

# RAT SİYATİK SİNİRİNDEN SCHWAN HÜCRE KÜLTÜRÜ HAZIRLANMASI İÇİN GELİŞTİRİLMİŞ METOD

Zeki CAN, Kutlu SEVİN, Erdem YORMUK  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı

## ÖZET

Bu yazıda, rat siyatik sinirinden schwann hücre kültürü hazırlanmasında basit, güvenilir ve yüksek oranda saflık oranı sağlayan bir metod tarif edilmiştir. Mekanik ve kimyasal disosiasyonla Schwann hücrelerinin izolasyonu esasına dayanan bu metotta Schwann hücreleri anti S-100 protein antikorları ile inkübe edilerek indirekt immüno Floresans yöntemi ile tanımlanmıştır. Sonuçta, rat siyatik sinirinden elde edilen Schwann hücre kültürünün saflık oranı % 95'in üstünde bulundu.

**Anahtar Kelime :** Schwann hücresi, doku kültürü, siyatik sinir

## SUMMARY

In this paper, a simple and relatively rapid method for preparation of Schwann cells with high purification ratio from rat sciatic nerve is explained. After removal of perineurium, nerves were divided into small fascicles, approximately, 150-200 Mm in diameter and explanted on collagen gel in order to reduce the number of contaminant fibroblasts. The last explants were fed with Dulbecco's modified Eagle medium. More than 105 Schwann cells (95% purification) were obtained.

**Key Words :** Schwann Cell, Tissue Culture, Sciatic Nerve

Schwann hücreleri konusunda son zamanlarda yapılan araştırmaların sayıca artmasının sebebi, bu hücrelerin periferik sinirlerin hem rejenerasyonunda hem de gelişmesi üzerindeki etkilerinin anlaşılmasına bağlanmaktadır(7,11). Schwann hücreleri üzerinde yapılan gerek "in-vivo" gerekse "in-vitro" çalışmalar, bu hücrelerin fonksiyonları ile periferik sinir sistemi içinde nöronal ve nonnöronal elemanlar ile olan etkileşimlerinin araştırılmasında çok yararlı olmaktadır(6). Bu güne kadar Schwann hücre kültürü hazırlanması için değişik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında başlıcaları; antimitotik uygulama (13) antimitotik uygulamanın antikor sitolizi ile kombine edilmesi (5), ayırıştırıcı adhezyon metodu (8), ve immünoselektif metodlardır (2,3). Bu yöntemlerle yüksek saflık oranlarına ulaşmak mümkün olmakla birlikte, metodların çoğunun karmaşık olması, pratik uygulamayı güçleştirmektedir.

Bu yazıda, % 95 gibi yüksek bir saflık oranına ulaşılabilen, hızlı ve uygulanması kolay olan bir yöntem anlatılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

Bu metod, Londra, University College, The Rayne Institute'de "freeze-killed otojenik sinir grefti ile sinir onarımlarında Schwann hücrelerinin rolü" adlı araştırmanın pilot çalışma aşamasında kullanılmıştır.

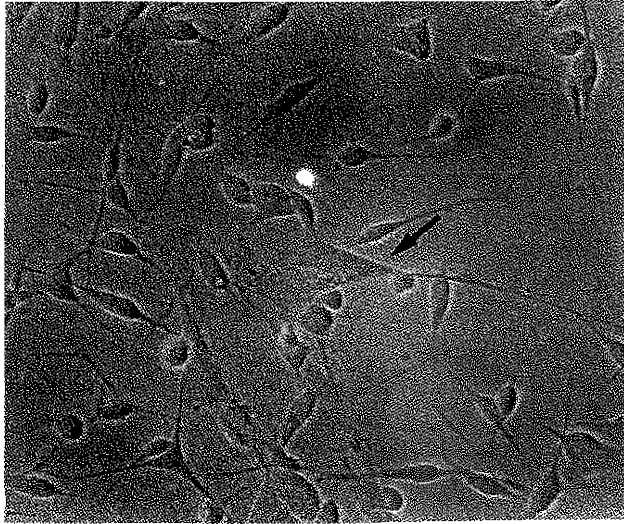
Lewis ratları dekapitasyon ile sakrifiye edildikten sonra siyatik sinirin 5 cm uzunlukta segmenti aseptik şartlarda çıkarılarak Dulbecco'nun fosfat tamponlu, kal-

