

FÖTAL SIĞIR TRACHEA HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI VE ÖZELLİKLERİ

Feray Alkan*

Preparation of foetal bovine trachea cell culture and its special feature

Summary: *In this study, the preparation of foetal bovine trachea cell culture and its special feature were described.*

Trachea was obtained from 4-5 month age bovine foetus. Trachea pieces which are included 2 tracheal rings were cultured in disposable cell culture flask with Eagle MEM supplemented with 10 % calf serum. Following the cell islets which originated from each tracheal ring were joined, the cells were subcultured.

Trachea cell culture was frozen using Eagle MEM supplemented with 20% foetal calf serum and 10 % dimethyl sulphoxide and stored at -80°C.

Trachea cell culture was subcultured 12 times. During the subsequent passages, no differences concerning the structure and growth characteristics of cells were observed. In the researchs performed by susceptible viruses, therefore, advantages caused by usage of trachea cell line were discussed and consequently this cell culture is recommended for routine diagnostics.

Özet: *Bu çalışmada, fötal sığır trachea hücre kültürünün hazırlanması ve özellikleri tanımlandı.*

Trachea 4-5 aylık sığır fötusundan sağlandı. Herbiri 2 trachea halkası içeren trachea parçaları, plastik doku kültürü şişelerinde % 10 dana serumlu Eagle MEM ile kültüre edildi. Parçaların iç ve dış yüzünden başlayan hücre üremeleri birbiri ile birleştikten sonra, hücreler subkültüre edildi.

Trachea hücre kültürü % 20 dana serumlu Eagle MEM ve % 10 DMSO ile dondurularak saklandı.

* Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Viroloji Bilim Dalı, Ankara.

Hücre kültürü 12 kez subkültüre edildi. Hücreler üreme yeteneği ve morfolojileri bakımından ilerleyen subkültürlerde değişiklik göstermedi. Bu sebeple, duyarlı olduğu virüsler ile yapılan araştırmalarda, trachea hücre kültürünün kullanılmasına sağladığı avantajlar tartışıldı ve trachea hücre kültürünün kullanılması önerildi.

Giriş

Hücrelerin invitro koşullarda üretilmelerine ilgili temel bilgiler 1907 yılında Harrison tarafından yayınlanmıştır (5). Hücre kültürleri; deneme hayvanı ve embriyolu tavuk yumurtası ile çalışmayı benimsemiş araştırmacılar tarafından önceleri ilgi görmemiş ise de, antibiyotiklerin geliştirilmesi ile hücre kültürlerinde kontaminasyon riskinin aza indirilmesi hücre kültürlerinde virus üremesi sonucu oluşan değişikliklerin (sitopatolojik efekt) tanınması ve üreyen virusların tesbiti için yeni yöntemlerin geliştirilmesinden sonra yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve zamanla virüsler ile çalışan araştırmacılar için vazgeçilmez bir sistem olmuşlardır.

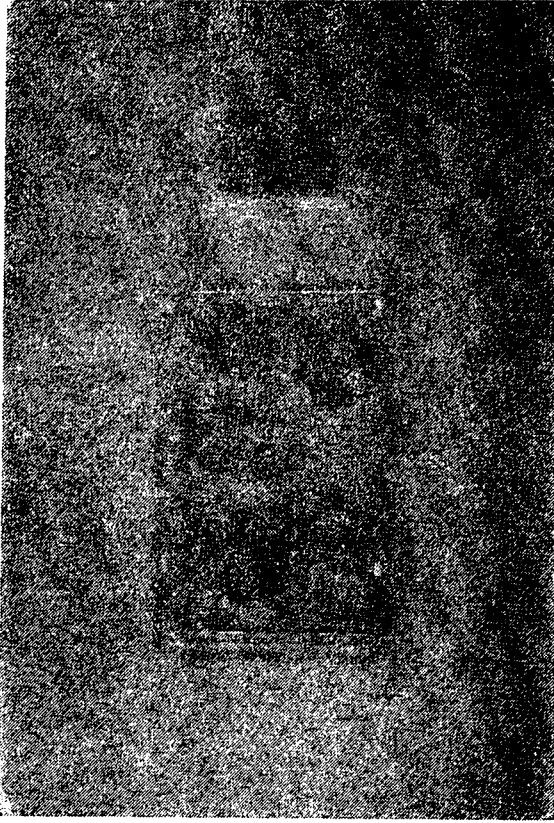
Trachea hücre kültürü ilk kez Kniazeff (2) tarafından tanımlanmıştır. Fibroblast benzeri ya da epitheloid hücrelerden oluşmaktadır. Semi permanent –yani yaklaşık 30–50 kez subkültürü yapılabilen– hücre kültürleridir (1,2,4,6).

