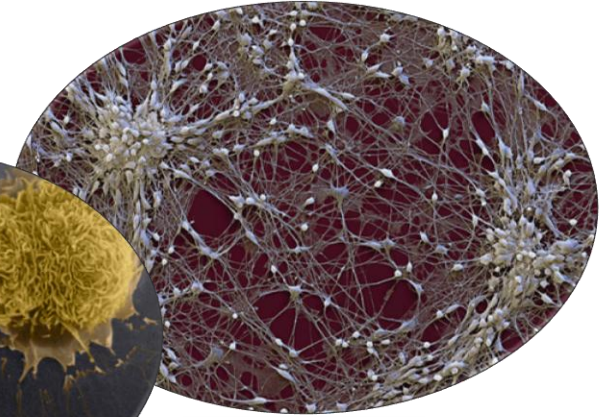
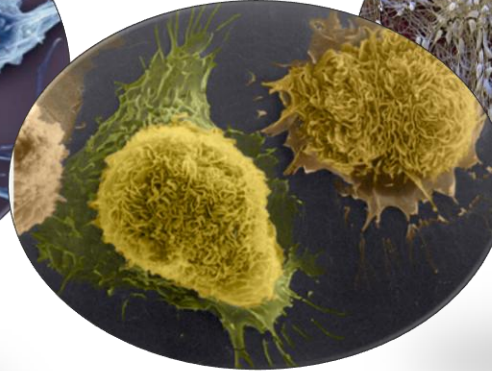
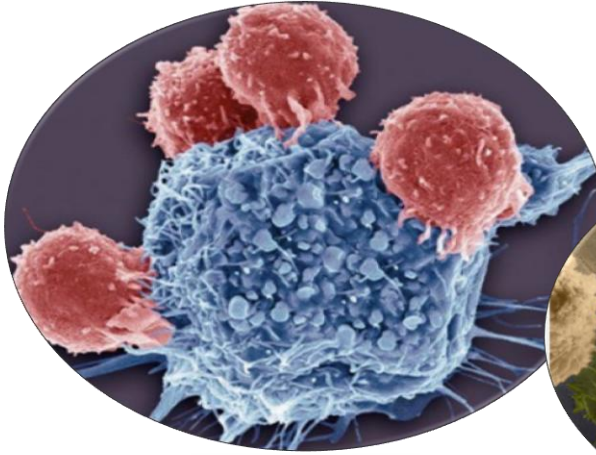




Sitotoksite Analizleri

Rasime Kalkan

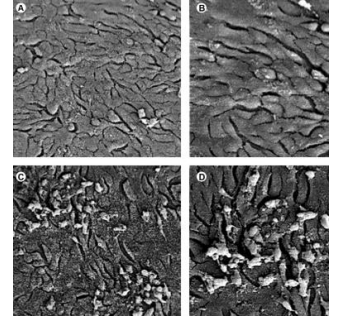
Uygulamalı Hücre Kültürü Kursu

3 -4 Haziran 2016

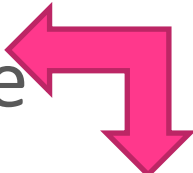
Lefkoşa, KKTC



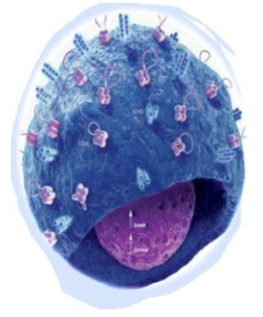
Sunum Planı



- Sitotoksite Testlerinin Kullanımı
- Hücre Ölümü Tipleri
- Hücre Canlılığını Saptamak için Kullanılan Reaktifler
- Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testleri

- 
- ✓ XTT
 - ✓ MTT
 - ✓ SRB
 - ✓ AlamarBlue
 - ✓ LDH
 - ✓ CaAM

Sitotoksite Testlerinin Kullanımı



❖ Biyouyumluluk



❖ İmplantlar



❖ Kozmetik

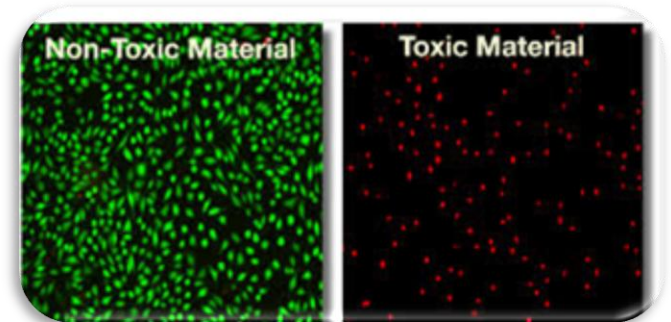
❖ Farmakoloji



❖ İlaç Geliştirme

❖ Toksik ajanların belirlenmesi

❖ Antikanser ilaçlarının toksisitesini belirlemek





http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr

IN PARTNERSHIP WITH LGC STANDARDS

[Sign In](#) | [Create a Profile](#) | [Quick Order](#) | [Shopping Cart \(0 items\)](#) | [Turkey](#)

Search by Keyword or Catalog No.



[Advanced Search](#)

PRODUCTS SERVICES STANDARDS DOCUMENTS AND LITERATURE CUSTOMER SUPPORT ABOUT

Cells and Microorganisms

Disease/Model

Focus Area

Special Collections

Tissue

Tumor Cell Panels

Microbial Panels

Ready to Use QC Strains

Bacteria

Cell Lines

Fungi and Yeast

hTERT Immortalized Cell Lines

Hybridomas

Molecular Biology

Plant Seeds

Primary Cells

Protein and Virus Production

Protists

Stem Cells

Culture Reagents

Antibiotics

Buffers and Stains

Cryopreservation Reagents

Dissociation Reagents

Feeder Layer Cells

Hybridoma Development

Media

Molecular Grade Water

Polysaccharides

Sera

Supplements

Substrates

Transfection Reagents

New Products

Angiogenesis Assay System

Ready-to-Use QC Strains

Transfection Tools

Testing and Characterization

Cell Proliferation

Universal Mycoplasma Detection Kit

STR Profile Database

Quality Control Strains

By Identifier

By Instrument

By Organization/Company

Certified Reference Material (CRM)

Ready to Use QC Strains

Nucleic Acids & Toxins

Genomic DNA & RNA

Quantitative Nucleic Acids

Product Use Policy

ATCC Licensing

Commercial Use

Research Use

ATCC® CULTURE GUIDES



Culturing biological materials can be challenging at times even for the expert culturist. With over 85 years of expertise with cell and microbial cultures, ATCC has acquired and developed a vast body of best practices to aid researchers at all levels of proficiency to maximize the return on their biomaterials investment. The guides below deliver that knowledge and insight to the end user in a portable, easy to follow format.

Download these useful guides and start with fresh authenticated cells and strains from ATCC to achieve the best results. As one of the new features of the ATCC website, you may download one or all of the ATCC® Culture Guides by [logging in](#) to the ATCC website. If you don't have an ATCC login, you may create a new [web profile](#), or [fill out the form](#) to download the guide.



Animal Cell

[Download](#)


Bacterial

[Download](#)


iPS Cell
Immortalized

[Download](#)


Mycology

[Download](#)


Mycology

[Download](#)


Primary Cell

[Download](#)

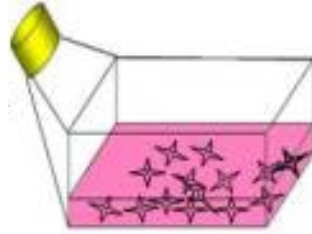
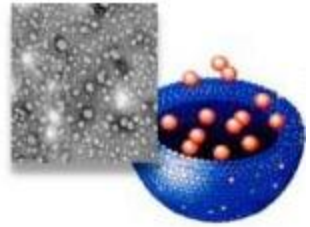

Stem Cell

[Download](#)

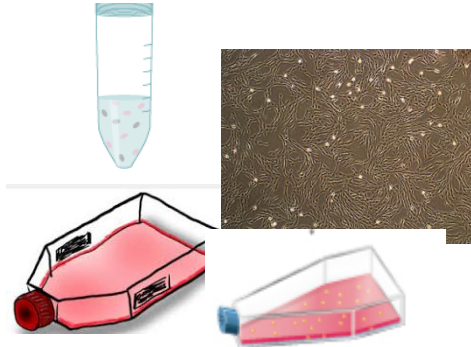
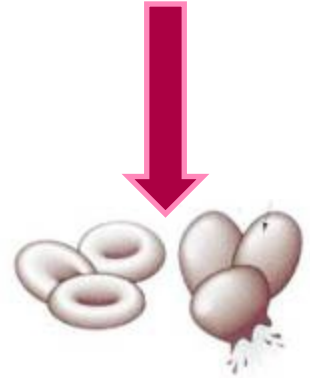

Microbiology

[Download](#)


Phishing Scams



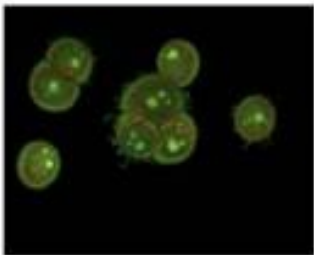
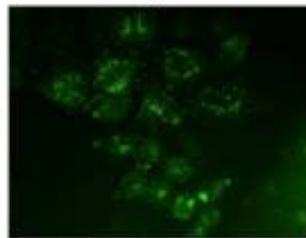
- XTT
- MTS
- SRB
- AlamarBlue
- [³H]-thymidine inkorporasyonu
- ATP formasyonu