siyum ve magnezyum içermeyen, antibiyotik eklenmiş (100 U/ml penisillin, 100 mg/ml streptomisin, 0.25 mg/ml fungizon) salin solüsyonu içine konuldu (PBS, GIBGO Grand Island NY). Daha sonra diseksiyon mikroskopu altında, epinörium tabakası ve bağ dokusu artıkları hassas diseksiyonla uzaklaştırıldı. Sinir, mikromakasla yaklaşık 2 mm uzunlukta ve 150-200 Mm çapında parçalara ayrıldı. Sinir parçaları 35 mm lik kültür kaplarına alındı (Corning). Kültür kaplarına, içinde % 15 fetal sıgır serumu (FGS, GIBGO), 25 mM HEPES solüsyonu (GIBGO), 1.25 Ünite/ml Dispaz (Boehringer), % 0.05 kollajenaz (Worthington), % 0.01 hyaluronidaz (Sigma) bulunan 5 ml Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamı (DMEM) (Collaborative Research Incorp) eklendi. Suspansiyon, gece boyunca 37°C'de 95 karbondioksit ve % 95 hava karışımında, nemli ortamda inkübe edildi. Ekspant ertesi gün DMEM ve % 10'luk fetal sıgır serumu ile iki defa yıkanarak 1000 devir/dk hızda santrifüje edildi. Üstte kalan eski ortam atılarak hücre suspansiyonu, aynı şekilde hazırlanmış taze ortama aktarıldı. İkinci ortamın tek farkı, hücrelerin kap yüzeyine yapışmalarını kolaylaştıracak 20 mg/ml laminin (Collaborative Research Incorp) içermesiydi. Altı saatlik inkübasyondan sonra 100 mg/ml sıgır hipofiz ekstresi (BPE) içeren 2 ml DMEM eklendi. Kültür ortamı günde iki defa değiştirilerek inkübe edildi. Sonuçta elde edilen eksplantın hücreleri tripsinizasyon ile suspansiyon edildikten sonra poly-L-lysine ile kaplı cam lamel üzerine aktarıldı. Aktarımdan bir gün sonra hücreler 4°C'de 5 dakika süreyle % 95

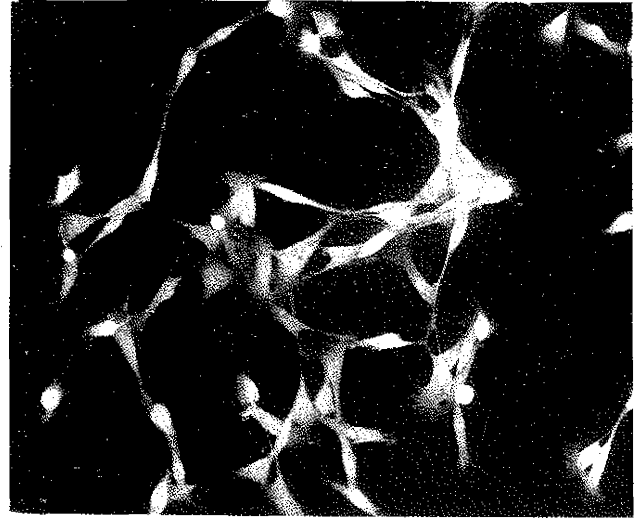
etanol ile tespit edildi. PBS solüsyonu ile yıkandıktan sonra, 12 saat 1:100 sulandırılmış tavşan anti S-100 protein antikoru (Funakoshi) ile inkübe edildi. Daha sonra da 4°C'de 12 saat floresein bağlanmış keçi anti-tavşan Ig G antikoru ile inkübe edildi. Elde edilen Schwan kültür spesmeni, Olympus flourescein mikroskobu altında incelendi. S-100 protein pozitif hücrelerin yüzdesini saptamak için mümkün olduğunca fazla hücre sayıldı.

## SONUÇ

Uyguladığımız yöntemde, ilk günlerde iki türlü hücre ile karşılaşıldı. Bunlardan birincisi, yassı ve poligonal görünümle, ovoid nükleuslu fibroblast benzeri hücreler, ikincisi ise daha küçük ve bipolar yapıda olan Schwan hücreleri idi (Şekil 1). Primer kültürde, fibroblast benzeri hücreler kollajen jel üzerinde hızla çoğalmakta ve genellikle periferde bulunuyorlardı. Bipolar yapıda olan Schwan hücreleri ise, daha çok merkeze yakın yerleşimde çoğalmaktaydılar. Ancak ileri devrelerdeki reeksplantlarda fibroblast benzeri hücrelerin kollajen jele yapışmaları nedeniyle ilk kaplarda kalarak büyük ölçüde elimine oldular. İleri devrelerdeki reeksplantlarda bipolar hücrelerin sayısal üstünlüğü vardı. Dördüncü reeksplanttan sonra ise hücrelerin hemen hemen tamamını bipolar veya tripolar Schwan hücreleri oluşturmaktaydı. Anti S-100 protein antiserum kullanılarak yapılan flourescein boyama ile bu hücrelerin Schwan hücreleri olduğu saptandı (Şekil 2). Uygulanan metodla bir rattan ortalama 105 sayıda hücre çoğaltıldı. Elde edilen kültürün saflık oranı ise % 95'in üzerinde idi.



