



AMNİYOTİK SIVI HÜCRE KÜLTÜRÜNDE AÇIK VE KAPALI SİSTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ
ASSESSMENT OF OPEN AND CLOSED SYSTEMS IN AMNIOTIC FLUID SAMPLES

Özgür ÇOĞULU
Ferda ÖZKINAY

Cumhur GÜNDÜZ
Cihangir ÖZKINAY

Gül SAPMAZ

Nuray TERZİBAŞIOĞLU

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Hastalıkları Araştırma ve Uygulama Merkezi, Bornova, izmir

Anahtar Sözcükler: amniyotik sıvı, hücre kültürü
Key Words: amniotic fluid, cell culture

ÖZET

Bu çalışmada hücre kültürlerinin açık ve kapalı sistemlerdeki üremeleri değişik besiyerleri kullanılarak karşılaştırıldı. Hücre kültürleri kullanılan tüp ya da flask başına maliyet, çalışma zamanı, mitotik indeks açılarından incelendi.

Sırasıyla gelen 100 amniyotik sıvı örneğinden hem açık, hem de kapalı sistem kullanılarak hücre kültürü yapıldı. Açık sistemde hücre kültürleri için 25 cm²'lik doku kültür flasksı, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava karışımını sağlayacak inkübatörler, kapalı sistemde, 10 mL'lik altı düz tüpler ve kuru etüvler kullanıldı. Açık sistemde penisilin/streptomisin ve L-Glutamin eklenmiş BioAmf, kapalı sistemde Hepes, L-Glutamin, penisilin - streptomisin, ultrosor-G ve fetal calf serum eklenmiş F-10 "Ham's Nutrient Mixture" ile "Chang-D" karışımı besiyeri kullanıldı. 100 amniyotik sıvı örneğinden kapalı sistemde kültürü yapılanların tamamında hücre üremesi saptandı. Bunlardan bir tanesinde hücre üremesi saptanmasına rağmen yeterli sayıda ve kalitede metafaz elde edilemedi. Açık sistemde kültür yapılanların dördünde mantar enfeksiyonu gelişti. Yirmisekiz örnek çeşitli nedenlerle çalışmadan çıkarıldı. Çalışmanın yapıldığı dönem içinde açık sistemde bir flask başına yapılan harcama, kapalı sistemde bir tüp çalışmaya hazır hale gelinceye kadar tüp başına yapılan harcama ya göre 4 misli daha pahalı olarak bulundu. Açık sistemde ortalama mitotik indeks 10.46 ±12.76; kapalı sistemde 9.16±9.75 bulundu (p>0.05). Açık hücre kültürlerinde çalışmaya alınan 68 olguda çalışmaya başlayıncaya kadar geçen süre ortalama 14,00±4,55 gün, kapalı sistemde ise toplam 100 olguda 13,19±3,60 gün olarak bulundu. Besiyeri değişim sayısı açık sistemde toplam 68 olguda ortalama flask başına 2,33±1,33; kapalı sistemde ise toplam 100 olguda ortalama tüp başına 1,29±0,46'dı.

SUMMARY

Total of 100 amniotic fluid samples were cultured both in open and closed systems to compare the growth of cell cultures by using different mediums. Each flask and tube was assessed in respect to cost effect, harvesting time and mitotic index. The 25-cm² plastic tissue culture flask and BioAmf I medium with penicilline-streptomycin and L-Glutamine for open system and 10 ml flat bottom tubes and F-10 Ham's Nutrient Mixture/Chang-D mediums supplied Hepes buffer, Ultrosor-G, fetal calf serum, penicilline-streptomycin and L-Glutamine for closed system were used. Cell growth was obtained in all samples cultured by using closed system. In one closed culture tube, the number and quality of metaphases were not sufficient. Twenty-eight out of 100 amniotic fluid samples in open system were excluded from the study. Four out of 68

Yazışma Adresi: Özgür Çoğulu, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Bornova, izmir

Makalenin geliş tarihi: 16. 03.1999; kabul tarihi: 07. 01. 2000

amniotic fluid samples were infected. Each flask for open system celi culture costed 4 times more expensive than each tube for closed system cell culture. The mean mitotic index was 10.46 +12.76 in open and 9.16±9.75 in closed system($p>0.05$). The mean time for harvesting in 68 cases was 14,00±4,55 days for open and 13,19±3,60 days in 100 cases for closed system. The mean number of medium change was 2,33±1,33 per flask for open system and 1,29±0,46 per tube for closed system.

