

Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi

The importance of utilization of authenticated cell lines in researches

Alper AKÇALI¹

¹Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale

İlk olarak 1951 yılında HeLa hücre hatlarının kültürünün yapılabilmesi bilimsel araştırmalarda çok önemli ilerleme sağlamıştır. Günümüzde kanser araştırmalarında ve viroloji alanında hücre kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, kırk beş yılı aşkın süredir pek çok hücre hattının çapraz kontamine olduğu veya yanlış tanımlandığı bilinmesine rağmen, bilimsel literatürde halen bu durumdan habersiz, geçersiz sonuçların yer aldığı yayınlar yapılmaktadır. Bu durum büyük zaman ve maddi kayıplara yol açmaktadır. Ayrıca, sonuçları kabul edilemeyecek çalışmalar araştırmacıları ve dergi editörlerini ileride zor durumda bırakacaktır. Yapılacak çalışmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılması ve eldeki hücrelerin çeşitli testlerle özelliklerinin saptanması ile bu problemin önüne geçmek mümkün olabilecektir. Ancak araştırmacıların bu konudan haberdar olması ve çözüm yollarını bilmesi gerekmektedir. Bu yazıda konuya dikkat çekmek amacıyla hücre hatlarının çapraz kontaminasyonu ve yanlış tanımlanmasının tarihçesinden, olası sebeplerinden ve bunları önleme yollarından bahsedilmiştir.

Anahtar sözcükler: Hücre hattı; medikal onkoloji; tanımlanma; viroloji; yanlış saptanma.

A very significant progression in scientific researches has been provided with the performance of the first cultures of HeLa cell lines in 1951. Currently, cell cultures are commonly utilized in cancer investigations and the field of virology. Although it has been known that cell lines are contaminated cross-wise or misidentified over a 45-year period, publications by those unaware of this condition with invalid results are still being seen in the scientific literature. This condition reflects a loss of time and money. Furthermore, investigators and journal editors will face controversy due to the unacceptable results of these studies. This problem can be avoided with the utilization of authenticated cell lines and identification of properties of available cells in future studies. However, investigators should be made aware of this issue and of the solutions. A short history of cross-contamination and misidentification of cell lines, the possible causes and means of prevention are discussed in this letter to call attention to this issue.

Key words: Cell line; medical oncology; authentication; virology; misidentification.

Araştırmalarda Tanımlanmış Hücre Hatlarının Kullanılmasının Önemi

Canlıların, memelilerin bilimsel deneylerde kullanılmasının mümkün olduğunca kısıtlanması gerekliliği, biyomedikal çalışmaların farklı pek çok alanında hücre kültürlerinin geliştirilmesi ve kullanılmasına yol açmıştır. Hücre kültürleri mikrobiyolojide özellikle virüslerin üretilmesi ve tanımlanması, ayrıca virüs aşularının üretimi amacıyla kullanılmaktadırlar. Yeni yüzyılda ise kanser

araştırmalarının hız kazanması ile özellikle kanser ilaçlarının geliştirilmesinde, etkilerinin saptanmasında hücre kültürleri özellikle büyük önem kazanmıştır.^[1]

İlk defa 1951 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Baltimore'da servikal kanser nedeniyle takip edilen Afrika kökenli Amerikalı bir hastanın kanser dokularının laboratuvarında kültürü başarılabildiği görülmüştür. Henrietta Lack adındaki hasta kanserin yayılması sonucu ölmüş ancak ölümsüz hücreleri-

İletişim (Correspondence): Dr. Alper AKÇALI. Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale, Turkey. Tel: +90 - 286 - 218 00 18 / 2217 Faks (Fax): +90 - 286 - 218 37 38 e-posta (e-mail): aakcali@isnet.net.tr

