

Göğüs Hastalıklarında *In Vitro* Araştırma Yöntemleri

In Vitro Research Methods in Pulmonary Medicine

Hasan Bayram

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

Özet

Abstract

In vivo olarak insan veya deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalar ciddi güvenlik, etik ve yasal sorunları beraberinde getirmektedir. Bu nedenle deney hayvanları veya insanlardan alınan doku örneklerinden laboratuvar ortamında hücre kültürleri elde edilerek araştırmalarda kullanılmaktadır. Hücre kültürleri, ticari olarak hücrelerin ölümsüzleştirilmesiyle elde edilen hücre dizilerinden elde edilebileceği gibi, primer olarak doğrudan hayvan veya insandan alınacak örneklerden de elde edilebilir. Primer hücre kültürleri, genetik ve diğer özellikleri ile *in vivo* ortamı daha iyi temsil ettiklerinden araştırmalarda daha güvenilir ve gerçekçi bilgiler vermektelerdir. Diğer yandan gerek *in vivo* gerekse de *in vitro* ortamda elde edilen biyolojik örneklerin değerlendirilebilmesi için çeşitli laboratuvar tekniklerine ihtiyaç vardır. Bu yazıda, solunum sisteminin hücre kültür yöntemleri tartışılırken, sağlık bilimlerindeki araştırmalarda en sık başvurulan laboratuvar ve moleküler analiz yöntemleri hakkında genel bilgi verilmiştir. Okuyucu bu yöntemleri çalışmalarında kullanırken gerek internet ortamında, gerekse de basılı olarak bulunan kaynaklardan daha ayrıntılı bilgi almalıdır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Solunum sistemi, hücre dizisi, primer kültür, laboratuvar teknikleri

In vivo studies on experimental animals and humans raise serious safety, ethical, and judicial questions. Therefore, cell cultures obtained from experimental animals and humans are used for research. Cell cultures can be obtained from commercial cell lines, which are created by the immortalisation of cells, as well as from tissue samples of animals and humans, which are referred to as primary cell cultures. Primary cells give more realistic and reliable information with respect to their genetics and other features since they represent the *in vivo* condition better. On the other hand, there is a need for various laboratory techniques for the evaluation of biologic samples that can be obtained from both *in vivo* and *in vitro* settings. While the present paper discusses cell culture methods of the respiratory system, it provides general information on laboratory and molecular analysis techniques that are used in the health sciences. More detailed information is available from online or printed sources for those wishing to use them in their research.

KEY WORDS: Respiratory system, cell line, primary culture, laboratory techniques

GİRİŞ

Sağlık bilimlerinde yapılan araştırmaların *in vivo* ortamda gerek insan, gerekse de deney hayvanları üzerinde yapılması, çoğunlukla güvenli olmamakta ve ciddi yasal-etik sorunları beraberinde getirmektedir. Bu nedenle deney hayvanları veya insanlara ait organ ve dokulardan alınan örneklerden laboratuvar ortamında çeşitli yöntemlerle hücre kültürleri elde edilmekte ve araştırma amaçlı kullanılmaktadırlar. Hücre kültürü çalışmalarını yürütecek teknik alt yapıyı kurmak gerek maliyet gerekse de teknik açıdan zor değildir. Mütevazı bir bütçe ile teknik alt yapı kurularak, bu iş için gerekli eğitim alındıktan sonra hücre kültürü kolayca yapılabilir. Hücre kültürleri ya çeşitli yöntemler ile ölümsüz ('immortal') hale getirilmiş hücrelerden elde edilen ve ticari olarak temin edilebilen hücre dizileri ile doğrudan hayvan veya insan dokusundan alınan örneklerden primer olarak elde edilebilir. Diğer yandan gerek *in vivo* ortamda insan veya deney hayvanlarından, gerekse de *in vitro* ortamda hücre kültürlerinden elde edilen örneklerden yapılan araştırmanın amacına uygun belli bir takım analizlerin yapılabilmesi için belli cihazlara ve kullanılacak *in vitro* yöntemlerin bilinmesine ihtiyaç vardır. Bu yöntemler kullanılmak suretiyle bir numunede protein analizi yapılabileceği gibi, bir takım genlerin ekspresyonu araştırılabilir. Yine örneklerdeki hücre tipleri, sayıları ve hücrelerin çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenebilir.

Bu bölümde temel olarak solunum sistemine yönelik olarak kullanılan hücre kültür yöntemlerinden hücre dizilerine kısaca değinilirken, ağırlıklı olarak primer hücre kültür yöntemleri anlatılacaktır. Bu arada sağlık bilimlerindeki araştırmalarda en çok kullanılan akım ('flow') sitometri, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)/Enzyme Immuno Assay (EIA), elektroforez ('western blot' vb.), polimeraz zincir reaksiyonu ('polymerase chain reaction', PCR) ve DNA dizi analizi gibi *in vitro* yöntemler hakkında genel bilgi verilirken proteomic, genomic vs gibi yöntemlerden çok kısa söz edilecektir. Araştırmacılar söz konusu yöntemler hakkında ayrıntılı bilgiyi yazının sonundaki kaynaklardan edinebilirler.



Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Hasan Bayram, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, 27310 Gaziantep, Türkiye Tel: +90 342 360 60 60-76163 E-posta: bayram@gantep.edu.tr

©Telif Hakkı 2013 Türk Toraks Derneği - Makale metnine www.toraks.dergisi.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2013 by Turkish Thoracic Society - Available online at www.toraks.dergisi.org

