

## Fare *In Vitro* Merkezi Sinir Sistemi Kültürlerinde Yeni Bir Metot: Etkinlik Araştırması <sup>[1]</sup>

Ender ERDOĞAN \*  Gürkan ÖZTÜRK \*\* Murat Çetin RAĞBETLİ \*\*\*

- [1] *Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na desteklenmiştir (2000TF074)*  
\* Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Alaaddin Keykubat Kampüsü, TR-42075, Konya - TÜRKİYE  
\*\* Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı & Neuroscience Araştırma Birimi, TR-65200, Van - TÜRKİYE  
\*\*\* Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, TR-65200, Van - TÜRKİYE

**Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-2335**

### Özet

Bu çalışmada; Periferik Sinir Sistemi (PSS) kültürlerinde kullanılmakta olan kollajenle kaplama metodunun Merkezi Sinir Sistemi (MSS) dilimleme doku kültürlerinde kullanılabilirliği ve buna etki eden diğer metodolojik faktörlerin etkinliğinin araştırılması amaçlandı. Genç Swiss albino tipi farelerden frontal girişimle çıkarılan beyinler derhal yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) içine alındı ve agaroz jel içinde bloklanıp; vibrasyonlu mikrotomda 200 µm kalınlığında alınan horizontal canlı dilimleme kesitler medyum içine alındı. Doku kesitleri 2 grupta incelendi. Grup 1 (kontrol): alınan taze kesitler doğrudan incelenirken, Grup 2: alınan kesitler kollajenle (Tip I) kaplanarak 3 gün boyunca %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. Kesitler, viabilite için calcein ve nonviabilite için propidium iodide ile boyanarak, konfokal lazer taramalı mikroskopta incelenerek görüntüleri alınıp değerlendirildi. Normal agarların erime derecelerinin yüksek oluşu canlılığı etkilediğinden; düşük derecelerde eriyebilen agar ile bloklamanın, ayrıca yüksek frekans-düşük hıza ayarlanmış vibrotomda kesitlerin alınmasının daha uygun olduğu görüldü. 3 günlük kültür sonrası incelemelerde viabilite/ nonviabilite oranlarının kontrol preparatları ile karşılaştırıldığında olumlu düzeylerde olduğu belirlendi. MSS dilimleme kültürlerinde kollajenle kaplama metodunun mevcut metotlara etkin, çalışır ve daha kolay bir alternatif olarak uygulanabileceği histolojik ve fizyolojik olarak gösterildi.

**Anahtar sözcükler:** *Fare, Merkezi sinir sistemi, Kültür, Dilimleme kesit, Konfokal mikroskop*

## A New Method in CNS (Central Nervous System) *In Vitro* Cultures in the Mouse: Study of Effectiveness

### Summary

In this study; to evaluate the effectiveness of collagen coating method, using in the peripheral nervous system cultures, and its involving factors caused from manipulations in central nervous system (CNS) cultures was aimed. Via frontal approach, brains, transected from young Swiss albino mice, were taken into artificial cerebro-spinal fluid immediately and made blocks in agarose gel. With a vibration microtome, 200 µm thickness horizontally live slices were taken in to the dishes filled with culture medium. Tissue sections were analyzed as two groups. In the group 1 (control): fresh slices were evaluated directly. In the group 2: sections were covered with collagen gel (Type I) and left in the incubator (5% CO<sub>2</sub>) for 3 days. These sections were dyed with calcein and propidium iodide for viability and non-viability and then observed with confocal laser scanning microscope. Images were captured digitally and examined. Since negative effects of high melting temperature of standard agar on the livability, using low melting agar to tissue blocking and high frequency - low speed vibrotome setting to cut were more preferably. In the 3 days cultures, viability/nonviability rates were indicated better values. It is concluded that, in the CNS slicing cultures, collagen coating method was an easier, effective, useful and alternative method to present techniques.

**Keywords:** *Mice, Central nervous system, Culture, Slice section, Confocal microscope*



**İletişim (Correspondence)**



+90 332 2415000/40064



drender@selcuk.edu.tr

## GİRİŞ

Morfolojik, fizyolojik, farmakolojik beyin araştırmalarında *in vitro* olarak beyinin farklı bölgelerinden alınan dilimleme kesitleri kullanılmaktadır. Sinir dokusunun *in vivo* ortamdaki orijinal hücresel mimarisini temsil ettiklerinden dolayı, bu kesitlerle yapılan çalışmalarda da gerçeğe yakın veriler elde edilebilmektedir. Ayrıca işlemin kolaylığı modelin kullanılabilirliğini artırmaktadır <sup>1-3</sup>. Bununla birlikte bu kesitlerin *in vitro* ortamdaki kısa süreli ömürleri, uzun süreli çalışmalar için alternatif metotları gerektirmiştir <sup>4,5</sup>.

