

Farklı kültür ortamlarının MDCK hücrelerine etkilerinin faz kontrast mikroskop ile gösterilmesi*

Neslihan TAŞÇENE, Hilal KARAGÜL

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Dışkapı, ANKARA.

Özet: Deneysel olarak Kalsiyumklorür (CaCl_2), Magnezyumsülfat (MgSO_4), Sodyumsitrat, Sodyumhidrojenfosfat (Na_2HPO_4) ve Kalsiyum okzalat solusyonlarına maruz bırakılan böbrek hücrelerindeki etkiler faz kontrast mikroskopla görüntülenmiştir. Hiçbir kimyasalla muamele edilmeyen Madin Darby Canine Kidney (MDCK) hücreleri kontrol grubu olarak kullanılmıştır. CaCl_2 eklenmiş grubun faz kontrast mikroskopik görüntüsünde yer yer kalsiyum birikintilerinin, kalsiyum okzalat eklenen grupta ise hücrelere tutunmuş halde kalsiyum okzalat kristallerinin olduğu gözlenmiştir. MgSO_4 çözeltisi eklenen MDCK hücrelerinde yer yer dejenerasyon bölgelere rastlanmıştır. Na-sitrat çözeltisi eklenen MDCK hücreleri, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığı zaman büyük bir farklılığa rastlanmamıştır. Na_2HPO_4 çözeltisi eklenen MDCK hücrelerinde ise hücreler arasında yer yer nekrotik alanlara rastlanmıştır.

Anahtar sözcükler: MDCK hücre hattı, CaCl_2 , Na-sitrat, MgSO_4 , Na_2HPO_4 , Kalsiyum okzalat.

Monitorize effects of chemicals that used in the study on MDCK cells with phase contrast microscope

Summary: The aim of this study is to monitorize effects of chemicals that used in the study on MDCK cells with phase contrast microscope. MDCK cells that were treated with CaCl_2 , MgSO_4 , Sodiumcitrate, Na_2HPO_4 and NaOx/ CaCl_2 solutions. MDCK cells that not treated with any chemicals are used as control group. Calcium islets were observed in cells that treated with CaCl_2 and calcium oxalate crystals which binded to the cells were observed in cells that treated with NaOx/CaCl_2 solution. The MDCK cells that treated with Na-citrate solution, there was any difference was found when compared with control cells. The MDCK cells, treated with Na_2HPO_4 solution, necrotic areas were found.

Key words: MDCK cell line, CaCl_2 , Na-sitrat, MgSO_4 , Na_2HPO_4 , Calcium oxalate

Giriş

Mineral maddeler ve tuzlar idrar içerisinde doymuş durumda bulunmakta, homeostazis sayesinde idrar yollarında çökme yapmadan vücuttan uzaklaştırılmakta ve özellikle kalsiyum tuzlarının çökmesi engellenmektedir (10).

İdrardaki erimeyen maddelerin artışı, taş oluşumuna etki eden en önemli faktördür. Böbreklerde geri emilim ve süzme mekanizmasındaki bozukluklar, idrarın çoğalması, yoğunlaşması, içindeki çözünebilir maddelerin azlığı taş oluşumunun hazırlayıcı nedenlerindedir (4,6). İdrar yolu taşlarına (ürolit), insan, sığır, koyun, domuz, at, eşek, köpek, kedi, tavşan, tavuk, fare, yılan, kaplumbağa, köpekbalığı, geyik, kurt ve kangurularda rastlanabilmektedir. İdrar yollarında taş oluşumunun yaygınlık derecesi hayvanın cinsine, türüne, yaşına ve beslenme şekline göre değişir (6,3).