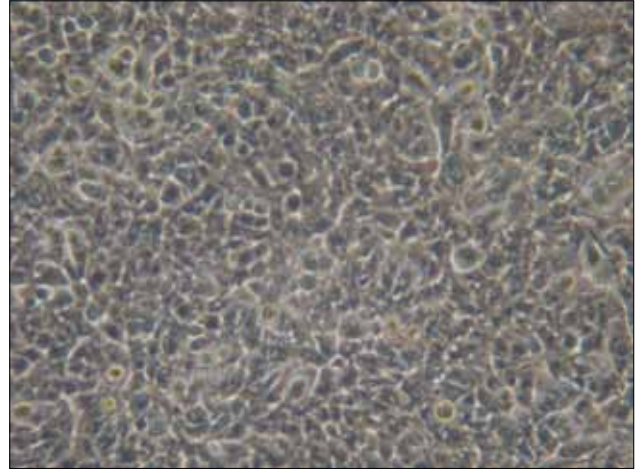
Solunum Sisteminin Hücre Kültürleri

Herhangi bir doku veya organdan alınacak numune hemen her zaman birden fazla hücre tipini bir arada bulundurmaktadır. Bu nedenle spesifik bir tip hücreden bir hücre popülasyonu elde edebilmek için hücre biyologları çeşitli yöntemler geliştirmişlerdir [1]. Eğer hücreler kompakt bir dokunun içinde yer alıyorsa (örneğin, hava yolu epitel hücreleri), önce etrafındaki dokudan serbestleştirilmeleri gerekir [1,2]. Bu mikroskop altında diseksiyon yöntemiyle olabildiği gibi, tripsin gibi çeşitli enzimlerin yardımıyla da yapılabilmektedir [1,3,4]. Sonraki aşamada bu hücrelerin bir birinden ayrılması gerekebilmektedir. Bu aşamada akım sitometri cihazlarının yardımıyla floresan aktive edilmiş hücre ayırma yöntemleri kullanılabilir [1]. İzole edilen bu hücrelerin kültür ortamında çoğaltılmaları sonucu ortaya çıkan hücre kültürlerine, primer kültürler denmektedir. Ancak vertebralı canlıların çoğunun hücreleri belli sayıdaki bölünmeden sonra çoğalamaz. Örneğin insan fibroblastları kültür ortamında 25-50 kez bölünürler. Bu özellikten dolayı insan hücreleri sonsuza kadar çoğalma yeteneği kazanıp kanserleşmezler. Bununla beraber, laboratuvar ortamında bu hücreler telomerazlarının katalitik alt ünitelerini kodlayan gen ile bir araya getirilerek sonsuza dek üreme yetenekleri kazandırılabilir. Böylece genetik değişiklik sonucu sonsuza dek bölünme özelliği kazanan hücrelere immortalize (ölümsüzleştirilmiş) hücreler denmekte ve kültür ortamında hücre dizileri ('cell line') olarak adlandırılmaktadırlar. Bu hücreler laboratuvar ortamında istedikleri miktarlarda çoğaltılıp kullanılabilirler [1].

Solunum Sistemi Hücre Dizi ('cell line') Kültürleri

Solunum sistemi hücre dizilerinden BEAS-2B hücreleri, insan bronş epitelyumundan elde edilmiş olup bir adenovirus 12-SV40 virus hibrid (Ad12SV40) ile infekte edilerek klonlama yoluyla elde edilmişlerdir. 16 HBE-140- hücreleri de insan bronş epitel hücrelerinden virus transformasyonu yoluyla üretilmişlerdir. Buna karşın, A549 hücreleri insan akciğer karsinoma hücrelerinden elde edilmişlerdir ve daha çok alveolar epitel hücre özellikleri taşırlar [1,2,5]. Bunlardan başka, solunum yollarının ve akciğerin çeşitli hücrelerinden diziler elde edilmiştir. Hücre dizilerinin en önemli avantajları kolay temin edilebilmeleridir. Bir kez elde edildiklerinde dondurulmak suretiyle ihtiyaç halinde çoğaltılarak kullanılabilirler. American Type Culture Collection (ATCC) gibi kurumlardan ücret karşılığında bu hücre dizileri elde edilebilmektedir. En önemli dezavantajları, genetik yapıları değiştirilmiş hücreler oldukları için bünyede sahip oldukları genotipik ve fenotipik özelliklerinin tamamını taşımazlar [1].

Solunum yolu hücre dizileri araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak üretilip kullanılabilirler. Başta kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve astım gibi patolojiler olmak üzere çeşitli solunum sistemi hastalıklarında alveol epitel hücrelerinin rolünün anlaşılmasında, inflamasyon ile ilgili mekanistik çalışmalar ile çevresel ajanların hücre düzeyindeki etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. A549 hücreleri ATCC gibi kuruluşlardan satın alınarak laboratuvar ortamında çoğaltılmak suretiyle bu tür çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kültür ortamında kolayca üretilen bu hücreler, birkaç günde kullanıma hazır hale gelebilmektedir (Şekil 1). Ülkemizde kısıtlı da olsa çeşitli araştırma laboratuvarlarında bu tür hücre dizileri kullanılmaktadır.



Şekil 1. Kültür ortamında deneysel kullanıma hazır alveolar epitel (A549) hücre dizileri

Solunum Sisteminin Primer Hücre Kültürleri

Başta üst ve alt solunum yolları olmak üzere, solunum sisteminin çeşitli organlarından primer hücre kültürü elde edilebilmektedir. Bu amaçla, fibroblast, hava yolu düz kas, hava yolu epitel hücre ve alveolar epitel hücre kültürleri üretilebilir. Söz konusu hücreler, başka amaçla alınan dokudan (örneğin, ameliyat materyali, post-mortem doku) elde edilebileceği gibi sağlıklı veya astım, KOAH gibi çeşitli patolojileri olan gönüllülerden fırçalama veya biyopsi yöntemi ile de elde edilebilirler [2-6]. Primer hücrelerin en önemli avantajları, kültür edildikleri ortamlarda *in vivo* genotipik ve fenotipik özelliklerini büyük ölçüde korumalarıdır. Ayrıca, çeşitli hastalık grupları ile spesifik çalışma yapma olanağı sağlarlar. En önemli dezavantajları, gerek biyopsi veya fırçalama uygulanabilecek gönüllü donörlerin ve diğer doku kaynaklarının teminindeki güçlüktür. Bundan başka, istenen hücreleri elde edebilmek için karmaşık ve zaman alıcı yöntemlere ihtiyaç duyulmakta, çoğu zaman bu kültürleri yapabilmek için belli bir eğitime gereksinim olmaktadır [2].