Bunun için diğer memeli eksplant kültürlerinden yola çıkarak beyin dilimleme kesitleri için de organotipik kültür metotları uygulanmıştır. Nöron, glia ve diğer membran yapılarının normal yapı ve özellikle hücre hücre bağlantılarının korunduğu çeşitli beyin bölgelerine ait kesitlerle yapılan bu kültürler sayesinde, çeşitli sinirsel mekanizmaların analizi günler hatta haftalar boyunca yapılabilmektedir <sup>1,4,6</sup>. Ancak; beyin dilimleme süreci glutamat eksitotoksitesi ve iskeminin bir sonucu olarak, doku hasarına neden olduğundan işleme bağlı bu türden bir hasarı minimize etmek için özellikle diseksiyon ve dilimleme metodolojisini de optimize etmek gerekmektedir. Uzun süreli kültürlerde, kültür boyunca canlılığı en üst düzeyde tutabilmek, dolayısı ile daha başarılı sonuçlar elde etmek için de kültür gereç ve yöntemlerinde farklı yaklaşımlar da denenmektedir. Operasyon süresi yanı sıra dilimleme ve kültür sürecindeki birçok değişik faktör bu başarıyı doğrudan etkilemektedir.

Dilimleme için sıklıkla kullanılan ve kalın dilimler alabilen doku dilimleyiciler (tissue chopper), daha ince dilimler alınmasına da olanak veren vibrasyonlu (titreşimli) mikrotom (vibrotom)'lar <sup>7,8</sup> yanı sıra yüksek basınçlı su jeti de kullanılmıştır <sup>9</sup>.

Doğrudan kesitler alınabildiği gibi, agar ve agaroz gibi uygun bir bloklama materyali de kullanılabilir. Kesit alma sırasında dokuların içinde bulunacağı ve daha sonra kültür işleminin gerçekleştirileceği vasatların modifikasyonları da mümkündür.

Kültür işlemi için tarif edilen en yaygın metotlardan ikisi: plazma pıhtısı ile kaplama kültür modeli ve yarı geçirgen membran üzerine yapılan kültürdür <sup>10</sup>. Üçüncü metotta ise; doğrudan bir lamel veya kültür kabına alınan dilim kesitlerin üzeri kollajen veya matrijelle kaplanmakta ve üzerine vasat konulmaktadır. Bu işlem sayesinde doku, üç boyutlu varlığını doku hacminde önemli bir azalma olmaksızın sürdürebilmektedir. Kaplama maddesi hücrelerarası madde gibi görev yaparak alttaki dokunun beslenmesi yanı sıra fiziksel bir destek de sağlamaktadır <sup>11-13</sup>.

Tüm bu işlemlerin kültürün başarısını ne derecede

etkilediği de rutin histokimyasal, immünohistokimyasal, insitu ve elektronmikroskopik metotlarla araştırılmıştır. Bu amaç için en çok irdelenen histo-patolojik parametreler: canlılık-ölülük ve apoptozis testleridir <sup>14</sup>.

Beyin ve çevre dokuları dilimleme kesiti kültürlerinde bir modifikasyon olarak daha önce periferik sinir sistemi arka kök gangliyonu kültür modelinde kullanılan kollajenle kaplama metodu ile beraber B27 katkılı nörobazal besi yerinin kullanılmasının etkilerinin canlılık/ölülük testleri kullanılarak konfokal mikroskopik olarak ortaya konması ile bu metodun etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

6-8 günlük genç Swiss albino fareler (~20-30 g) kullanıldı. Fareler normal oda ısı ve nem koşullarında, plastik kafeslerde tutuldu, şehir şebeke suyu ve standart pellet sanayi yemi (Van Yem Sanayi) ile beslendiler. Çalışmalar, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Neuroscience Araştırma Birimi Deneysel Hayvanları Ünitesi'nde kurumsal yerel etik kurulu kuralları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Ketamin HCl (100 mg/kg, i.p.) anestezisi altında fareler frontonasal girişimle skalp ve kraniyumu hızla açılıp beyin hemisferleri bağlarından kurtararak nazik fakat hızlı bir şekilde kalvaryumlarından ayrıldı ve hemen içerisinde soğuk (0-3°C) vasat (B27 supplement-katkılı neurobasal A) bulunan Petri kaplarına alındı. Gerektiği takdirde; yıkama amacı ile vasat yenilendi. Beyinin orta hattan sağ ve sol hemisferleri ayrıldı.

Dilimleme kültürünün kesit alma basamakları için Gähwiler'ce tarif edilen metotlar esas alındı <sup>11,12</sup>. Bloklama için: steril bir enjektörden hazırlanmış bir kalıp içine beyin hemisferi uygun pozisyonda yerleştirildi ve üzerine etüvde 37°C'de bekletilen düşük erime ısıly agar (Sigma A9045) solüsyonu eklendi. Derin dondurucuya alınarak agarın hızla jelleşmesi dolayısı ile bloklama sağlandı. Blokların sertliği kontrol edilerek kalıptan çıkarıldı ve cyanoacrylate tabanlı hızlı bir yapıştırıcı ile kesit platformuna yerleştirildi.

Vibrotomun (Laica, VT) kesit havuzu soğutulmuş yapay Beyin Omurilik Sıvısı (yBOS)'la (1-3°C) doldurulup; yüksek frekans ve düşük hızda 200 µm'lik koronal kesitler cihazın havuzundan steril çok ince bir fırça veya küçük bir spatula yardımı ile önce içinde medyum bulunan bir Petri kabına alındı. Preparatlar 2 grup halinde toplandı.