Taş oluşumuna katılan başlıca mineraller ve tuzlar; kalsiyum, magnezyum, fosfat, amonyum ve karbonattır. Taşlarda rastlanan başlıca katyonlar ve oranları; kalsiyum

%97, magnezyum %25 ve amonyum %20'dir (1,3,6). Strüvit taşları köpeklerde en sık karşılaşılan taş tipidir. Strüvit, magnezyum amonyum fosfat heksahidratı ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MAP). Strüvit taşları yalnızca strüvitten oluşabildikleri gibi çoğunlukla kalsiyum fosfat, amonyum ürat, okzalat ya da karbonat gibi diğer bileşikler de içerirler. Spaniel Cocker ırkında kalıtsal olarak bu taşa sık rastlanmaktadır (3,6,14). Köpeklerde strüvitten sonra en çok hiperkalsüri, hiperokzalatüri, hipositratüri ve kristal gelişimini engelleyici mekanizmanın bozukluğu sonucunda kalsiyum okzalat taşları şekillenmektedir ve genellikle 2-10 yaş arası köpeklerde gözlenir. İdrardaki sitrat kalsiyum okzalatın taşa dönüşmesini engelleyen bir faktördür. Çünkü sitrat idrardaki kalsiyumu bağlamakta kalsiyum sitrat şeklinde atılmaktadır. Böylece kalsiyum okzalat şekillenmesi engellenmektedir (1,3,6,15). Analiz edilen kalsiyumlu taşların %90'ı kalsiyum okzalat monohidrat, %5'i kalsiyum okzalat dihidrat, %5'i ise kalsiyum fosfat taşıdır (12). Ürat taşlarına köpeklerde özellikle Dalmaçyalı ırkında ve kongenital portosistemik

* Çalışma birinci yazarın doktora tezinin bir bölümünden özetlenmiştir.

şanlı hastalarda yaygın şekilde rastlanır (1). Kedi ve köpeklerde gözlenen taşların %1-2 gibi bir kısmını kalsiyum fosfat taşları oluşturur. Mineral (apatit) taşı olarak da adlandırılır (15). Hayvanlarda ayrıca tetrasiklin, baryum taşları, karbonat ve yonca taşlarına da rastlanabilmektedir (3).

Kristallere maruz kalan hücrelerde, makromoleküler kristal oluşumunu önleyici moleküllerin üretimi artmakta, kristaller tarafından bir çekirdek şekillenmesi, büyümesi ve agregasyonunu önleyici bir cevap oluşmaktadır. Şekillenen herhangi bir kristal idrar ile atılmaktadır. Kristaller hücrelerle temas ederse endositoz ile hücre içine alınmakta ve lizozomlara gelerek uzaklaştırılmaktadır yada renal interstisyumda makrofajlar tarafından alınarak elimine edilmektedir. Fakat kristaller renal tubullerde plak oluşturursa kristallerin hareketleri yavaşlar ve renal tubullerde tıkanmaya neden olur. Renal epitelyum ile kristal arasındaki uzun süren bu karşılıklı etkileşim sonucu, böbrek hücrelerinde fonksiyon bozukluğu ve yıkım şekillenir. Hüresel yıkım hem kristallerin çekirdek oluşumunu hem de hücrelere tutunmasını artırır.(2,5,7,8)

İnsan ve hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda (invivo) (11) ve doku-hücre kültürü çalışmalarda (invitro) (13,17) taş oluşumunun böbreklerde yangıya neden olduğu, hücre hasarının taş oluşumunu hızlandırdığı (13) gösterilmiştir. Taşların yapısında yer alan kristaller ile böbrek hücreleri arasındaki etkileşimin araştırılması, böbreklerde biriken kristallerin sebep olduğu hüresel yıkımın daha iyi anlaşılmasını sağlar. Bu çalışmada da, deneysel olarak CaCl₂, MgSO₄, Sodyumsitrat, NaHPO₄ ve Kalsiyum okzalit solusyonlarına maruz bırakılan böbrek hücrelerindeki etkilerin faz kontrast mikroskopla görüntülenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada MDCK II (Madin Darby Canine Kidney) Hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler %10 fetal dana serumu, %1 Penicilin-Streptomycin ve 1 g/l Glikoz içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)'da 37 °C ve %5 CO₂'li etüvde inkube edilmiştir.

