HÜCRE ÇÖZME, DONDURMA VE PASAJLAMA

Doç. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT

Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü MANİSA

YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ DENEYSEL SAĞLIK BİLİMLERİ ARAŞTIRMA MERKEZİ
UYGULAMALI HÜCRE KÜLTÜRÜ KURSU 03-04/06/2016

- Hücreler kültür koleksiyonundan alındığında üreyen kültür şeklinde veya donmuş haldedir.

- Donmuş haldeki hücrelerin kullanılabilmesi için çözdürme işlemi yapılmalıdır.

- Donmuş olarak saklanmış hücrelerden araştırma ya da üretim amacıyla yeni kültürler hazırlanabilir.
- Çözdürme işlemi, en az hücrelerin dondurulma aşaması kadar önemlidir ve özen gerektirir.
- Donma sırasında gelişen olaylar, çözülme sırasında tersine oluşur.

- Dondurulmuş hücreler tekrar ısıtılırken iki önemli sorun hücre harabiyetine yol açmaktadır.

- Birincisi ısınma sırasında hücre içinde kristal oluşumu yeniden başlar

hücrede mekanik hasara yol açar.

- İkincisi donma sırasında gelişen olayların tam tersinin çözünme sırasında gerçekleşerek ekstrasellüler alanın hipotonik karakter kazanmasıdır.

Ekstrasellüler ortam intrasellüler ortamdan önce çözülür ve ani olarak serbest sıvı salınır.

Hücrenin şişerek patlamasına yol açar.

- Özellikle bu olay kuvvetli penetran kryoprezervatiflerin varlığında daha belirgindir.

Çözüm

- Çözünmenin, dondurmanın aksine çok hızla yapılması
- Hücreleri çözünme sırasındaki osmotik şoktan koruyabilmenin bir yolu
- Nonpenetran (HES gibi) kryoprezervatiflerin kullanılması
- Penetran olsa dahi, (DMSO gibi) hızlı diffüzyon yeteneği olan bir kryoprezervatif ajanın kullanılması

Çözdürme

LN_2

▼

37°C

▼

+serum

▼

santrifugasyon

▼

+besi ortamı

▼

inkubasyon

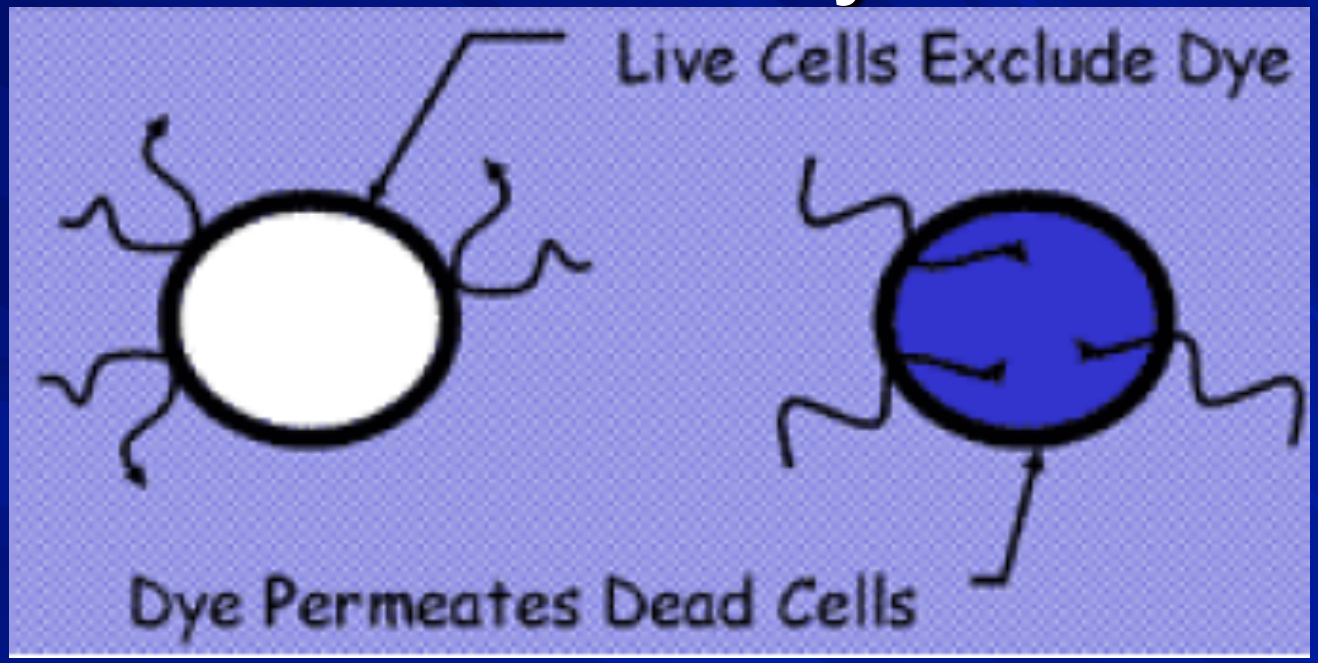
Hücre Çözdürme Protokolü

- Hücreler dondurma vasatı içersinde -80 veya -196°C'deki ortamlarda uzun süre saklanabilir.
- Hücre çözdürülmesi ve kültürü için laboratuar uygun şekilde hazırlandıktan sonra stok hücre alınarak 37°C'deki su banyosunda kapak kısmından tutularak sallanarak çözülmesi beklenir (yaklaşık 1-2 dk).
- Bu işlem yapılmadan önce ısınmış olan kültür vasatından 5 ml santrifüj tüpüne konur.
- Tamamen çözünmüş stok hücre viali alkol ile silindikten sonra hava akışlı kabin içerisine alınır.
- Sol el ile vial sabitlenerek, sağ el ile kapak dikkatli bir şekilde açılarak kapak ters olarak kabin içersine konur.
- Sol eldeki vial içerisinden içerisinde 2ml kültür vasatı olan pipet ile hücre alınır ve santrifüj tüpüne aktarılır.
- Pipetaj yapılarak hücre ile kültür vasatının karışması sağlanır.
- Hücreler 1000 rpm' de 5 dk santrifüj edilir. Tüpün içindeki süpernatant pipetle çekilerek atılır.
- Tüpün içine 1 ml vasat konularak pipetaj yapılır ve direkt kültür kabı içine hücreler konur.
- Kültür kabı üzerine hücrenin adı, açılma tarihi ve dondurulduğu tarihteki pasaj sayısı yazılarak hücreler inkübatöre kaldırılır.

ÖNLEMLER

- Derin dondurucu veya sıvı azot kaplarının kullanımı sırasında soğuk yanıklarından ve hasarlı ampullerden korunmak için koruyucu gözlük ve yalıtımlı eldiven kullanmalıdır.
- Ampulleri sıvı azottan çıkartırken dikkatli olmalıdır. Ani ısı değişimi ampullerin patlamasına neden olabilir.
- Koruyucu gözlük ve yalıtımlı eldiven kullanmalıdır.
- Eğer stoklanan biyolojik materyal tehlikeli ise (patojenleri, kanserojenleri ya da benzeri zararlıları içeriyorsa) dondurma öncesi ampulü koruyucu bir tüp içerisine yerleştirilmelidir.