**1. Kontrol Grubu:** Taze kesitler herhangi bir işlem veya kültüre tabi tutulmadan vasat içinde serbest yüzer halde boyanarak mikroskopik olarak incelendi ve görüntüldü.

**2. Deneysel Grubu:** Preparatlar önceden Poly-L-Lysine (Sigma P8920) kaplanmış lameller üzerine alınıp üzerleri

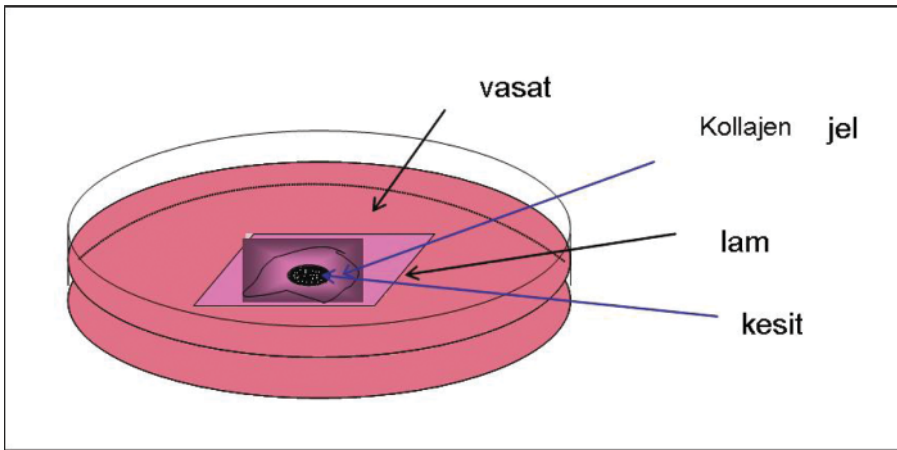
Nikosia ve Ottinetti'ye göre <sup>15</sup> her biri 20-30 µL kollajen (Type I, from rat tail-Sigma C7661) solüsyonu ile kaplandı ve kültür kaplarına aktarılıp üzeri B27 katkılı (Gibco 17504) Neurobasal A (Gibco, 10888-022) vasatı ile doldurularak derhal %95 nemli %5CO<sub>2</sub>'li 37°C'lik etüve (Sanyo IR) alınıp 72 saat boyunca kültüre edildi (*Şekil 1*). Daha sonra boyanarak incelendi.

Canlılık/ölülük değerlendirmesi için: 10 µL (1µM) Calcein AM (Sigma-BioChemika 04558) preparatları kaplayan vasata eklenerek 15 dak. beklendi ve mikroskopik incelemeye alındı. Canlı hücreler sarı-yeşil fluoerans yayarlar. Daha uzun süreler canlı hücrelerde toksik etki yaparak canlılığı olumsuz etkilediğinden bu süreye azami dikkat gösterildi. Propidium Iodide (PI), 1/10000 konsantrasyonda 10 µl olarak eklenerek PI (Sigma P4170), Calcein'le beraber aynı anda kullanıldı.

Mikroskopta inceleme esnasında canlılığı devam ettirmek için özel bir düzenek tasarlandı. Lam ebatlarına uygun olarak 5 mm kalınlığında bir pleksiglasın ortasında yaklaşık 6X8 mm ölçülerinde prizmatik bir

kuyucuk açıldı. Bunun alt yüzü geniş bir lamelle kapatıldı ve silikonla sabitlendi. Tüm görüntüleme işlemi en fazla 30 dak. sürdüğünden steril değil, fakat temiz çalışmaya özen gösterildi. Kuyucuk inkübatörde ısı ve gaz dengesi için bekletilmiş vasatla dikkatlice taşmıyacak şekilde dolduruldu. Daha sonra, incelenecek preparatın yerleştirildiği lamel 180° çevrilerek bu kuyucuğun üzerine doku kesiti vasatla temas edecek şekilde yerleştirildi ve iki kenarından platforma bantla sabitlendi (*Şekil 2*).

Mikroskopik inceleme konfokal lazer taramalı mikroskop (KLTM - Zeiss LSM 510 Meta sistemi)'da gerçekleştirildi. Calcein AM için (yeşil fluoerans) 488 nm, PI için ise (kırmızı) 543 nm dalga boyundaki filtreler kullanıldı. Çeşitli merkezi sinir sistemi bölgelerinin ayrıntılı görüntüleri alındı. Yaklaşık 1 µm kalınlığında alınan Z düzleminde optik kesit görüntüleri .zvi veya .ism uzantılı dosyalar halinde dijital olarak kaydedildi. Zeiss Axiovision 3.1. veya Image J (By, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) programı ile değerlendirildi.