nin kültürü adına atfen HeLa adı ile dünya genelindeki laboratuvarlara talep nedeniyle dağıtılmıştır. Bu olayın ilginç diğer yanı ailesinin uzun yıllar bu hücrelerin tüm dünya genelinde yaşamaya devam ettiğinden haberdar olmamalarıdır. Kanser hücrelerinin ölümsüz olması ve çok kolay üretilmeleri çalışmalarda hücre kültürü gerektiren araştırmalara hız kazandırmıştır. Ancak, ilerleyen süre içerisinde yaptığı çalışmalar ile Stanley Gartler 1966'da Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection=ATCC) kurumunda saklanan 20 insan hücrelerinin 18'inin kromozomal ve biyokimyasal olarak HeLa hücreleri ile tıpatıp aynı olduğunu bildirmiştir. ATCC kayıtlarına göre bu hücreler beyaz ırktaki bireylerden sağlanmış gözükmelerine rağmen, sıklıkla Afrika kökenli Amerikalılarda bulunan A tipi glikoz 6 fosfat dehidrogenaz enzimi aktivitesi göstermeleri, kurumda saklama işlemleri sırasında bu hücrelerin HeLa hücreleri ile kontamine olduğunu göstermiştir. Gartler 1968 yılında Nature dergisinde bu durumu yayınlamıştır.^[2-4] Bilimsel araştırmalarda kullanılan hücre kültürleri için bu saptama önemli bir sorunun habercisi olmuştur. İlginç olan bu tarihteki saptamaya rağmen kontamine veya yanlış tanımlanmış olduğu bilinen pek çok hücrenin halen yanlış şekilde araştırmalarda kullanılmasının devam etmesidir.^[1,5-6]

Bu yazı ile ülkemizde hücre kültürleri ile çalışma yapan araştırmacıların bilgilendirilmesi ve çalışmalarında tanımlanmış, onaylanmış (*authenticated*) hücre serilerinin kullanımının öneminin vurgulanması, ayrıca hücre kültürleri ile çalışırken temel "iyi uygulamaların" özetlenmesi amaçlanmıştır. Bu konuda çalışmalar yürütecek araştırmacılarımızın, kabul edilebilir ve doğru sonuçlar elde edebilmeleri mümkün olacaktır.

Yanlış Tanımlanmış Hücre Hatları

Uzun yıllardır bazı hücre hatlarının kontamine olduğu ve köken aldığı hücre türlerini artık temsil etmediği bilinmektedir. Bu yanlış tanımlanmış hücre hatlarına yenileri de eklenmektedir. Çapraz kontaminasyon (*cross-contamination*) olarak uluslararası nomenklatürde kabul görmüş olan tanımlama, mikrobiyolojik bir organizma kontaminasyonunu değil; bir hücre hattının yanlış tanımlama ile bir başkası olarak isimlendirilmesini ifade etmektedir.^[7]

Masters yaptığı araştırma ile kullanımda olan hücre hatlarının %20 kadarının ilk tanımlandıkları özellikte olmadıklarını bildirmiştir.^[5] Buehring ve arkadaşları PubMed'den yaptıkları araştırmada 1969-2004 yılları arasında HeLa hücresi olduğu bilinen yanlış tanımlanmış hücre hatlarının 220 kere kullanıldığını saptamışlardır.^[8]

KB hücreleri oro-laringeal skuamöz karsinoma hücrelerine örnek gösterilmesine rağmen kırk yıl önce aslında bir servikal adenokarsinom hücresi olan HeLa hücreleri olduğu gösterilmiştir. İlginç olarak son beş yılda 525 kere yanlış atıf almışlardır. Yine insan epidermoid larinks karsinoma hücresi olarak tanımlanmış Hep-2 hücreleri de HeLa hücreleridir ve son beş yılda 667 kere yanlış atıf almışlardır.^[9] MCF-7/Adr hücrelerinin MCF-7 meme karsinomu hücrelerinin ilaca dirençli varyantları olmadığı, OVCAR-8 ovarian karsinoma hücreleri olduğu gösterilmiş olmakla birlikte, literatürde yaklaşık üç yüz yayında ilaca dirençli meme karsinomu hücresi olarak atıf almışlardır.^[10] Yanlış tanımlanmış veya çapraz kontamine olan hücre hatlarının listeleri çeşitli kaynaklardan bulunabilir. Özellikle, ATCC, Coriell Enstitüsü, Avrupa Hücre Kültürü Koleksiyonu (ECCC), Japon Hücre Saklama Bankası (JCRB) ve Alman Hücre Bankası Merkezi (DMZB) gibi uluslararası hücre bankaları stoklarındaki hücrelerin incelemelerini yapmakta, yanlış tanımlananları duyurmaktadır.^[3-4] Bu hücre hatlarından sıklıkla yanlış kullanılanların bir kısmının listesi, ilk izolasyonu yapıldığındaki özellikleri ve kontaminasyonu belirlenen hücreleri Tablo 1'de sıralanmıştır. Detaylı listeler ve açıklamalar kaynaklardaki yayınlardan bulunabilir. Verilen örneklerden de görüleceği gibi yanlış tanımlanmış hücre hatlarında yapılmış çalışmalar ile elde edilen sonuçlar ilgili hastalık ve tedavi için geçersiz olacaktır.