Çalışma deney grupları;

1. Grup (Kontrol Grubu) : Hiçbir kimyasalla muamele edilmeyen 1g/l glikoz içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) vasat ortamındaki MDCK hücreleri
2. Grup: Kalsiyumklorür ve sodyumokzalit (kalsiyumokzalit) eklenmiş1g/l glikoz içeren DMEM vasat ortamındaki MDCK hücreleri
3. Grup: Magnezyumsülfat eklenmiş1g/l glikoz içeren DMEM vasat ortamındaki MDCK hücreleri
4. Grup: Kalsiyumklorür eklenmiş1g/l glikoz içeren DMEM vasat ortamındaki MDCK hücreleri
5. Grup: Sodyumhidrojenfosfat eklenmiş1g/l glikoz içeren DMEM vasat ortamındaki MDCK hücreleri

6. Grup: Sodyumsitrat eklenmiş1g/l glikoz içeren DMEM vasat ortamındaki MDCK hücreleri olmak üzere beş çalışma ve bir kontrol grubundan oluşmuştur. Her bir çalışma grubu için 3 farklı konsantrasyon uygulanmıştır. Uygulanacak konsantrasyonlar hücre canlılık testlerine göre belirlenmiştir (Tablo1).

Tablo 1. Çalışmada farklı kültür ortamları oluşturmak amacıyla kullanılan solusyon konsantrasyonları.

Table 1. Concentration of solutions that used for making different culture conditions.

MgSO ₄		0,2M	0,15M	0,1M
CaCl ₂		0,06M	0,045M	0,03M
Na-sitrat		0,015M	0,0112M	0,0075M
NaHPO ₄		0,01M	0,0075M	0,005M
COM	NaOX	0,001M	0,00075M	0,0005M
	CaCl ₂	0,001M	0,00075M	0,0005M

MDCK hücreleri üzerine CaCl₂, MgSO₄, Sodyumsitrat, NaHPO₄, Kalsiyum okzalit solusyonlarının etkileri konfluent kültür ortamlarında faz kontrast mikroskopla (Leica microsystems) görüntülenmiştir.

Bulgular

Bir hafta boyunca 0,06 M CaCl₂ çözeltisi eklenen MDCK hücreleri, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığı zaman sağlıklı hücreler arasında kalsiyum birikimlerinin şekillendiği alanlar tespit edilmiştir (Şekil 1).

Bir hafta boyunca 0,001 M NaOX / CaCl₂ çözeltisi eklenen MDCK hücreleri, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığı zaman sağlıklı hücreler üzerine tutunmuş şekilde kalsiyumokzalit kristallerinin oluşmuş olduğu gözlenmiştir (Şekil 2).

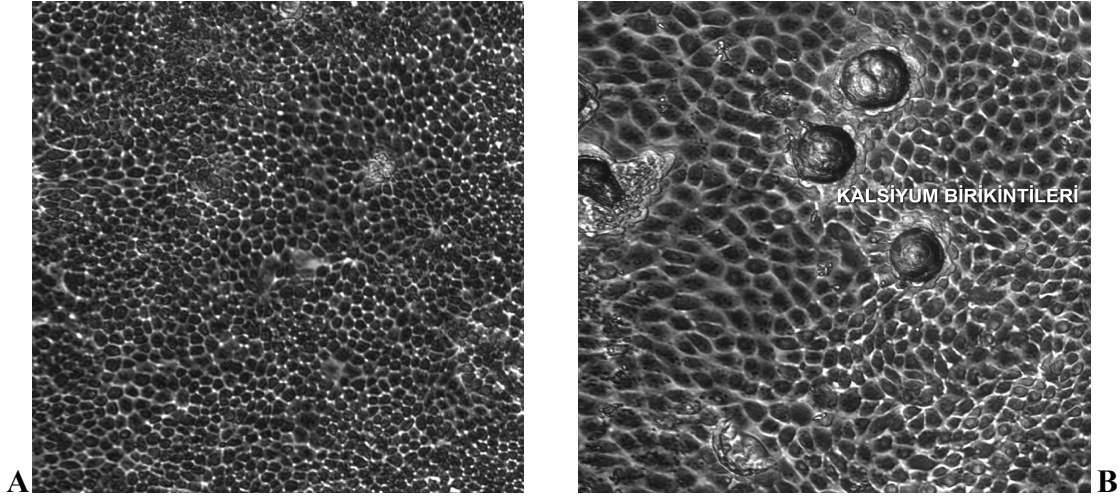
Bir hafta boyunca 0,2 M MgSO₄ çözeltisi eklenen MDCK hücreleri, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığı zaman yer yer dejenere bölgelere rastlanmıştır (Şekil 3).