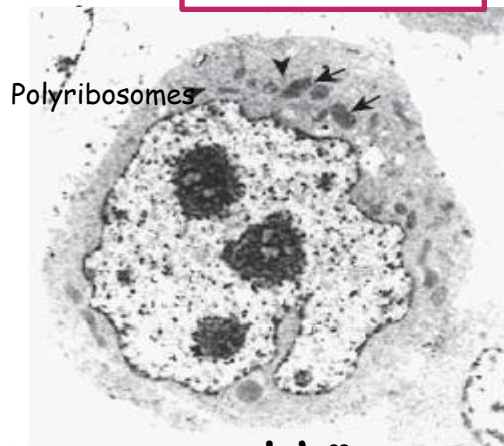
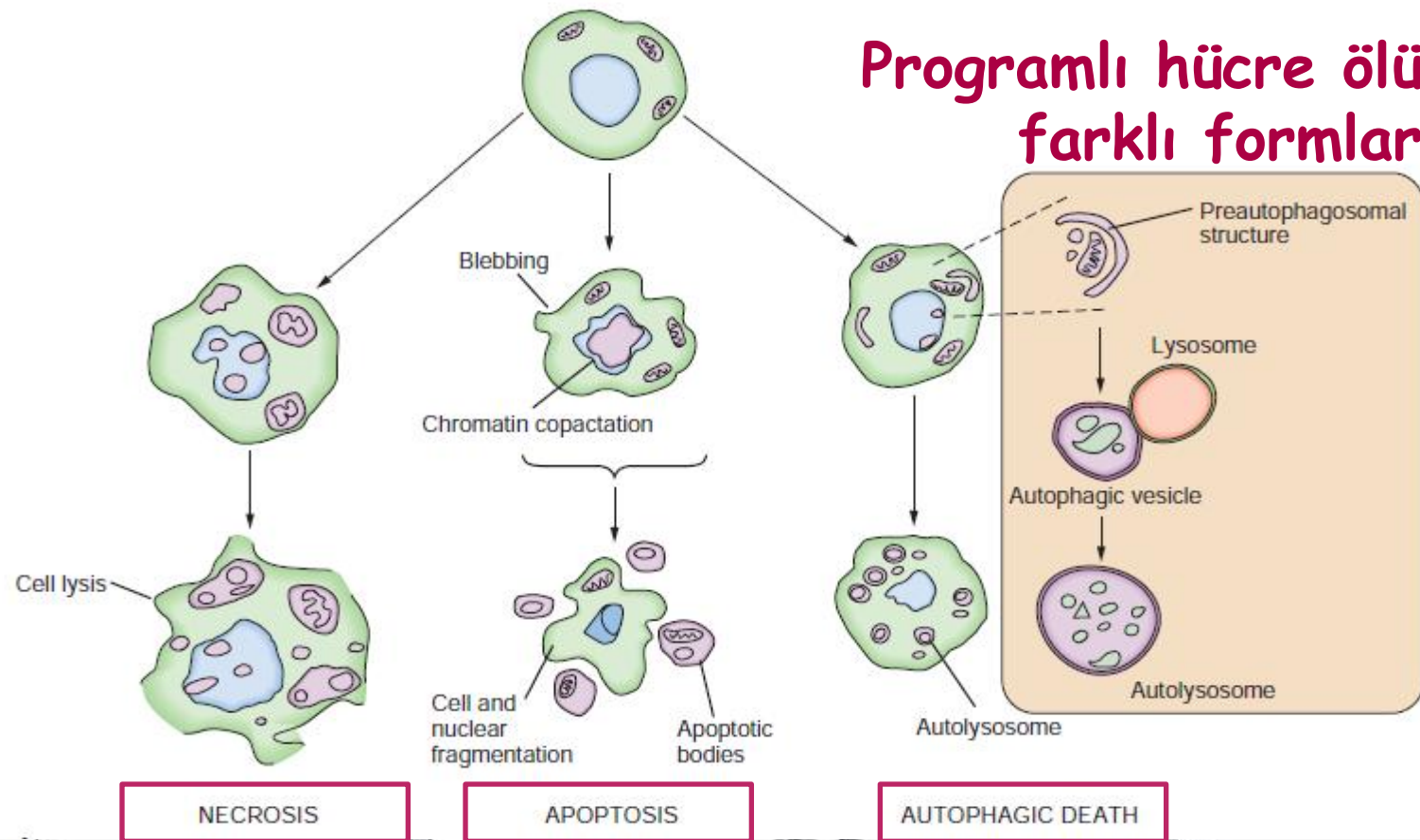
- ☒ Sitotoksite analizleri
- ☒ Apoptoz markerlarının ölçümü
- ☒ Hücre canlılık ölçümleri



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○



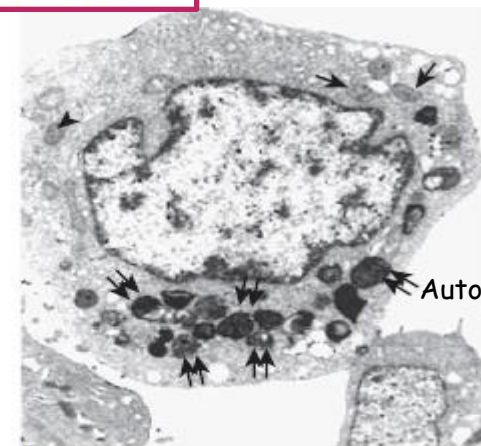
Programlı hücre ölümünün farklı formları



B normal hücre



C apoptotic hücre

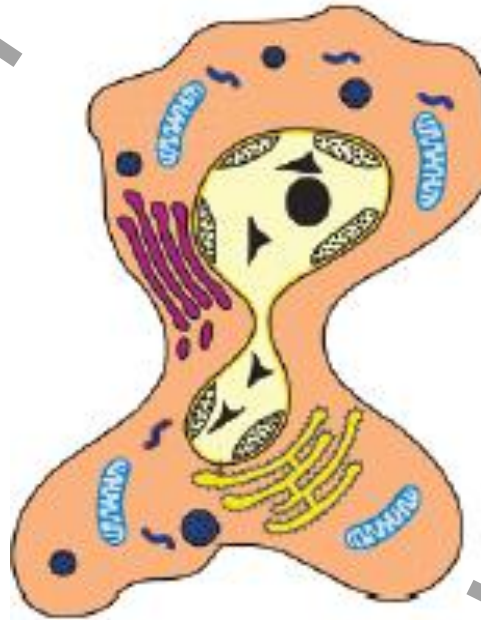


Autophagic hücre ölümü

**Kaspaz
Aktivasyonu**

**Membran
Değişiklikleri**

- Annexin-V
- LDH salımı
- Impermeable DNA boyaları



**DNA
Fragmentasyonu**

- TUNEL
- BrdU
- DNA laddering

**Mitokondriyal
Hasar**

- Sitokrom C
- WST
- MTT

Kategori	Testler	Presnsipler
Membran geçirgenlik testleri	○Boyanın hücreye girememesi ○Floresan Boyalar ○LDH salınımı	Membran bütünlüğünün canlı hücrelerdeki boyanın dışarda kalması prensibi
Fonksiyonel Testler	○MTT ○XTT ○Almar Blue ○³H timidin/BrdU inkorporasyonu	Hücre büyümesinde önemli olan metabolik bileşenlerin analizi
DNA işaretleme Testleri	Floresan konjuktat	Simultane hücre seçimi ve canlılık testi
Morfolojik Testler	Mikroskopik gözlem	Morfolojik değişikliklerin saptanması
Reproduktif Testleri	Koloni oluşumu	Büyüme oranının saptanması

İn vitro olarak farklı markerların ölçümü ile hücre ölüm mekanizmasının belirlenmesi -I

Apoptoz

Time 0



30 dk- 4 s.



24 s.



	Canlı Hücre		2 ^o Nekroz
LDH Salınımı	0	+	+++
Kaspaz	0	+++	++
ATP	+++	++	0
MTS	+++	++	0
Resazurin	+++	++	0

İn vitro olarak farklı markerların ölçümü ile hücre ölüm mekanizmasının belirlenmesi -II

Nekroz

Time 0



30 dk- 4 s.

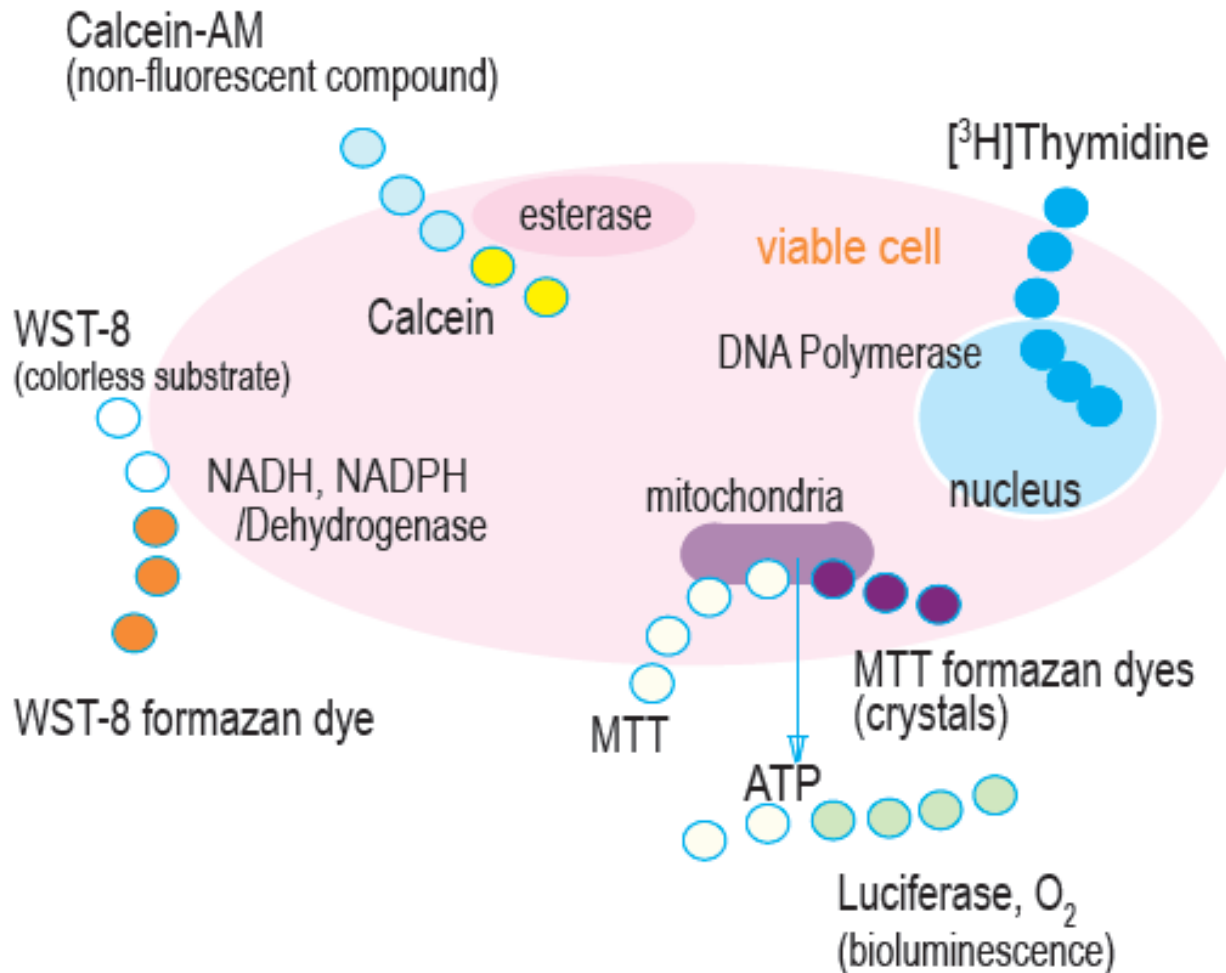


24 s.



	Canlı Hücre		Cell Debris
LDH Salınımı	0	+++	++
Kaspaz	0	0	0
ATP	+++	0	0
MTS	+++	0	0
Resazurin	+++	0	0

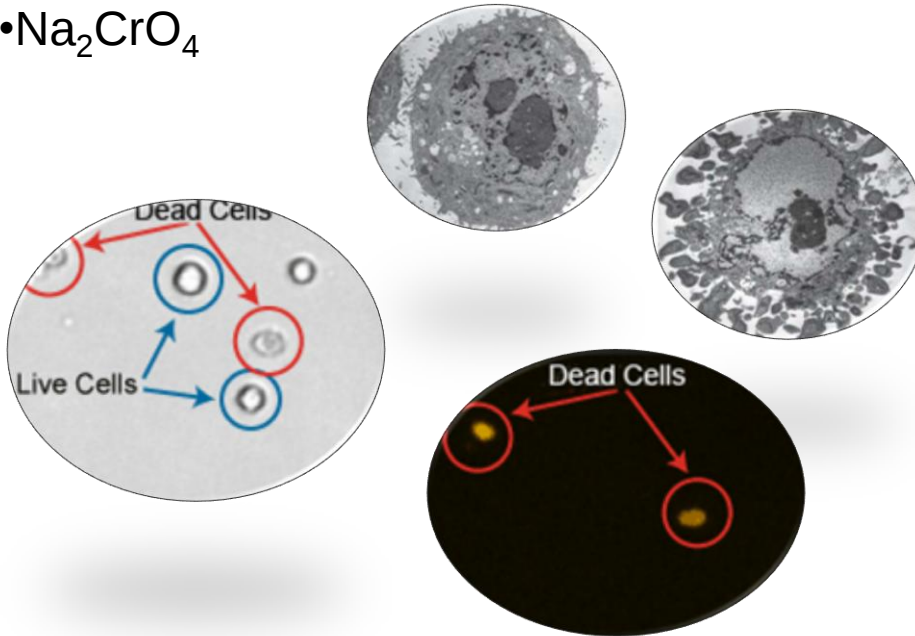
Hücre Canlılığını Saptamak için Kullanılan Reaktifler