Hava Yolu Düz Kas Hücre Kültürleri

İnsan hava yolu düz kas hücreleri çeşitli nedenlerle akciğer rezeksiyonu veya transplantasyonu uygulanan hastaların trakea veya bronş halkalarından elde edilebilir [7,8]. Hirst [7] ve Xie ve ark.'larının [8] yöntemine göre, trakea veya bronş halkaları 4-5 kez gentamisin veya penisilin ve streptomisin ile amfotersin B içeren tamponlanmış tuzlu Hank solüsyonu ile ('Hank's buffered salt solution', HBSS) yıkanır. Diseksiyon mikroskobu kullanılarak, yapışık konnektif doku adventisyal yüzeyden ve epitelyumdan steril bistüri yardımı ile ayrılır. Son olarak düz kas kartilajdan temizlenir ve yaklaşık 1mm³'lük parçalara kesilir. Doku parçacıkları kültür 'flask'ları veya kaplarına konur ve dokunun yüzeyini hafifçe kaplayacak şekilde %10 fetal buzağı serumu (foetal calf serum, FCS), sodium pyruvate, L-glutamin, esansiyel olmayan amino asitler ve antimikrobiyal ajanlar içeren Dulbecco'nun moifiye vasatına (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) konur. İlk 3-4 gün, hücrelerin kültür kaplarına temas etmelerini ve yapışmalarını sağlamak için sadece doku yüzeyini kaplayacak şekilde az miktarda vasat konur. Hücre kültürleri yeterli hacme ulaştıktan sonra fiziksel olarak kazınarak veya tripsin yardımıyla serbestleştirilerek başka kültür kaplarına ekim için transfer edilebilir. Bu şekilde hü-

relerin birkaç alt pasajı elde edilerek deneylerde kullanılabilir. Bu yöntemin farklı modifikasyonları değişik araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır [7,8].

Fibroblast Kültürleri

Fibroblast kültürleri de çeşitli nedenlerle lobektomi veya pnömonektomi gibi akciğer rezeksiyonu uygulanan hastaların cerrahi eksplantlarından elde edilebilir [9]. Bu iş için, tümör veya hasta akciğerden uzak doku alınarak küçük parçacıklara 3-5 mm kesilerek %10 FCS ile kaplanan kültür flasklarına konur. Fibroblastların dokudan çevreye doğru çoğalmaları beklenir. Yeterli alan hücre ile kaplandıktan sonra doku alınır ve hücrelerin yüzeyi tamamen kaplaması beklenir. Hücreler daha sonra tripsin yardımı ile yerlerinden ayrılarak ileri pasajlar elde edilebilir [9].

Alveolar Epitelyal Hücre Kültürleri

Bu amaç için daha çok Tip II alveolar epitelyal hücrelerin kültürleri elde edilir. Bu hücrelerin elde edilmesi nispeten karmaşık yöntemleri gerektirir [5,6]. Hücre kaynağı olarak da, Fang ve ark.'nın [10] yaptığı gibi konsolide olmayan ve hemoraji gelişmemiş akciğer eksplantı kullanılabilir. Bu yöntem göre, transplant için alınan, ancak kullanılmayan ve 4°C'de muhafaza edilen akciğer kadavrası 4-8 saat içinde kullanılabilir. Pulmoner arter 37°C'de fosfat ile tamponlanmış solüsyon ('phosphate buffered saline, PBS) solüsyonu ile perfüze edildikten sonra distal havalı alanları ılık Ca ve Mg içermeyen PBS solüsyonu ile 10 defa yıkanır. Daha sonra, elastaz içeren Ca ve Mg bulandırmayan HBSS solüsyonu segmental bronşiyal intübasyon yapılarak distal hava yollarına uygulanır. Kırk beş dakika süre ile enzimatik digesyona maruz bırakılan akciğer FCS ve DNaz varlığında kıyılarak ince parçacıklara ayrılarak, hücreden zengin fraksiyon çeşitli süzme teknikleri ile filtre edilir. Solüsyon daha sonra, Percoll dansite gradiyenti uygulanarak 1500 rpm hızında 20 dak süre ile santrifüje edilerek, üstte kalan tip II pnömosit ve alveolar makrofaj karışımından oluşan bant toplanır ve 800 rpm hızında 10 dakika süre ile santrifüje edilir. Hücre topluluğu %5 FCS içeren Ca ve Mg içermeyen PBS ile yıkanır ve süspansiyon haline getirilir. Daha sonra, hücreler anti-CD-14 antikoru ile kaplı manyetik bilyeler ile 4°C'de 40 dakika devamlı karıştırılmak suretiyle inkübe edilir. Inkübasyon periyodunun sonunda manyetik bilyeler bir mıknatıs yardımı ile ortamdan uzaklaştırılarak, geriye kalan hücre süspansiyonu insan Ig G ile kaplı doku kültürü için hazırlanmış Petri kutusunda nemlendirilmiş inkübatörde (%5 CO₂ ve 37°C) 90 dakika inkübe edilir. Yapışmayan hücreler toplanarak sayılır, hücre canlılığı trypan blue eksklüzyon metodu ile belirlenirken, izole edilen insan Tip II hücrelerinin saflığı Papanicolaou boyası ile belirlenir [10].

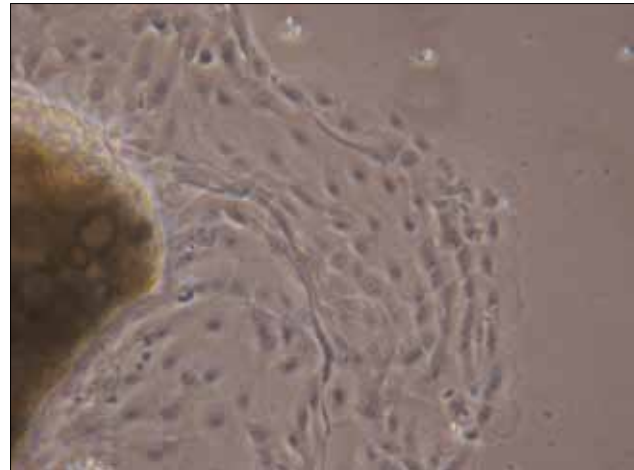
Bronş Epitel Hücre Kültürleri

Bronş epitel hücreleri, hava yolu hastalıklarının patogenezi ve inhale toksik ajanlar ve hava yollarına yönelik zararlıların etkilerini araştırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmakla birlikte, ülkemizde primer eksplant kültür tekniği kullanılarak ilk kez laboratuvarımızda üretilmeye başlandılar. Bu amaç için insan bronş epitel hücreleri (İBEH) çeşitli yöntemler kullanılarak izole edilebilir ve kullanılabilir. Bunlardan biri fırçalama yöntemidir. Bunun için bronkoskopi yardımı ile ana bronşlara fırçalama uygulanır, elde edilen hücreler daha sonra kollajen ile kaplı kültür flasklarına alınır. Kültür flasklarına alınan hücreler serumsuz, hormonla zenginleştirilmiş