Bir hafta boyunca 0,015 M Na-sitrat çözeltisi eklenen MDCK hücreleri, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığı zaman büyük bir farklılığa rastlanmamıştır.

Bir hafta boyunca 0,01 M Na₂HPO₄ çözeltisi eklenen MDCK hücreleri, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığı zaman sağlıklı hücreler arasında yer yer nekrotik alanlara rastlanmıştır (Şekil 4).

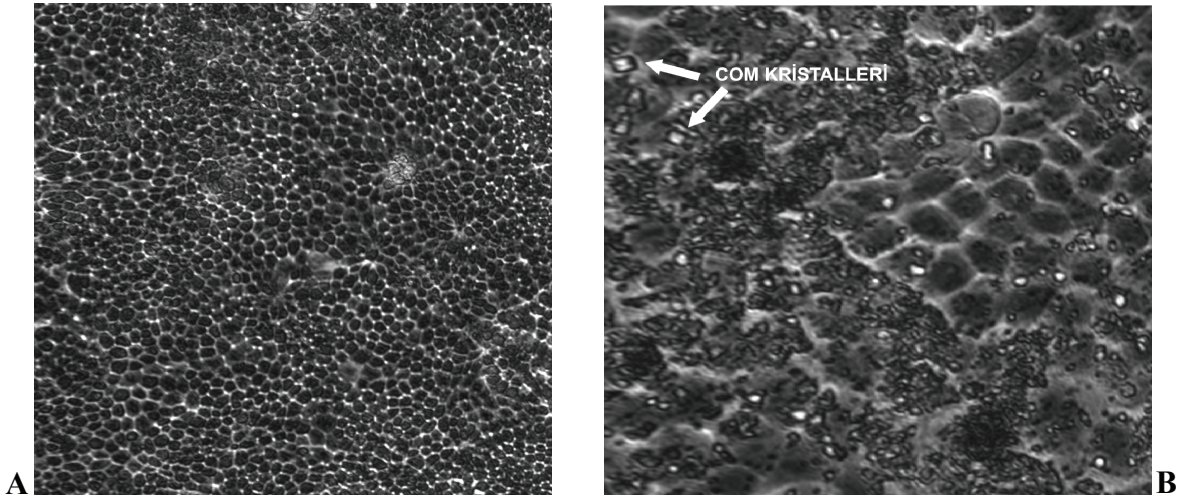
Tartışma ve Sonuç

Böbrek hücreleri üzerine ve ayrıca MDCK hücreleri üzerine in vivo ve in vitro ortamlarda, okzalitin toksik olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. (9,12,16). Verkoelen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (16), MDCK hücrelerine kalsiyum ve okzalit solusyonları birlikte ve ayrı şekilde verilmiş, sadece okzalit verilen hücrelerde hücre şekli değişmiş, hücrelerde yuvarlaklaşma



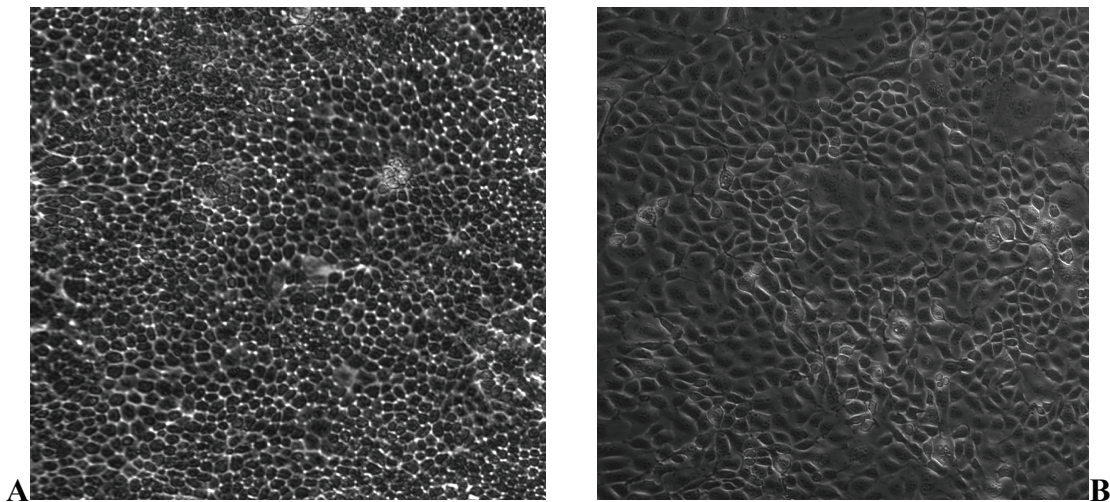
Şekil 1. Kontrol grubu MDCK hücrelerinin (A) ve 0,06 M CaCl_2 eklenmiş MDCK hücrelerinin (B) faz kontrast mikroskopik görüntüleri (x40).