Membran Geçirgenlik Testleri

Vital boyalar

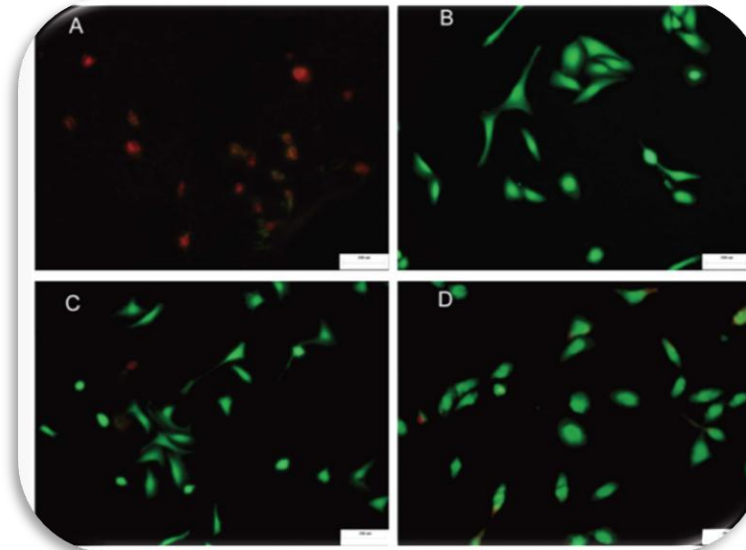
- nötral kırmızı
- Na_2CrO_4



Non- Vital boyalar

- tripan mavisı
- propidium iodide

Canlı hücreler
Ölü hücreler



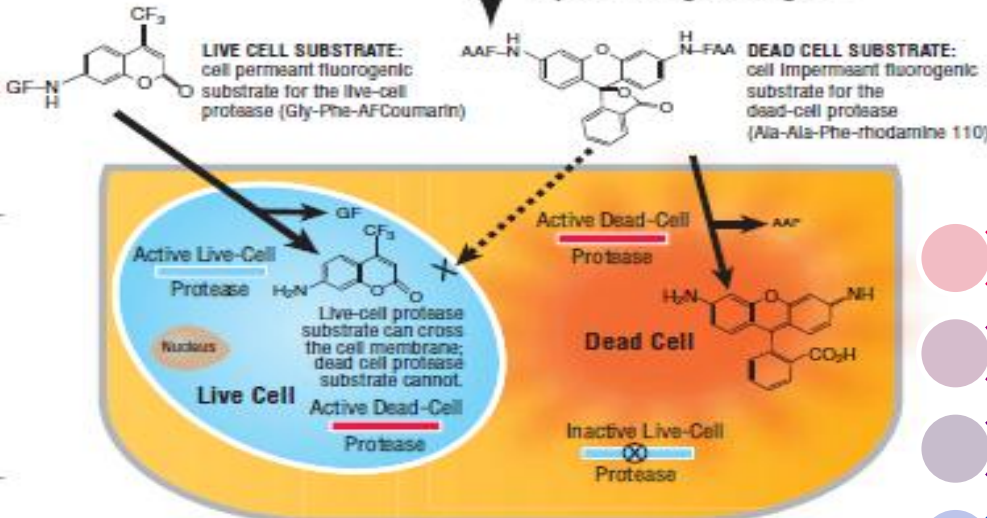
In vitro sitotoksite testi genel protokol şeması



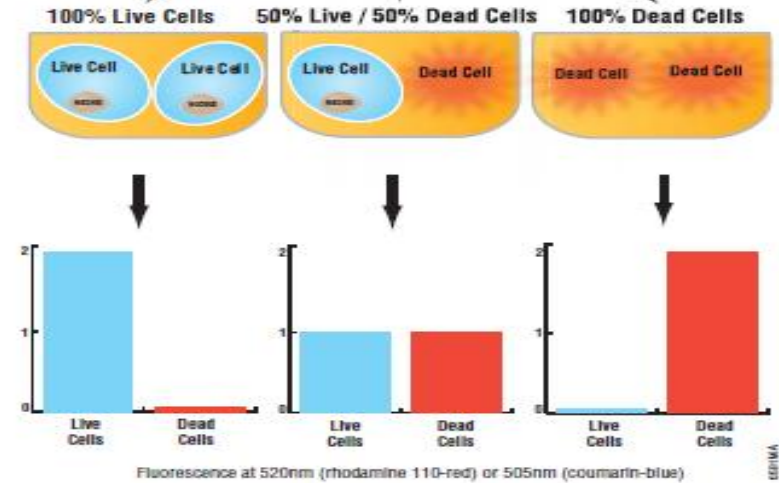
1) Treat cells with the potential cytotoxic agent



2) Add single reagent



3) Measure fluorescence



Ölü hücre sayısı
(Sitotoksite Analizi)

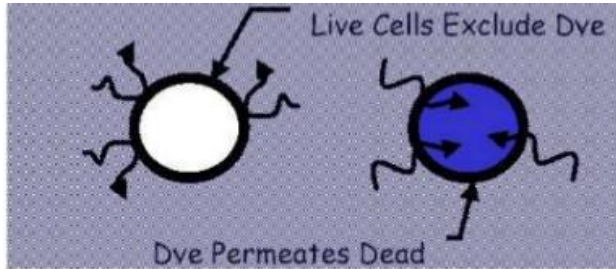
Canlı Hücre Sayısı
(Canlılık Analizleri)

Toplam Hücre Sayısı

Hücre Ölüm Mekanizması
(Apoptoz, Nekroz, Otofaji, vs.)

Trypan Blue Boyaması

- Cansız hücreler mikroskop altında maviye boyanırken canlı hücreler boyanmamış olarak görüntülenmektedir.



Canlı Hücre →

Canlı Hücre →



- ✓ Canlı-cansız hücre ayırımı
- ✗ Apoptotik ve nekrotik hücre ayırımı

MTT

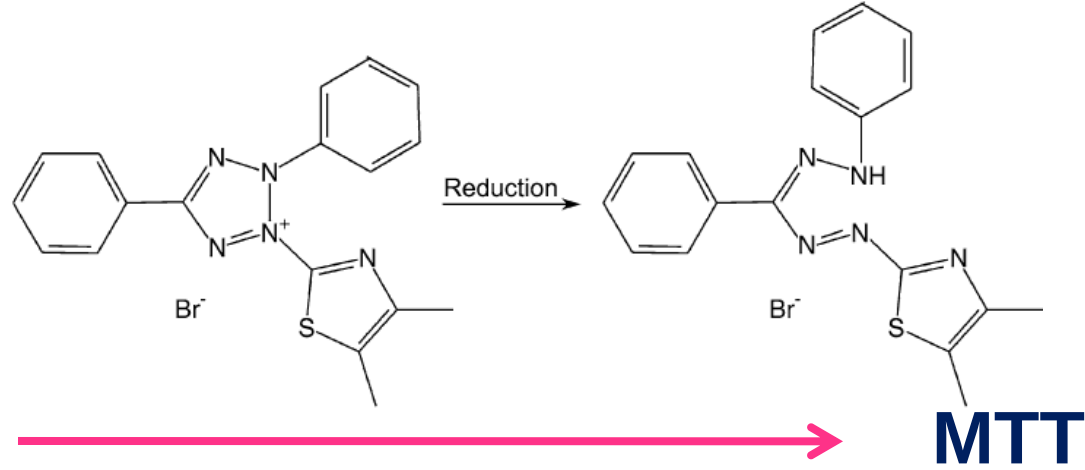
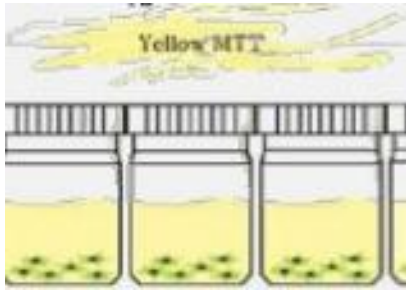
(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Amaç:

- ✓ Metabolik aktiviteyi göstermek
- ✓ Sitotoksitesiyi ölçmek
- ✓ Sitostatik aktiveyi ölçmek
(proliferasyon → quiescence)

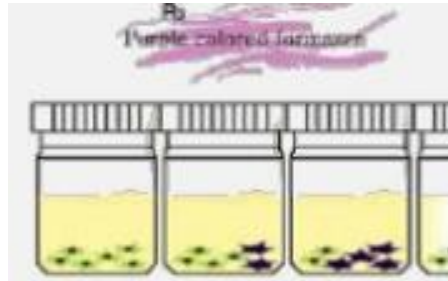
MTT

İndirgenmesi



Metabolik olarak
aktif hücre

Formazon



Formazon miktarı



Canlı Hücre Miktarı

Deneyin Prensibi

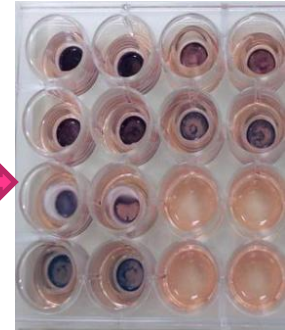
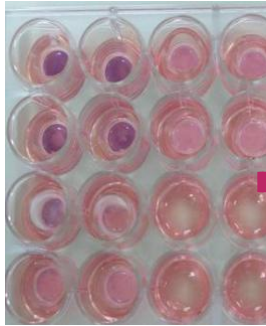
Canlı Hücre