Çapraz kontaminasyon veya yanlış tanımlama farklı sebepler ile gerçekleşebilir. Bunlar sıralanacak olursa: Hücre hatlarının muamelesinde dikkatsizlik sonucunda, bir hücre hattının başka bir hücre hattının vasatına veya kültür şişesine bulaştırılması ile (kontamine eden hücrelerin üreme hızları daha yüksek ise, daha yavaş üreyen hücre hattına baskın gelerek tamamen kendisi yer alır), kültür şişeleri-

Tablo 1Sıklıkla yanlış tanımlamalarla kullanılan bazı hücre hatları^[1,5]

Hücre hattı adı	İlk atfedilen köken	Gerçek içerik
Chang karaciğer	Karaciğer hücreleri	HeLa hücreleri (serviksin glandüler kanseri)
Girardi kalp	Atriyal miyoblast hücreleri	HeLa
Hep-2 veya (H.Ep.-2)	Larinks karsinoma hücreleri	HeLa
INT 407	Emrionik bağırsak hücreleri	HeLa
J111	Monositik lösemi hücresi	HeLa
KB	Oral epidermoid karsinoma hücreleri	HeLa
NCTC2544	Deri epiteli hücreleri (keratinositler)	HeLa
WISH	Amnion hücreleri	HeLa
RPMI-8402	T hücre lösemi	Bilinmemekte
IM-9	Multiple myeloma hücreleri	Epstein-Barr virüs transfekte edilmiş B hücreli lenfoblastoid seri
HBL-100	Meme transforme ancak tümörojenik değil	Bilinmemekte ancak Y kromozumu içermediği bulunmuştur.
TSU-Pr1	Prostat kanseri hücreleri	T24 hücreleri (mesane kanseri)
ECV-304	Spontan transforme olmuş umbilikal kord endotelyal hücreleri	T24 hücreleri
MGH-U2	Mesane kanseri	T24 hücreleri
HU456	Mesane kanseri	T24 hücreleri
JCA-1	Prostat kanseri hücreleri	T24 hücreleri
PPC-1	Prostat kanseri hücreleri	PC-3 hücreleri (prostat kanseri)
ALVA-31	Prostat kanseri hücreleri	PC-3 hücreleri
SK-N-MC	Nöroblastoma hücreleri	Ewing ailesi tümör hücreleri
DAMI	Megakaryosit	HEL hücreleri (erythroleukemia)
HS-Sultan	Plazma hücreleri (multiple myeloma)	Jijoye hücreleri (Burkitt lenfoma)

nin yanlış etiketlenmesi, sıvı nitrojen depolarının muamelesinde dikkatsizlik (etiketlenme ve envanter kayıtlarındaki dikkatsizlik) sonucu yanlış hücre şişesinin hatalı şekilde başkasının yerine çözdürülmesi, hücre serilerini hazırlayanların yeni bir hücre hattı geliştirmedeki aşırı heyecanları, yeni hücre hatlarının yeterli tanımlanmasını gölgede bırakabilmesi, bir laboratuvardan başkasına hücrelerin aktarılması sırasında alıcının hücrelerin yeterli tanımlanmalarını ihmal etmesi.^[9]

Hücre Kültürü Çalışmalarında Dikkat Edilmesi Gerekenler

Hücre kültürlerinde asepsiyi sağlamanın ve hücre hattının içeriğinin korunması için aşağıdaki bazı temel kurallara uyulması gerekir.^[9]

1. Her hücre hattı için ayrı bir vasat ve tripsin

gibi reajenler ayrı olarak kullanılmalıdır.