GİRİŞ

Kromozomların ışık mikroskopunda incelenebilmesi için bölünmekte olan hücrelerden metafaz dönemindeki kromozomların elde edilmesi gerekir. Bu işlemler pahalıdır ve büyük dikkat ve sabır gerektirir. Kemik iliği, gonadlar ve koryonik villus sitotrofoblast hücreleri spontan bölünen hücreler olması nedeniyle hemen; lenfositler birkaç gün içinde incelenirken diğer dokuları birkaç hafta uygun kültür ortamında tutmak gerekir. Ancak bu dönem boyunca enfeksiyon gelişimi, ya da çok az sayıda metafaz elde etme gibi bazı istenmeyen durumlarla karşılaşılabilir. Öte yandan hücre kültüründe kullanılan maddelerin pahalı olması nedeniyle az madde kullanılarak en verimli sonucun alınması gerekir. Optimal hücre büyümesi için 7.2-7.4 pH sağlayacak uygun steril bir besiyeri ortamına ve 37 °C ısı sağlayan inkübatöre gereksinim vardır (1,4). inkübatör seçimi açık ya da kapalı sistem hücre kültürü kullanmaya bağlı olarak değişiklik gösterir. Açık sistem, COVİ inkübatöre gereksinim gösterir. Hücre kültürünün dış ortamla ilişkili olması nedeniyle buharlaşmayı önlemek amacıyla ortamın nemlendirilmesi gerekir. Bu durumda da mikroorganizma kontaminasyonu söz konusu olabilir. Ayrıca CO₂ silindirinin boşalması ya da sızdırması diğer dezavantajlardır. Öte yandan açık sistemin doğal duruma en yakın ortamı sağlaması avantajıdır. Kapalı sistem kullanıldığında ortamda % 5 CO₂ bulunması gerekmez, dolayısıyla tüplerin ya da flasklerin kapaklarının gevşek bırakılması veya filtrelili flask kullanma zorunluluğu yoktur. 37 °C ısı sağlayan basit, kuru bir inkübatör yeterlidir. Avantajı kapaklar kapalı olacağı için mikroorganizma kontaminasyonu olasılığı yoktur.

Bu çalışmada amniyotik sıvı hücreleri açık ve kapalı sistemde değişik besiyerleri kullanılarak, açık sistemde 25 cm² lik flasklere, kapalı sistemde 10 mL' lik altı düz tüplere ekildi ve olgu başına maliyet, enfeksiyon gelişimi, mitotik indeks, çalışma süresi ve besiyeri değişim sayısı açılardan incelendi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Amniyotik sıvı hücre kültürünün açık ve kapalı sistemlerdeki kullanımlarını kıyaslamak amacıyla 1999 yılı Nisan ve Ekim ayları arasında yapılan bu çalışmada 100 amniyotik sıvı incelemesi çalışmaya alındı. Kapalı sistem için 1 adet altı düz 10 mL' lik tüpe, açık sistem için 25 cm² lik 2 adet flaske ekim yapıldı. Gelen materyalin ³/_V ü açık sistem için, %' ü kapalı sistem için kullanıldı. Bu amaçla

amniyotik sıvı örnekleri 1100 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi ve aşağıda yazılı yöntemler uygulandı.

Kapalı yöntem

Alt kısmı düz 10 mL' lik tüplere 1,5 - 2,5 mL arasında değişen miktarlarda besiyeri eklendi. 37 °C deki kuru inkübatörde inkübe edildi. Yedi gün sonra yapılan kontrol de hücre üremesi durumunda 1 mL besiyeri değişikliği yapıldı. Koloniler uygun büyüklükte ve sayıda olduğunda kültür ortamına kendi içinde pasaj (KİP) yapıldı. KİP' ten 1 - 2 gün sonra kültür ortamı çalışmaya alındı. 2 mL verse ne ile kültür ortamı yıkandı ve 0,5 mL tripsin eklendi. 30 sn 37 °C etüvde bekletildikten sonra 1,5 - 2,5 mL besiyeri eklendi ve tekrar inkübatöre kondu. Bir dizem "colchemide" eklendi ve 3 saat inkübatörde 37 °C'de bekletildi. Besiyeri boşaltıldıktan sonra 1 mL tripsin eklendi. 30 sn 37 °C inkübatörde bekletildi. 10 mL hipotonik eklendi ve bu şekilde 15 dakika inkübatörde bekletildi. 10 dakika 1100 rpm' de santrifüj edilen tüpün süpernatanı atıldı. Dipte kalan hücre çökeltisi üzerine hafif darbeler eşliğinde 1:3 oranında asetik asit / metanol karışımı damla damla olacak şekilde toplam 10 mL eklendi. 15 dakika bekledi ve 1100 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi ve işlem 3 kez tekrarlandı. Kullanılan besiyeri 100 mL 1xHam's F10 (Hepes tamponu eklenmiş), 30 mL Chang-D, 10 mL fetal calf serum, 2 mL ultroser-G, 2,6 mL Penisilin/Streptomisin ve 2,6 mL L-Glutamin karışımıydı.