bronş epiteli büyüme vasatı içinde penisilin ve streptomisin bulunan vasatta 37°C'de, %5 CO₂'li, nemlendirilmiş ortamda inkübe edilir ve yeterli hacme ulaşmış kültürler deney için kullanılır [2,5,6].

Hücre kaynağı olarak çeşitli nedenlerle alınan akciğer eksplantının kullanıldığı çalışmalarda ise epitel hücrelerini bronş dokusundan ayırmak için çoğunlukla enzimatik sindirme yöntemleri gibi hücrelerin morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini etkileyebilen yöntemler kullanılmıştır [4]. Bizim hücre kültürü çalışmalarımızda, primer eksplant tekniği kullanılarak, hücreler herhangi bir kimyasal veya enzimatik işleme tabi tutulmadan izole edilmektedir [3,6]. Lobektomi veya pnömonektomi uygulanan hastaların cerrahi eksplantları kullanılabilir gibi, istenildiği şekilde karakterize edilmiş sağlıklı veya atopik astmatik bireylerin veya KOAH'lıların bronş biyopsi eksplantlarından diseksiyon mikroskopunun yardımı ile bronş epitelyum tabakası ayrılarak 1-2 mm³ veya 0,5-1 mm³ (biyopsi çalışmaları) ebadındaki parçacıklara bölünür (Şekil 2) [11,12]. Doku parçacıkları önceden ıslatılmış antibiyotik ve antimikotik içeren 'Medium 199' adlı vasatla 3 kez yıkandıktan sonra, FCS, bovine pancreatic insulin, human transferin, epidermal growth factor, hydrocortisone, L-glutamine ve antibiyotik/antimikotik içeren 'Medium 199' bulunan kültür ortamına konur. Amaçlanan çalışmalara göre primer BEH kültürleri plastik kültür kaplarında veya yarı geçirgen membran içeren 'insert'ler üzerinde üretilebilir. Son çalışmalarımızda, plastik kültür kaplarında üretilen hücreler tripsin yardımı ile kaldırıldıktan sonra kültür kuyucuklarına ('well') aktararak üretildiler [6,11-15]. Bu yolla hücre sayıları standardize edilerek ilgili çalışmalarda kullanılabilirler [6]. Başlangıçta kültür kabı, 'insert' veya kuyucuğun büyüklüğüne uygun olarak eksplantın üzerini hafifçe örten miktarda vasat konurken, hücreler kültür ortamında zemine yapıştıktan sonra biraz daha fazla oranlarda vasat kullanılarak her 2-3 günde bir kültür vasatı değiştirilir. Kültürler genellikle 2-3 haftada deney için kullanıma hazır hale gelirler.

Hücreler kültür kap yüzeyini %80-90 oranında kapladıktan sonra doku eksplantları penset ile alınarak ortaya çıkan boşluğun hücreler tarafında doldurulması için 1-2 gün daha bekletilir. Bu arada alınan eksplantlar hücre kültürü elde etmek için ikinci kez kullanılabilir. Ancak yaptığımız göz-



Şekil 2. Sağlıklı bir bireyden alınan biyopsiden elde edilen bronş epitel hücrelerinin kültür ortamında 3 gün sonraki görünümü

lemler, doku eksplantları ikinci kez kullanıldığında, siliyalı hücre sayısı ve mediatör sentezleme yetenekleri açısından birtakım değişikliklere uğrayabileceklerini göstermektedir [15]. Dolayısıyla, ideali eksplantın sadece bir kez kullanılmasıdır. Kültürler deney için kullanılmadan 24 saat önce kültür vasatı FCS ve diğer hormon ve growth faktörleri içermeyen Medium 199 vasatına konarak, istenen deneysel amaçlar için kullanılabilirler.

Plevra Mezotelial Hücre Kültürü

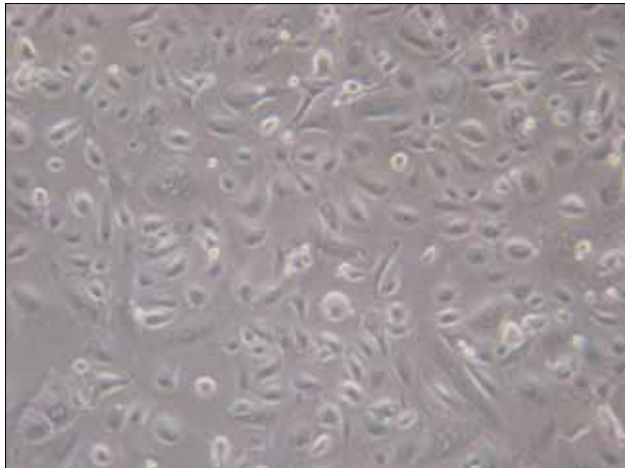
Plevra sıvısının hücre içeriği çoğu monosit, az miktarda lenfosit, makrofaq, mezotel hücresi, polimorfonukleer lökositlerden oluşur ve μL 'de yaklaşık 1500 hücre bulunur. Mezotel hücreleri, her natürdeki plevra sıvısında (transüda, eksüda, hemorajik sıvı vb.) bulunduğundan teorik olarak her tür plevra sıvısından bu hücrelerin kültürünü elde etmek mümkündür. Ancak, sağlıklı mezotel hücre kültürü elde edilmek isteniyorsa transüda yapısındaki plevra sıvısının kullanılması gerekir.