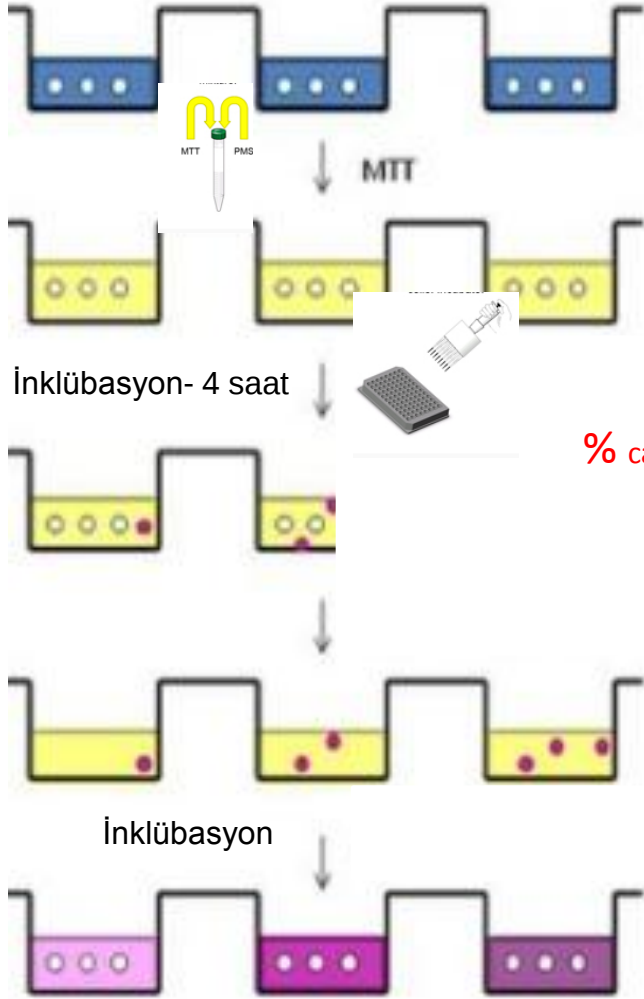


Mitokondriyal Süksinat Dehidrogenaz

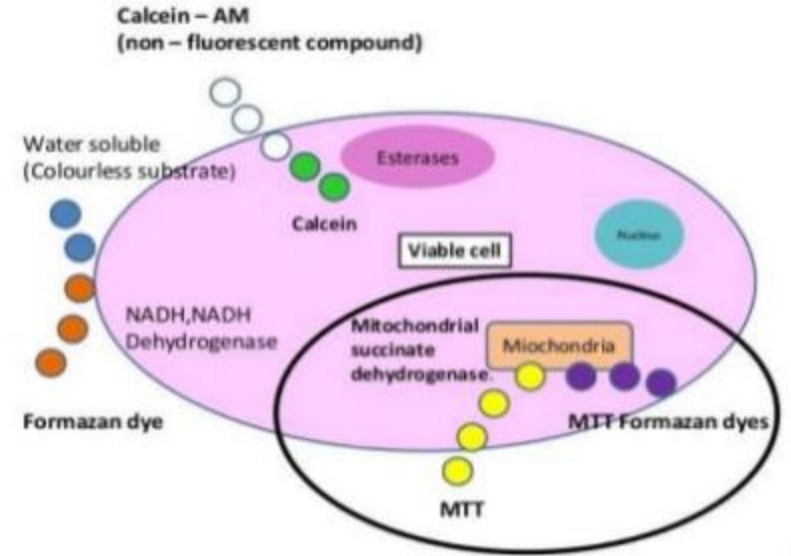
Tetrozilin
Tuzları

Formazon





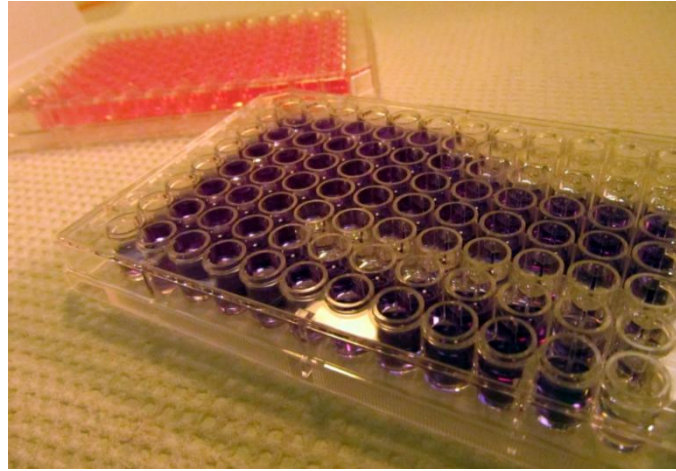
$$\% \text{ canlı hücre} = \frac{\text{maruz bırakılmış hücre}}{\text{maruz bırakılmamış hücre}} \times 100$$



Ölçüm (570 nm)

1.63	2.129	2.172	2.26	1.542	2.203
1.718	2.218	1.99	1.811	1.643	2.013
1.706	2.383	2.156	2.034	1.676	1.724
0.603	1.022	1.351	1.504	1.67	1.685
0.762	0.989	1.345	1.647	1.905	1.762
0.799	1.029	1.599	1.681	2.159	2.469

“add–incubate–read”



- ✓ Sensitif
- ✓ Daha az deneysel aşama
- ✓ Aynı anda çok fazla örnek analizi
- ✓ Canlı hücre oranı kolorimetrik olarak belirlenmektedir
- ✓ Non-izotopik

- ✗ Farklı hücre tiplerinin karşılaştırılamaması
- ✗ Confluency !
- ✗ Maruziyet süresi !
- ✗ Kültür ortamında direkt çözünemez → +DMSO

MTT Limitleri-I:

Etkileyen faktörler

Faktör	İnterferans Tipi	Solüsyon
Glukoz	Glukozun olmaması glikolizi azalttığından MTT üretimi azalmaktadır	Eski besiyeri ile kullanılmamaktadır
Protein presipitasyonu	Organik solventler serum proteinlerinin presipitasyonu için kullanılabilmektedir	Farklı solventler kullanılabilir
Fenol Red	Fenol Red pH değişikliklerini göstermektedir	Fenol redsiz asitleştirilmiş solvent veya besiyerleri kullanılabilir.
Confluency	Aşırı konfluent olmuş hücrelerde metabolik aktivite azalmıştır.	Az hücre ekimi
Metabolik Oran	Maruziyete bağlı olarak metabolik oran değişmektedir	Standart curve kullanımı veya alternatif hücre sayma metodları

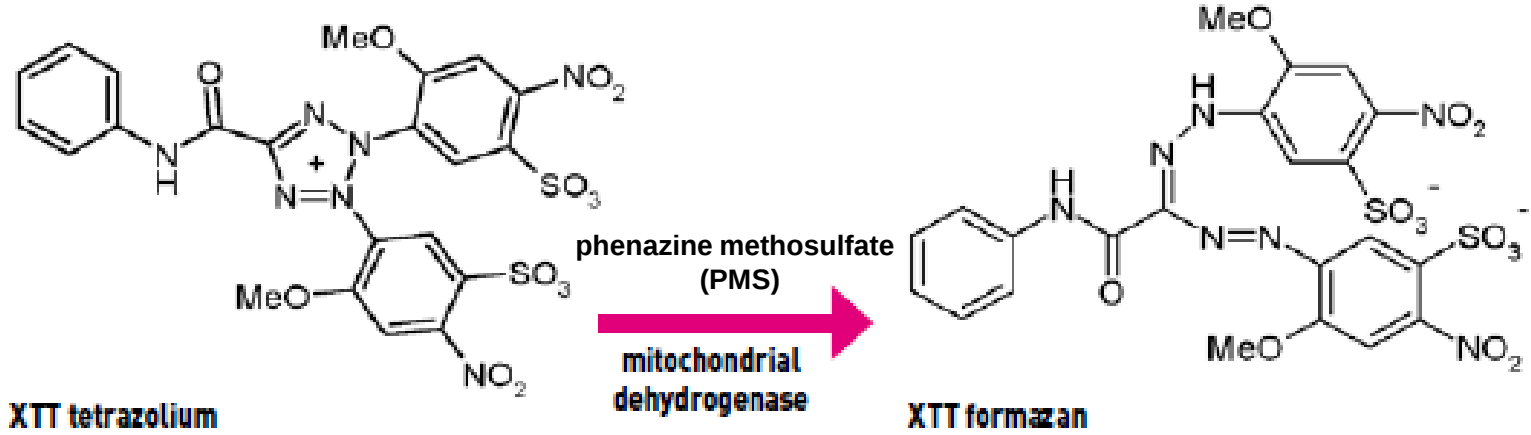
MTT limitleri-II

- (1) hücrelerin fizyolojik durumu
- (2) farklı hücre tiplerindeki mitokondriyal dehidrogenaz aktivite varyantları

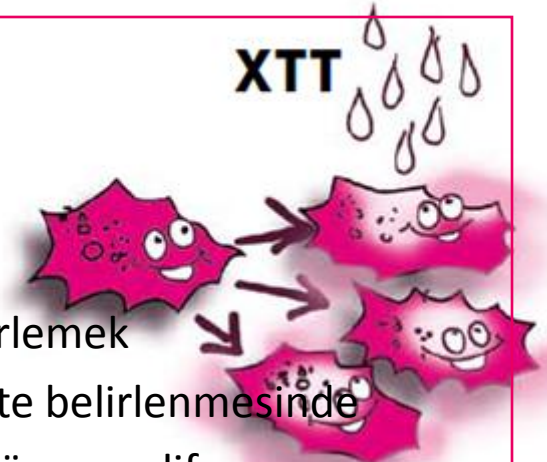
→ MTT metodu: mitojenlere, antijenik uyarılara, büyüme faktörlerine verilen sitotoksik yanıtların belirlenmesinde kullanılmaktadır.

XTT

(2,3-Bis(2-metoksi- 4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum)



- ✓ 1988 de tanımlandı
- ✓ Kolorimetrik bir yöntem
- ✓ Proliferasyon ölçümü
- ✓ Hücrelerin kuantifikasyonu
- ✓ Radyoaktif izotoplar kullanılmadan hücre canlılığını belirlemek
- ✓ TNF veya diğer büyüme inhibitörleri varlığında sitotoksite belirlenmesinde
- ✓ Farklı büyüme faktörleri, sitokinler ve besin varlığında hücre proliferasyonunu saptamak



XTT ile Hücre Proliferasyonu ve Canlılığının Ölçülmesi

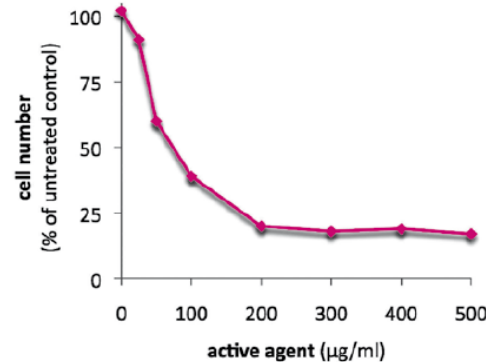
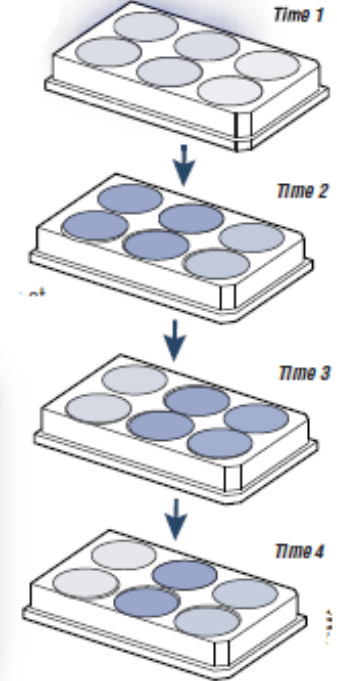
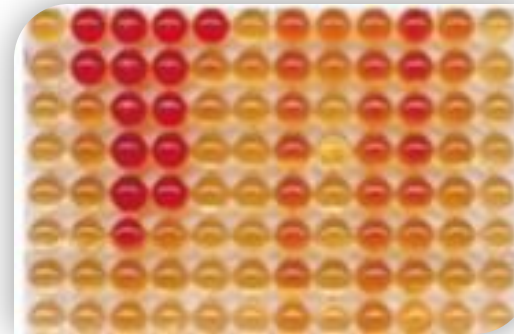
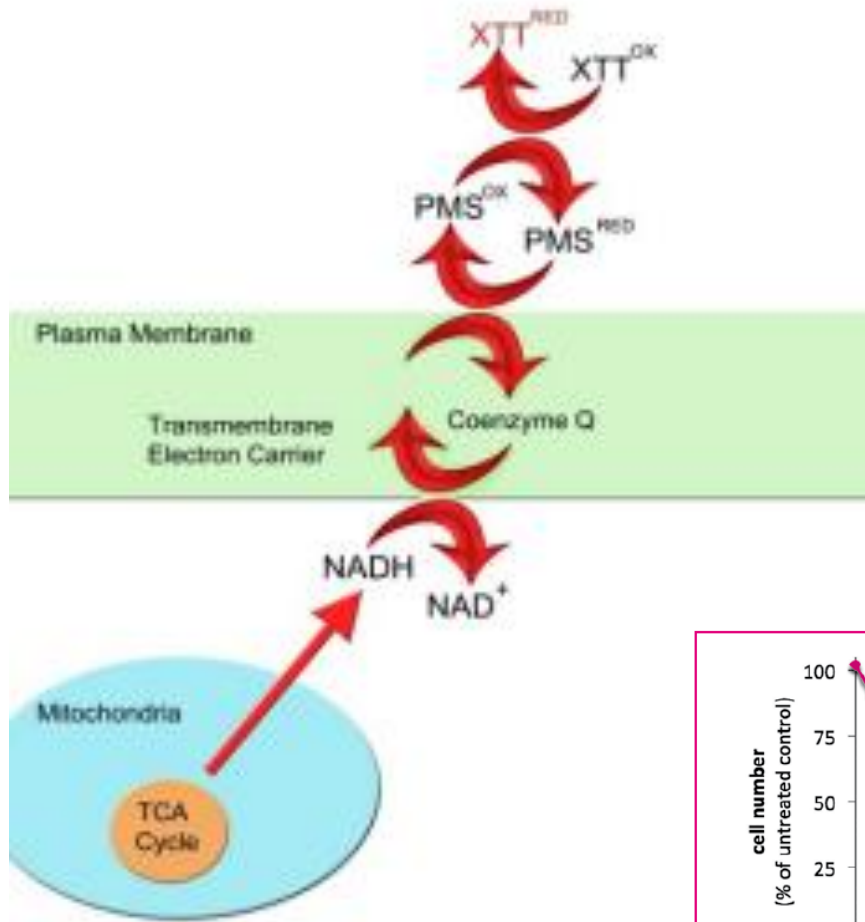
→ Spektrofotometre/ELISA