Açık yöntem

Gelen materyal 1100 rpm' de santrifüj edildikten sonra amniyotik sıvı dibinde kalan hücre tortusu 25 cm² lik flasklere geçirildi ve 4' er mL besiyeri kondu. Yedi gün sonra yapılan kontrolde hücre üremesi durumunda 4 mL besiyeri değişikliği yapıldı ve koloniler uygun büyüklükte ve sayıda olduğunda kültür ortamı çalışmaya alındı. Bu amaçla 2 dizem colchemide eklendi ve 3 saat 15 dakika inkübatörde 37 °C'de bekletildikten sonra besiyeri boşaltıldı ve 2 mL serumsuz ortam kullanılarak hücre kültürü yıkandı. Flask içine 0,5 mL tripsin eklendi ve 5 saniye bekletildikten sonra tripsin geri alındı. Kültür ortamı 5 dakika inkübatörde tutulduktan sonra 5 mL serumlu ortam ilave edildi ve santrifüj tüpüne aktarılan hücreler 1100 rpm' de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Dipte kalan hücre tortusu üzerine 5 mL hipotonik eklendi ve 20 dakika inkübatörde bekletildi. On dakika 1100 rpm' de santrifüj edilen ve üst kısım atılan tüpün dibinde kalan hücre çökeltisi üzerine hafif darbeler eşli

ğinde 1:3 oranında asetik asit / metanol karışımı damla damla olacak şekilde toplam 5 mL eklendi ve 15 dakika beklendi. 1100 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek işlem 3 kez tekrarlandı. Besiyeri olarak BioAmf I kullanıldı.

Mitotik indeks her bir örnek için 1000 hücrede görülen metafaz oranına bakılarak hesaplandı.

Kültür süresi, bir örneğin ekime başlanmasından çalışma ya alındığı tarihe kadar geçen süre olarak değerlendirildi.

Maliyet hesabında yalnızca kullanılan besiyerleri, tüp ve flaskler göz önünde tutuldu. Her bir örnek için harcanan besiyeri ve kullanılan flask ya da tüplerin fiyatları hesaplandı. Bu amaçla bir şişe içindeki besiyerinin mililitre fiyatı hesaplanarak kullanılan tüp ya da flask başına harcanan besiyeri miktarı ile çarpıldı, istatistik değerlendirmede varyans analiz yöntemi kullanıldı.

BULGULAR

incelemeye alınan 100 amniyotik sıvı örneğinden kapalı sisteme ekilenlerin tamamında hücre üremesi saptandı. Bunlardan 1 tanesinde hücre üremesi saptanmasına rağmen yeterli sayıda ve kalitede metafaz elde edilemedi. Açık sisteme ekilen 100 amniyotik sıvı örneğinden 28'i çeşitli nedenlerle çalışmadan çıkarıldı. Dördünde mantar kontaminasyonu oldu.

Yöntemlerde kullanılan besiyerleri, tüp ve flasklerin maliyetlerinde kapalı sistem için hazırlanan besiyerinin şişe başına (140 mL) fiyatı 121 USD (0,86 USD/mL), tüpü 1,12 USD; açık sistem için kullanılan besiyerinin şişe başına fiyatı (100 mL) 102 USD (1 USD/mL) ve flask 12 USD olarak hesaplandı. Kapalı sistemde bir tüp çalışmaya hazır hale gelinceye kadar tüp başına yapılan harcama 6 USD ve açık sistemde bir flask başına yapılan harcama 25 USD olarak bulundu. Açık sistemde bir flask başına yapılan harcama, kapalı sistemde bir tüp çalışmaya hazır hale gelinceye kadar yapılan harcamaya oranla yaklaşık 4 misli daha pahalı olarak bulundu. Bu değerlere besiyeri, tüp ve flask dışında yapılan harcamalar dahil edilmedi.