Laboratuara ulaştırılan plevra sıvısı $+4^\circ\text{C}$ 'de 4000 rpm'de 5 dakika çevrilerek hücreler çöktürülür. Üst faz aspire edildikten sonra altta kalan hücre peletlerinin üzerine 2-3 mL %0,85'lik amonyum klorit eklenip homojenize edilir. Örnekler oda ısısında 10 dakika bekletilerek ortamda bulunan kan hücrelerinin parçalanması sağlanır. Örnekler 4000 rpm'de 24°C 'de 5 dak. santrifüj edildikten sonra üst faz aspire edilir ve kan hücreleri uzaklaştırılmış olur. Altta kalan pelet üzerine 10 mL %20 FBS, antibiyotik-antimikotik ve 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamisin içeren DMEM vasatında kültür flasklara ekilir. 37°C 'de %95 nem ve %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edilir. Hücreler flasksın tabanını kapladıktan sonra kaldırılarak sayılırlar. Hücreler yeni kültür ortamına (flask, 'plate' vb.) aktarılabilir gibi, daha sonra kullanmak üzere %10 DMSO ve %10 FCS içeren DMEM besiyeri içinde, sıvı azotta dondurularak saklanabilir, istendiğinde tekrar çözülürülerek kültürleri yapılabilir (Şekil 3) [16,17].

In Vitro Araştırma Teknikleri

Akım Sitometri

Akım sitometri, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir sıvının içindeyken özelliklerin ölçülmesidir. Akım sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir;

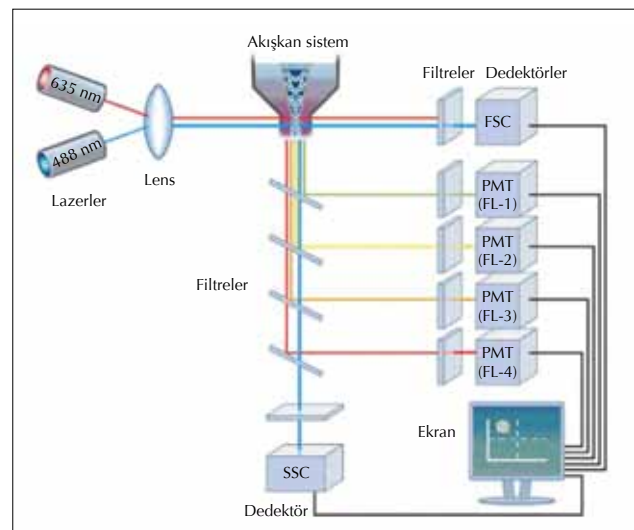


Şekil 3. Primer mezotel hücre hücre kültürü ('Hoffman Modulation Contrast' Işık Mikroskopi, x400)

hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabilir gibi; hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir. Akım sitometrilere floresen olmayanları tam kan hücresi sayımları için klinik laboratuarlarda kullanılır. Daha çok araştırmalar için floresen olanları kullanılır. Bunlara sitofluorometre denir [18-20].

Akım sitometrilere; akışkanlar, lazer optikler, elektronik dedektörler, analog dijital çevirmiciler ve bilgisayarları içerir. Optik kısım lazer ışığı yayar ve ışını birkaç hücre çapının oluşturduğu demet üzerine odaklar [19]. Hücrelerin akım sitometrik analizde ölçülen özelliklerine göre ayrılması işleme floresanla aktive edilmiş hücre ayrışması ('fluorescence-activated cell sorting', FACS) denir. Bu özellik her akım sitometri modelinde bulunmamakta, daha çok araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Bu cihazlar, kan gibi karışık bir hücre topluluğunu içeren süspansiyonlarda istenen özelliğe sahip hücre alt gruplarının farklı tüplere ayrılabilmesini sağlar ve aynı anda 4 farklı hücre popülasyonu ayrıştırılabilir [20].

Kan, kemik iliği, beyin omurilik sıvısı, bronko-alveoler lavaj (BAL) sıvısı, eklem sıvısı, plevral sıvı, asit sıvısı, doku biyopsi örnekleri, parafin bloktaki dokular ve hücre kültürlerinden hücre süspansiyonları hazırlanarak akım sitometride analiz edilebilir [18]. Akım sitometri tekniğinden yararlanılarak hücre DNA'sının özellikleri (hücre siklusü, proliferasyonu vb.), apoptozis ve hücre yüzey antijenleri (başkalaşım küme [Cluster of Differentiation', CD] belirteçleri) ile hücre içi antijenler (sitokin, mediatör vs) belirlenebilir. Bundan başka, kromozom analizi ve tespitinde, RNA çalışmalarında ve protein ekspresyon ve lokalizasyonunda akım sitometri kullanılabilir. Bu yöntem akciğer hastalıklarının tanısında özellikle BAL'da hücre tiplerini belirlemede, çeşitli inflamatuvar mediatör ve sitokinleri belirlemede, yine solunum yolu hücre kültürlerinde hücre siklusunu ve apoptozisini belirlemede etkin olarak kullanılabilir (Şekil 4) [18,21].



Şekil 4. Tipik bir akım sitometresinin kurulumunun şematik gösterimi

Enzim İlişkili İmmün Assay ('Enzyme-linked Immunosorbent Assay', ELISA)

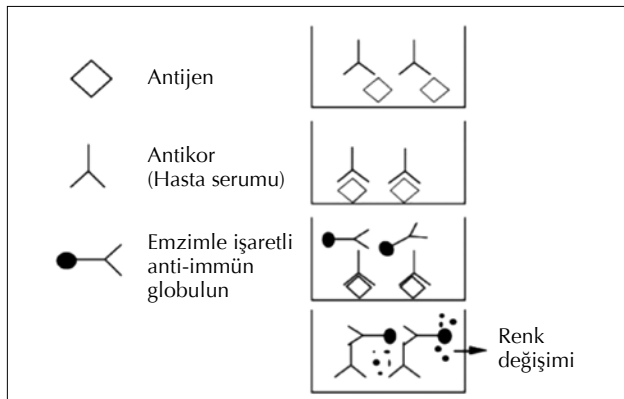
Hedef molekülü işaretlemek için enzimlerin kullanıldığı yöntemler ELISA ('enzyme-linked immunosorbent assay') ya da EIA ('enzyme immunoassay') olarak adlandırılırlar. Günümüzde bir çok tanı laboratuvarında yaygın olarak kullanılan ELISA testlerinin avantajları arasında; geniş tanı parametrelerinin ticari olarak kolayca temin edilebilmesi, yöntemin otomasyona uyarlanabilirliği ve böylece çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılabilmesi, sonuçların spektrofotometrede objektif olarak kalitatif, semikantitatif ya da kantitatif değerlendirilebilmesi gibi özellikler sayılabilir. Diğer yandan araştırma amacıyla bir biyolojik örnekteki mediatör veya protein ELISA ile ölçülebilir.