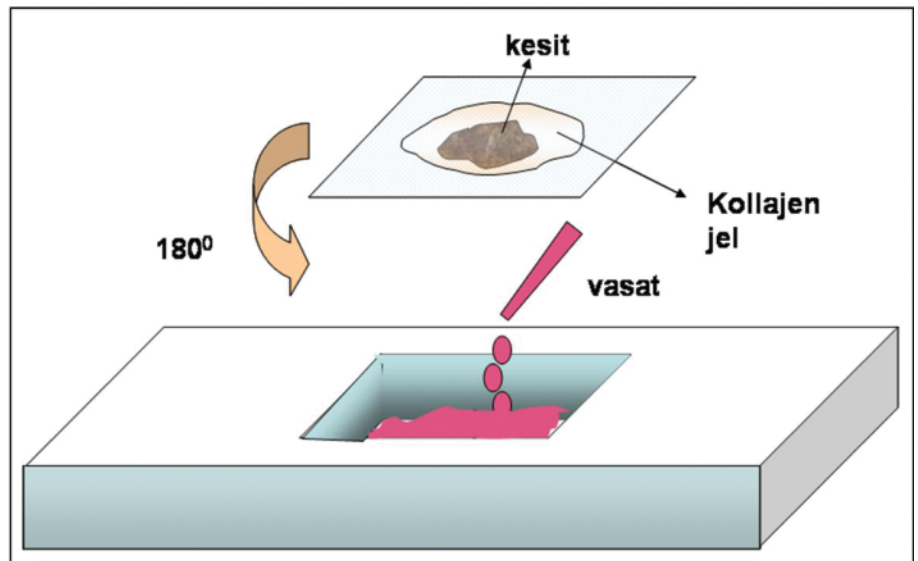


**Şekil 1.** Kültür için; kollajenle kaplanmış kesitlerin yer aldığı lamel vasatla doldurulmuş bir Petri kabına yerleştirilmesi

**Fig 1.** For culture; placing a collagen coated slice preparation to a Petri dish filled media

**Şekil 2.** Özel tasarlanmış görüntüleme platformu

**Fig 2.** Special designed imaging chamber



## BULGULAR

Pilot çalışmalarda kesit alma işleminde vibrotomun frekans ve hızının bu işlemin başarısını çok etkilediği görülmüş olup; en iyi sonuçlar, yüksek frekans ve düşük hızlarda elde edildi. Alınan kesitlerin konulduğu yBOS 'nin de daha sonraki kollajenle kaplama işleminde jelleşmeyi olumsuz etkilediği görüldü. Bu nedenle her ne kadar kesitler ilk çalışmalarda yBOS içinde alınsa da, daha sonra Nörobasal medyum kullanılması ile bu sorun giderildi.

*In vivo* ortama benzer ekstraselüler bir ortam oluşturulmak için invert mikroskopta canlı inceleme için tarafımızca tasarlanan kompartımda kesitler medyumla ters çevrilmiş olarak temas etmekteydi. Bu kuyucuğun sahip olduğu vasat ve gaz içeriğinin inceleme süreci kısa bir süreyi kapsadığından yeterli olduğu görüldü.

Bu çalışmada fluoresan işaretleme metotları yanı sıra lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılmıştır. Kesit diliminin kalınlığı arttıkça konvansiyonel mikroskopik tekniklerde görüntünün ayırt edici detaylı analizi zorlaşır; konfokal mikroskopide kesit kalınlığının bir olumsuz yönü yoktur. Bu sayede 200 mikrometrelik kesitlerden Z düzleminde belli yüksekliklerden 1 mikrometrelik optik kesit görüntülerini alındı ve dolayısı ile daha detaylı kesit görüntüleri alınabildi.

Kesit canlılığı fluoresan Calcein AM ve propidium iodide (PI) kullanılarak canlı-ölü karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Canlılık - ölümlük değerlendirilmeleri de niteliksel planda değerlendirilmiştir.

Kesiti takiben (taze preparatlarda) yapılan boyamalarda hücrelerin büyük kısmının canlı olduğu görüldü. Canlılık kesitin periferik bölgelerinde daha belirgindi. Ayrıca optik kesitlerde kesitin dış bölgelerinde de boyanmanın daha yoğun olduğu dikkati çekti (*Şekil 3/A*). Yer yer PI ile boyanmış hücrelerin çoğunda Calcein-AM'le de pozitif bir çift boyanma gözlemlendi. PI ile boyanmış ve ölü olarak kabul edilen bu hücreler de Calcein-AM ile boyanan hücrelerin yoğun olduğu bölgelere denk düşmekteydi. Bu hücreler, ölü değil fakat ölmekte olan hücreler olarak kabul edildi (*Şekil 3/B*). Genel olarak histolojik yapı bütünlüğü ve hücresel membran bütünlüğü korunmuştu. PI ile boyanmış hücreler bireysel bir karakter göstermekteydi.

Üç günlük kültür işlemi sonunda da taze preparatlarda olduğu gibi canlılığın özellikle periferik bölgelerde daha bariz olduğu; merkezi bölgelerde ise daha zayıf bir Calcein-AM boyanmasının olduğu gözlemlendi (*Şekil 3/C*). Büyük objektif büyütmelelerinde de PI ile boyanan hücre oranının da daha fazla olduğu belirlendi. Yine de PI ile

boyanan bu hücrelerin bir kısmının sitoplazmalarında da Calcein-AM ile boyanmış partiküllerin varlığı dikkati çekmekteydi (*Şekil 3/D*).

Genel olarak MSS dokularının katmanlarına ait histolojik mimari ve damarsal yapılarda da bütünlük korunmakla birlikte; hücresel olarak membran bütünlüğü kısmen bozulmuştu. PI ile boyanmanın yer yer grupsal bir karakter gösterdiği izlendi (*Şekil 3/E,F*).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tür model ve etkinlik araştırmalarında ana amaçlardan birisi: en uygun ve verimli metodu bulmak, diğeri: işlemler esnasında oluşan zararlı etkileri en aza indirmektir.