Mitotik indeks için her 1000 hücredeki ortalama metafaz sayısı tespit edildi ve buna göre açık sistemde ortalama indeks $10,46 \pm 12,76$; kapalı sistemde $9,16 \pm 9,75$ bulundu (Tablo 1). Açık ve kapalı sistemin mitotik indekslerinin varyans analizi sonucu anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).

Açık hücre kültürlerinde çalışmaya alınan 68 olguda çalışmaya başlayınca kadar geçen süre ortalama $14,00 \pm 4,55$ gün, kapalı sistemde ise toplam 100 olguda $13,19 \pm 3,60$ gün olarak bulundu. Açık ve kapalı sistemin hücre kültür sürelerinin varyans analizi sonucu anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).

Besiyeri değişim sayısı açık sistemde toplam 68 olguda ortalama flask başına $2,33 \pm 1,33$; kapalı sistemde ise toplam 100 olguda ortalama tüp başına $1,29 \pm 0,46$ 'dı. Açık ve kapalı sistemin hücre kültürü besiyeri değişim sayılarının varyans analizi sonucu anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,0001$).

Tablo 1. Açık ve kapalı hücre kültür sistemlerinin mitotik indeks, kültür süreleri (gün) ve besiyeri değişim sayılarının karşılaştırmalı dağılımları

Hücre kültür sistemi	Olgu sayısı	Ortalama indeks (1000 hücrede metafaz sayısı)	Ortalama süre (gün)	Ortalama değişim sayısı (gün)
Açık	68	$10,46 \pm 12,76$	$14,00 \pm 4,55$	$2,33 \pm 1,33$
Kapalı	100	$9,16 \pm 9,75$	$13,19 \pm 3,60$	$1,29 \pm 0,46$

TARTIŞMA

Nisan ve Ekim ayları arasında yapılan ve iki ayrı inkübatör ve kültür ortamına ekilen 100 adet amniyotik sıvı inceleme örnekleri mitotik indeks, kültür süresi ve maliyet açılarından karşılaştırıldı. Bunlar yanında kullanılan besiyerleri ve hücre kültür ortamlarında göze çarpan bazı noktalar tartışıldı.

Kapalı sistemde incelemeye alınan toplam 100 örneğin tamamında hücre üremesi saptandı. Ancak 1 tanesinde yeterli sayıda metafaz elde edilemedi. Prenatal sitogenetik çalışmalarda yeterli sayıda metafaz bulunması hem sonuçların daha erken verilmesi hem de çalışmalarda daha az materyal harcanması ve dolayısıyla daha az iş gücü ve ekonomik kaybın sağlanması açısından önemlidir. Çalışmamızda açık ve kapalı sistemlerde hazırlanan hücre yaymalarında mitotik indeks açısından anlamlı bir fark yoktu (Tablo 1). incelenen metafazların kalitesi her iki sistemde farklılık göstermedi. Açık sistemin doğal ortama daha yakın bir kültür ortamı oluşturması nedeniyle daha bol sayıda mitozaya yol açması beklenmekle birlikte bu çalışmada kapalı sistemle benzer mitotik indeks oranları saptanmıştır. Kapalı sistemde kullanılan besiyerinin Chang-D, Ultrosor-G ve fetal calf serum gibi mitozu arttıran besiyerleri ile zenginleştirilmesinin ve yapılan kendi içinde pasajın açık sistemdeki kadar yüksek bir mitotik indeks elde edilmesinde etkili olduğu düşünülebilir.

Hücre kültür süreleri de her iki sistemde çok farklı değildi (Tablo 1). CO₂'li ortamda yapılan amniyotik sıvı hücre kültürlerinde çalışma başlayınca kadar geçen süre Young ve ark.'lan tarafından yapılan bir çalışmada 17 gün, Shalev ve ark.'ları tarafından yapılan bir diğer çalışmada da 7,9 gün olarak belirtilmektedir (5,6). Kennerknecht ve ark.'lan 13 haftalık gebe olgulardan alınan amniyotik sıvı

hücrelerinde açık sistemle 14,4 gün sonra çalışmaya başlamışlardır (3). Eiben ve ark.'ları ise erken amniyosentez yapılan olgularda çalışmaya başlayıncaya kadar geçen süreyi 14,5 gün olarak bulmuşlardır (2). Çalışmada bu süre açık sistemde 14,00±4,55 gün, kapalı sistemde 13,19±3,60 gün olarak bulundu.