ELISA çeşitli aşamalardan oluşur. Manüel ELISA yöntemlerinde kullanılan katı fazda, 96 çukurlu mikro kuyulara analitler (antijen veya antikor) emdirilerek bağlanır. Daha sonra kuyucuklara eklenen standart protein solüsyonu veya test edilen örnekteki antijen/antikor kuyucuklardaki analitlere bağlanır. Bir sonraki aşamada ortama enzimle işaretli anti-immünglobülin eklenir. Bu işlemlerin aralarında yıkama yapılır, bu işlem özgül bağlanmaları etkilemezken özgül olmayan bağlanmaları gidermektedir. Yıkama işlemleri iyi yapılmadığında yalnızca pozitiflikler saptanabilir. Testin son aşamasında ortama eklenen substrat enzimle reaksiyona girerek ortamda renk değişimine yol açar. Belli bir sürenin sonunda çukurcuklara eklenen durdurma (stop) solüsyonu (H_2SO_4 , HCl, NaOH) ile reaksiyon durdurulur. Böylece enzim-substrat reaksiyonu istenilen sürede sona erdirilir. Reaksiyon sonunda oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür. Okumada en sık kullanılan dalga boyları 405, 450 ve 630 nm'dir. Sonuçlar tek bir dalga boyunda okutulabileceği gibi çift dalga boyuyla da okutulabilir. Çukurların renk şiddeti (absorbans değeri=optik dansite) örnekte ölçülen antigen/antikor yapısındaki analitin (sitokin, mediatör vs) konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir [18]. Şekil 5'te ELISA'nın çalışma prensipleri gösterilmektedir.

ELISA prensibi ile çalışan otomatize sistemlerde (Bio-Plex, Luminex vb.) ise submikron boyutlarında manyetik bilyeler veya lateks partikülleri kullanılır. Bu sistemlerde 50 μ L gibi çok küçük miktarlardaki numunelerde aynı anda onlarca mediatörün analizi yapılabilir. Bu sistemler ile ilgili en önemli sorun kit ve cihaz maliyetlerinin geleneksel ELISA sistemlerine göre oldukça yüksek olmasıdır.

Western Blot

Bu yöntem uzun yıllardır araştırmalarda, solid veya bir sıvı içinde yer alan spesifik bir proteinin düzeyini belirlemek için



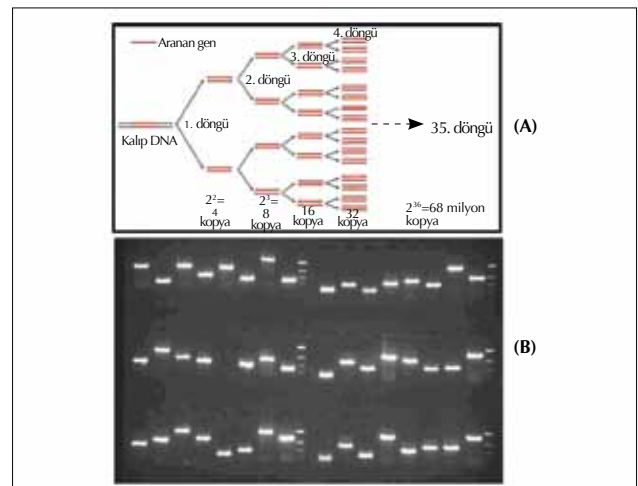
Şekil 5. ELISA yöntemi ile antikor tayininin şematik gösterimi

yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknikte poliakrilamid jelde yürütülerek ayrılan protein bantları nitroselüloz veya naylon bant üzerine transfer edilir. Daha sonra bu proteinler özgül problemlerle bağlanarak tanımlanabilmektedir. Bu yöntemde kullanılan problemler genellikle radyoaktif veya flüoresan işaretlidir. Ayrıca işaretli antikorlar kullanılarak bağlanma gerçekleştirildikten sonra "sandviç" reaksiyon ile daha sonra işaretli ikinci bir antikorla görüntüleme yapılabilir. 'Sandviç' metodunun avantajı tek bir preparat ile birden fazla farklı prop kullanılarak farklı proteinlerin tespiti gerçekleştirilebilmektedir [22].

Blotlamadan önce, çalışılan numunedeki proteinler elektriksel ortamda jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jelde ('Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis', SDS-PAGE,) gerçekleştirilmektedir. Çalışılan numunedeki SDS-polipeptid kompleksleri, poliakrilamid jele yüklenip, elektrik akımına maruz bırakıldıkları zaman, proteinler molekül ağırlığıyla orantılı olarak, artı kutba (anot) doğru göç etmekte ve jelde buldukları yerde bantlar halinde yığılım göstermektedir. Western blot tekniği, elektroforez işlemini takip eden dört adımda gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son adımda ise proteinlerin görüntülenmesi aşamalarıdır [18]. Böylece bir numunedeki farklı ağırlıktaki proteinler bu iş için özel olarak hazırlanmış bir jelde yürütülerek bantlar halinde ayrıştırılarak bir membrana aktarılmaktadır. Söz konusu membran araştırılmak istenen protein için hazırlanan özgül antikorlar kullanılmak suretiyle immünokimyasal yöntemler ile boyanmakta ve bu



Şekil 6. Western blot yöntemiyle elde edilen bantların yoğunluğu görüntü analiz sistemleri ile değerlendirilerek sayısal değerler halinde bir biriyle karşılaştırılabilir



Şekil 7. (A) PCR reaksiyonu aşamaları, (B) DNA agaroz jel elektroforezi

proteinin oluşturduğu bant görünür hale getirilerek değerlendirilebilmektedir (Şekil 6) [23].