→ Metabolik aktivite $\longleftrightarrow$ boya yoğunluğu

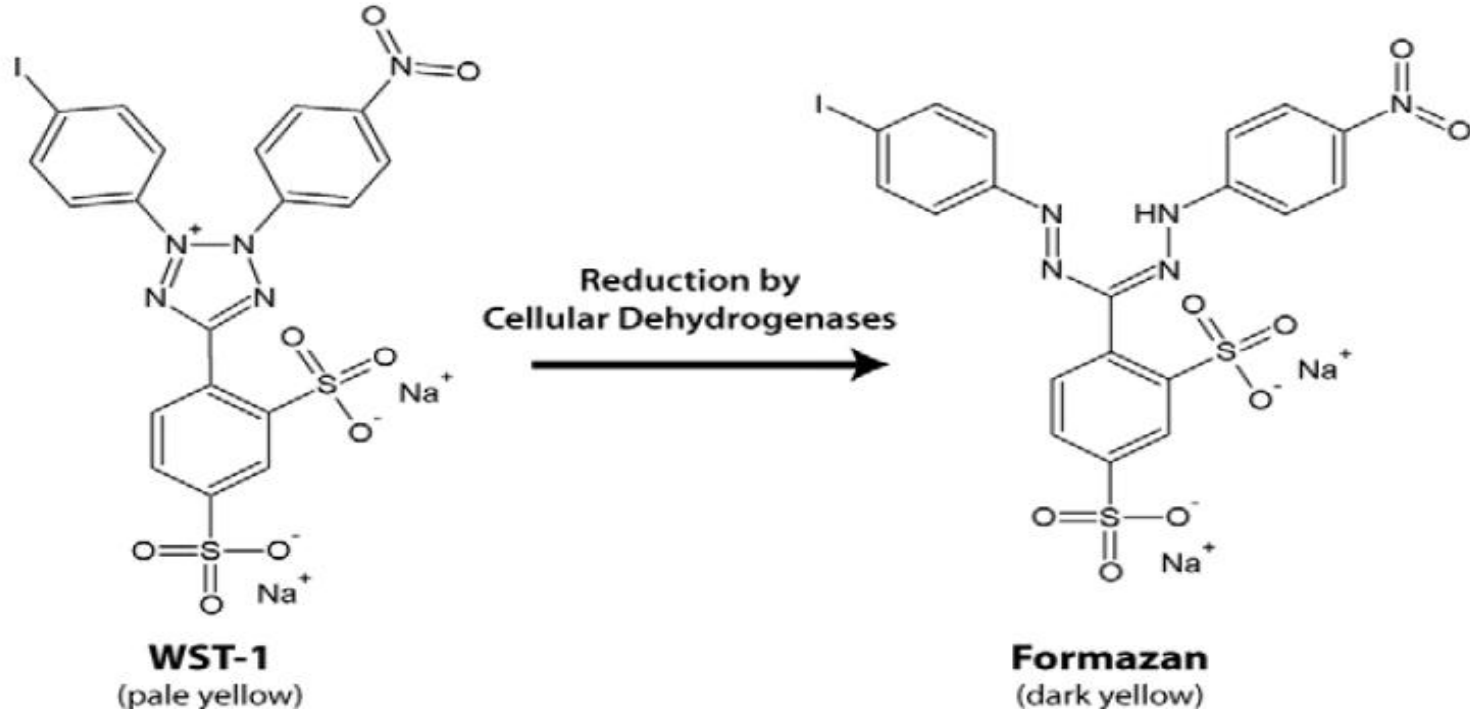
Metabolik olarak aktif hücre → yüksek yoğunlukta boya oluşumu



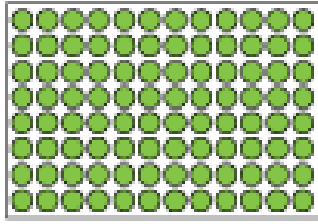
XTT ile Hücre Proliferasyonu ve Canlılığının Ölçülmesi



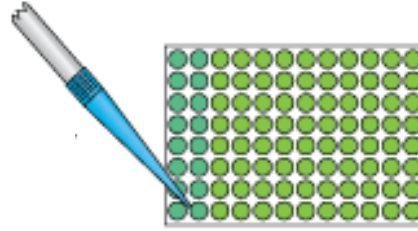
WST



- ✓ Canlı hücre sayısını belirleme
- ✓ Harvest veya yıkama gibi basamaklara ihtiyaç yok
- ✓ MTT, XTT'den daha hassastır.
- ✓ Hücre tahribatı yapmaz
- ✓ Resazurin sodium tuzu içeren memeli hücre proliferasyonunu görüntülemek
- ✓ Hücre proliferasyon ve sitotoksite testleri



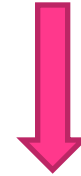
Hücre Hattı



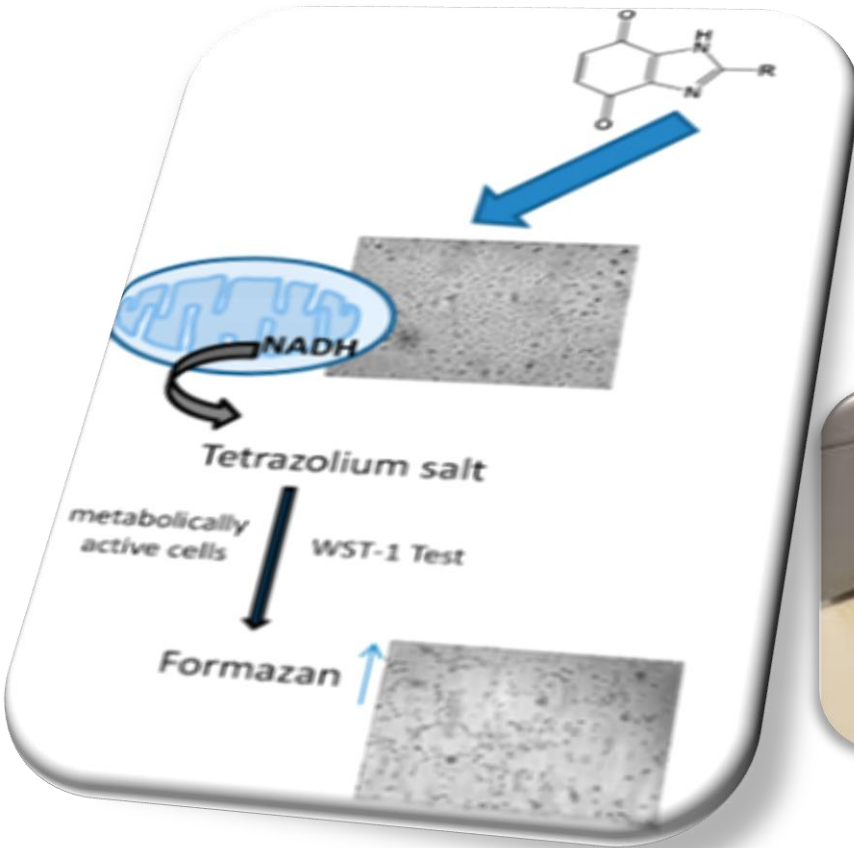
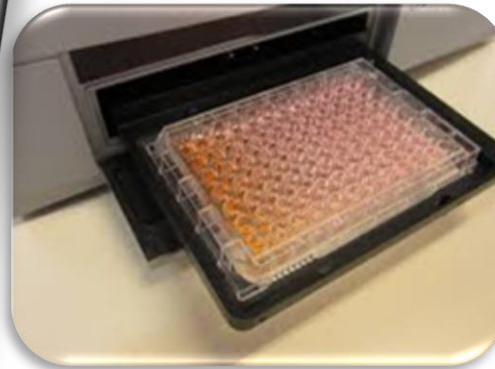
WST eklenmesi

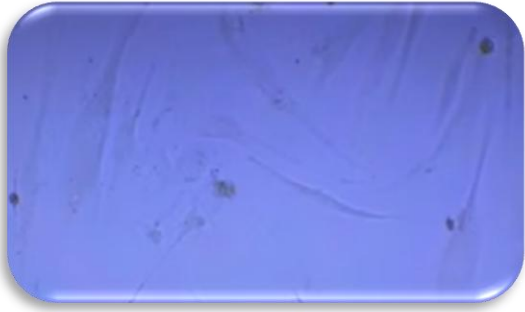


inkübasyon



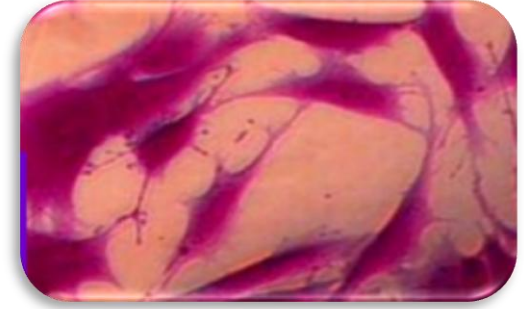
Analiz





SRB Testi

(Sulforhodamine B)



- ✓ in vitro sitotoksite testi
- ✓ Bazik amino asitlere bağlanan bir aminoxanthene boyası kullanılmaktadır
- ✓ SRB bir kemosensitivite testidir
- ✓ Mitokondriyal fonksiyona bağımlı değildir



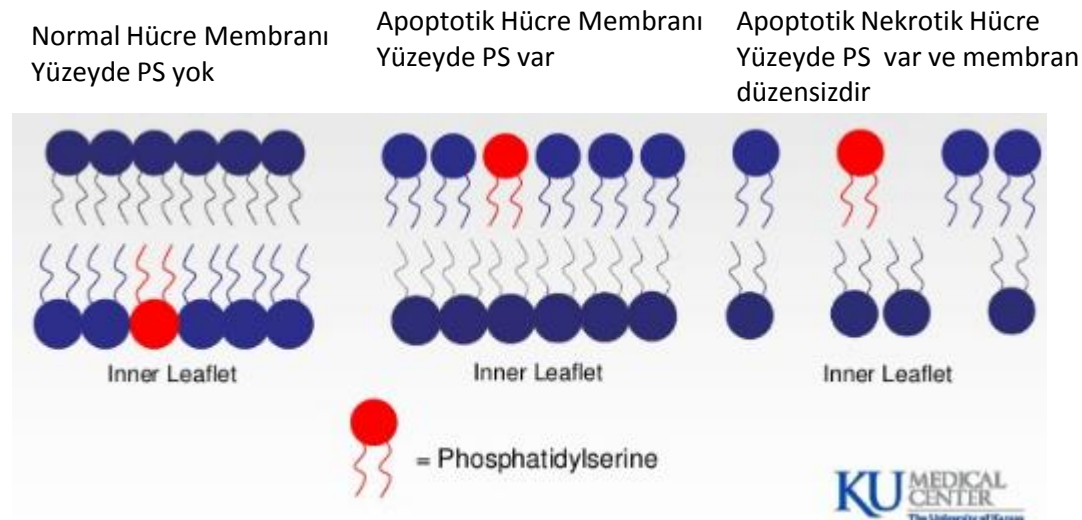
Alamar Blue Testi

- ✓ Resazurin-tabanlı method
- ✓ kolorimetrik veya florometrik
- Floresan özellik nedeni ile önemli bir sensitiviteye sahiptir



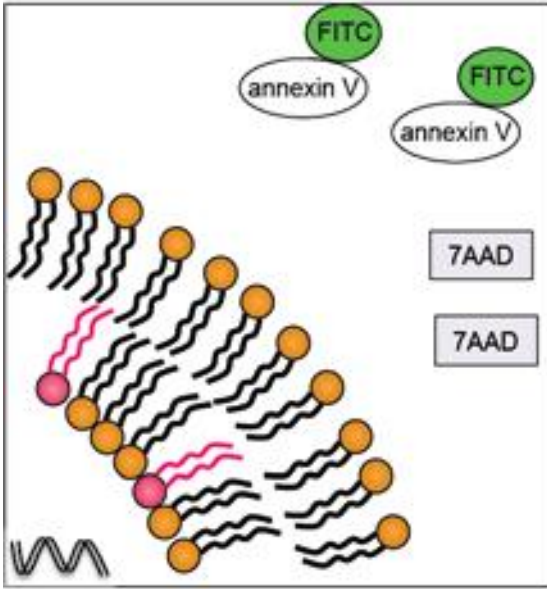
Annexin V/7-amino-actinomycin (7-AAD)

- Erken ve geç apoptoz ayırımında kullanılan bir boyama yöntemidir.
- Phosphatidylserine (PS) yüksek afinite göstermektedir.