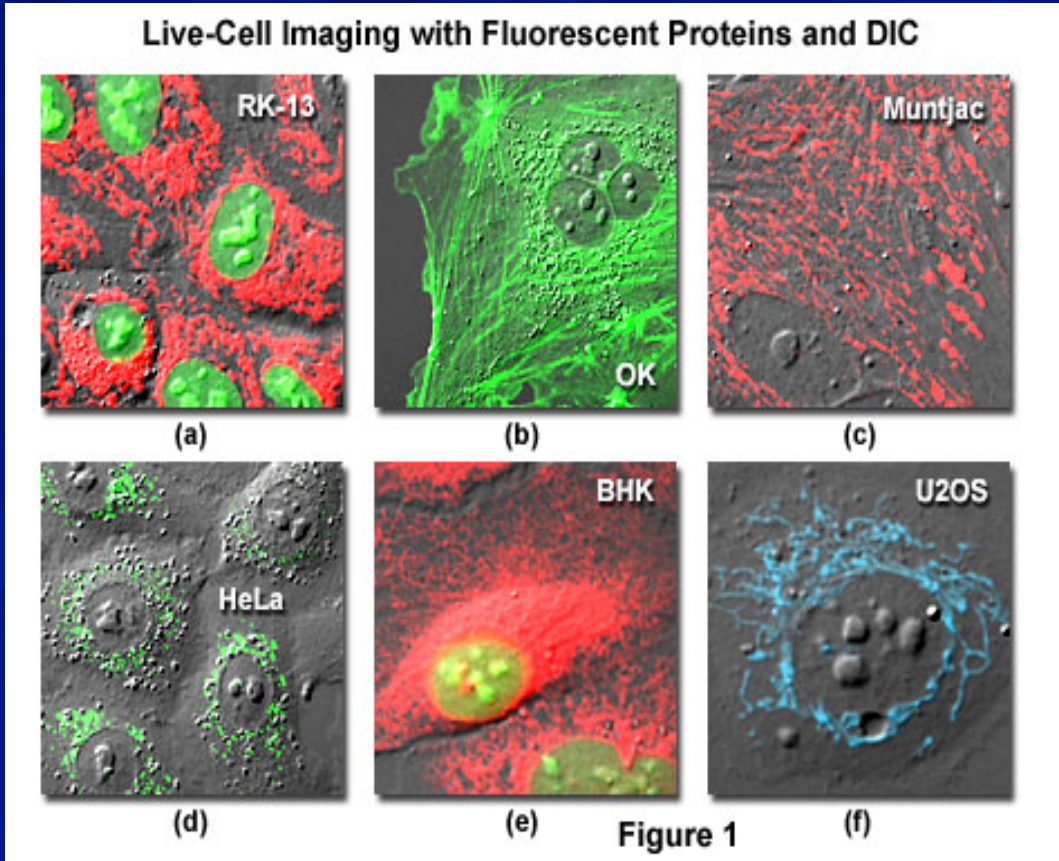
Canlılık Tayini



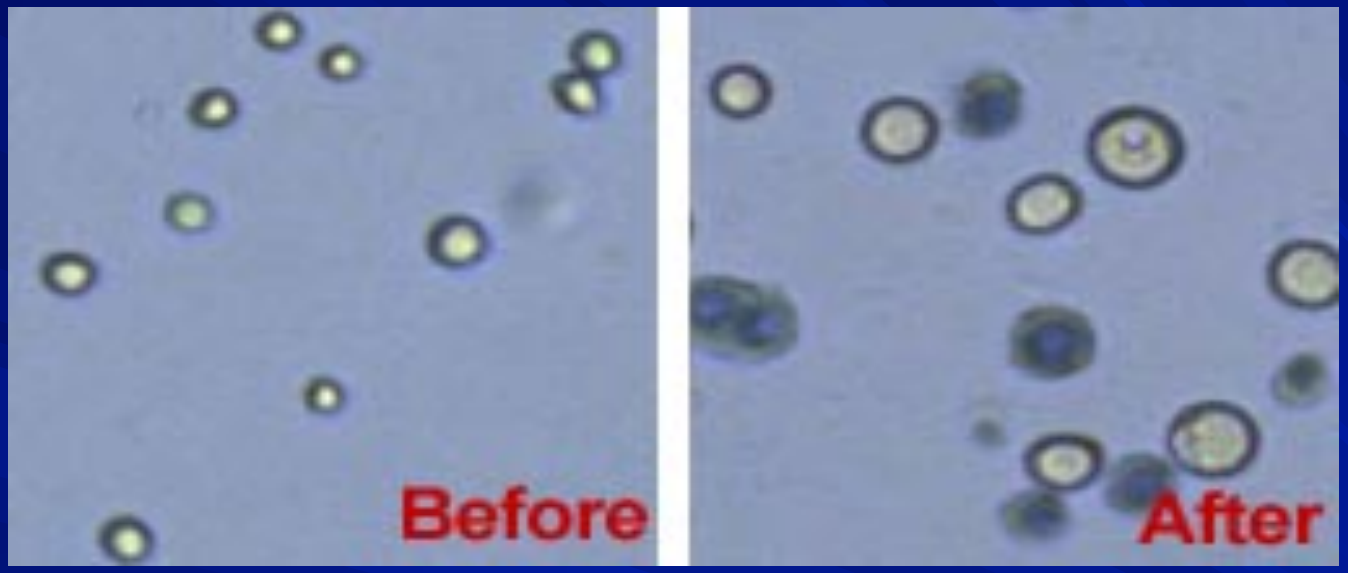
- Hücrelerin boyanarak incelenmesi, hücre morfolojisini gözlemlemek ve hücreleri identifiye etmek için kullanılan en kolay ve en direkt tekniklerdendir.

Hücre kültürlerinde hücre morfolojisini ve canlılığının saptanmasında yaygın olarak kullanılan boyalar;

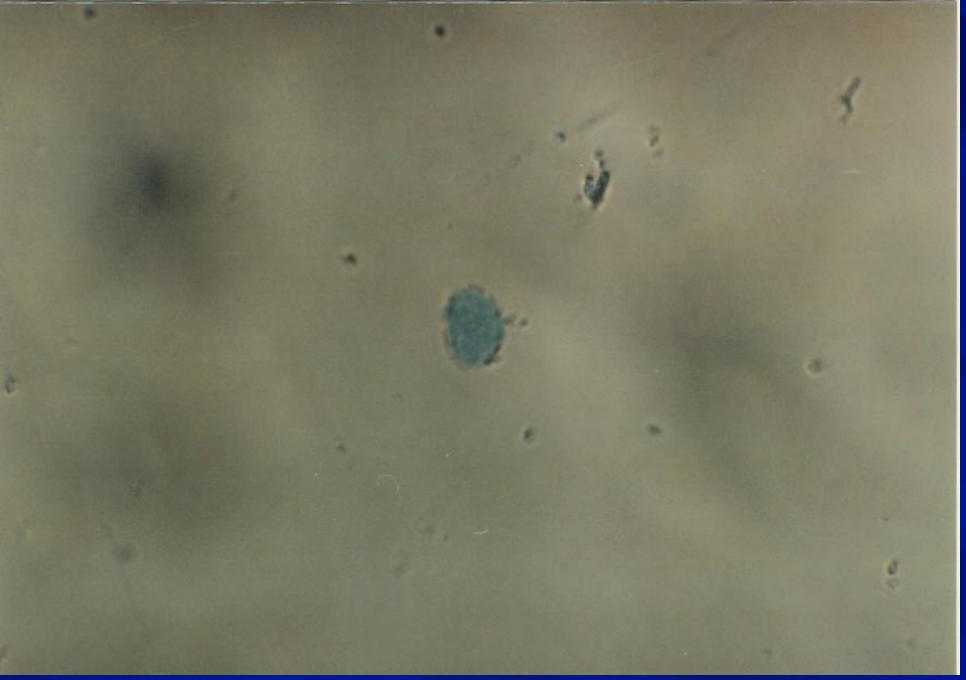
- tripan mavisi
- kristal viyole
- Giemsa
- metilen mavisi
- alşiyan mavisi
- ***Coomassie*** mavisi
- Kongo kırmızısı
- safranin
- eosin
- eritrosin
- nötral kırmızısı
- MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