Figure 1. Phase-contrast microscopy images of control (A) and 0,06 M CaCl_2 treated (B) MDCK cells.



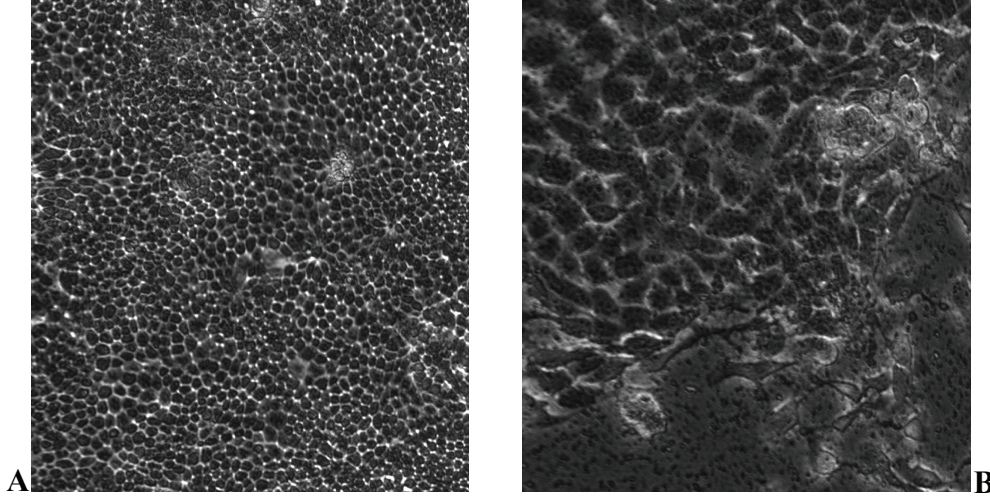
Şekil 2. Kontrol grubu MDCK hücrelerinin (A) ve 0,001 M COM eklenmiş MDCK hücrelerinin (B) faz kontrast mikroskopik görüntüleri (x40).

Figure 2. Phase-contrast microscopy images of control (A) and 0,001 M COM treated (B) MDCK cells.



Şekil 3. Kontrol grubu MDCK hücrelerinin (A) ve 0,2 M MgSO_4 eklenmiş MDCK hücrelerinin (B) faz kontrast mikroskopik görüntüleri (x40).

Figure 3. Phase-contrast microscopy images of control (A) and 0,2 M MgSO_4 treated (B) MDCK cells.



Şekil 4. Kontrol grubu MDCK hücrelerinin (A) ve 0,01 M Na_2HPO_4 eklenmiş MDCK hücrelerinin (B) faz kontrast mikroskobik görüntüleri (x40).

Figure 4. Phase-contrast microscopy images of control (A) and 0,01 M Na_2HPO_4 treated (B) MDCK cells.