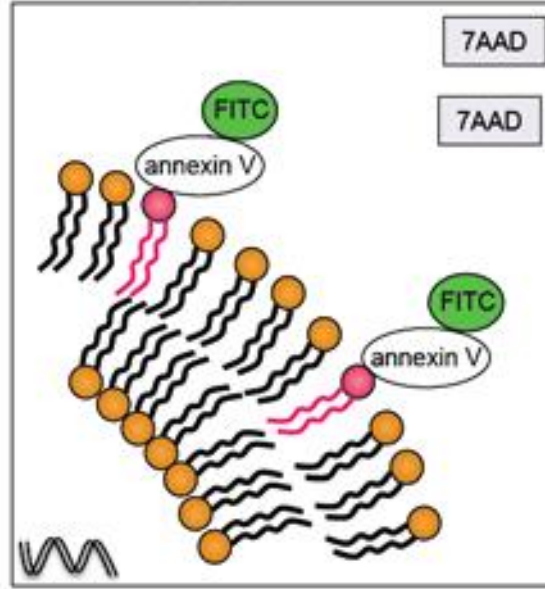


Canlılık ve Apoptozun annexin V ve 7-AAD boyaması ile saptanması

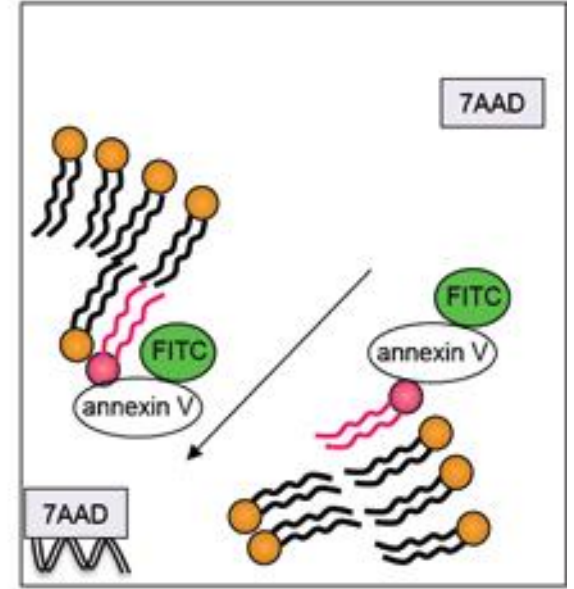
Normal Hücre



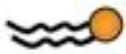
Apoptotik Hücre



Ölü Hücre



Legend:



phospholipids



phosphatidylserine (PS)

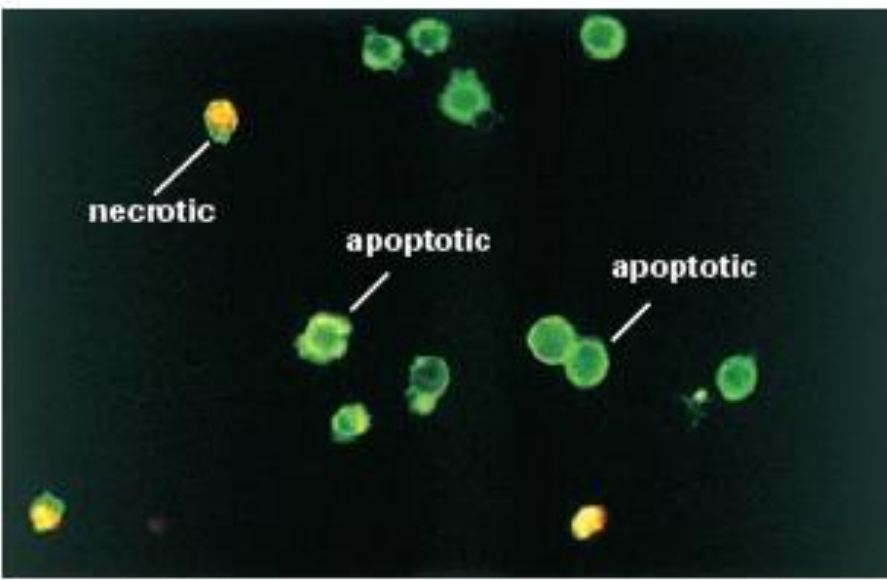


DNA

Canlı Hücreler → - annexin V ve 7-AAD

Erken Apoptotik Hücreler → + annexin V ve - 7-AAD

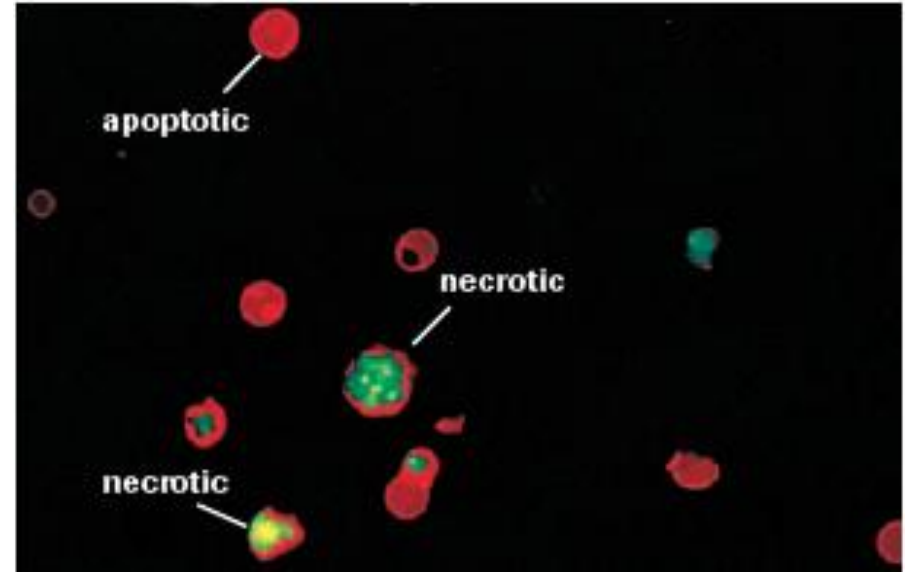
Geç Apoptotik ve Nekrotik Hücreler → + annexin V ve 7-AAD.

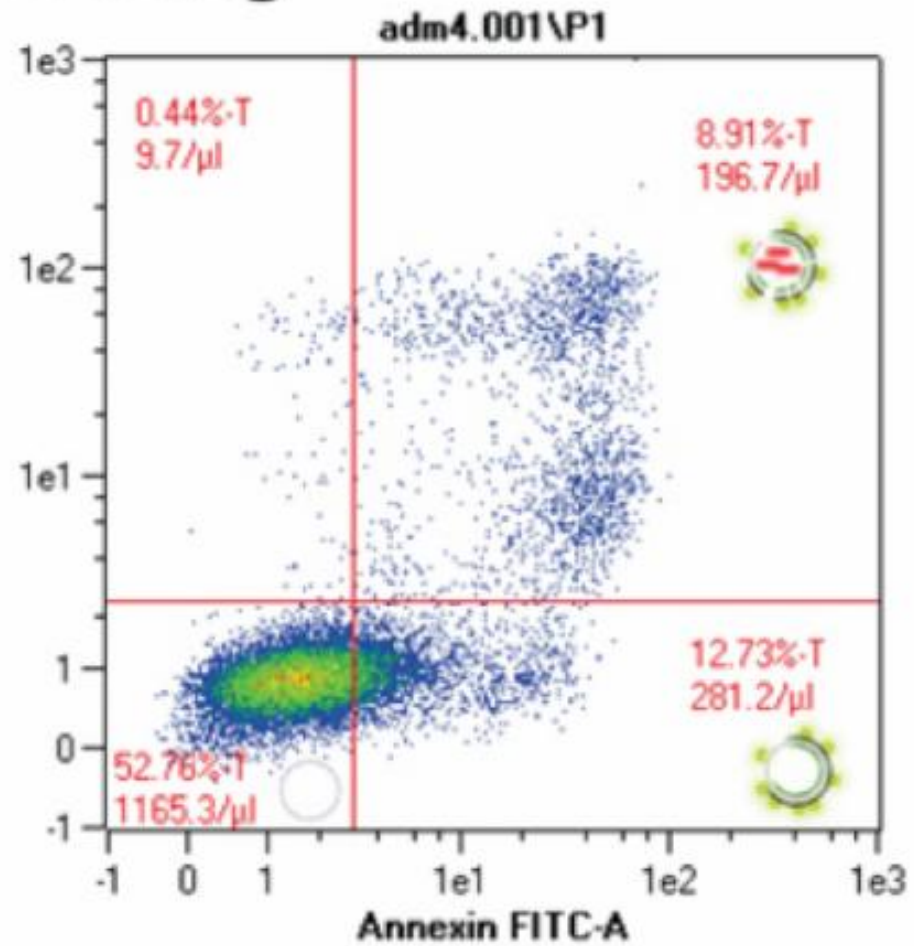
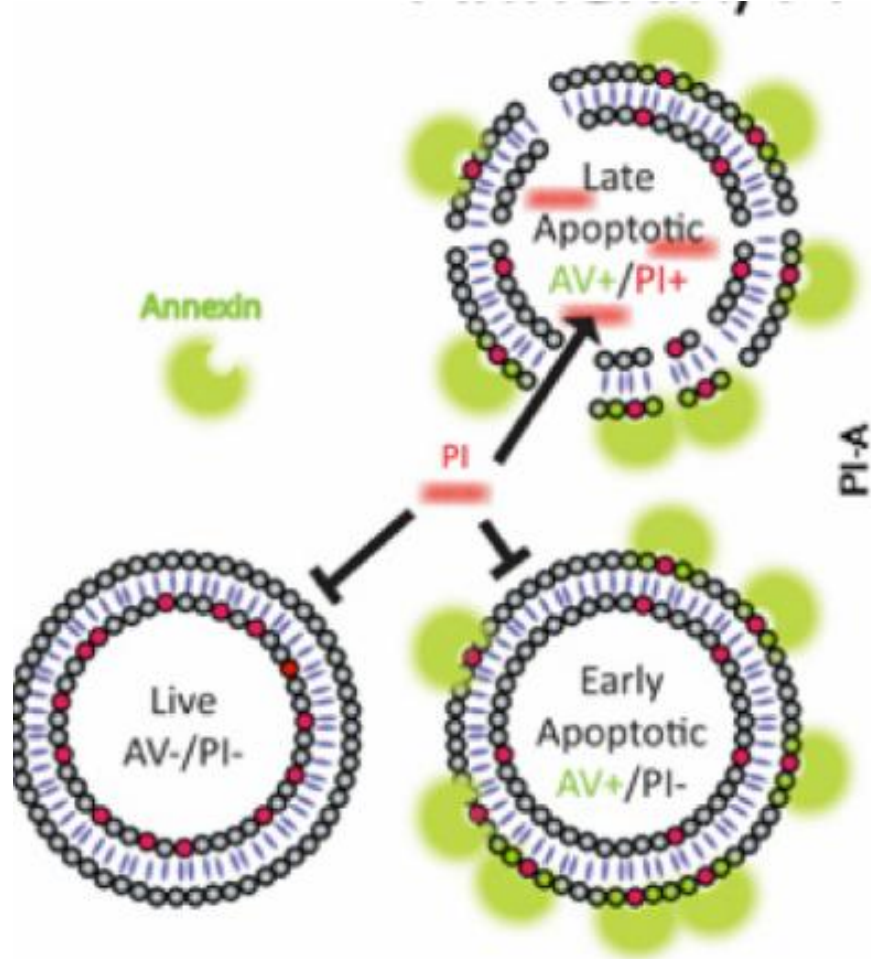