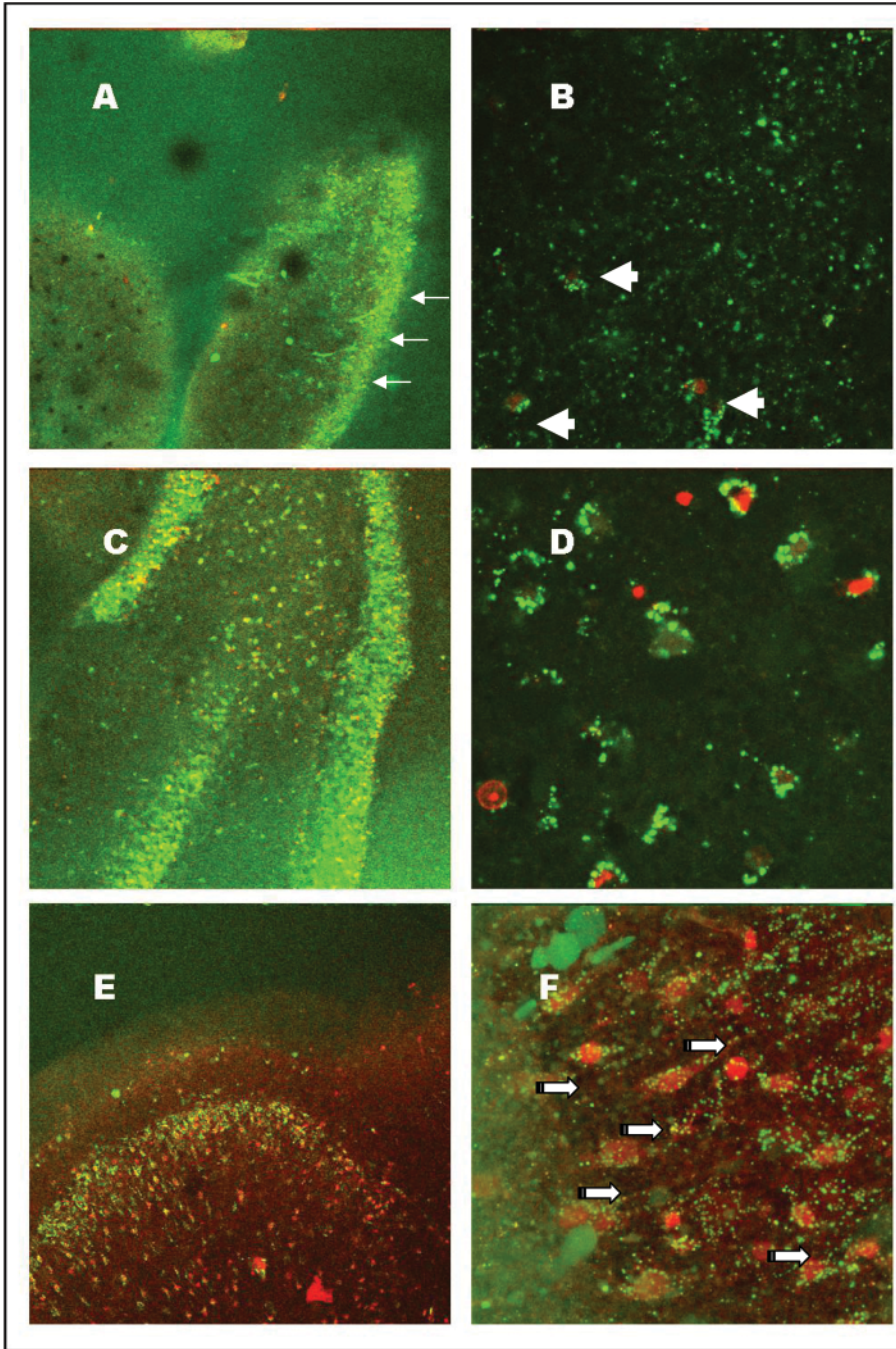
Dilimleme kültürleri ile farklı beyin bölgelerinden elde edilen ko-kültürler, ilaç veya toksik maddelerin uygulamaları, nöral plastisite ve nöral bağlantıların gelişimleri, fibril gelişimi ve sinaptik transmisyon analizinde yeteri kadar uzun bir süre için preparatların canlılığını sağlayarak anlık ve videomikroskopik izlenmesini sağlar <sup>4</sup>.

Tek tabakalı dilimler nöropil görüntülemesi dahil deneysel uygulamaların bir çoğu için hücrelerin canlı popülasyonlarını sağlayabilen bir ortam oluşturur. Ayrıca elektro-fizyolojik uygulamalarda elektrotların daha rahat yerleştirilmesi, farmakolojik ve toksikolojik çalışmalarda ise ilaç kalibrasyonunun daha rahat yapılması ve yıkama işlemlerinin daha kolay ve etkin yapılabilmesi gibi avantajları da vardır <sup>16</sup>.