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ('Polymerase Chain Reaction', PCR)

Metod basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. PCR, bir çeşit "in vitro klonlama"dır. PCR ile genomun istenilen bölgesi milyonlarca kez çoğaltılarak genomun kalan kısmından etkin biçimde ayrılabilir. İstenilen DNA dizisini iki yandan sınırlayan iki DNA oligonükleotid kimyasal yöntemlerle sentezlenir. Daha sonra tüm genoma özgü DNA ısıtılarak iplikler birbirinden ayrılır ve iki iplik üzerinde de bu oligonükleotidler kullanılarak DNA sentezi başlatılır. Safaştırılmış bir DNA polimeraz tarafından katalizlenen *in vitro* tepkimeyle yeni DNA iplikleri sentezlenir. PCR yöntemi son derece duyarlıdır ve örneğin içindeki bir tek molekülü bile saptayabilir. Eser miktardaki RNA'da önce ters transkriptaz yardımıyla DNA'ya çevirdikten sonra aynı yöntemle incelenebilir (Şekil 7) [18].

PCR'in en çok kullanıldığı alanlar arasında; kalıtsal hastalıkların belirlenmesi, prenatal tanı, patojen organizmaların saptanması, adli tıpta, onkogenlerin saptanması, klonlama ve gen ekspresyon araştırmaları, DNA üzerinde araştırılan bölgelerin tespitinde kullanılan tek zincirli dizilerin ('probe') oluşturulması, DNA dizi analizi, bilinmeyen dizilerin tayini, DNA-protein etkileşiminin araştırılması ('footprinting') sayılabilir [18].

Real-Time PCR

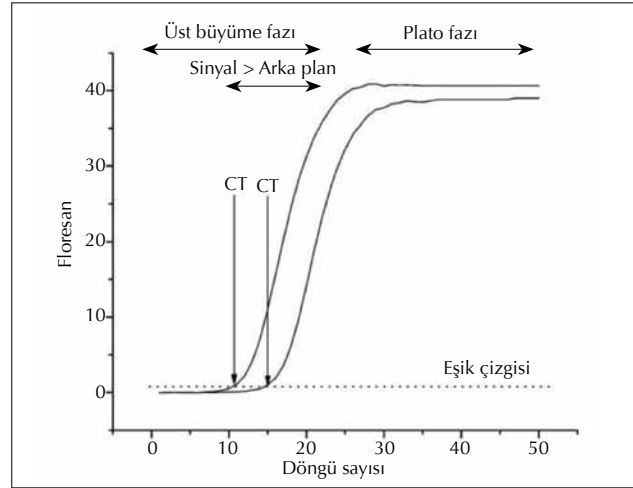
Real-time (RT) PCR'da PCR çoğaltımı görünür hale getirilir ve monitorize edebilen flüoresan işaretli prob ve boyalar kullanılır. Floresan oluşan DNA ile doğru orantılı olarak artar, böylece DNA artışı dinamik olarak saptanabilir. Bu yöntem, çeşitli kaynaklarda "kinetik PCR", "homojen PCR", "kantitatif real-time PCR" gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir [24].

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, tek nükleotid polimorfizmi ('single-nucleotide polymorphism', SNP) analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur.

RT-PCR için flüoresan işaretli belirleyicilere ihtiyaç vardır. PCR ürününün oluşumunu bu işaretli belirleyicilerin yaydığı flüoresan ışığı şiddeti ile hesaplanabilmektedir. Flüoresan işaretli belirleyiciler primerler, proplar veya dNTP'ler ('Deoxynucleotide Triphosphate') olabilir. Flüoresan ışığın şiddeti ilk döngülerde çok zayıftır ve ölçülebilir düzeyin altındadır. Ürün miktarı artmaya başladığında flüoresan ışığının yoğunluğu da artmaya başlar. RT PCR reaksiyonu genelde standart bir eğri oluşturur (Şekil 8). RT PCR ile hedef bir genin ifadesi (ekspresyonu) kantitatif olarak saptanabilir. RT-PCR akciğer araştırmalarında herhangi bir durumda veya patolojik olayda bir proteine ait genin ekspresyonunun artıp artmadığını dinamik olarak değerlendirilmesini sağlar [18,25].

DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi bir DNA olinükleotidinde yer alan adenin (A), timin (T), sitozin (C) ve guanin (G) nükleotid bazlarının



Şekil 8. 'Real-time PCR' sonucu oluşan eğriler

diziliminin ortaya konulmasıdır. DNA dizi analizi sayesinde on binlerce genin dizisini saptamak mümkün olmuş, birçok organizmanın genom dizisi tümüyle belirlenmiştir. Günümüzde DNA dizi analizi çok hızlı ve güvenilir biçimde uygulandığından proteinlerin amino asit dizisini belirlemek için dolaylı olarak bu yöntem kullanılmaktadır. DNA dizisi üzerinde var olan mutasyonların, nükleotid kaybı veya kazanımların tespiti yapılabilmektedir. Gen mühendisliği ve DNA klonlamada bu yöntem sıklıkla kullanılmaktadır [18].

Mikro dizi ('micro array') genom analizinde oldukça güçlü bir yöntem olup, tek bir deneyde genom analizi hakkında genel bir fikir sahibi olunmasını sağlar. 'Genomics' çalışmalarında bir organizmanın tüm genomunun belirlenmesi, dolayısıyla organizmadaki tüm DNA dizilerinin belirlenmesi hedeflenir. 'Proteomics' terimi 'genomics' ile analogi yaratmak amacıyla kullanılır. Burada kapsamlı olarak organizmadaki proteinlerin yapıları ve fonksiyonlarının aydınlatılması amaçlanır.