- U937 hücre hattının camptothecin ile maruziyeti:
- Annexin V → erken apoptoz

U937 hücre hattının camptothecin ile maruziyeti:

Annecin-V: kırmızı
BOBO-1: yeşil



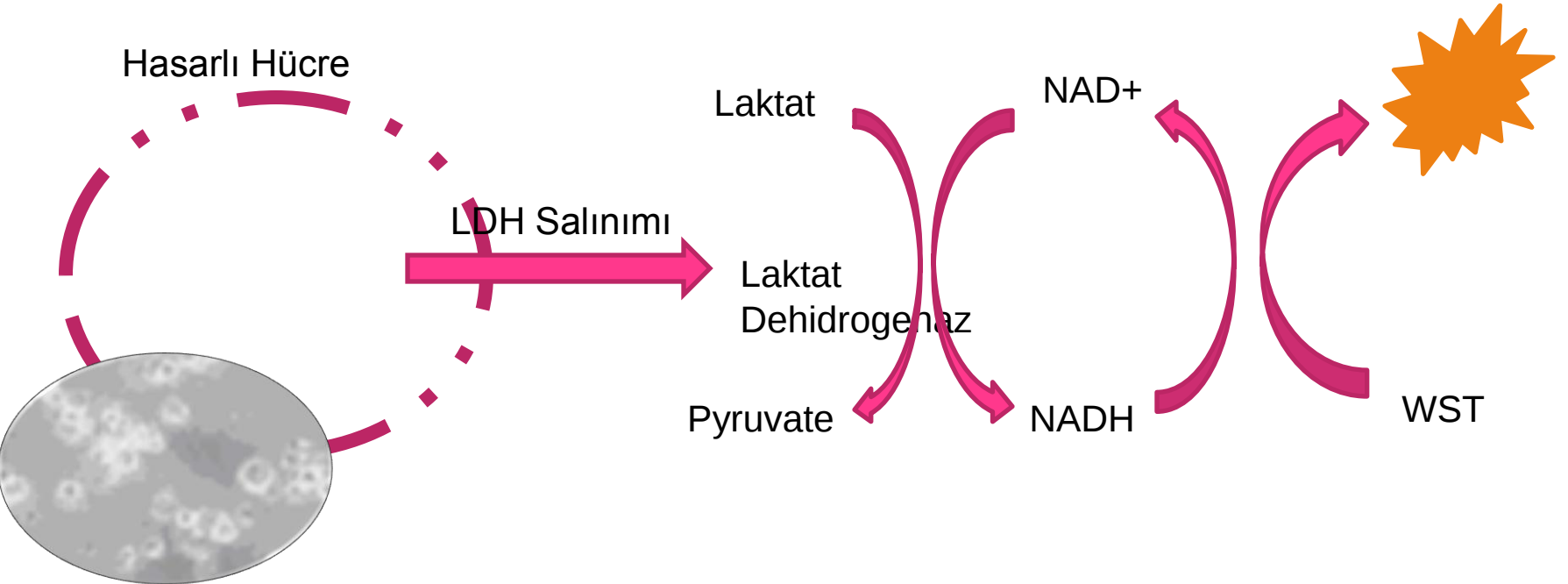


Canlı ve Ölü Hücreleri Konfokal Görüntüleme Protokolü

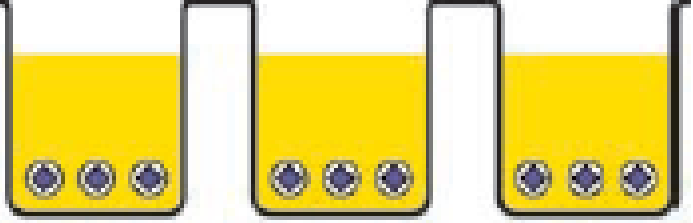
- Hücre canlılığı, hücrelerin uzun süreli sağ kalımını değerlendirmek için doku mühendisliği ve kültür çalışmalarının en önemli parametresini oluşturmaktadır.
 - Three-dimensional (3D) scaffold
 - Lactate dehydrogenase (LDH) boyama
 - Calcein AM & ethidium homodimer-1 boyama

LDH

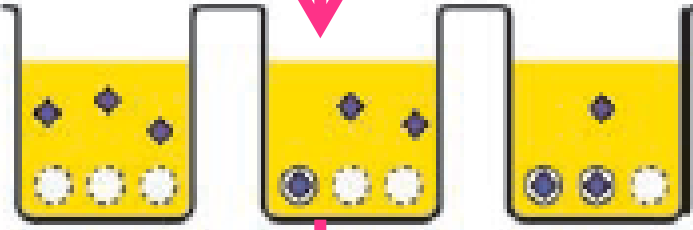
- ✓ tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzimdir.
- ✓ Hücre plazma membranı hasar gördüğünde hücre kültürü süpernatantına kolaylıkla salınabilmektedir.
- ✓ LDH, NAD^+ 'nın indirgenme reaksiyonlarında görev almaktadır.
- ✓ kolorimetrik ölçüm



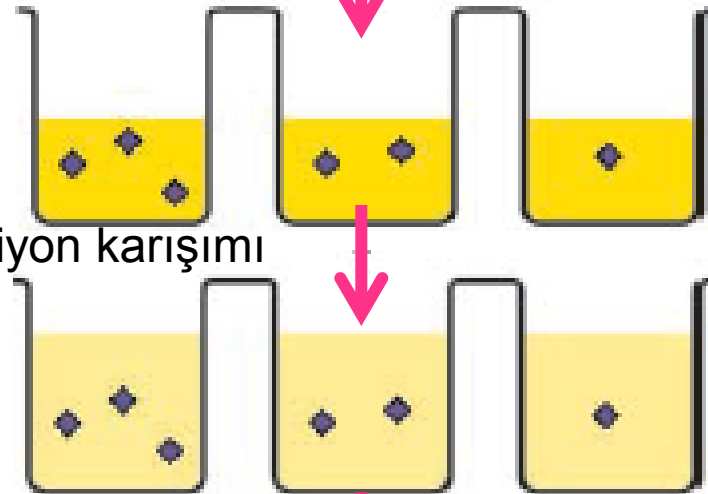
İnkübasyon



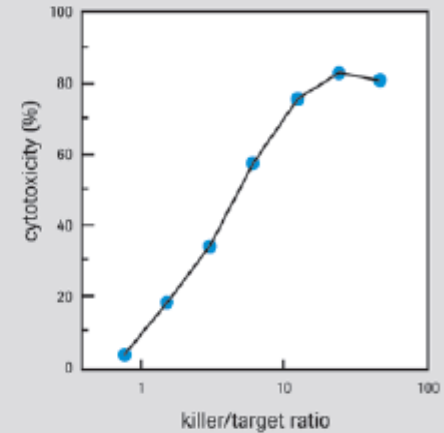
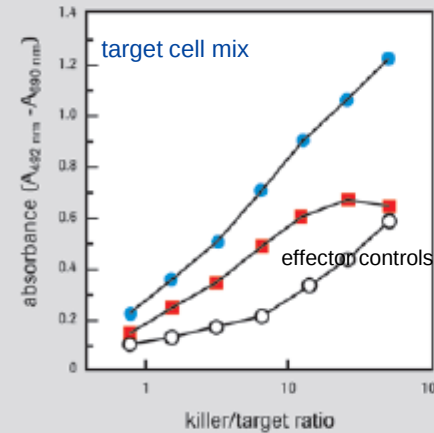
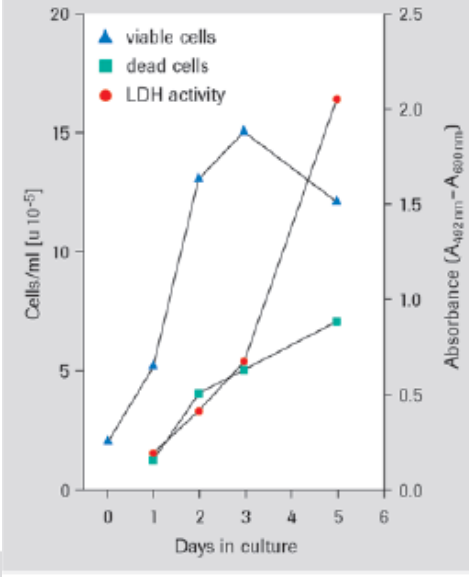
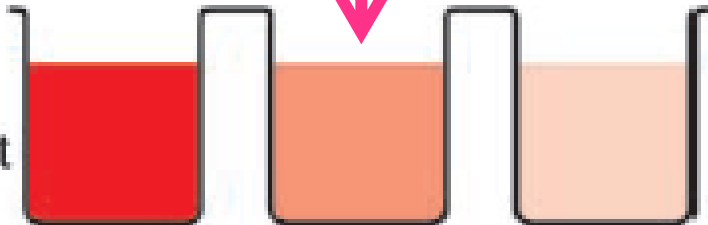
Süpernatant transferi



Reaksiyon karışımı



İnkübasyon



Ölçüm/ ELISA

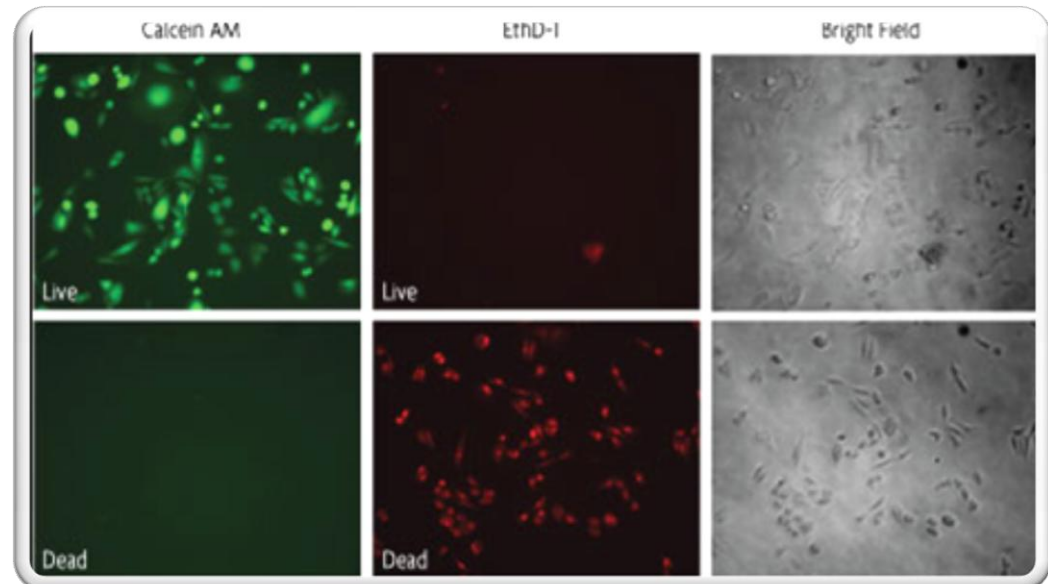
CaAM/EthH boyaları

- ✓ direkt doku veya scaffold üzerinde canlı ve ölü hücreleri boyamak için kullanılmaktadır.
- ✓ CaAM (calcein acetoxymethyl) canlı hücrelerde enzimatik olarak calceine hidrolize olmakta ve böylelikle yeşil floresan vermektedir.
- ✓ EthH ise membrandan geçip nükleik asidi kırmızı floresan ile boyamaktadır.