Hangi kültür sisteminin seçileceği deney ihtiyacına göre ayarlanmalıdır. Kısa süreli bir çalışma planlanıyorsa, üç boyutlu (3D) ve morfolojiye dönük çalışılacaksa, elektro-fizyolojik özellikle de çoklu kayıt yapılacaksa veya biyokimyasal çalışmalar için büyük miktarda doku gerekiyorsa kaplama metodu daha uygundur <sup>2</sup>.

Bu çalışmada da, diğer tekniklerin dezavantajları göz önüne alınarak; daha önce fare arka kök gangliyonu (periferik sinir) *in-vitro* kültürlerinde kullanılan kollajenle kaplama modelinin bu kültüre bir uyarlaması kullanıldı. Bu modelin bir dezavantajı olarak oksijenizasyon sınırlı olduğundan: ya fetal bir dokudan alınmalı veya süre kısa tutulmalı veyahut da dilimlerin kalınlığı daha ince (100-150 mikrometre) olmalıdır <sup>2</sup>. Bu çalışmada literatürdeki sınırlar içerisinde 200 µm'lik bir kesit kalınlığı ve konfokal mikroskopik inceleme tekniği kullanılmıştır. Bu çalışmada farklı kesit kalınlıkları denenmediğinden karşılaştırmalı bir veri olmamakla birlikte; bu düzeydeki bir kesit kalınlığının hem histolojik yapıyı uygun düzeyde yansıtmayı, hem de canlılığın makul düzeylerde bulunması nedeni ile tercih edilebilir olduğu söylenebilir.





**Şekil 3.** Konfokal LTM ile alınan Calcein AM (yeşil)-PI (kırmızı) ile boyanmış viabilite-nonviabilite görüntüleri. A: Taze preparat: 10X genel görüntüde çevrede kuvvetli canlılık (ince oklar), B: Taze preparat: 40X detay görüntüde çift boyanmış hücreler (ok başları), C: 3 günlük kültür sonrası: 10X genel görüntüde merkezde zayıf canlılık, D: 3 günlük kültür sonrası: 40X detay görüntü, E: PI ile boyanmış ölü hücre toplulukları (10X) ve F: PI ile boyanmış ölü hücre toplulukları (kalın şerit oklar) (40X) görülmektedir

**Fig 3.** Viability and nonviability images of sections dyed by Calcein AM (green)-PI (red) on confocal microscope. A: From a fresh section: 10X magnification, general view (viability was stronger at side) (thin arrows), B: From a fresh section: 40X magnification, detailed view (double dyed cells) (arrow heads), C: From 3 days culture: 10X magnification, general view (viability was poorer at the center), D: From 3 days culture: 40X magnification, detailed view, E: Dead cells mass dyed with PI, 10X, F: Dead cells mass dyed with PI (thick arrows), 40X

Farelerle yapılan deneysel çalışmalarda donör yaşının da önemli olduğu; 1-2 günlük beyinlerde viabilite, 4-13 günlük beyinlerde ise morfolojinin daha belirgin olduğu, ancak birkaç günden sonra bu canlılığın düştüğü görülmüştür<sup>1</sup>. Merkezdeki nekrozisin sebebi O<sub>2</sub> yetersizliğidir<sup>2</sup>. Bu avantajdan faydalanmak için biz de çalışmamızda genç hayvanları kullandık.

Dilimleme süreci glutamat eksitotoksitesisi ve iskeleminin bir sonucu olan doku hasarına neden olur<sup>17</sup>. Konvansiyonel işlem soğuk (ice-cold) yBOS içinde mikrotomla kesmektir<sup>18</sup>. 50 mikrometrelik bir kesitte dokunun kompresyon veya stres nedeni ile hasra uğradığı ve

oluşan debrisin gaz ve substrat geçişini engellediği bunun da nöron canlılığını etkilediğini iddia edilmiştir. Kesim işleminin bir takım zararlar oluşturması söz konusudur<sup>9</sup>.

Vibrotom kesitlerinde beklenen kesi zararlarından olan doku kaybı ve zedelenmesinin engellenerek daha homojen ve düzgün kesitler alınabilmesi, cihazın yüksek titreşim frekansında ve çok düşük hızlarda kullanılması ile büyük oranda sağlandı. Aksine, yüksek hız ve düşük frekansın dokunun fragilitesi nedeni ile kesit kalınlığının her tarafında homojen olmaması ve kesit yüzeyinin pürüzlü olması gibi sorunlara yol açtığı gözlemlendi.

Dilimleme kültürlerinde modifikasyonlar ile vasat (medyum) ve kültür şartları optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada da dokunun ilk çıkarılmasından itibaren kültür işlemine kadar olan aşamalarda soğuk ortam ve vasatlar (yBOS ve Nörobasal Medyum) kullanılmıştır <sup>19</sup>. Bu işlem dokunun metabolizmasını yavaşlatarak besin ve oksijene olan ihtiyacını azaltacak, dolayısı ile bu aşamada meydana gelecek doku hasarını en az düzeye indirecektir <sup>20</sup>.

Literatürde de bu çalışmada kullanılan konfokal mikroskopla yapılmış benzer çalışmalar olmakla birlikte sınırlıdır <sup>21,22</sup>. KLTM'de 200 mikrometre gibi çok daha kalın kesitler veya doku parçaları incelenebilir. KLTM'de odak belirli aralıklarla değiştirilerek preparatın istenilen seviyelerinden optik kesitler alınabilir ve daha sonra bunlardan üç boyutlu, interaktif görüntüler elde edilebilir.