2. Hücre kültür flaskları, vasatları ve reajen şişeleri aynı anda birden fazla hücre hattı için açık tutulmamalıdır.
3. HeLa gibi hızlı büyüyen hücre hatları yalnız başına işleme alınmalı ve çalışmaları diğere hücre hatlarının sonrasında gerçekleştirilmelidir.
4. Hiçbir zaman aynı pipet farklı hücreler için kullanılmamalıdır.
5. Hücre içeren bir flaska sokulan pipet asla vasat şişelerine geri konulmamalıdır.
6. Her zaman tıkaçlı pipetler kullanılmalıdır.
7. Tıkaçlı uçlar olmadan pipetleyiciler kullanılmamalıdır.

8. Subkültür öncesinde ve sonrasında hücrelerin yapısı değerlendirilmeli, standart fotoğraflar ile kıyaslanmalıdır.
9. Hücre hatlarının mikoplazma kontaminasyonu açısından kontrol edilmelidir.
10. Hücre hattının içeriği dondurulmadan önce ve çözdürülmeden önce mutlaka doğrulanmalıdır.

İlk defa 1911’de Peyton Rous tarafından saptanan, onkojenik etkisi olduğu tespit edilen “Rous sarkoma virüsü”, virüslerin onkoloji alanında ilgi çekmesine yol açmıştır. Onkojenik etkileri olan virüsler yanında, kanserli olgularda virüslerle oluşan enfeksiyonlar önem taşıdığından, hem araştırma hem de tanı amacıyla virüslerle çalışmalar yapılırken hücre kültürü kullanımında bazı noktalara dikkat edilmesi gereklidir. Moleküler yöntemlerin giderek popülerleşmesine rağmen virolojide hücre kültürü halen temel yöntemdir. Virolojik çalışmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanımının yanında, bu tanımlanmış hücre hatlarının aranacak virüsleri üretebilme kapasitelerinin de belirlenmiş ve takip ediliyor olması gereklidir. Bu durum kullanılan hücrelerin özellikle aranacak virüsler için duyarlılığının saptanmasıyla belirlenebilmektedir. Duyarlılığı olmayan hücrelerde klinik örnekte virüs bulunsa bile üretilmesi veya sitopatik etkinin saptanması mümkün olmayacaktır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yürütülen Polio Laboratuvar Ağı çalışmasında hücre hatlarının duyarlılığı en çok üstünde durulan konulardan birisidir. Bu amaçla titresi kullanılan hücre hattında önceden belirlenmiş referans Sabin tipi polio virüsleri hazırlanır. Belirli aralıklarla veya farklı bir üreticinin vasatı kullanılması gibi zamanlarda virüs titresi o hücre hattında tekrar saptanır. Belirlenen virüs titresinde 0,5 log₁₀’dan fazla sapma olmaz ise hücrenin bu virüsün saptanmasında kullanılabileceği kabul edilir.^[11] Benzer uygulama klinik örneklerden virüs izolasyonu çalışan laboratuvarlarda farklı virüsler için de kullanılabilir. Böylece kullanılan hücrelerde veya kimyasallarda bir uygunsuzluğun saptanması mümkün olabilecektir.

Hücre hatlarının takibinde dikkat edilmesi gereken diğer nokta hücrelerin pasajlanma sayısıdır. Sürekli hücre hatları olan kanser hücrelerinde pa-

sajlanma sayısı arttıkça morfolojik ve fizyolojik özelliklerde sapmalar gözlenmektedir. Bu nedenle çalışmalar sırasında pasaj sayısı takip edilmeli, kayıt altında tutulmalıdır. Belirli bir sayı geçildikten sonra saklanmış olan ana hücre stoklarından yeni hücre hatları hazırlanmalıdır.^[12]