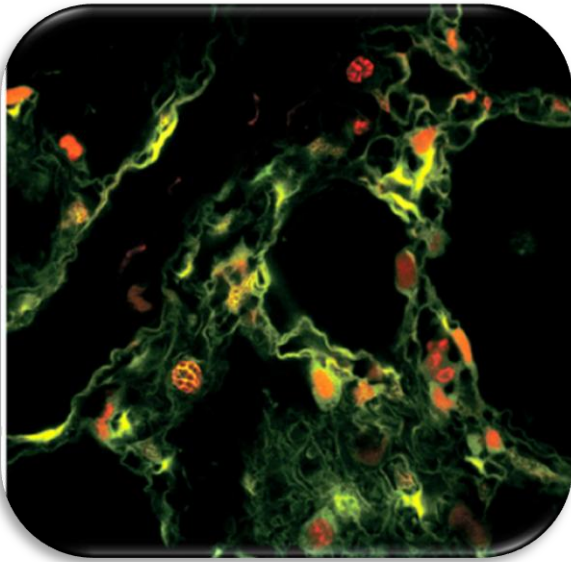
Ethidium homodimer (EthD-1)

- ✓ Ölü hücreleri ölçmek
- ✓ Sadece hasarlı hücre membranı tarafından geçirilebilmektedir.
- ✓ EthD-1; ssDNA, dsDNA, RNA, oligonucleotides, ve triplex DNA bağlandığı zaman 40 katı fazla ışımaya vermektedir.

- ☐ Verimli
- ☐ Güvenilir
- ☐ Ucuz
- ☐ Hassas



Ethidium homodimer (EthD-1)



Rat akciğer hücresi

Ethidium homodimer-1 ve Calcein AM ile rat akciğer hücrelerinin boyanması.

Canlısız hücre → nükleik asit boyasını geçirecektir



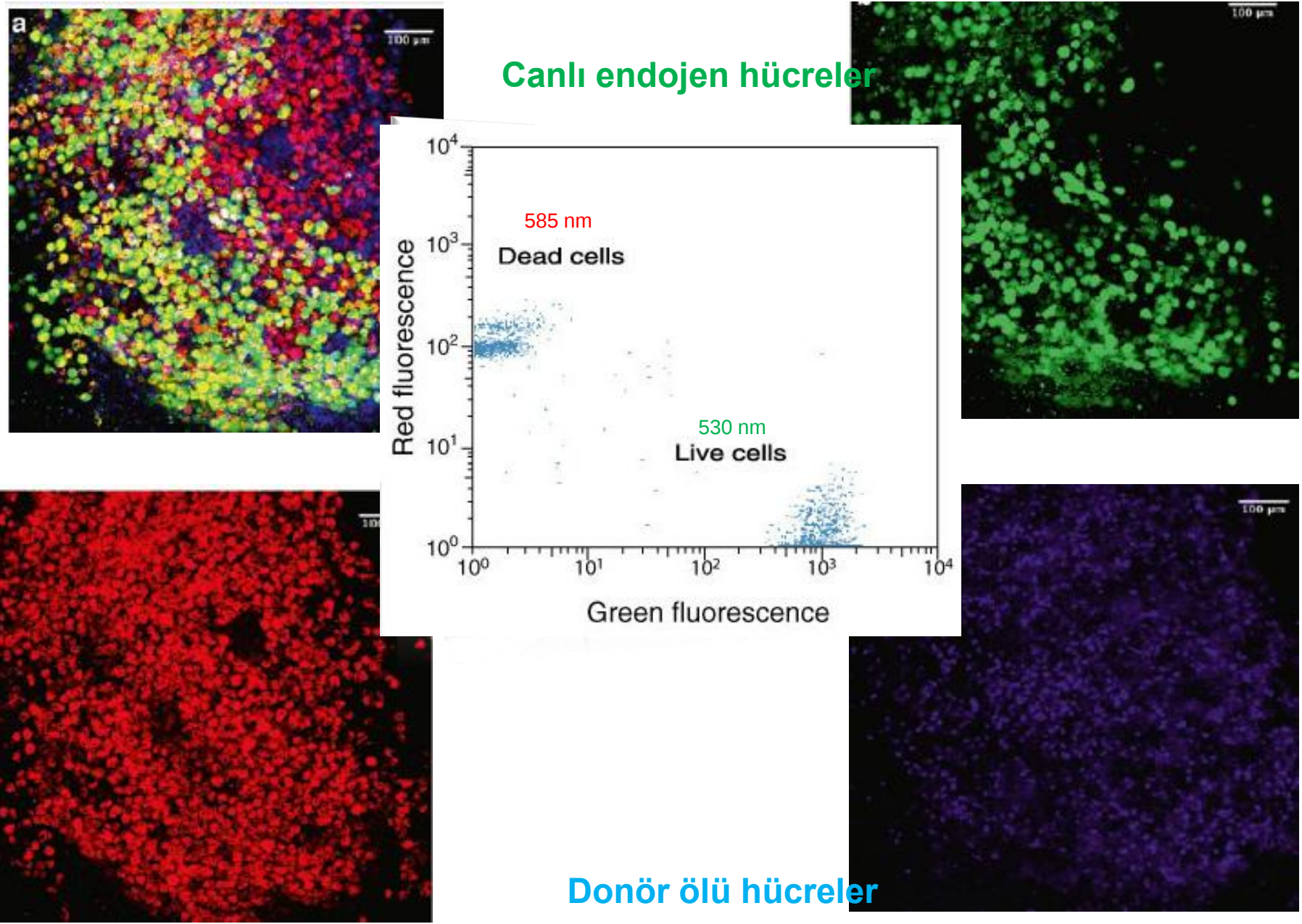
kırmızı floresan

İntakt hücre membranı → nonspesifik sistolik esteraz calcein M ile Boyanmaktadır



yeşil floresan

Bovine vertebral diske enjekte edilmiş bMSC & calcein



→ Uygun hücre tipi kullanılması durumunda intrinsik hücre hassasiyeti:

- ☑ Kimyasal biyotransformasyon ve bağlanma
- ☑ Memran geçirgenliği
- ☑ Yüzey özellikleri
- ☑ İntraselüler sentetik yollar
- ☑ Adaptasyon ve tamir mekanizmaları

Değişken Parametreler

- Kullanılan kimyasalın konsantrasyonu
- Kimysala maruz kalınan süre
- Hücre yoğunluğu
- Koloni yoğunluğu
- Koloni büyüklüğü
- Solventler

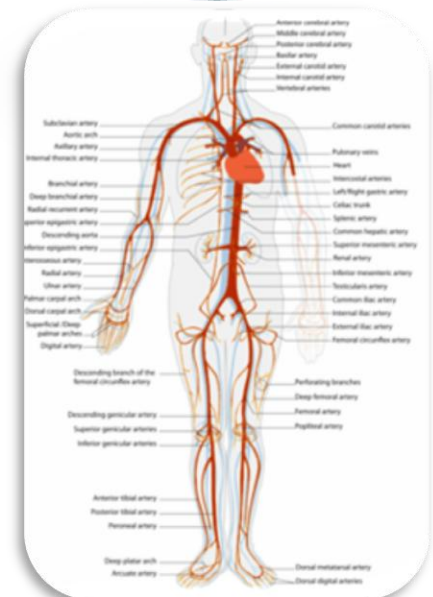
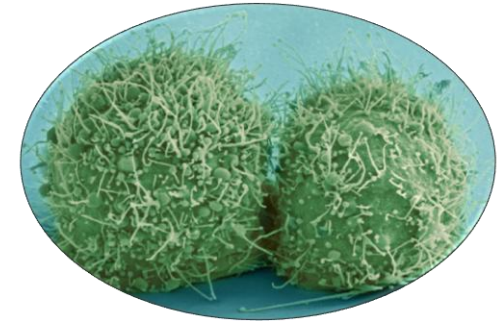
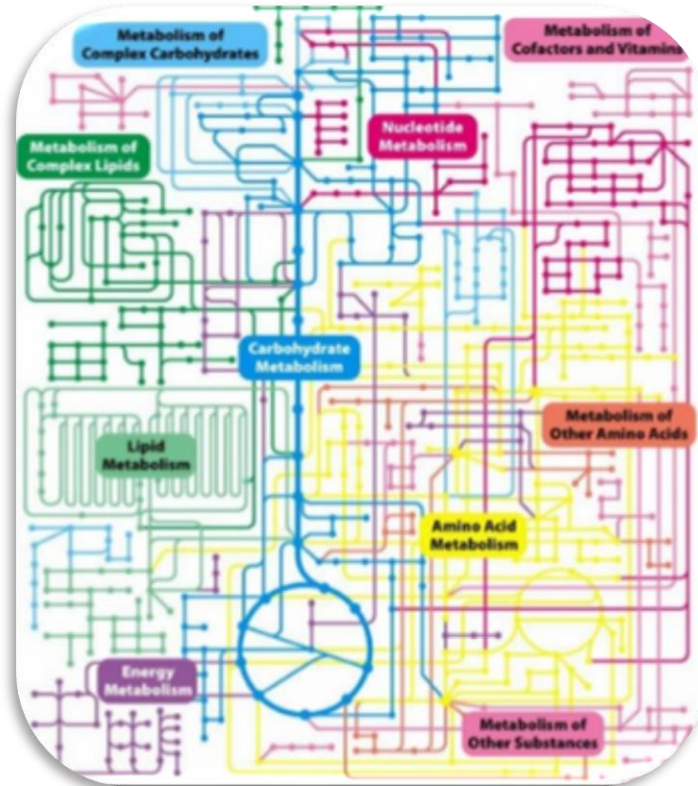
in vitro limitler



Farmakokinetik



Metabolizma



In Vitro Sitotoksosite Testlerinin Avantajları

1. Hücre metabolizmasında spesifik bir fonksiyonun değerlendirilmesi,
2. Kısa zamanda ve ekonomik olarak çok sayıda numune değerlendirilebilmesi,
3. Kantitatif ve karşılaştırılabilir sonuçlara ulaşılabilmesi,
4. Test yöntemlerinin standardize edilebilmesi,
5. Hassasiyetlerinden dolayı, toksik materyalin hayvan deneylerine geçmeden elimine edilmesine imkân tanınmaları,
7. Hayvan ve kullanım testlerine göre daha geniş kullanım alanına sahip olmalarıdır.

In Vitro Sitotoksite Testlerinin Dezavantajları

1. Her test için bir tür hücre kullanılması,
2. Kültür hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması,
3. In vitro ortamın organizmada bulunan immün sistem, inflammatuar sistem ve dolaşım sistemi gibi karmaşık koordinasyon mekanizmalarına sahip olamaması dolayısı ile in vitro test sonuçlarının in vivo şartlarla uyumluluğunu tartışmalı hale getirmektedir.

Teşekkür ederim