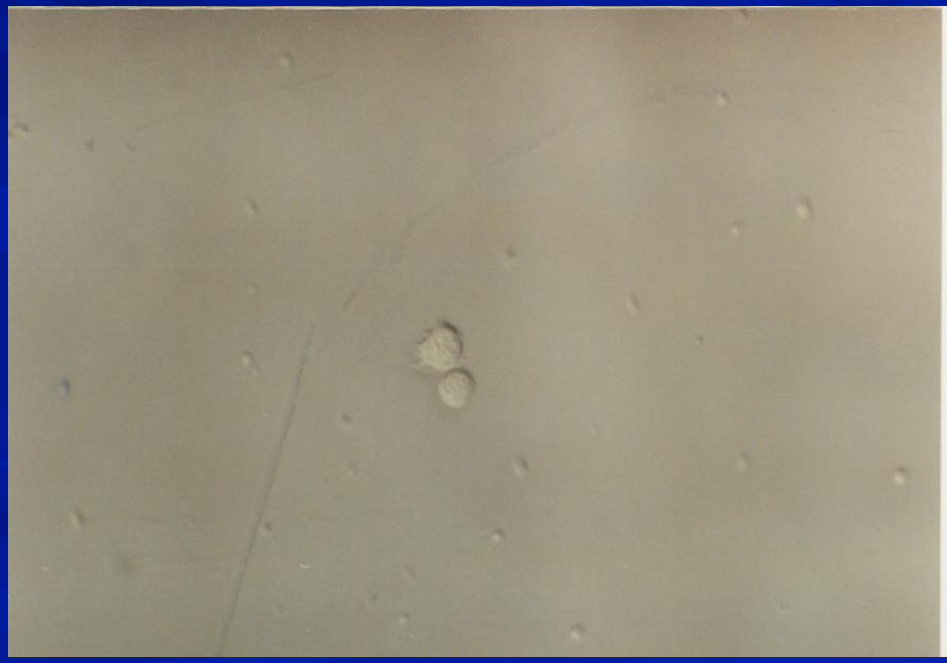


Tripan Mavisi ile Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi



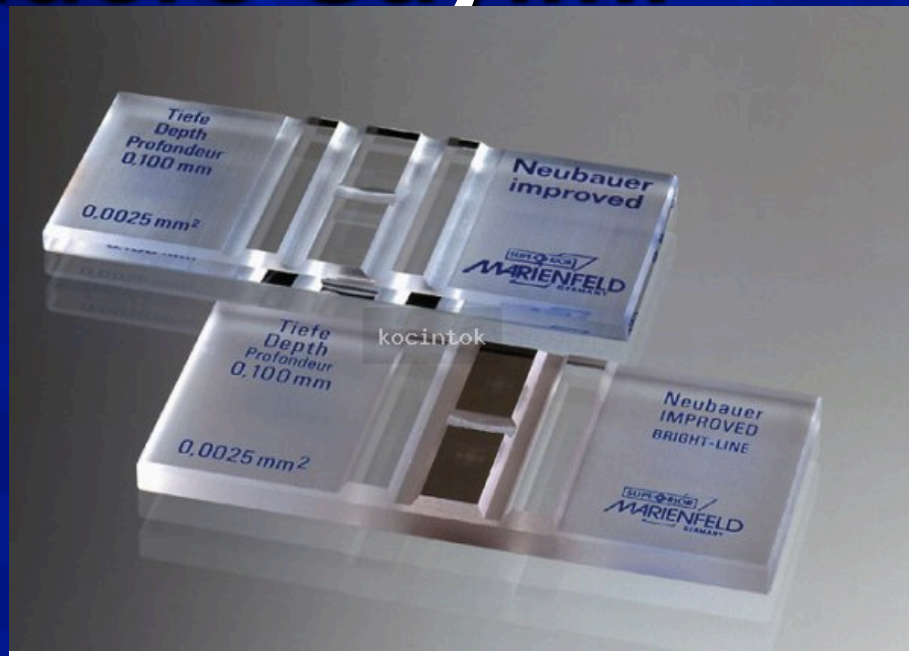
- Canlılık tayininde veya hücre sayımında membran bütünlüğünün korunması esasına göre ölü hücreler boya alırlar. Bu amaç için eritrosin-B, tripan mavisi vb. boyalar kullanılır.
- Ölü hücreler içersine boya girdiğinden dolayı sitoplazlamaları boyanmış olarak görülür.
- Canlı hücreler ise boyayı almadığından dolayı parlak sarı renkte ayırt edilir.

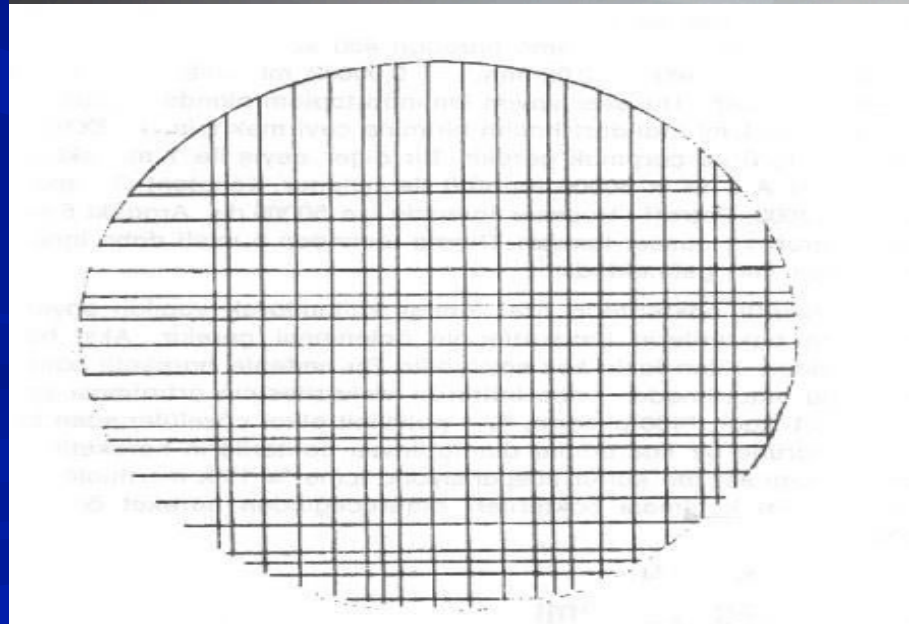




Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

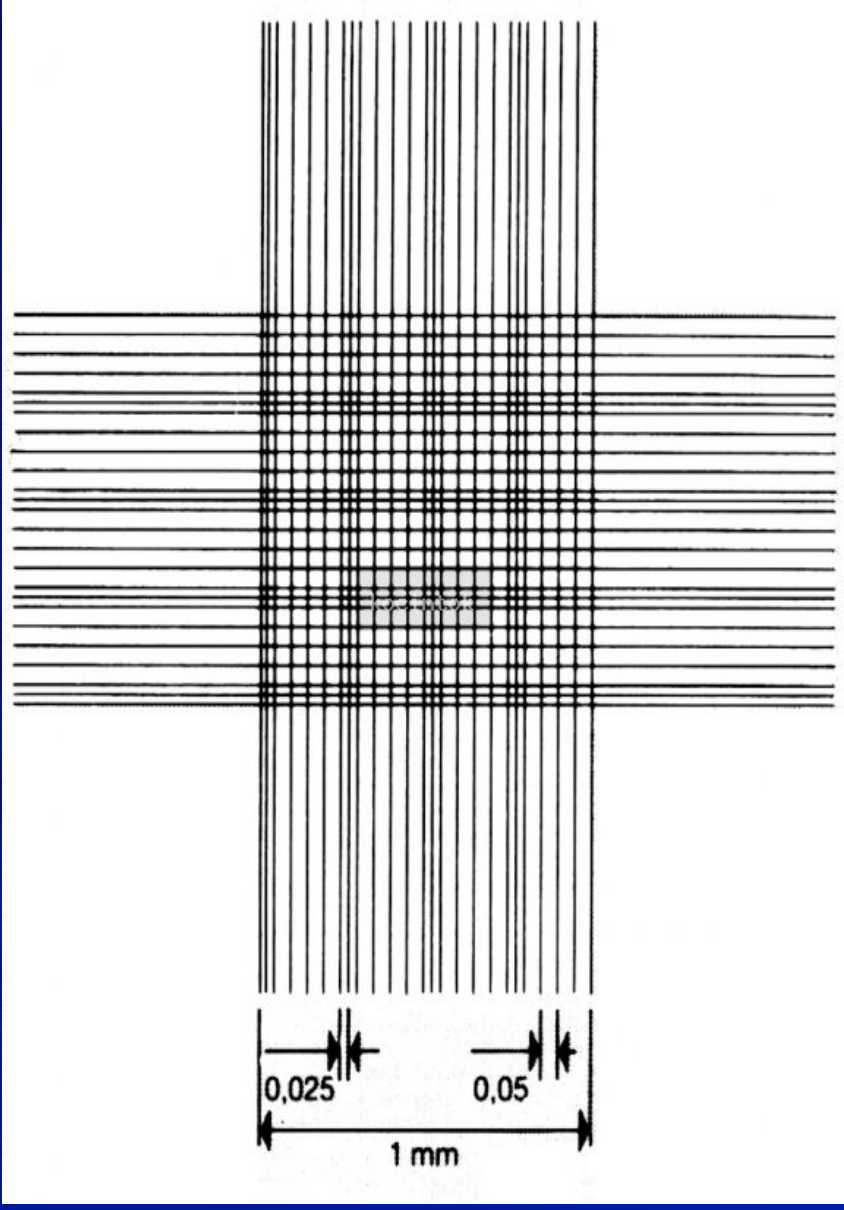
- Thoma lamının esası, 0,1 mm^3 hacimde sayım yapılmasıdır.
- Thoma lamının üzerinde çukur bir kısım vardır. Hücreler buraya aktarılır üzerine lamel kapatıldığında bu çukurda 0,1 mm yüksekliğinde bir sıvı kalmaktadır.
- Sayım yapılacak alan cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiştir.





Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

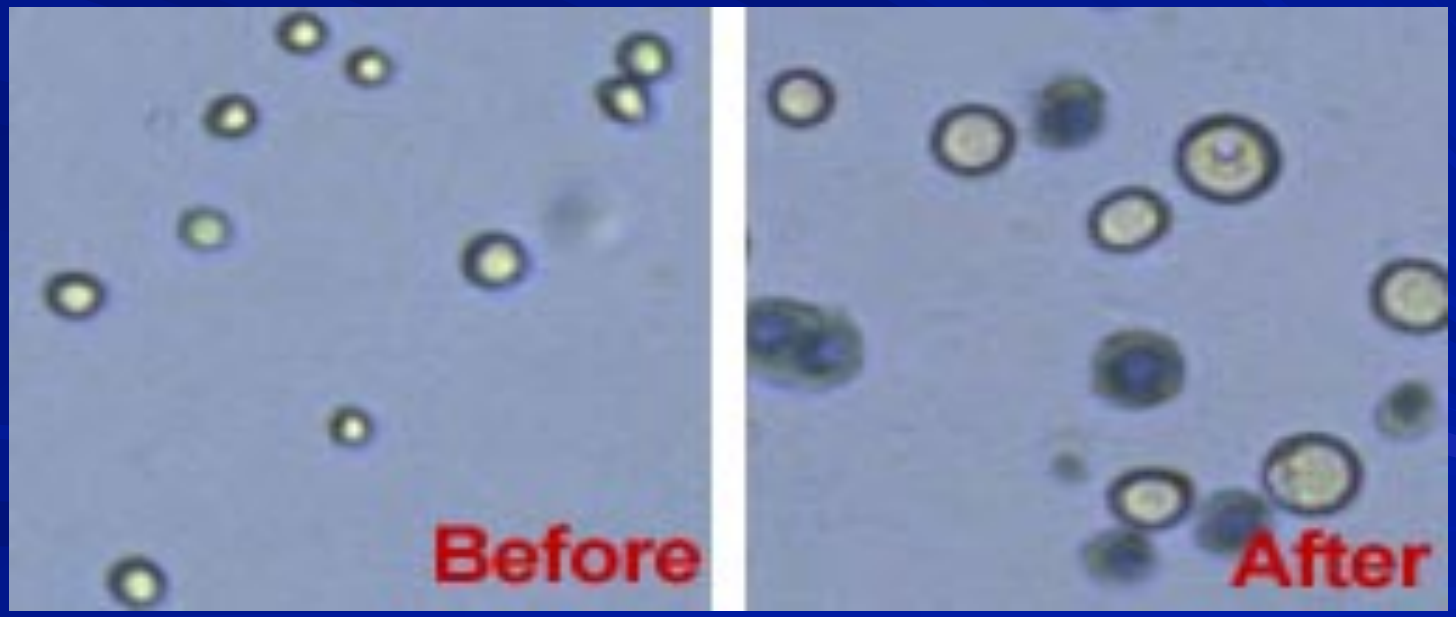
- Hücre süspansiyonu 1000 RPM' de 5 dakika santrifüj edilir ve süpernatant uzaklaştırılır.
- Hücre peleti 1 ml kültür vasatı ile homojenize edilir
- Bir kısım % 0.4 tripan mavisi ile bir kısım hücre süspansiyonu karıştırılır ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilir.
- Bir damla tripan mavisi-hücre karışımı thoma sayma lamına konur ve mikroskopta incelenir.