Araştırmalarda canlı hücre boyaması için Calcein-AM, ve MTT <sup>22-26</sup> gibi, ölü hücre boyaması için de propidium iodide (PI) <sup>21,24,27</sup>, etidium bromide, DAPI, trypan blue <sup>22,25</sup> kullanılmıştır.

Calcein AM, canlı hücrelerin membranlarından serbestçe geçebilen bir fluoresan klorometil türevidir <sup>23,24,26</sup>. Canlı hücreler birkaç saat sarı-yeşil fluoresan yayarlar. Calcein AM boyaması için 15 dakika yeterlidir. Daha uzun süreler canlı hücrelerde toksik etki yaparak canlılığı olumsuz etkilediğinden bu süreye azami dikkat gösterilmelidir.

PI nöronal hücre ölümünü hesaplamada eski, fakat etkin bir metodudur. Fluoresan yoğunluğu ile hücre ölümü arasında lineer bir ilişki bulunmuştur. PI, intakt/canlı bir hücre membranından geçemezken; ölü hücrelerde oldukça erken bir dönemde nükleer bozulmanın bir sonucu olarak sitoplazma içine dağılan nükleer materyali veya çekirdeği parlak pembe/kırmızı fluoresan renge boyar <sup>21,27</sup>. Nöral bütünlüğe ait bir gösterge olarak kullanılmakta olup; temelde sinir hücreleri için nontoksik olarak kabul edilir <sup>12</sup>.

Canlı/ölü değerlendirmelerinde PI ve Calcein AM kombinasyonu kullanılmaktadır. Bu ölü veya ölmekte olan hücreler ile intakt canlı hücreleri aynı anda gösterilmektedir. Tek problem, PI tek başına DNA veya RNA'ya tutunduğundan denatüre intraselüler nükleik aside sahip ölmekte olan hücreleri de göstermemektedir. Fakat bu eksiklik de canlı hücreleri gösteren Calcein AM ile kapatılmıştır <sup>16</sup>. Bu çalışmada da bu yaygın kombinasyon tercih edilmiştir. Boyalar bu metotta birbirlerinin kontrolü gibi çalışmaktadır. Diğer ve en önemli avantajı ise, aynı anda kullanılabilir olmalarıdır. Zira ayrı zamanlarda yapılacak canlı/ölü değerlendirmeleri doku-

nun sadece o andaki durumunu yansıtacağından eş zamanlı veriler olarak değerlendirilmesi tartışmalıdır.

Ancak bu boyamada dikkati çeken çifte boyanmış hücrelerin varlığıdır. Bu büyük olasılıkla Calcein-AM'in hücrelerde yaptığı toksik etkiye bağlıdır. Boyama için inkübasyon süresi kısa tutularak bu asgari düzeye indirilebilse de, özellikle uzayan konfokal incelemelerde bu çift boyamanın arttığı gözlemlendi. Dolayısı ile her ne kadar bir hücre PI ile boyanmışsa da eğer Calcein-AM ile de boyanmışsa bu o hücrenin ölmüş bir hücre değil büyük ihtimalle toksik etkiye bağlı olarak ölmekte olan bir hücre olduğunu gösterir. Bundan dolayı bu hücreleri de canlı olarak kabul etmek mümkündür.

Bu metodun bir açık tarafı da nöron yanı sıra diğer glia hücrelerinin hatta damar endotelinin de boyanmasıdır. Bu morfolojik ayırımı gerektiren bir husus olup genellikle sorun oluşturmaz. Tabii ki immünohistokimyasal teknikler veya insitu-hibridizasyon metotları daha özgün olmakla birlikte uygulamaları pratik değildir <sup>28</sup>.

Bu çalışma bir yöntem arayışı ve etkinlik çalışması olması yönüyle, morfolojik yorumları canlı ölü testi ile sınırlandırılmış olup; bu canlılık - ölümlük değerlendirilmeleri de niteliksel planda değerlendirilmiş ve herhangi bir niceliksel ve istatistiksel yoruma gidilmemiştir. Bu çalışmanın niceliksel stereolojik çalışmalar yanı sıra immünohistokimyasal veya insitu teknikleri içeren daha ileri çalışmalarla desteklenmeleri gerekmektedir.

Sonuç olarak: model olarak öngörülen MSS dilimleme ve organotipik kültürü metodu ile bu metodun etkinliğini çabuk ve kolay bir şekilde ve eş zamanlı olarak ortaya koyabilen Calcein-AM ve PI canlılık/ölülük testinin, kısa süreli *in vitro* uygulamalar için etkin, denenmiş ve başarılı bir metot olarak kullanılabilir olduğu ve bu tür metotların invivoyu yüksek temsil kabiliyeti ile farmakolojik, toksikolojik ve gelişimsel hayvan deneyleri için uygulanabilir bir model olduğu kanısına varılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'nca desteklenmiş (2000TF074) ve YYÜ Tıp Fakültesi Neuroscience Araştırma Birimi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Yazarlar her iki kuruma da katkılarından dolayı teşekkür ederler.