tespit edilmiştir. Kalsiyumla okzalatin beraber verildiği hücrelerde ise kalsiyum okzalat kristalleri gözlenmiştir. Bu çalışmada da, MDCK hücreleri üzerine kalsiyum okzalatin hücrelerde yaptığı morfolojik değişiklikler faz kontrast mikroskopla gösterilmiştir (Şekil 2). Kullanılan sodyum okzalat- kalsiyum okzalat dozu, hücrelerin ölmemesi amacıyla hücrelerin ölmediği en yüksek doz seçilmiştir. Bu doz okzalatin böbrek hücreleri üzerine aşırı toksik olması nedeniyle çok düşük seçilmek zorunda kalmıştır. Tablo 1’de de görüldüğü üzere, sırasıyla 0.0005, 0.00075 ve 0.001 M dozlar uygulanmış, hücrelerin ölmeden yaşayabildikleri doz, 0.001 M olarak belirlenmiştir. Konfluent hücrelere çözelti vasat içerisinde verildikten 1 hafta sonra faz kontrast mikroskopla görüntüleri alınmış ve Şekil 2’de de görüldüğü gibi hücrelere tutunmuş şekilde Verkoelen ve arkadaşlarının (16) çalışmasıyla uyumlu olarak kalsiyum okzalat kristalleri gözlenmiştir.

Hücreler üzerine CaCl_2 ’ün etkilerini göstermek amacıyla da hücrelere, 0.03, 0.0045 ve 0.06 M CaCl_2 çözeltileri vasat içerisinde MDCK hücrelerine verilmiştir (Tablo 1). Canlılığın gözleendiği en yüksek konsantrasyon olan 0.06 M CaCl_2 çözeltisi verilen grupta hücrelere çözelti verildikten 1 hafta sonra faz kontrast mikroskopla görüntüleri alınmış ve hücrelerde kalsifiye bölgeler oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 1).

Hücreler üzerine MgSO_4 ’ın etkilerini göstermek amacıyla, hücrelere, 0.2, 0.15 ve 0.1 M MgSO_4 çözeltileri eklenmiştir (Tablo 1). Canlılık durumunu etkileyen en yüksek doz olarak hücrelerin 0.2 M çözeltide yaşayabildikleri gözlenmiştir. Hücrelere vasat içerisinde 0.2 M MgSO_4 verilmesinden 1 hafta sonra faz kontrast mikroskopla alınan görüntüleri Şekil 3.’de gösterilmiştir. Hücreler, kontrol grubu ile (Şekil 3A) karşılaştırıldıkları zaman hücrelerde yer yer dejenerasyona rastlanmıştır.

Hücreler üzerine Na-sitrat’ın etkilerini göstermek amacıyla hücrelere, 0.015, 0.0112 ve 0.0075 M Na-sitrat verilmiştir (Tablo 1). En yüksek doz olarak hücrelerin 0.015 M çözeltide yaşayabildikleri gözlenmiştir. Hücrelere vasat içerisinde 0.015 M Na-sitrat verilmesinden 1 hafta sonra faz kontrast mikroskopla alınan görüntülerinde hücrelerde morfolojik olarak çok büyük bir farklılık tespit edilememiştir.

Hücreler üzerine Na_2HPO_4 ’ın etkilerini göstermek amacıyla hücrelere, 0.01, 0.0075 ve 0.005 M Na_2HPO_4 vasat içerisinde verilmiştir (Tablo 1). 0.01 M Na_2HPO_4 çözeltisiyle hücrelerin yaşayabildiği tespit edilmiştir. Hücrelere vasat içerisinde 0.01 M Na_2HPO_4 verilmesinden 1 hafta sonra faz kontrast mikroskopla alınan görüntüleri Şekil 4’de gösterilmiştir. Hücreler kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığı zaman, hücrelerde şişme ve hücre zarında gerilme tespit edilmiştir.

Kristallere maruz kalan hücrelerde, kristaller yabancı cisimler gibi yangı hücre infiltrasyonuna neden olmaktadır. Kristallerin oluşturduğu renal tubullerdeki tıkanmalar, mekanik strese ve yıkımlara yol açar. Oluşan yıkım ve stres sonucu, tubuler epitelyum hücreleri, intersitisyel hücreler ve yangı hücrelerinden çeşitli sitokinler, kemokinler, mitojenler, büyüme ve diğer yangı faktörleri salınır. Tüm bu etkileşimler sonucu böbrek hücrelerinde patofizyolojik değişimler gözlenir(7)

Sonuç olarak; CaCl_2 eklenmiş grubun faz kontrast mikroskobik görüntüsünde yer yer kalsiyum birikintilerinin, kalsiyum okzalat eklenen grupta ise hücrelere tutunmuş halde kalsiyum okzalat kristallerinin oluştuğu gözlenmiştir. MgSO_4 ve NaH_2PO_4 eklenmiş gruplarda ise yer yer dejenerere olmuş hücrelere rastlanmıştır. Farklı kristallerin aynı hücrelerde (MDCK) farklı değişim ve bozukluklara sebep olduğunun gözleendiği bu çalışmada

urolitiaziste taş içeriğine göre farklı rasyonel terapötik uygulamaların gerekli olduğu ortaya konulmuştur.