Hücre hatlarında çapraz kontaminasyonun belirlenmesi için izoenzim analizleri, karyotiplendirme, HLA tiplendirme ve amplifiye fragman uzunluğu polimorfizmi (AFLP) yöntemleri kullanılmıştır. Güncel olarak “*short tandem repeat=STR*” analizi daha duyarlı ve hızlı şekilde sonuç verebilmektedir.^[7] STR analizinde ticari primer dizi setleri kullanılarak polimorfik STR lokusları çoğaltılmakta ve oluşan bantlar floresan temelli sinyal saptama cihazları ile belirlenmektedir. Sonuç olarak, her lokusta çoğaltılmış olan tek bir kodon hassaslığında PZT ürünleri uzunlukları ile sayısal bir kod elde edilir. Bu yöntem ile laboratuvarlar kendileri hücre tanımlamalarını sağlayacakları gibi 200 USD gibi bir maliyetle ticari olarak da bu testi yaptırabilirler.^[9,12,13] Masters ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada uluslararası hücre bankalarından elde edilmiş 253 hücre hattında STR analizinin hücre tanımlamada başarı ile kullanılabileceği gösterilmiştir.^[13] Yapılacak araştırmaya başlamadan önce eldeki hücrelerin bu gibi testlerle tanımlanmış olmasına dikkat edilmelidir.

Roland M. Nardone önderliğinde bir grup bilim adamı bu konuya dikkati çekmek için 2008 Mayıs ayını “Cell Line Authentication Global Awareness Month” (Hücre hatları tanımlanması global farkındalık ayı) ilan etmişler ve <http://cellid.cua.edu/web> sitesini konu ile ilgili güncel bilgi amacıyla hazırlamışlardır.

Özet olarak, araştırmalarında hücre kültürü kullanacakların, tanımlanmış hücre hatlarını kullanmaları son derece önemlidir. Araştırmalarından önce ilgili hücre hattının tüm bilgisi elde edilmeli ve deney modellerini temsil ettiğinden emin olmalıdırlar. Hücre hatları mikoplazma benzeri bakteri kontaminasyonu açısından kontrol edilmeli, pasaj sayısı sınırlı tutulmalıdır. Virolojik çalışmalarda hücrelerin duyarlılıkları takip edilmelidir. Hücre bankaları dışında, araştırma ve deney laboratuvarlarından hücre hatlarının temin edilmesinden

kaçınılmalıdır. Araştırmacılar çalışmaları sırasında çiçeklerini seven bahçıvanlar gibi dikkatli olmalıdırlar. Aksi takdirde boşa harcanan para ve zaman ile tutarsız sonuçlar üreten bilim adamları olarak bilim dünyasında yerlerini alacaklardır.

Bilgi ve Teřekkür

Yazar 2006-2008 yılları arasında Dünya Sağlık Örgütü Ağına bağlı Türkiye Ulusal Polio Laboratuvarı sorumluluğunu yürütmüştür. Bu dönemde laboratuvarında hücrelerin takibi ve bakımını özveriyle yapan tüm Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Enterovirüs ve Doku Kültürü Laboratuvarı personeline titiz çalışmaları için teşekkür eder.

Kaynaklar

1. Lacroix M. Persistent use of “false” cell lines. *Int J Cancer* 2008;122(1):1-4.
2. Gartler SM. Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines. *Nature* 1968;217(5130):750-1.
3. Chatterjee R. Cell biology. Cases of mistaken identity. *Science* 2007;315(5814):928-31.
4. Nardone RM. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action. *Cell Biol Toxicol* 2007;23(6):367-72.
5. Masters JR. False cell lines: The problem and a solution. *Cytotechnology* 2002;39(2):69-74.
6. Markovic O, Markovic N. Cell cross-contamination in cell cultures: the silent and neglected danger. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998;34(1):1-8.
7. Cabrera CM, Cobo F, Nieto A, Cortés JL, Montes RM, Catalina P, et al. Identity tests: determination of cell line cross-contamination. *Cytotechnology* 2006;51(2):45-50.
8. Buehring GC, Eby EA, Eby MJ. Cell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it? *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2004;40(7):211-5.
9. Freshney RI. Authentication of cell lines: ignore at your peril! *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8(3):311-4.
10. Liscovitch M, Ravid D. A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/AdrR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OVCAR-8 human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett* 2007;245(1-2):350-2.
11. Department of Immunization Vaccine and Biologicals. *Polio Laboratory Manual*. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 2004: 73-80.
12. Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques* 2007;43(5):575, 577-8, 581-2 passim.
13. Masters JR, Thomson JA, Daly-Burns B, Reid YA, Dirks WG, Packer P, et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(14):8012-7.