Boyanmamış (canlı) ve boyalı (cansız) hücreler sayılır. Canlı hücrelerin mililitredeki toplam sayısını elde etmek için canlı hücrelerin sayısı 2 (tripan mavisi için dilüsyon faktörü) ile çarpılır.

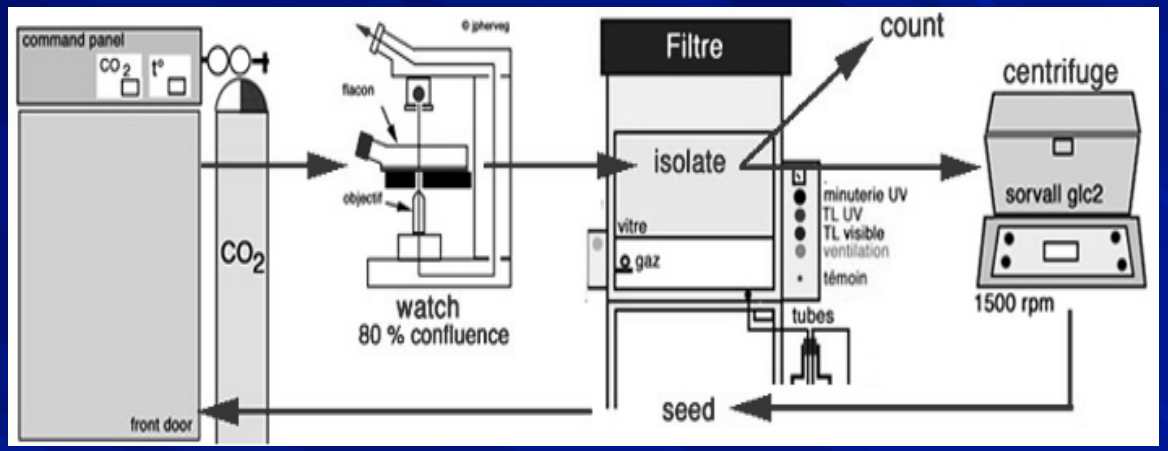
Canlı hücrelerin yüzdesini hesaplamak için:

$$\text{Canlı hücre (\%)} = \frac{\text{Canlı hücrelerin mililitredeki toplam sayısı}}{\text{Tüm hücrelerin mililitredeki toplam sayısı}} \times 100$$



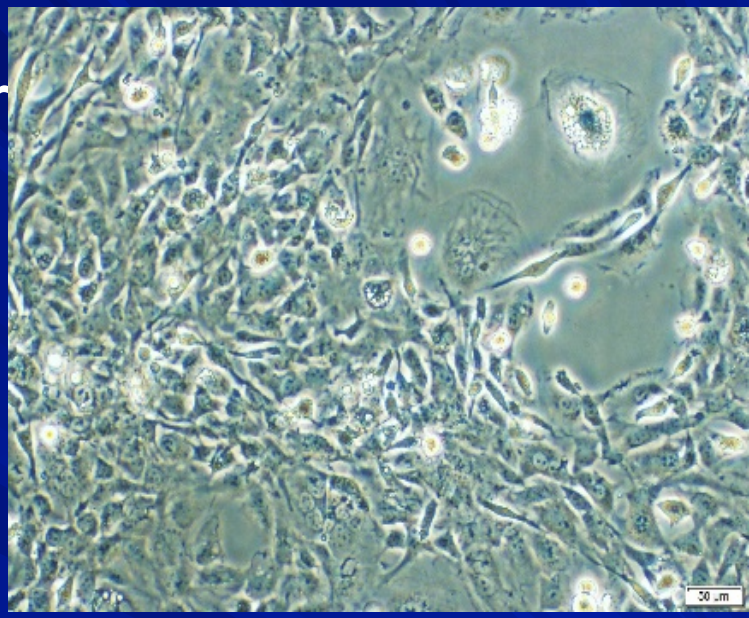
HÜCRELERİN PASAJLANMASI VE DONDURULMASI

Hücre Kültürlerinde Pasaj



- Kültürlerde çoğalan hücreler içinde bulundukları besi ortamındaki nutrientleri büyük ölçüde tükettikten ya da üreme yüzeyinin tamamını kullandıktan sonra çoğalma hızları düşer ve zamanla tamamen durur.
- Bu dönemde kültürün bölünmesi yapılması gerekli en doğru işlemdir.
- Bu işleme “subkültür” ya da “pasaj” adı verilir.

Hücreler orijinlerine bağlı olarak yüzeye bağımlı ya da süspansiyon halinde büyüyebilirler

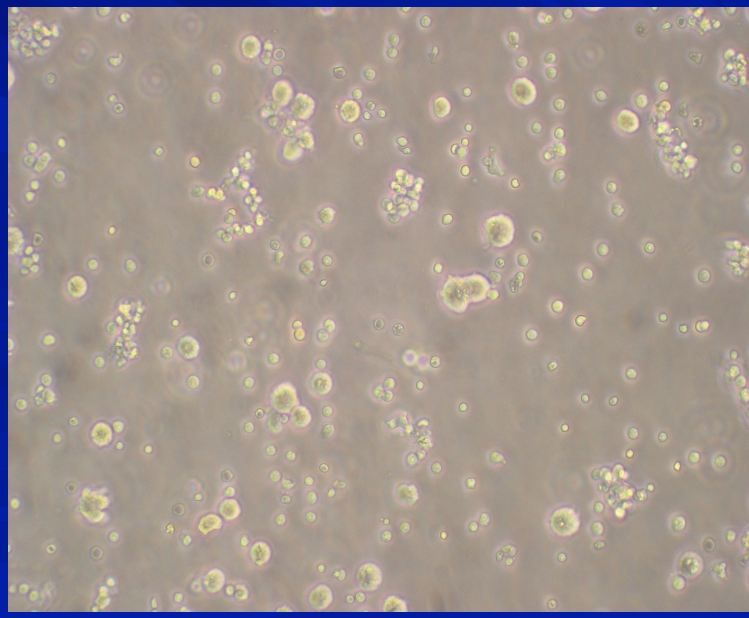


- **Monolayer Kültürler:**

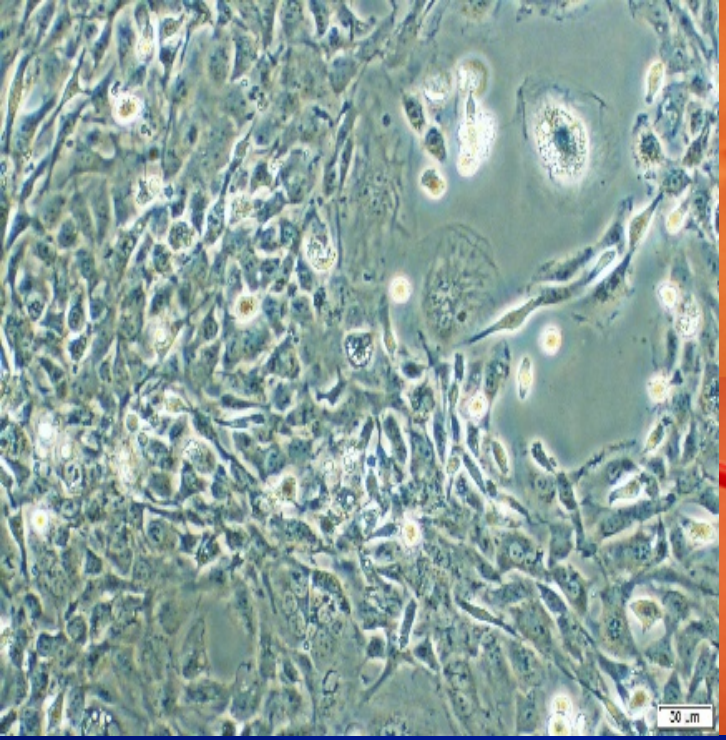
Monolayer hücreler bir yüzeye bağımlı olarak üreyen hücrelerdir