Şekil 1 : Prolifere olan yassı-poligonal (fibroblast benzeri) ve daha küçük bipolar (Schwann) hücrelerinin faz-kontrast mikroskopik görünümü. Ok, kontaminant olmuş fibroblastı göstermektedir, 10x20



Şekil 2 : Anti S-100 protein antiserumu ile boyamada bipolar hücrelerin immunoflorescein mikroskopide görünümü, 10x20

## TARTIŞMA

Uyguladığımız metodda, Schwan hücrelerini karakteristik morfolojileri (küçük, bipolar hücreler), kültür ortamında zincirler oluşturma eğilimleri ve kuvvetli S-100 protein boyanma özellikleri ile ayırdık (5). S-100, Schwan hücreleri için güvenilir bir marker iken, fibroblast ve perinöral hücreler için değildir (9). İki hafta gibi kısa bir sürede sonuç alınabilen ve yüksek bir saflık oranına ulaşılabilen bu yöntem, diğer "invitro" yöntemlerle birlikte kullanılabilir. Elde edilen kültür spesmenindeki fibroblast sayısını azaltmak için dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, perinörium diseksiyonunun çok iyi yapılmasıdır(12). Diğer önemli konu ise kültür ortamı içinde bulunan TIP I kollajen ve peptidlerin, ilk günlerde Schwan hücrelerinden daha hızlı çoğalan fibroblastları kemotaksik özellikleri ile çekmeleri ve reeksplantasyon için yapılan aktarımlar sırasında bir sonraki kültür ortamına geçmelerini engellemeleridir (4, 10,13). Reeksplantasyonlar sırasında önemli sayıda Schwan hücresi kaybı olmakla birlikte yaklaşık iki haftada yeterli sayıya ulaşılabilir. Bu metodda tripsin ve kollajenaz gibi proteolitik enzimler (3, 14, 15) veya sitozin ve arabinozid gibi antimitotik ajanlar (5, 9, 13) kullanılmadı. Çünkü bazı araştırmacılara göre bu ajanlar Schwan hücresi yapı ve fonksiyonlarını kötü yönde etkileyebilmektedir(1).

Biz, bu metodun güvenilir ve uygulanması kolay olduğuna inanıyor ve konvansiyonel kültür ekipmanı ile Schwan hücresi kullanarak "in-vitro" çalışma yapmak isteyenlere öneriyoruz.

Dr. Zeki CAN

A.Ü.T.F.

Plastik ve Rekonstr. Cerr. ABD.

06100 Cebeci, ANKARA

## KAYNAKLAR

1. Askanas, V., Engel, W.K., Dalakas, M.C. Lawrence, J.V., Carter, L.S. (1980) Human Schwann cells in tissue culture: histochemical and ultrastructural studies, *Arch. Neurol.*, 37: 329-337
2. Assouline, J.G., Bosch, E.P., Lim, R. (1983) Purification of rat Schwann cells from cultures of peripheral nerve; an immunoselective method using surfaces coated with anti-immunoglobulin antibodies, *Brain Res.*, 277: 389-392.
3. Assouline, J.G., Bosch, E.P., Lim, R., Kim, I.S., Jensen, R., Pantazis, N.J. (1987) Rat astrocytes and Schwann cells in culture synthesize nerve growth factor-like neurite-promoting factors, *Dev. Brain Res.*, 31: 103-108.
4. Blakemore, W.F., Grang, A.J. (1985) The use of cultured autologous Schwann cells to remyelinate areas of persistent demyelination in the central nervous system, *J. Neurol. Sci.* 70: 207-223.
5. Brockes, J.P. Fields, K.L, Raff, M.C. (1979) Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified population from cultures of peripheral nerve, *Brain Res.*, 165: 105-118.
6. Bunge, R.P. (1983) Recent observations on the control of Schwann cell functions, *Anat. Rec. Suppl.*, 1:3-25.
7. Keynes, R.J. (1987) Schwann cells during neural development and regeneration: leaders or followers?, *Trends Neurosci.*, 10:137-139.
8. Kreider, B.Q., Messing, A., Doan, H., Kim, S.U., Lisak, R.P., Pleasure, D.e. (1981) Enrichment of Schwann cell cultures from neonatal rat sciatic nerve by differential adhesion, *Brain Res.*, 207:433-444.
9. Nakajima, T., Kameya, T., Watanebe, S., Hirota, T., Sato, Y., Shimosato, Y. (1982) an immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissues, *Am. J. Surg. Pathol.*, 6:715-727.
10. Postlethwaite, A.E., Seyer, J.M., Kang, A.H. (1978) Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II and III collagens and collagen-derived peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:871-875.
11. Selzer, M.E.(1987) Nerve regeneration. *Sem. Neurol.*, 7:88-96.
12. Webster, H. (1971) The geometry of peripheral myelin sheaths during their formation and growth in rat sciatic nerves, *J.Cell Biol.*, 48:348-367.
13. Wood, P.M. (1976) Separation of functional Schwann cells and neurons from normal peripheral nerve tissue, *Brain Res.*, 115:361-375.
14. Wrathall, J.R., Rigamonti, D.D., Kao, C.C. (1981a) Non-neuronal cell cultures from dorsal root ganglia of the adult cat; production of Schwann-like cell lines, *Brain Res.*, 229:163-181.
15. Wrathall, J.R., Rigamonti, D.D., Kao, C.C. (1981b) Cultures enriched in Schwann-like cells from dissociated nerve segment of the adult cat, *Brain Res.*, 224:218-223.