



IV. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRE BİLDİRİSİ

Tıbbi Atıktan Laboratuvara: Kİ Naklinde Kullanılan Filtre- Torba Sistemlerinin MKH İzolasyonu Amacıyla Değerlendirilmesi

Yazarlar : Araştırma Görevlisi Yağız Anasız - Prof. R. Köksal Özgül - Doç.Dr. B. Barış Kuşkonmaz
- Prof. Duygu Uçkan Çetinkaya

Kurum : Hacettepe Üniversitesi, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (PEDISTEM)

GİRİŞ - AMAÇ

Rejeneratif ve restoratif amaçla yapılan prelinik ve klinik seviyedeki araştırmalarda ve yeni ilaç başvurularında, mezenkimal kök hücreler (MKH) en yaygın kullanılan kök hücre tipi olduğu tespit edilmektedir. Kemik iliği (Kİ), insanlarda MKH izolasyonu için ana kaynaklardan biridir fakat MKH miktarı toplam çekirdekli hücrenin %0.01-0.001 gibi çok ufak bir kısmını oluşturmaktadır. Bu düşük verim problemini çözecek, optimum terapötik amaç için gerekli hücre sayısını sağlamak üzere tasarlanmış olduğumuz ön çalışma kapsamında Kİ nakli sırasında kullanılan ve sonrasında "tıbbi atık" olarak uzaklaştırılan filtre ve torba sistemlerinin MKH kaynağı olarak uygunluğu değerlendirilmiştir.

METOD

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni alındıktan sonra, Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı ve Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi tarafından "rutin olarak gerçekleştirilen sağlıklı Kİ nakil işlemlerinde" kullanılmış olan filtre ve torba sistemleri (BioAccess) (n=5) aynı gün hücre kültürü laboratuvarına getirilmiştir. Sistem içerisinden steril yıkama çözeltisi (8,26 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, 0,037 g EDTA / 1 litre distile su içerisinde) geçirilerek filtre ve torbaya yapışan hücreler 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Hücre popülasyonu içerisindeki eritrosit yükünü azaltmak için 37°C'de 20 dakika süreyle inkübasyon yapılmış, sonrasında santrifüj işlemi ile hücreler pellet şeklinde elde edilmiştir. Toplam hücre sayısı ve canlılığı, hemositometre ve Turk Çözeltisi kullanılarak tespit edilmiştir. Elde edilen hücreler, düşük glukoz içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-LG), %10 fetal sıgır serumu (FBS), 2 mM L- Glutamin, %1 Penisilin-Streptomisin çözeltisi (büyüme ortamı) içerisinde standart kültür kaplarına ekilmiş ve 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültür işlemi başlamıştır. Kültür kapları ters faz ışık mikroskobu ile kontrol edilerek fibroblastoid görünümlü hücrelerin tespit edilmesi ile büyüme ortamı değiştirilmiş ve takiben haftada iki kere yenilenmiştir. %70-%80 yoğunluğa erişilmesi ile %0.25 Trypsin/EDTA çözeltisi yüzeyden kaldırılan hücreler, 3000 hücre/cm² olacak şekilde pasajlanmış ve %10 Dimetilsülfoksit (DMSO) içeren büyüme ortamı ile hücreler dondurulmuştur. Bu süreçte izole edilen hücreler morfolojik olarak ve büyüme davranışları açısından değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Yıkama çözeltisi ile inkübasyon sonucu yüksek canlılıkta hücre eldesi sağlanmıştır. Heterojen morfoloji ile başlayan hücre kültürü çalışmaları, yüzeye yapışan fibroblastoid hücrelerin gözlenmesi ve takiben



IV. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRE BİLDİRİSİ

büyüme ortamının değiştirilmesi ile homojen hale dönmüştür. İzole edilen hücreler yüzeye yapışarak çoğalmakta ve koloni oluşturmaktadır.

SONUC

Yapılan ön çalışma kapsamında KI nakli sonrasında tıbbi atık olarak uzaklaştırılan filtre ve torba sistemlerinin MKH izolasyonu için değerlendirilebileceği, seçilen yıkama çözeltisi ve prosedürün yüksek sayıda ve canlılıkta hücre verimi için uygun olduğu tespit edilmiş ve gelecekte çalışmalarda kullanılmak üzere değerlendirilebileceği gösterilmiştir. (Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: THD-2016-12181)

ANAHTAR KELİMELELER

Rejeneratif Tıp, Kök Hücreler, Kemik İliği Nakli, Filtre Sistemleri, Mezenkimal Kök Hücreler