## KAYNAKLAR

1. Connely CA, Chen LC, Colquhoun SD: Metabolic activity of cultured rat brainstem, hippocampal and spinal cord slices. *J Neurosci Methods*, 99 (1-2): 1-7, 2000.
2. Gähwiller BH, Copogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM: Organotypic slice cultures: A technique has

- come of age. *Trends Neurosci*, 20 (10): 471-477, 1997
3. **Peña F:** Organotypic cultures as tool to test long-term effects of chemicals on the nervous system. *Curr Med Chem*, 17 (10): 987-1001, 2010.
  4. **Haydar TF, Bambrick LL, Krueger BK, Rakic P:** Organotypic slice cultures for analysis of proliferation, cell death and migration in the embryonic neocortex. *Brain Res Brain Res Protoc*, 4 (3): 425-437, 1999.
  5. **Stoppini L, Buchs PA, Muller D:** A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, 37 (2): 173-182, 1991.
  6. **Lossi L, Alasia S, Salio C, Merighi A:** Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS. *Prog Neurobiol*, 88 (4): 221-245, 2009.
  7. **Lynch G, Schubert P:** The use of *in vitro* brain slices for multidisciplinary studies of synaptic function. *Annu Rev Neurosci*, 3, 1-22, 1980.
  8. **Teyler TJ:** Brain slice preparation: hippocampus. *Brain Res Bull*, 5 (4): 391-403, 1980.
  9. **Bingmann D, Wiemann M, Speckmann EJ, Köhling R, Straub H, Dunze K, Wittkowski W:** Cutting of living hippocampal slices by a highly pressurized water jet (macromingotome). *J Neurosci Methods*, 102 (1): 1-9, 2000.
  10. **Bergold PJ, Casaccia-Bonnel P:** Preparation of organotypic hippocampal slice cultures using the membrane filter method. *Methods Mol Biol*, 72, 15-22, 1997.
  11. **Gähwiler BH:** Organotypic cultures of neural tissue. *Trends Neurosci*, 11 (11): 484-489, 1988.
  12. **Gähwiler BH:** Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, 4 (4): 329-342, 1981.
  13. **Lonchamp E, Dupont JL, Beekenkamp H, Poulain B, Bossu JL:** The mouse cerebellar cortex in organotypic slice cultures: An *in vitro* model to analyze the consequences of mutations and pathologies on neuronal survival, development, and function. *Crit Rev Neurobiol*, 18 (1-2): 179-186, 2006.
  14. **Del Turco D, Deller T:** Organotypic entorhino-hippocampal slice cultures - a tool to study the molecular and cellular regulation of axonal regeneration and collateral sprouting *in vitro*. *Methods Mol Biol*, 399, 55-66, 2007.
  15. **Nicosia RF, Otinetti A:** Growth of microvessels in serum-free matrix cultures of rat aorta. *Lab Invest*, 63 (1): 115-122, 1990.
  16. **Hochman S, Song L, Fedirchuk B, Parsley C, Sawchuk M, Bachle-Stolz C:** Near-monolayer sectioning of live CNS tissue. Leica Application Brief, 1997.
  17. **De Clerck LS, Bridts CH, Mertens AM, Moens MM, Stewens WJ:** Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *J Immunol Methods*, 172 (1): 115-124, 1994.
  18. **Misgeld U, Bijak M, Brunner H, Dembowski K:** K-Dependent inhibition in the dentate- CA3 network of guinea pig hippocampal slices. *J Neurophysiol*, 68 (5): 1148-1157, 1992.
  19. **Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ:** Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*, 35 (5): 567-576, 1993;
  20. **Kasparov S, Teschemacher AG, Paton JF:** Dynamic confocal imaging in acute brain slices and organotypic slice cultures using a spectral confocal microscope with single photon excitation. *Exp Physiol*, 87 (6): 715-724, 2002.
  21. **Laake JH, Haug FM, Wieloch T, Ottersen OP:** A simple *in vitro* model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. *Brain Res Brain Res Protoc*, 4 (2): 173-84, 1999.
  22. **Monette R, Small DL, Mealing G, Morley P:** A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. *Brain Res Brain Res Protocol*, 2 (2): 99-108, 1998.
  23. **Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K:** A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull*, 19 (11): 1518-1520, 1996.
  24. **Liu Y, Peterson DA, Kimura R, Schubert D:** Mechanism of cellular 3-(4,5dimethylthiasol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*, 69 (2): 581-593, 1997.
  25. **Patterson MK:** Measurement of growth and viability of cells in culture. *Methods Enzymol*, 58, 141-152, 1979.
  26. **Wang XM, Terasaki PI, Rankin GW Jr, Chia D, Zhong HP, Hardy S:** A new microcellular cytotoxicity test based on Calcein AM release. *Hum Immunol*, 37 (4): 264-270, 1993.
  27. **Wilde GJ, Sundstrom LE, Iannotti F:** Propidium iodide *in vivo*: An early marker of neuronal damage in rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 180 (2): 223-226, 1994.
  28. **Noraberg J, Poulsen FR, Blaabjerg M, Kristensen BW, Bonde C, Montero M, Meyer M, Gramsbergen JB, Zimmer J:** Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 4 (4): 435-52, 2005.