insan hücreleri kişiye özel deneysel çalışmalar ile pek çok toksikolojik veya genomik çalışmada kullanılabilir. Bu çalışmada, literatürde bulunan farklı primer kültür tekniklerinden üçünün karşılaştırılması sonrasında kollajenez ile muamele edilen böbrek dokusundan daha yüksek verimle hücre saflaştırılabileceği gözlemlendi. Sonuçlarımız, farklı proteinlerin immunositokimyasal dağılımları incelenerek böbrek hücrelerinin tanımlanmasında ve podosit hücrelerinin kültüre edilmesinde protokol etkinliği ve hücre sağkalım verimi açısından kollajenez yönteminin en uygun yöntem olduğunu göstermektedir.

Referanslar

1. Chawla, Lakshmi S, Paul, L.K, Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome, *Kidney international*, 2012, 82(5), 516-524.
2. Levey, A.S, Cassandra, B.B, Lesley, A.I, Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review, *JAMA*, 2015, 313(8), 837-846.
3. Ding, W, Keyvan, Y, Lina, A.S, Isolation, characterization, and high throughput extracellular flux analysis of mouse primary renal tubular epithelial cells, *Journal of visualized experiments JoVE*, 2018, 136.

4. Vander, A.J, Sherman, J.H, Luciano, D.S, The mechanism of body function. In: Vander's human physiology, McGraw-Hill Education, 2000, pp 476-486.
5. Detrisac, C.J, Sens, M.A, Garvin, A.J, Spicer, S.S, Sens, D.A, Tissue culture of human kidney epithelial cells of proximal tubule origin, *Kidney international*, 1984, 25(2), 383-390.
6. Uysal, O, Sevimli, T, Sevimli, M, Gunes, S, Sariboyaci, A.E, Cell and Tissue Culture: The Base of Biotechnology, In: Omics Technologies and Bio-Engineering Towards Improving Quality of Life, 1st edn, Academic Press, London, 2018, 391-429.
7. Hendijani, F, Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues, *Cell proliferation*, 2017, 50(2), e12334.
8. Valente, M.J, Henrique, R, Costa, V.L, Jerónimo, C, Carvalho, F, Bastos, M.L, Pinho, P.G, Carvalho, M, A rapid and simple procedure for the establishment of human normal and cancer renal primary cell cultures from surgical specimens, *PLoS one*, 2011, 6(5), e19337.
9. Hawksworth, G.M, Isolation and culture of human renal cortical cells with characteristics of proximal tubules, *Methods in Molecular Medicine*, 2005, 107, 283-290.
10. Vesey, D.A, Qi, W, Chen, X, Pollock, C.A, Johnson, D.W, Isolation and primary culture of human proximal tubule cells, *Methods in Molecular Biology*, 2009, 466, 19-24.
11. Glynne, P, Primary culture of human proximal renal tubular epithelial cells, *Methods in Molecular Medicine*, 2000, 36, 197-205.
12. Qian, T, Hernday, S, Bao, X, Olson, W.R, Panzer, S.E, Shusta, E.V, Palecek, S.P, Directed differentiation of human pluripotent stem cells to podocytes under defined conditions, *Scientific reports*, 2019, 9(1), 1-12.
13. Satelli, A, Li, S, Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy, *Cellular and molecular life sciences*, 2011, 68(18), 3033-3046.
14. Shen, S.S, Krishna, B, Chirala, R, Amato, R.J, Truong, L.D, Kidney-specific cadherin, a specific marker for the distal portion of the nephron and related renal neoplasms. *Modern pathology*, 2005, 18(7), 933-940.
15. Sureshbabu, A, Muhsin, S.A, Choi, M.E, TGF- β signaling in the kidney: profibrotic and protective effects, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2016, 310(7), F596-F606.
16. Bruno, S, Bussolati, B, Grange, C, Collino, F, Graziano, M.E, Ferrando, U, et al, CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis, *The American journal of pathology*, 2006, 169(6), 2223-2235.
17. Shankland, S.J, Pippin, J.W, Reiser, J, Mundel, P, Podocytes in culture: past, present, and future. *Kidney international*, 2007, 72(1), 26-36.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Atıf-GayriTicari4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