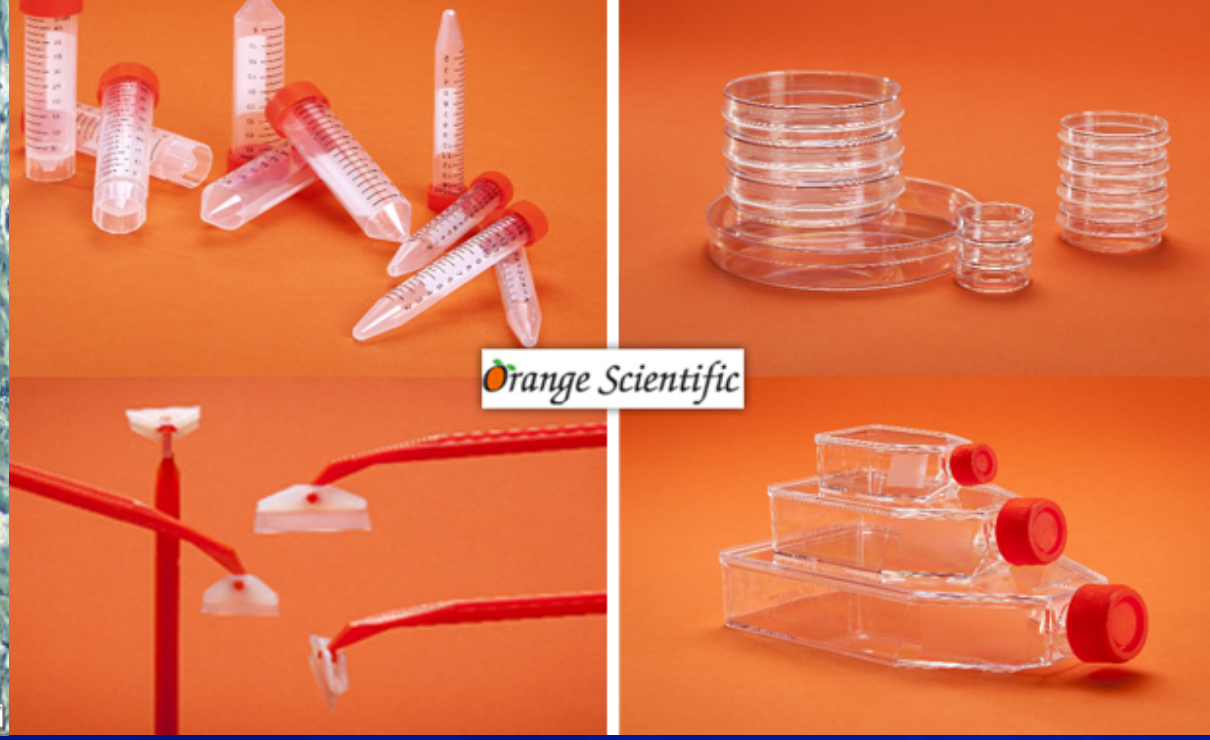
- **Süspanse Kültürler:**

Süspanse hücreler herhangi bir yüzeye gereksinim duymadan besi ortamında askıda üreyebilirler.



- Süspanse kültürlerde bu işlem, kültürün hacmine bağlı olarak, ya uygun hacimlere ayrılan kültürde hücrelerin kullanılmış besi ortamından santrifugasyonla ayrılması ve taze besi ortamı ilavesiyle ya da kültürün uygun hücre konsantrasyonu (ör. $5x10^5$ hücre/ml) oluşturulabilecek oranda seyreltilmesi ile gerçekleştirilir.





- Monolayer kültürlerde ise öncelikle, hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılmaları gerekir.
- Bu da ya çalkalama veya bir hücre kazıyıcı ile mekanik olarak veya enzimatik ve kimyasal işlemlerle mümkündür.

Kullanılan kimyasallar

- Dispaz
- Pronaz
- Elastaz
- Tripsin
- Kollagenaz
- Hiyalüronidaz

- Hücrelerin birbirine ve substrata tutunmasında hücre yüzey glikoproteinlerinin ve Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonların önemli rolü vardır.
- Pasaj sırasında bu faktörlerin ortadan kaldırılması gerekir.
- Bu da besi ortamının uzaklaştırılmasının ardından bazı proteolitik enzimler ve kimyasallar yardımıyla mümkündür.
- Hücrelerin yüzeyden ayrılmasından sonra en kısa sürede kullanılan enzim ve kimyasallar ortamdan uzaklaştırılır veya yeni besi ortamı ile seyreltilirler. Burada kullanılan enzim ve kimyasal ajanlar hücrenin özelliğine göre belirlenir.

Subkültür

Ne zaman?

*hücreler tüm yüzeyi kapladığında

*hücre yoğunluğu besi ortamının kapasitesini aştığında

Ne yapmalı?

*besi ortamının değişim sıklığını arttır

*kültürü böl (subkültür)

Pasaj oran

sınırlı ömürlü hücreler	½, ¼, 1/8, 1/16….
devamlı hücreler ve sınırlı ömürlü fibroblastlar	1-5 X 10^4 hücre/cm^2
zor üreyen hücreler	~ 10^5 hücre/cm^2
süspanse hücre kültürü	0.5-5 X 10^5 hücre/ml

HÜCRE PASAJLANMASI

Tripsinizasyon

▼

- Süspanse hale gelen hücreler içerisine daha önce ilave edilen tripsin/EDTA miktarı kadar kültür vasatı ilave edilir.