Sonuç olarak, çeşitli araştırmalarda kullanılmak üzere, *in vitro* laboratuvar ortamında solunum sistemini oluşturan organ ve dokulardan hazırlanan hücre dizileri kullanılabileceği gibi, direkt olarak hasta veya sağlıklı gönüllülerden veya deney hayvanlarından alınan dokulardan hazırlanacak primer hücre kültürleri de kullanılabilir. Bu *in vitro* metodun sağladığı olanaklarla, solunum sistemi hastalıklarının altında yatan mekanizmaların anlaşılması, tedavi edici ajanların etkilerinin sınılanması ve inhalasyon veya sistemik yollardan alınan toksik ajanların hücre düzeyindeki etkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmalar yapmak mümkündür. Yine *in vitro* ortamda uygulanacak çeşitli moleküler araştırma yöntemleri ile *in vivo* veya *in vitro* ortamda elde edilecek bir örnekteki hücrelerin ve özelliklerinin saptanması, o örnekte araştırılmak istenen protein veya mediatörün tespiti ve genetik özelliklerinin belirlenmesi işlemi başarıyla yürütülebilir. Bu yöntemler, hastalıkların tanısına sunacakları katkılar yanında, yürütülecek çeşitli araştırmalarda da etkin bir şekilde kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Alberts B, Bray D, Hopkin K, et al. Manipulating genes and cells. In: Essential cell biology. 2nd ed. New York: GS Garland Science, Taylor& Francis Group; 2004:323-7.
2. European Respiratory Society Annual Congress 2002, Stockholm. Postgraduate Course-01 Airway epithelial cell culturing techniques: opportunities and limitations.

3. Devalia JL, Sapsford RJ, Wells C, et al. Culture and comparison of human bronchial and nasal epithelial cells in vitro. *Respir Med* 1990;84:303-12. [\[CrossRef\]](#)
4. Stoner GD, Katoh Y, Foidart JM, et al. Identification and culture of human bronchial epithelial cells. *Methods Cell Biol* 1980;21A:15-35. [\[CrossRef\]](#)
5. Charron CE, Ito K. Solunum yolu hücre kültürleri. In: Bayram H, Deveci F, Dikensoy Ö, Kara V; eds. Göğüs hastalıklarında in vivo ve in vitro araştırma yöntemleri- Toraks Kitapları. 1st ed. İstanbul: Aves Yayıncılık, 2011:370-403.
6. Bayram H, Gögebakan B. Primer akciğer hücre kültürü modelleri. In: Bayram H, Deveci F, Dikensoy Ö, Kara V; eds. Göğüs hastalıklarında in vivo ve in vitro araştırma yöntemleri- Toraks Kitapları. 1st ed. İstanbul: Aves Yayıncılık, 2011:357-69.
7. Hirst SJ. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. *Eur Respir J* 1996;9:808-20. [\[CrossRef\]](#)
8. Xie S, Sukkar MB, Issa R, et al. Regulation of TGF- β 1-induced connective tissue growth factor expression in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:68-76. [\[CrossRef\]](#)
9. Eickelberg O, Köhler E, Reichenberger F et al. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-b1 and TGF-b3. *Am J Physiol* 1999;276:814-24.
10. Fang X, Song Y, Hirsch J, et al. Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:242-9. [\[CrossRef\]](#)
11. Bayram H, Devalia JL, Sapsford RJ, et al. The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:441-8. [\[CrossRef\]](#)
12. Bayram H, Devalia JL, Khair OA, et al. Comparison of ciliary activity and inflammatory mediator release from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients and the effect of diesel exhaust particles in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:771-82. [\[CrossRef\]](#)
13. Bayram H, Rusznak C, Khair OA, et al. Effect of ozone and nitrogen dioxide on the permeability of bronchial epithelial cell cultures of non-asthmatic and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1285-92. [\[CrossRef\]](#)
14. Bayram H, Devalia JL, Khair OA, et al. Effect of loratadine on nitrogen dioxide (NO₂)- induced changes in electrical resistance and release of inflammatory mediators from cultured human bronchial epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:93-9. [\[CrossRef\]](#)
15. Bayram H, Sapsford RJ, Abdelaziz MM, Khair OA. Effect of ozone and nitrogen dioxide on the release of pro-inflammatory mediators from bronchial epithelial cells of non-atopic non-asthmatic subjects and atopic asthmatic patients, in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:287-94. [\[CrossRef\]](#)
16. Carbone M, Pannuti A, Zhang L, et al. A novel mechanism of late gene silencing drives SV40 transformation of human mesothelial cells. *Cancer Res* 2008;68:9488-96. [\[CrossRef\]](#)
17. Dikensoy Ö, Gögebakan B, Tükenmez E, Bayram H. İnsan primer plevral mezotel hücre dizi kültürlerinin in vitro ortamda elde edilmesi. *Türk Toraks Derneği Kongre Kitapçığı* 2009;165.
18. Öztuzcu S, Bayram H. İn vitro araştırma yöntemleri ve teknikler. In: Bayram H, Deveci F, Dikensoy Ö, Kara V; eds. Göğüs hastalıklarında in vivo ve in vitro araştırma yöntemleri- Toraks Kitapları. 1st ed. İstanbul: Aves Yayıncılık, 2011:337-56.
19. Karaboz İ, Kayar E, Akar S. Flow sitometri ve kullanım alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* 2008;6:1-18.
20. Taneli F. Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2007;5:75-82.
21. Bayram H, Ito K, Issa R, et al. Regulation of human lung epithelial cell numbers by diesel exhaust particles. *Eur Respir J* 2006;27:705-13. [\[CrossRef\]](#)
22. Primrose S, Twyman R, Old B. Principles of gene manipulation, 6th ed. Malden, USA: Blackwell Science Ltd, 2002:1-36.
23. Bulut H, Doymaz MZ. Blotlama teknikleri ve mikrobiyolojide kullanımları. <http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/Uyg-MolMikr/123.pdf>. Erişim tarihi: 04.10.2011.
24. Günel T. Gen anlatımının kantitatif analizi "real-time PCR". *Türkiye Klinikleri (J Med Sci)* 2007;27:763-7.
25. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006;27:95-125. [\[CrossRef\]](#)