Fötal siğir trachea hücre kültürü, bovine viral diarrhoea (BVD) virüsü, infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virüsü, parainfluenza-3 (PI-3) virüsü, Reovirus tip-3, Vaccinia, Herpes Simplex virüsü, Vesicular Stomatitis virüslerinin üretilmeleri, titrasyonu ve bu virüslerin kullanıldığı teşhis yöntemleri (nötralizasyon, plak test, immunofloresan testi, vs.) ile virus izolasyonu için duyarlı bir sistem olarak bildirilmiştir (2,3,4,6).

Materyal ve Metot

Trachea 4–5 aylık siğir fötusundan aseptik koşullarda çıkarıldı. Herbir parçası 2 trachea halkası içerecek şekilde transversal olarak parçalara ayrıldı. 25 cm³lik (50 cc'lik) plastik hücre üretme şişesine¹ 4–6 trachea parçası eşit aralıklı olarak yerleştirildi (Şekil 1). Hücre üretme şişesi, trachea parçalarının şişe yüzeyine yapışması için 3–4 saat 37°C'de inkube edildi. Daha sonra, hücre üretme şişesine 5 cc % 10 dana serumlu Eagle MEM vasatı konuldu. Hücre üretme va-

¹ Greiner, Nuertingen, Almanya.



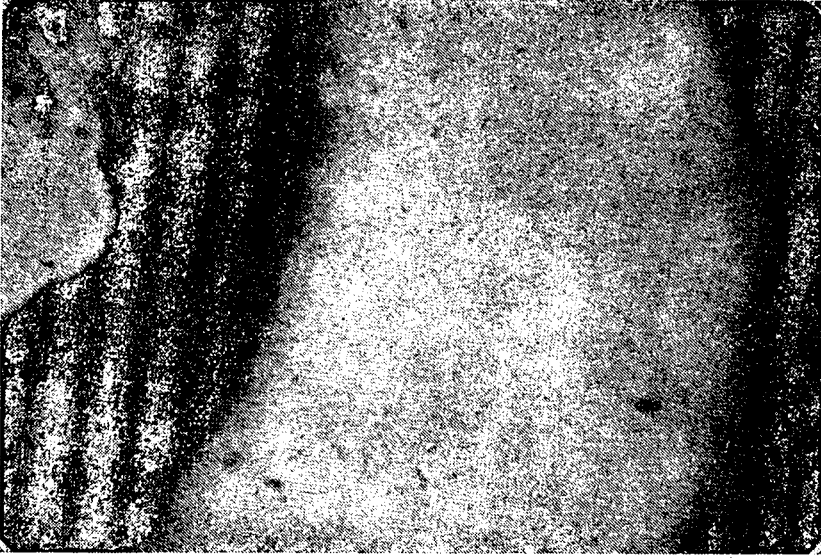
Şekil 1. Trachea halkalarının hücre kültürü şişesine yerleştirilmesi.
Figure 1. Settlement of tracheal rings into cell culture flask.

satı 3-4 gün ara ile değiştirildi. Hücreler şişe yüzeyini tümüyle kapladıktan sonra (yaklaşık 5-6 hafta) subkültüre edildi.

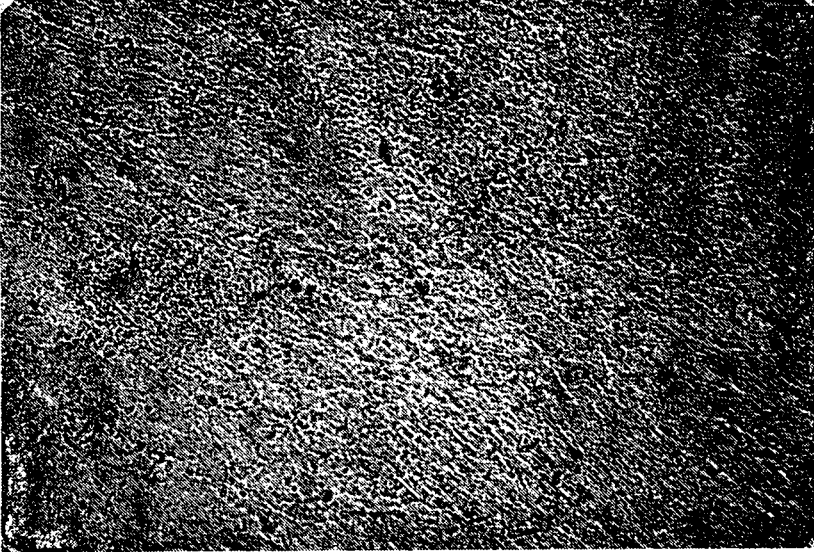
Trachea hücre kültürü 4. ve 10. pasaj aşamalarında donduruldu. Bu amaçla, hücreler 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde % 20 fotal dana serumu içeren Eagle MEM vasatı ile sulandırıldı ve % 10 Dimethyle sulfoxide (DMSO) ilave edilerek, 1 ml'lik porsiyonlar halinde -80°C 'de saklandı.