▼

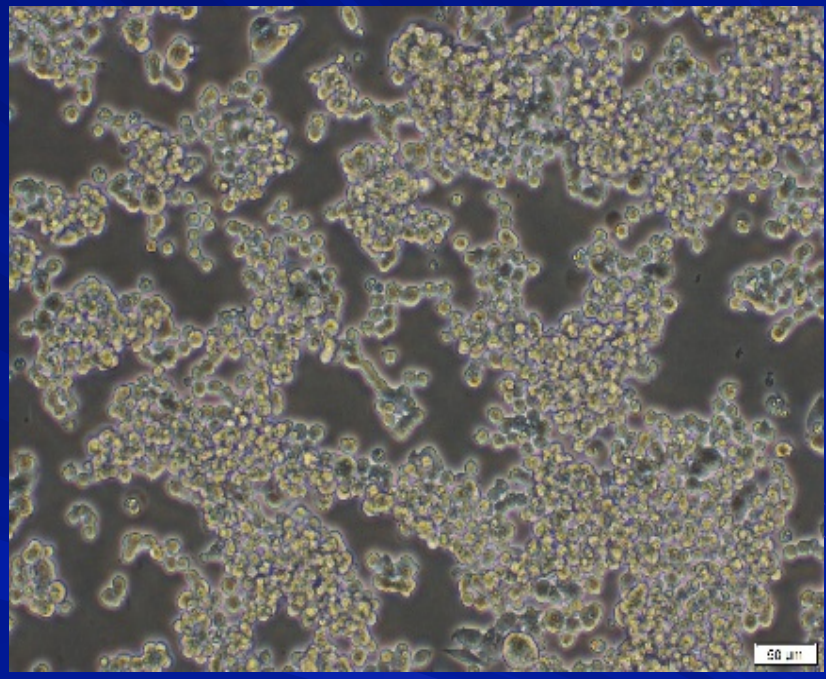
Santrifugasyon

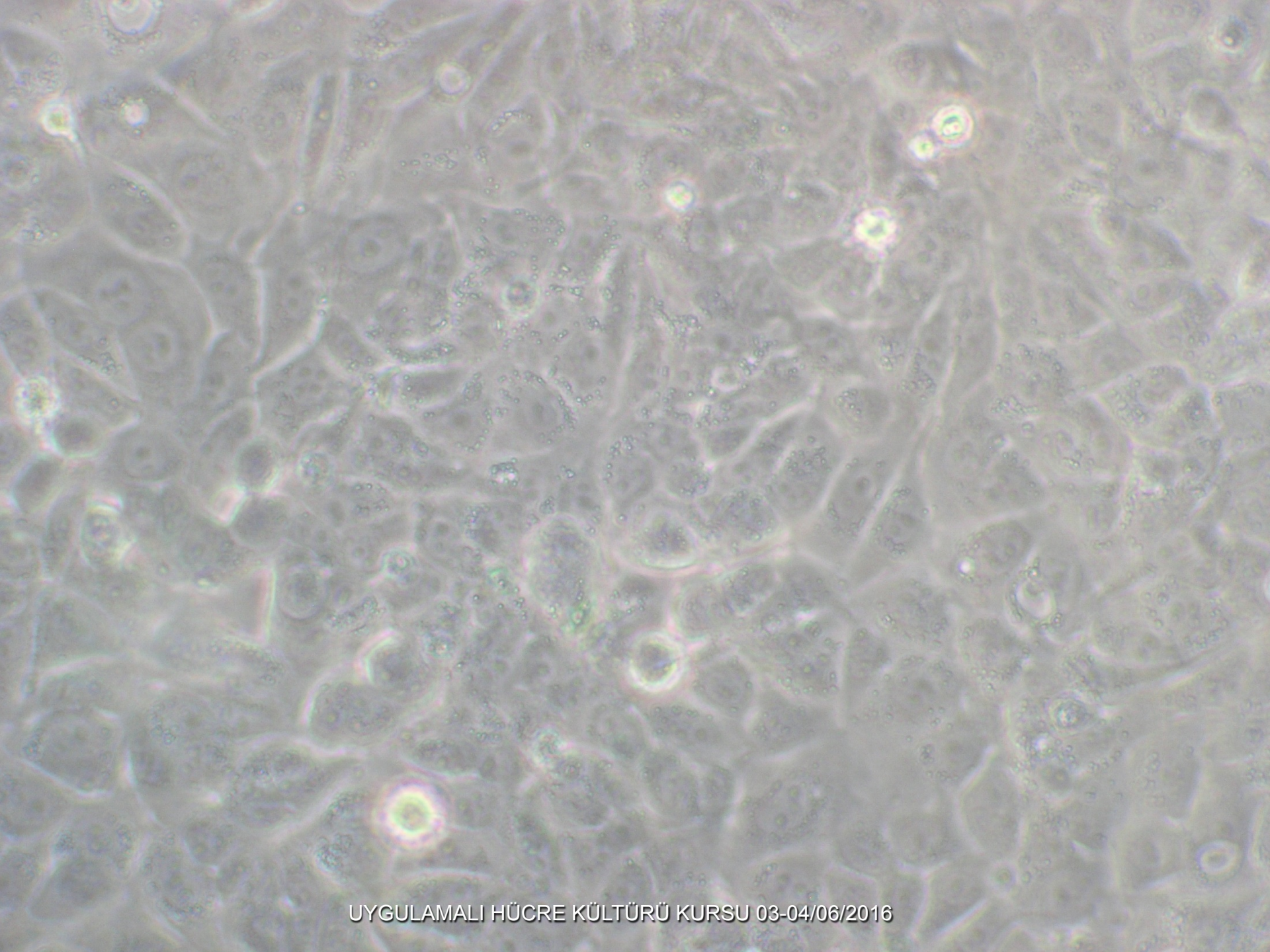
▼

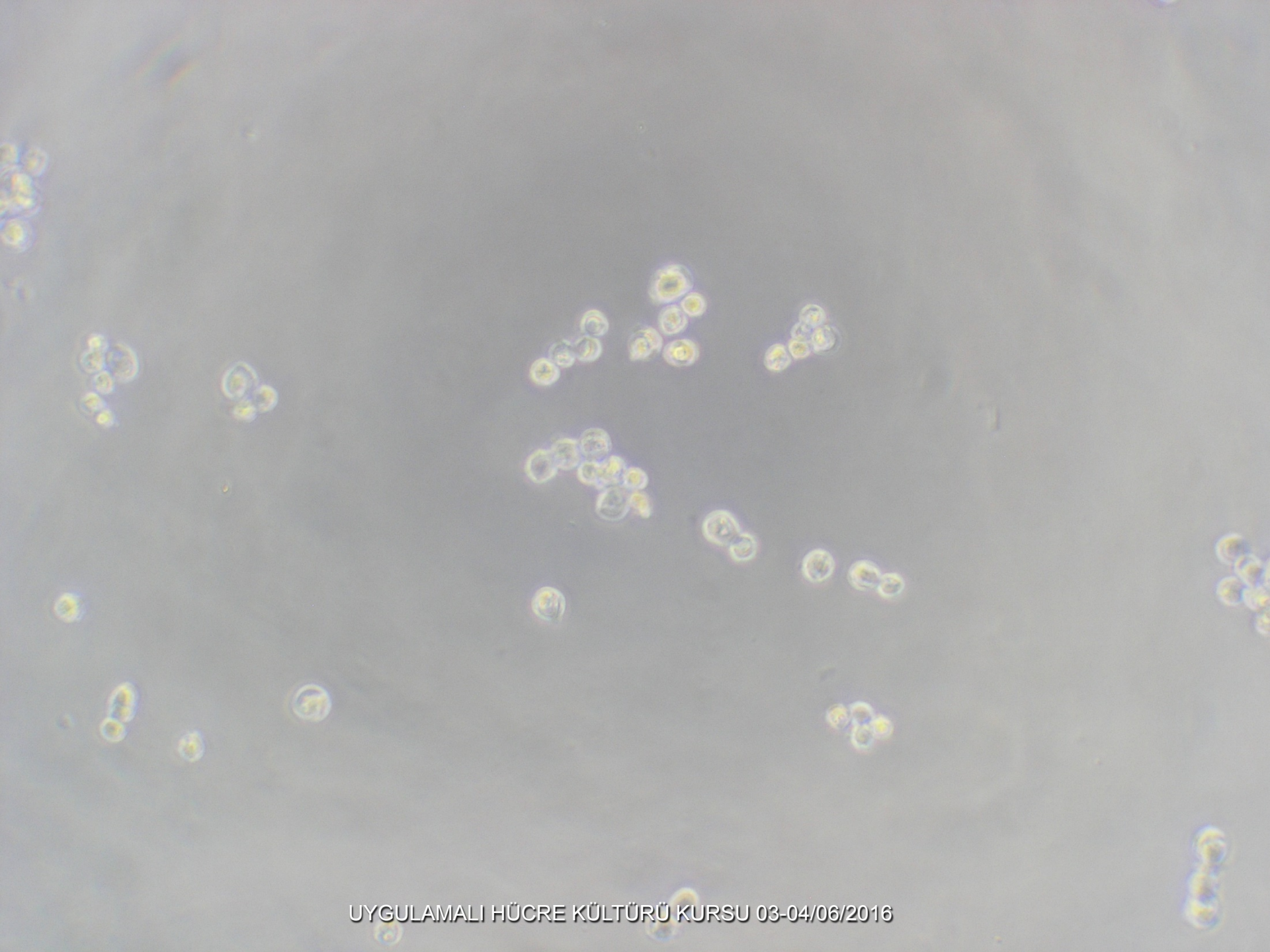
Kalan hücre peleti üzerine 1:3 oranında pasajlanmak üzere 3 ml kültür vasatı ilave edilir ve pipetaj yapılarak homojenizasyonu sağlanır

▼

- Her bir pasajlanan kültür kabının üzerine o günün tarihi, pasaj sayısı ve hücre adı yazılır.




UYGULAMALI HÜCRE KÜLTÜRÜ KURSU 03-04/06/2016


UYGULAMALI HÜCRE KÜLTÜRÜ KURSU 03-04/06/2016

Hücre Kültürlerinin Korunması ve Saklanması

UYGULAMALI HÜCRE KÜLTÜRÜ KURSU 03-04/06/2016

- Hücre hatlarının kültür ortamında sonsuza dek devam ettirilmesi mümkün değildir; *in vitro* kültivasyon nedeniyle özelliklerinde bazı değişiklikler oluşur.

- Hücre kültürü çalışmalarını etkileyen ve çoğunlukla geri dönüşümü olmayan bu değişiklikler ve bozunmalarla karşılaşmamak için hücrelerin kısa ve uzun süreli stoklanması gerekir.

Hücre Kültürlerinin Stoklanmasının Yararları

- Değerli hücre hatlarının korunabilmesi,
- Pasaj sayısının ilerlemesine bağlı fenotipik değişimlerin önlenmesi,
- Çalışmalar sırasında geriye dönebilme olasılığı,
- Aynı pasaj seviyesindeki hücre toplulukları ile değişik zamanlarda çalışabilme olanağı

Saklama koşulları

Oda sıcaklığı ***(monolayer)***.....1 hafta

(suspanse).....1-2 saat

4-10 ˚C ***(monolayer)***.....24 saat

(suspanse).....1 hafta

-70-86 ˚C.....6 ay-5 yıl

<-150 ˚C..... ∞ yıl

- Hücre kültürlerinin stoklanmasında dondurarak saklama yöntemi kullanılmaktadır.

- Hücre kültürlerinin sağlıklı bir şekilde saklanabilmesi için hücre içi metabolik aktivitenin oldukça yavaşlaması ve hatta durması gerekir.

- Soğutma hızının termal şoka neden olmayacak şekilde ayarlanması önemlidir.

- Metabolik aktivite -79ºC' nin altındaki sıcaklıklarda yavaşlar, -196ºC' de minimum düzeydedir.

- Hücre içi ve dışı sıvılarda dengesiz kristalleşme, hücre membranına ve hücre içi cisimciklere zarar verir.

Donma süreci

- Hücreler hızla dondurulduğunda ortamdaki tuz konsantrasyonu aniden artar. Hücreler, ozmotik basınçtaki artış sonucu büzüşür ve ölür.