Harcanan besiyeri miktarının, her iki sistemde kullanılan flask ve tüpler için değiştirilen besiyeri miktarına bağlı olduğu ve bu da maliyeti etkilediği için olgu başına ortalama besiyeri değişikliği sayısı da hesaplandı. Buna göre açık sistemde 2.33±1.33 defa; kapalı sistemde 1.29±0.46 defa besiyeri değişikliği yapıldı ($p<0.0001$). Bunun her besiyeri değişikliğinde kullanılan besiyeri miktarıyla çarpılmasıyla harcanan toplam besiyeri miktarı bulundu ve buna göre o günkü fiyatlar üzerinden açık sistemde flask başına yapılan harcama, kapalı sistemde tüp başına yapılan harcamaya göre 4 misli daha pahalı olarak hesaplandı. Bu değerlere besiyeri, tüp ve flask dışında yapılan harcamalar dahil edilmedi.

Açık sistemde ortamda CO₂ ve nem bulunması gerekir. Sistem doğal ortama daha yakın bir ortam sağlamakla birlikte CO₂ ve neme bağlı olarak bazen beklenmedik sorunlara da neden olabilmektedir. Çalışmadan çıkarılan 24 materyalde sonradan CO₂ tüpünden kaynaklandığını saptadığımız bir sorun yaşandı ve hücre üremesi olmadı. CO₂ tüpünün içinde neyin bu soruna yol açtığı bulunamadı, fakat boşaldıkça doldurulan tüpün değiştirilmesi ile hücre üremesindeki aksaklık ortadan kaldırıldı. Hücre

kültürlerinde genelde mantar ve bakteriyel enfeksiyonlar görülür. Bunlardan mantar kontaminasyonu inkübatördeki su ve nemli ortam nedeniyle çok kolay gelişmekle birlikte bakteriyel kontaminasyonlar genellikle çalışan kişilerin steriliteye dikkat etmemeleri ve kullanılan maddelerin kontamine olmaları nedeniyledir. Çalışmada sekiz materyalde kontamine olmuş bir besiyerinin aynı gün açık hücre kültürlerinin besiyeri değişiminde kullanılması nedeniyle bakteriyel enfeksiyon gelişti ve araştırma kapsamından çıkarıldı. Mantar kontaminasyonu açık sistemin en büyük dezavantajıdır ve enfeksiyon kolaylıkla diğer hücre kültür ortamlarına geçebilir. Bu çalışmada dört kültür ortamında mantar kontaminasyonu gelişti (%5,8).

Bu çalışmada açık sistemde kullanılan inkübatörün ısısının özellikle yaz aylarında ve sıcak günlerde optimal şartlarda tutulmasında zorluklarla karşılaşıldı.

Sonuç olarak çoğu laboratuvar tarafından kullanılan açık sistem hücre kültürünün yanında Türkiye şartlarında, kapalı sistemle de hücre kültürünün hazırlanması güvenlik açısından yararlı olabileceği gibi maliyet ve işlemin verimliliği açısından da olumlu katkıda bulunabilecektir. Hücre kültürlerinin hazırlanmasından kromozom düzeyinde değerlendirme aşamasına kadar her basamağında deneyimin çok büyük önemi vardır. Her iki hücre kültür yöntemi ve kullanılan malzemeler temelde benzer olmakla birlikte bütün şartlar optimal olsa da çalışmayı yapacak kişi, elde edilecek metafaz sayısı ve kalitesinde en önemli rolü oynayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Cooper GM: *The Celi: A molecular approach*, Chapter I. Washington D C, ASM Press, 1997;30-31.
2. Eiben B, Goebel R, Hansen S, Hammans W: Early amniocentesis a cytogenetic evaluation of over 1500 cases. *Prenat Diagn* 1994;14: 497-501.
3. Kennerknecht I, Baur-Aubele S, Grab D, Terinde R: First trimester amniocentesis between the seventh and 13th weeks: evaluation of the earliest possible genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 1992; 12: 595-601.
4. Rooney DE, Czepulkowski BH: *Human Cytogenetics, A practical Approach*, Vol I, Constitutional analysis, Chapter 3. Second edition, (Ed: Rooney DE, Czepulkowski BH). Oxford University Press, 1992, 55-72.
5. Shalev E, Weiner E, Yanai N et al: Comparison of first-trimester transvaginal amniocentesis with chorionic villus sampling and mid-trimester amniocentesis. *Prenat Diagn* 1994;14: 279-283.
6. Young SR, Shipley CF, Wade RV et al: Single-center comparison of results of 1000 prenatal diagnoses with chorionic villus sampling and 1000 diagnoses with amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165: 256-61.