Bulgular ve Sonuç

Trachea parçalarının implantasyonundan 1-3 gün sonra, parçaların iç ve dış yüzeyinden hücre üremesi başladı (Şekil 2). Doku kültürü mikroskobu ile hücre üremesi hergün izlendi. Trachea parçalarının etrafında oluşan hücre adacıklarının birbiri ile birleşmesinden sonra (yaklaşık 5-6 hafta) hücreler subkültüre edildi (Şekil 3).



Şekil 2. Trachea halkasının iç ve dış yüzünden hücre üremesi.
Figure 2. Cell proliferation from both side of tracheal rings.



Şekil 3. Trachea hücre kültürü X 250.
Figure 3. Trachea cell culture X 250.

Hücreler 4. ve 10. subkültür aşamalarında donduruldu. Kullanılacakları zaman 37°C de su banyosunda hafif sallanarak çözüldü ve % 20 dana serumlu Eagle MEM vasatı ile karıştırılarak, hücre üretme şişelerine aktarıldı. Hücreler 48-72 saat sonunda hücre üretme şişesini tamamen kaplayacak şekilde monolayer tabakalanma oluşturdu. Böylece trachea hücre kültürünün dondurularak saklanabildiği belirlendi. Kniazeff (2) ve Kapp (1)'de değişik pasaj aşamalarında trachea hücrelerinin dondurularak saklandığını bildirmişlerdir.

Hücre kültürü 12 kez subkültüre edildi. Hücreler üreme yeteneği ve morfolojileri bakımından değişiklik göstermedi. Westenbrink ve ark. (6), 12-25 subkültür aşamasında, Nettleton ve ark. (4), 8-35 subkültür aşamasında bulunan trachea hücre kültürünü kullanmışlardır. Kapp (1) domuz trachea epitel hücrelerinin 39. subkültür aşamasına kadar üretildiğini ve hücre kültürlerinde bir değişikliğin oluşmadığını belirtmektedir. Kniazeff (2) ise fetal sığır trachea hücre kültürünü 80. subkültür aşamasına kadar ürettiğini, ancak 55. subkültürden sonra hücrelerin üreme yeteneğinin azaldığını bildirmiştir.

Viral teşhis laboratuvarlarında virus izolasyonu amacıyla genellikle dana böbrek, dana testis, fetal dana böbrek ve fetal dana testis hücre kültürlerinden yararlanılmaktadır. Bu hücre kültürleri en fazla 5-8 kez pasajlanabilme özelliğindedir. Bu nedenle, duyarlı olduğu viruslar ile yapılan çalışmalarda fetal sığır trachea hücre kültürünün kullanımı, diğer primer hücre kültürlerine oranla bazı avantajlar sağlamaktadır. Bunlar;

- 1- Primer hücre kültürü hazırlamak için organ materyali bulma ihtiyacı azalır.
- 2- Hücre kültürü hazırlanması için gereken zaman ve malzemenin tasarruf sağlanır.
- 3- Araştırmanın aynı seriden hücre kültürü ile tamamlanabilmesine olanak sağlanır.

Bu çalışma ile, virus araştırmalarında duyarlı bir sistem olan fetal sığır trachea hücre kültürünün hazırlanışı ve özellikleri tanımlanmıştır. İleri araştırmalara bir ön hazırlık şeklinde olan bu çalışma ile trachea hücre kültürünün duyarlı olduğu virusların belirlenmesi, primer ve devamlı hücre kültürleri ile trachea hücre kültürünün bu viruslar için duyarlılıklarının karşılaştırılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. **Kapp, B.** (1983). *Untersuchungen zur Vermehrung von parzinem Enterovirus-Type 2 und Adenovirus Type 1 Organkulturen aus Schweinetracheen.* Doktora Tezi, Hannover-Almanya.
2. **Kniazeff, A.J.** (1965). "American Type Culture Collection" Certified Cell Line, CCL-44, EBT.
3. **Kreeft, H.A.J.G., Greiser-Wilke, I., Moening, V. and Horzinek, M.C.** (1990). *Attempts to characterize bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle after immunization with a contaminated vaccine.* Dtsch. Tierärztl. Wschr. 97: 63-65.
4. **Nettleton, P.F., Sharp, J.M., Herring, A.J. and Herring, J.A.** (1984). *Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination, challenge and immunosuppression.* (191-209). In: Latent Herpes Virus infection in Veterinary Medicine. (Ed. G. Wiltmann.; R.M. Gaskell., H.J. Rzika.) Martinus Nijhoff, Dordrecht, Netherlands.
5. **Paul, J.** (1970). *Development of tissue culture techniques.* Cell and Tissue Culture (Ed. John Paul). E.S. Livingstone Ltd.
6. **Westenbrink, F., Middel, W.G.J., Straver, P.J. and De Leeuw, P.W.** (1986). *A blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for bovine virus diarrhoea virus serology.* J. Vet. Med. B. 33: 354-361.