- Soğuma sırasında ortamdaki tuz, soğuma hızı ile ters orantılı olarak çevresine ısı yaymaya başlar ve bu ısı hücrelere zarar verir (***termal hasar***).

- Tuz içeren ortam hızla soğutulduğunda ise hücre içi sıvıda kristalleşme görülür, hücre parçalanır ve ölür.

Kriyoprotektan

Su molekülerini bağlayarak, su kristalizasyonunu yavaşlatmak ve solütlerle eş zamanlı donmasını sağlamak

Bu amaçla gliserol veya DMSO gibi kolligatif ajanlar kullanmak

Penetran bir kryoprotektif ajan, donma işlemi esnasında hücre içine geçerek internal kristalizasyonun önüne geçecektir.

Kriyoprotektan denilen bağlayıcı ajanların kullanılmasıyla kristalizasyon hızı yavaşlar, ani ozmotik basınç artışı engellenir ve tuz çözeltisi düşük ısılarda da izotonik kalır.

Kriyoprotektanlar

Dondurma ve çözündürme uygulamaları sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddeler

- Kriyoprotektanlar hücre membranından nüfuz edilebilme özelliklerine göre iki grupta incelenir.

1.Hücre membranından geçebilen (hücre içerisine nüfuz edebilen = permeating)

2.Hücre membranından geçemeyen (hücre içerisine nüfuz edemeyen = non-permeating) kriyoprotektanlar.

1.Hücre membranından geçebilen (hücre içerisine nüfuz edebilen = permeating):

dimetilsülfoksit (DMSO)

gliserol

etilen glikol (EG)

1.2 propanediol

2.3 bütanediol

propilen glikol

diğer bazı alkoller

2.Hücre membranından geçemeyen (hücre içerisine nüfuz edemeyen =non-permeating):

glikoz

sükroz

trehaloz

rafinoz

galaktoz ve diğer bazı şekerler

polivinil alkol (PVA)

polivinil pirrolidon (PVP)

diğer bazı polimerler

Hücre Membranından Geçebilen Kriyoprotektanlar

- düşük moleküler ağırlığa sahiptirler

- donmanın gerçekleşmesinden önce, ozmotik basınç farkından dolayı, hücre içerisindeki sıvı, kriyoprotektan maddeler ile yer değiştirir ve böylece hem hücre hacmindeki değişiklikler azaltılarak hem de hücre içerisindeki buz kristallerinin oluşumu minimum düzeye indirilerek dondurma işlemi sırasında hücrelerin çok az zarar görmesi sağlanır.

- Hücre içerisine girebilen maddeler, suya bağlanabilme özellikleriyle ve diğer bileşenlerin yüksek konsantrasyonlarından kaynaklanan toksik etkileri azaltarak koruyucu etkilerini gösterirler.

- Bu gruptaki kriyoprotektanların çoğu yüksek oranda suda çözünebilme yeteneğine ve ısı etkisine sahiptir.

- Bu nedenle bu niteliklere sahip kriyoprotektanlar suyun hidrojen bağlarını kopararak, suyun yapısını değiştirirler.

- Bu grupta yer alan kriyoprotektanlar su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturabilmektedirler.
- Örn.; gliserol kendi hidroksil grubu ile su molekülündeki mevcut oksijen arasında hidrojen bağı şekillendirmektedir.
- DMSO'in oksijeni ise, suyun protonları ile birleşmekte ve bunun sonucunda da ısı açığa çıkmaktadır.

- Bunun yanı sıra, kriyoprotektanlar hücreler yüksek konsantrasyonda tuz ile çevrildiğinde hücreleri yoğun dehidrasyonun şekillendiği dönemde korumaktadırlar.

Hücre Membranından Geçemeyen Kriyoprotektanlar

Bu grup kriyoprotektanlar kendi aralarında iki ayrı gruba ayrılırlar:

1. Düşük molekül ağırlıklı (glikoz, sükroz, trehaloz, rafinoz, galaktoz ve diğer bazı şekerler) kriyoprotektanlar,

2. Yüksek molekül ağırlıklı (polivinil alkol; PVA, polivinil pirrolidon; PVP ve diğer bazı polimerler) kriyoprotektanlar.

- Hücre içine geçemeyen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar donma işlemi süresince şekillenen buz kristalleri oluşumunu azaltan etkilerini, soğutmadan önce hücreleri dehidre ederek gösterirler.

- Hücre içine geçemeyen yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar ise, hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi sırasında oluşan buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini zararsız olacak biçimde değiştirerek etkilerini gösterirler.

Bunlardan başka,

- albumin,
- Ficoll
- antifriz protein (AFP)

gibi bazı proteinler de hücre içerisine geçemeyen yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar içerisinde yer almaktadırlar.

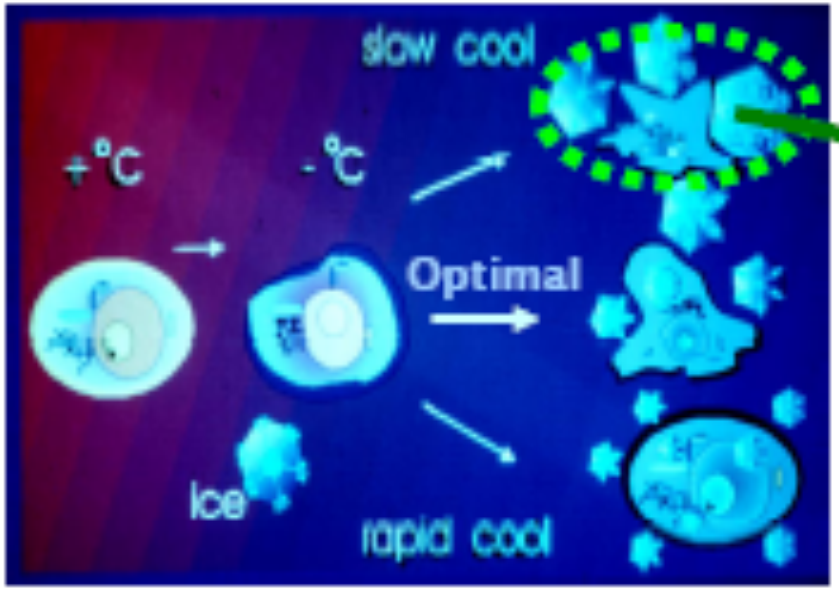
- Ancak bu ajanların penetrasyon özelliği hücreler dondurulduktan sonra çözünürken bir dilüsyon şokuna neden olabilmektedir.
- Bu nedenle tek bir kryoprotektif ajanın kullanılmasından çok, birden fazla kryoprotektanın uygun karışımları daha iyi sonuçlar verir.

- 1983'e kadar kryoprezervasyonda kullanılan altın standart %10 DMSO ve %20 otolog plazma karışımı idi.
- Intrasellüler ve ekstrasellüler kryoprotektanların beraber kullanımı gündeme girdi
  - Stiff et al. Cryobiology 1983:20:17-24.

- %5 DMSO ve %6 HES'ın beraber kullanılması halinde hücre engraftmanının %10 DMSO'e göre daha iyi olduğu rapor edilmiştir.
  - 7th Annual meeting of ISHAGE, June 14-17, 2001; Qabec City, Canada

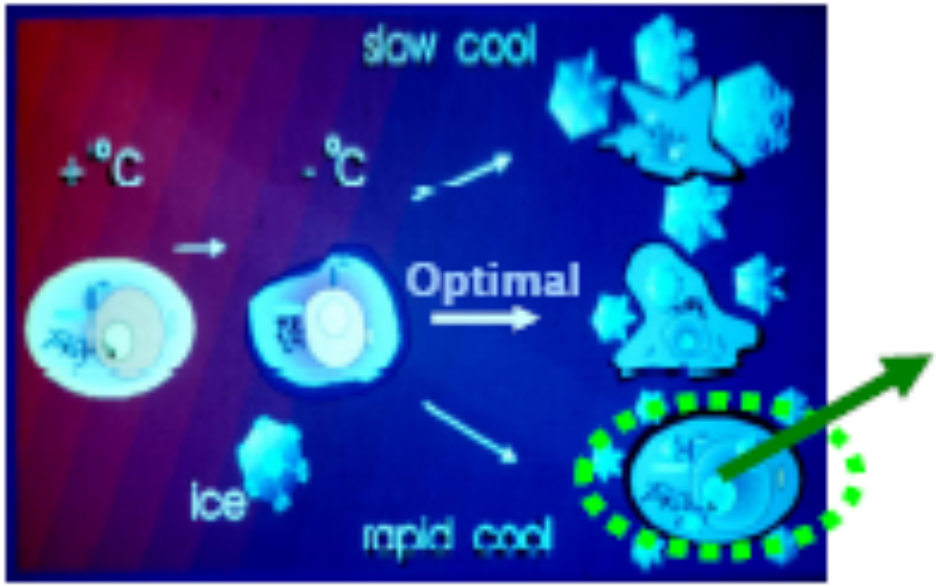
- Benzer olarak Kang ve ark. aynı kombinasyonun daha iyi hücre canlılığı ve recovery'sini sağladığını rapor etmişlerdir.
  - Blood.2002:99:850-5
- Hatta HES varlığında DMSO oranının %3,5‘a çekilebileceği, bu kombinasyonda tekrarlanan dondurma ve çözmelerden sonra dahi hücrelerin proliferatif etkilerini devam ettirebildikleri gösterilmiştir.
  - Halle P et al. Transfusion.2001:41667-73

Why there is an optimal freezing rate?