Teşekkür

Doktora süresince maddi destek aldığım TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığına ve laboratuvar çalışmalarımı yürüttüğüm Hannover Veteriner Yüksekokulu Biyokimya Enstitüsü Başkanı Prof. Dr. Hassan Yusuf NAİM'e teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Aiello SE** (1998): The Merck Veterinary Manual. 8th Ed. Merck Co. Inc. Philadelphia.
- Coe F, Evan A, Worcester E** (2005): Kidney Stone Disease. J Clin Invest. **115**, 2598–2608.
- Haziroğlu R., Milli Ü** (2001): Veteriner Patoloji Cilt I. Medipres Matbaacılık-Yayıncılık.
- Herring Lc** (1962): Observations On The Analysis Of Ten Thousand Urinary Calculi. J Urol. **88**, 545–562.
- Jonassen JA, Kohjimoto,Y, Scheid, CR, Schmidt M** (2005): Oxalate toxicity in renal cells. Urol.Res. **33**, 329-339.
- Karagül H, Altıntaş A, Fidancı UR, Sel T** (2000): Klinik Biyokimya. Medisan Yayınevi. 1. Baskı. Yayın Serisi:45. Ankara.
- Khan SR** (2004): Crystal-Induced İnflammation of The Kidneys: Results From Human Studies,Animal Models, and Tissue-Culture Studies. Clin Exp Nephrol. **8**,75–88.
- Khan SR., Canales BK** (2009): Genetic Basis Of Renal Cellular Dysfunction and The Formation of Kidney Stones. Urol Res. **37**,169–180.
- Lieske J C, Toback FG** (2000): Renal Cell-Urinary Crystal Interactions. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. **9**, 349–355.
- Mazzali, M., Kipari T, Ophascharoensk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J** (2002) : Osteopontin- A Molecule For All Seasons. Q J Med., **95**, 3-13.
- Okada A, Yasui T, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Hirose M, Kojima Y, Itoh Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K.** (2010): Renal macrophage migration and crystal phagocytosis via inflammatory-related gene expression during kidney stone formation and elimination in mice: Detection by association analysis of stone-related gene expression and microstructural observation. J Bone Miner Res. **25**:2701-11
- Osborne CA., Lulich JP, Polzin DJ** (1999): Analysis of 77000 canine uroliths. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. **29**,17-38.
- Ouyang JM, Yao XQ, Tan J, Wang FX** (2011): Renal Epithelial Cell Injury And Its Promoting Role In Formation Of Calcium Oxalate Monohydrate. J Biol Inorg Chem. **16**, 405-416.
- Prien El, Prien El Jr** (1968): Composition And Structure Of Urinary Stone. Am J Med **45**,654–672.
- Tilley LP, Smith FMK** (1997): The 5 Minute Veterinary Consult Canine and Feline. Williams & Wilkins Company. Pennsylvania, U.S.A.
- Verkoelen CF, Schepers MSJ, Ballegooijen ES, Bangma CH** (2005): Effects of luminal oxalate or calcium oxalate on renal tubular cells in culture. Urol.Res. **33**, 321-328.
- Yuen JW, Gohel MD, Poon NW, Shum DK, Tam PC, Au DW.**(2010): The initial and subsequent inflammatory events during calcium oxalate lithiasis. Clin Chim Acta. **411**: 1018-1026.

Geliş tarihi: 28.04.2011 / Kabul tarihi: 29.03.2012

Yazışma adresi:

Dr. Neslihan Taşçene

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı 06110 Dışkapı, Ankara.

e-mail: vetmesli@yahoo.com