

DENEY NO: 9

SİTOTOKSİSİTE

A) Genel Bilgi:

Sitotoksosite; canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranını ifade eder. Sitotoksosite testleri, toksik olduğu düşünülen maddenin, uygun hücre kültüründe, hücre çoğalma oranı ve hücre üzerindeki toksik etkisi dikkate alınarak değerlendirme yapılan testlere denir. Bu test sistemleri; morfolojik olarak hücresel hasarın gözlenmesi, hücresel hasarın çeşitli ölçüm yöntemleri ile belirlenmesi, hücresel büyümenin belirlenmesi, hücresel metabolizmadaki herhangi bir değişikliğin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır.

Sitotoksosite testleri *invivo* veya *invitro* olarak yapılabilmektedir. *Invitro* testlerde, sitotoksitesini araştırılan madde artan konsantrasyonlarda hücrelere uygulanır. Bu maddenin hücre morfolojisi ve hücrelerin yaşama oranları üzerine etkileri araştırılır.

Sitotoksosite 5 farklı yöntem kullanılarak ölçülebilir, bunlar;

1. **MTT yöntemi** [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid]: Bu yöntemde MTT formazana indirgenir, bu esnada oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür. Oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısını verir.
2. **Tripan mavisi yöntemi** (Laboratuvarımızda bu yöntem kullanılacaktır)
3. **Sülforodamin B yöntemi**: Kiton kırmızısı kullanılarak yapılan bir fluoresan boyama yöntemidir.
4. **WST yöntemi** (2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium, monosodyum tuzu): Bu yöntemde hücre proliferasyonu ve yaşama oranını kolorimetrik olarak tayin edilir.
5. **Klonojenik yöntem**: Mikrobiyolojik bir yöntemdir. Genellikle kanser araştırma laboratuvarlarında ilaçlar veya radyasyonun, tümör hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla kullanılır.

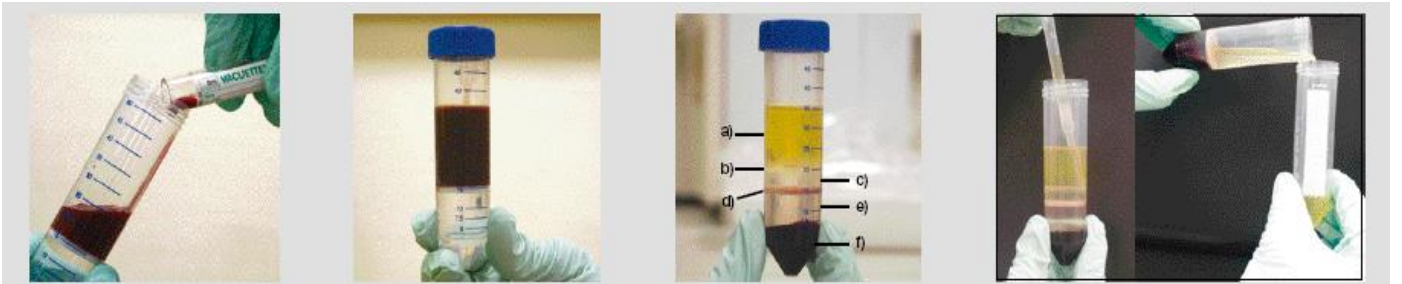
B) Deneyin Yapılışı:

Kandan lenfosit izolasyonu:



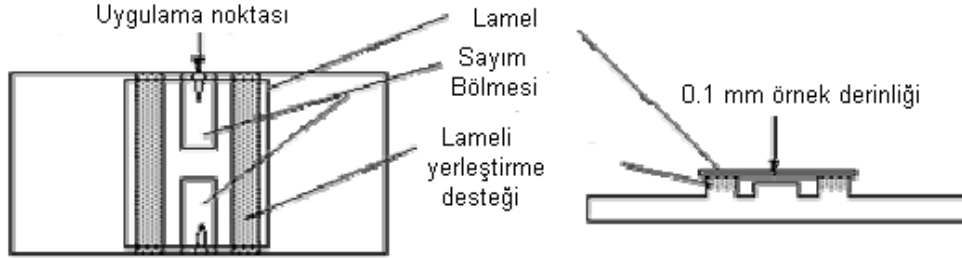
1. Öncelikle fikol (lenfosit ayırma çözeltisi) ışıktan korunarak oda sıcaklığına getirilir.
2. 50 ml'lik LeucoSep tüplere 15 ml fikol konur.
3. 1000 g'de 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edilir.
4. Taze ve antikoagüle edilmiş (heparinli tüpe alınarak) 15-30 ml kan tüpe aktarılır.
5. 1000 g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilir.
6. Santrifüjden sonra tüpteki fazların sıralaması yukarıdan aşağıya şu şekilde olmaktadır:
Plazma - lenfosit içeren arafaz – fikol – disk – fikol – pellet (eritrositler ve granüositler).
7. Lenfosit içeren arafaz bir pastör pipet yardımı ile alınır veya disk üzerinde tüm fazlar başka bir tüpe aktarılır. Bu aşamada tüpte bulunan disk, eritrositler ve granüositleri içeren pelletin aktarılmasını önlemektedir.
8. Diğer bir tüpe aktarılan lenfositli fazın üzerine 10 ml PBS ilave edilir. Vorteksledikten sonra 250 g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilir.
9. Santrifüjden sonra üst faz atılır, tekrar 10 ml PBS ilave edilerek 250 g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilir.
10. Son santrifüjden sonra üst faz atılır ve pelletin üzerine 1 ml RPMI ilave edilerek iyice karıştırılır.

Bu şekilde lenfosit izolasyonu sağlanmış olunur.

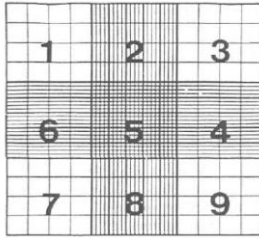


Lenfositlerin mikroskopta sayılması:

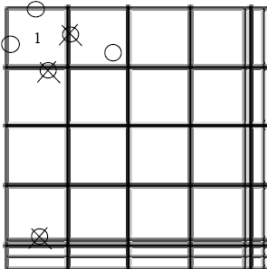
1. 1ml'lik lenfosit çözeltisinden 40 µl alınır ve üzerine 40 µl trypan mavisini eklenir (dilüsyon faktörü = 2) ve karıştırılır.
2. Neubauer sayım lamı alınır. Üzerine şekilde görüldüğü gibi lamel kapatılır. Lenfosit-trypan mavisini karışımı bekleme yapılmadan uygulanır.



3. 1, 3, 5, 7 ve 9 numaralı karelerdeki hücreler sayılır.



1, 3, 7 ve 9 numaralı karelerin (köşe kareler) içerisinde 16 adet küçük kareler, 5 numaralı karenin (merkez kare) içerisinde ise 25 adet küçük kare bulunmaktadır. Her bir kare 1mm²'dir ve derinlik 0.1 mm'dir, buna göre her karedeki hacim 0.1 mm³ 'tür. (0.0001 ml)



Yandaki şekilde köşe karelerden bir tanesi görülmektedir. Sayım yapılırken soldan sağa, yukarıdan aşağıya gidilmelidir. Aynı hücreyi iki kez saymamak amacıyla, karelerin sol ve üst çizgilerine temas eden hücreler sayılır, alt ve sağ çizgilere temas eden hücreler sayılmaz.

Canlı hücreler şekildeki gibi görülürken ölmüş hücreler boyayı absorbe edeceğinden içleri mavi görülür.

4. Sayılan 5 karedeki hücrelerin ortalaması alınır, dilüsyon faktörü ve 10⁴ ile çarpılır.

$$\frac{\text{Toplam hücre sayısı}}{5} \times 10^4 \times 2 = 1 \text{ ml'deki hücre sayısı.}$$

5. 5 kare içerisindeki ölü hücrelerin sayısı hesaplanır.
6. % Yaşama oranı bulunur.

Lenfositlerin H₂O₂ ile maruz bırakılması:

1. 25, 50 ve 100 µM H₂O₂ hazırlanır.
2. 3 adet ependorf alınır, her birine 50 µl lenfosit çözeltisi + 900 µl PBS + 50 µl H₂O₂ (25, 50 ve 100 µM H₂O₂ olacak şekilde) konulur.
3. 5 dakika buzdolabında bekletilir.
4. 5 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilir.
5. Üst faz atıldıktan sonra 900µl PBS ilave edilerek karıştırılır.
6. Tekrar 5 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilir.
7. Üst faz atıldıktan sonra RPMI ile 1 ml'ye tamamlanır.
8. H₂O₂'e maruz bırakılan lenfositlerde hücre sayımı yapılır.