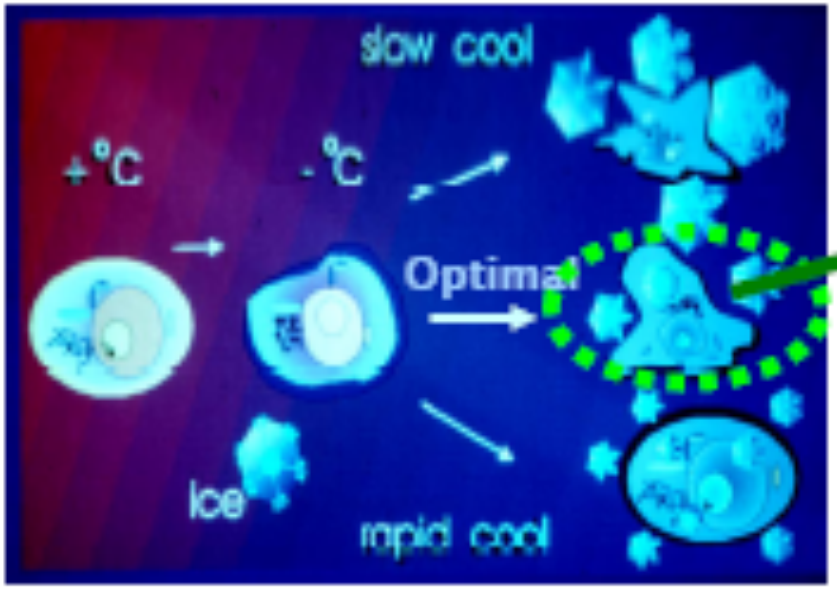
If the freezing process is too slow, the cell will lose too much water and its volume will become too small, it will suffer from severe "Solution Injury"

http://www.soq.ubc.ca/a-cold-greeting-an-introduction-to-cryobiology/
The first picture was selected from Prof. DY Gao's ppt file



If the freezing is too fast, the cell will lose too little water and the water kept in the cell will become ice, its volume may not change or even become bigger, it will suffer from severe "Intracellular Ice Injury"

http://www.soq.ubc.ca/a-cold-greeting-an-introduction-to-cryobiology/
The first picture was selected from Prof. DY Gao's ppt file



If the freezing is not too slow and too fast, it will lose enough water while still keep some water, its volume become smaller but not too small, it will suffer from minor "Solution Injury" and "Intracellular Ice Injury".

http://www.soq.ubc.ca/a-cold-greeting-an-introduction-to-cryobiology/
The first picture was selected from Prof. DY Gao's ppt file

Hücre Kültürlerinin Dondurulması Sırasında Geçirdiği Evreler

Likit Faz:

İşleme başlanması ile donma işleminin başladığı zaman arasındaki süreçtir.

Hücrelerin içi ve dış ortamlarının dengelenmesi bu fazda gerçekleşir.

Faz Geçiş Zamanı:

Donma işleminin başladığı andan, donmanın tamamlandığı ana kadar olan süreçtir.

Dondurma işleminin en kritik periyodudur.

Su, sıvı durumundan katı duruma geçerken ısı yayar. Eğer dondurma sırasında buna dikkat edilmez ise geçiş fazında bir uzama meydana gelir ki, bunun hücre canlılığı üzerine çok olumsuz etkileri olur.

Rome AW and Rinfred AP: Blood 20:636, 1962.

Bu dönemde yapılması gereken soğutma hızını arttırmaktır.

Bu ısının hücreye zarar vermesi, ortam ısısının -20ºC' ye ulaşıncaya kadar -15ºC ile -20ºC/dk olacak şekilde düzenlenmesiyle önlenebilir.

Donma Sonrası Soğutma Fazı:

Donmanın gerçekleştiği noktadan, saklama ısısına ulaşılıncaya kadar geçen süreçtir.

Bu dönemde -50ºC' ye kadar 5ºC/dak, -80ºC' den sonra 1-3ºC/dak olması uygundur.

Bu işlemden sonra hücreler sıvı azot içerisine transfer edilebilir.

Depolama Fazı:

Bu fazda önemli bir hücre hasarı oluşmaz.

Hücre türüne ve saklama ısısına bağlı olarak bazı değişiklikler görülebilir.

En az hasar sıvı azot içerisindedir (-196ºC).

Hücreler bu ortamda teorik olarak sonsuza kadar saklanabilir.

Dondurma

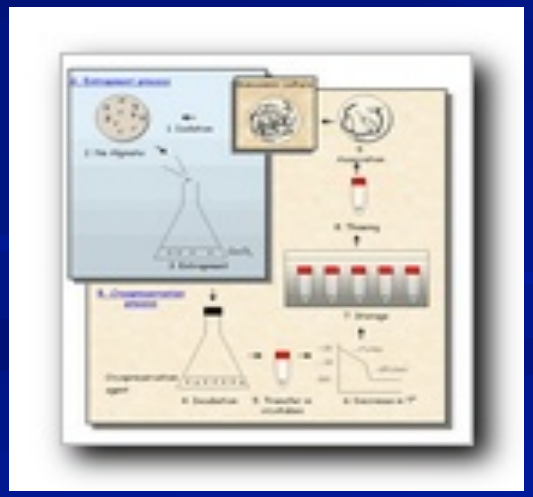
Tripsinizasyon

▼

Santrifugasyon

▼

Dondurma ortamı ilavesi (+4°C)



▼

-86°C

▼

LN_2

UYGULAMALI HÜCRE KÜLTÜRÜ
KURSU 03-04/06/2016

Hücre Depolama Kapları

- Genellikle elektrikli ve elektriksiz olmak üzere 2 farklı özellikte kap kullanılır.

Elektrikli depolama kapları:

- -86ºC' ye kadar soğutan derin dondurucular dır.

- <u>En önemli dezavantajları:</u>

*hücrelerin sağlıklı saklanma sürelerinin maksimum 5 yıl

*elektriğe bağımlı

Elektriksiz depolama kapları:

- buhar veya sıvı azot içeren özel depolama sistemleridir.

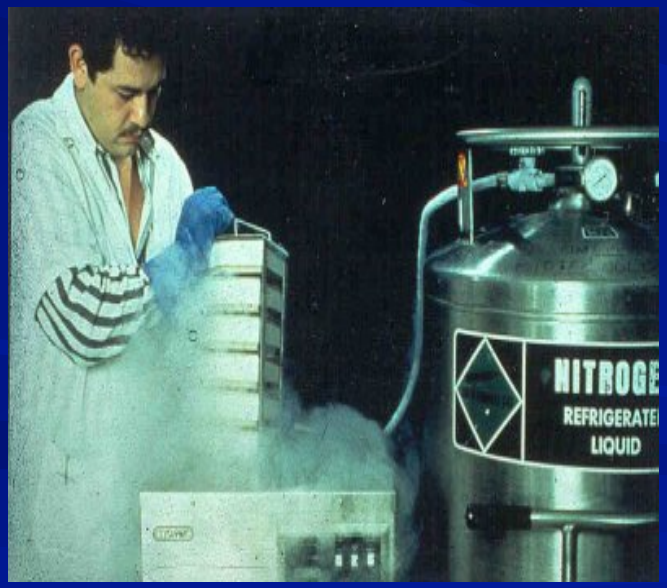
<u>En önemli riskleri:</u>

*kontaminasyon

Ampuller ikinci bir koruyucu kap içine alınmalı.

CT 38

LR-40


NITROGE
REFRIGERATE
LIQUID

OGEN NF

GEN NF

thank you
danke
謝謝
ngiyabonga
teşekkür ederim
gracias
tapadh leat
спасибо
bedankt
dziękuję
obrigado
hvala
mauruuru
sukriya
kop khun krap
go raibh maith agat
mochchakkeram
arigatō
takk
dakujem
grazie
merci
terima kasih
감사합니다
ευχαριστώ
мерси
рахмат
Баярлалаа
ありがとう
ধন্যবাদ
sagolun
taiku
kiitos
dankie
dank je
mahalo
grazzi
хвала
asante
manana
obrigado
murakoze
tenki
enkosi
bayarlalaa
gracie
koszönöm
akun
dankon
djere dieuf
tau
mamnun
дякую
chokrane
chnorakaloutioun
gracies
sulpay
sobodi
dekuji
mesi
najis tuke
tanemirt
rahmet
dhanyavadagalu
shukriya
marce
trugarez
didi madloba
kam sah hamnida
rahmat
xièxie
diolch
তোমাকে ধন্যবাদ
spas
welalin
tack
barka
mersi
kia ora
vinaka
faafetai lava
blagodaram
misaotra
malondo
paldies
nanni
nandri
dhanyavad
aciu