

- Doku kültürü teknikleri günümüz de en çok kullanılan tekniklerden biridir.
- Moleküler biyolojinin yeni kurulan alanlarında çalışan biyoteknologlar, moleküler biyologlar ve biyologlar kendi alanlarında ki deneysel araştırmalarında teknik olarak kullanmaktadırlar.

- Biyomedikal araştırmaların birçok alanlarında hayvan deneylerinin yerini tutacak olan doku kültürü metotları geliştirilmiştir.
- Örneęin ilaç aktivitelerinin araştırılması ve terapinin yeni şeklinin tasarlanması için in vitro **farmakotoksikoloji** diye bir disiplin oluşmuştur.

- Son seneler de doku kültürü alanında ki değişmeler doku kültürünün geleceğini de göstermektedir.
- İn vivo da dokular için de meydana gelen ve birçok hastalıklarının ilerlemesine katkıda bulunan veya sebep olan hücresel bozukluklar, kültür şişelerinde yapılan çalışmalar ile bu **hücresel olaylar aydınlatılmaya** çalışılmaktadır.

➤ Biyomedikal alanda da, çeşitli **transplantasyonları** **içeren klinik tedavilere** doku kültürü teknolojisi katkı da bulunmaktadır.

➤ **Kültürleri yapılmış deri hücreleri;** aşı olarak veya deri ülserlerinde ve yanıklar da yaraların üstünü örtmekte kullanılmaktadır.

- Genetik mühendisliği dalında DNA sequenslerini; transplante ettikleri hücreler ile, gelecekte diyabetik hastaların bozukluklarının düzeltilmesinde, kistik fibrosis veya hemofili hastalar da, parkinson hastalarında kullanılabilir.
- Ayrıca belli nadir enzimlerin noksanlığından dolayı ortaya çıkan sendromlarda da kullanılabilir.
- Geleneksel ilaç terapisine nazaran daha çok implante edilmiş hücreler yolu ile bozukluğun düzeltilmesi tercih edildiğinde pek çok olasılıklar vardır.

- Biyoteknoloji dalı hızla gelişen ve bu dala ilişkili olarak doku kültüründe de yeni metodlar ortaya çıkmıştır.
- Hayvan doku kültüründen oldukça farklı olarak aynı zaman periyodu içinde bitki doku kültürü tekniği de gelişmiştir. Bu iki konu arasında da bilgi alışverişi yapılmıştır.

DOKU KÜLTÜRÜ LABORATUVARI

LABORATUVAR DÜZENİ

- Doku kültürü laboratuvarları, biyomedikal araştırma laboratuvarı olarak kullanılan laboratuvarların genel amaçlarından farklıdır.
- Bu laboratuvarlar da kültürleri yapılan **hücrelerin sterilitesi** en önemli husustur.
- Pratikte çevrede ki total bakterileri yok etmek mümkün değildir, o nedenle mikroorganizma kontaminasyonundan kültürleri ve kültür medyumlarını koruyabilmemiz için garanti altına almamız gerekir.
- Aksi taktir de **mikroorganizmalar** hücre kültür ortamında hızla çoğalacak ve **hücrelerin medyumlarını tüketerek veya toksinlerini salarak hücrelerin ölümlerine** sebep olacaktır.

➤ Bütün modern laboratuvarların çoğunda hücre kültürlerinin steril şartlarda yapıldığı **Laminar Flow** denilen kabinler vardır. Bu kabinin içi **steril çalışma alanıdır.**

➤ Laboratuvarın diğer bütünü de temiz olarak muhafaza edilmelidir. Ve yüzeyler belirli aralıklarla **temizleyici antiseptik solüsyonlar** ile temizlenmelidir.

- Bütün doku kültür laboratuvarlarının diğer aktiviteleri de içine alan kısımlarının olması gerekir.
- Bu laboratuvar tek bir oda için de olabilir veya bir **hazırlık odası bir de çalışma odası** şeklinde olabilir.
- Laboratuvarda çalışan sayısına bağlı olarak iyi düzenlenmiş tek bir oda olarak da kullanılabilir.
- Bu şekilde ki oda minimum şartlar içindir.

- İdeal bir doku kültürü laboratuvarı birbirine geçebilen **iki odadan** oluşmalıdır.
- Her iki halde de laboratuvarın çok fazla **hareket, toz, hava akımı içermeyen, hayvan yetiştirme, mikrobiyoloji ve virüs laboratuvarlarından** ayrı bir koridor sonunda olması tavsiye edilmektedir.
- Bu laboratuvarda pencere bulunabilir, ancak pencerelerin açılması, hava akımı, toz ve kir giremeyecek şekilde olması gerekir.

- Ayrıca fazla **ışık ve sıcaklık geçirmeyecek** şekilde örtülmesi yararlıdır.
- Laboratuvar kolay temizlenen **bir tezgah**, aşırı sıcak ve soğuğa karşı **soğutucu ve ısıtıcı** bir sistem ile laboratuvar ortamını steril edebilmek için **ultraviyole lamba** sistemi içermelidir.

Tek odadan oluşan bir laboratuvar da bulunması gereken araçlar ve gereçler şunlardır

- Laminar Flow
- İnkübatör (37 oC lik)
- Santrifüj
- Terazî
- Sterilizatörler
- Otoklav
- Kurutma Etüvü
- Su Banyosu
- Mağnetik Karıştırıcı
- Saf ve deionize su cihazı
- Mikroskop
- CO₂ tüpü

Bunlar laboratuvarlar da rahat ve düzenli çalışmayı sağlayacak şekilde yerleştirilmelidir.

- ✓ Eğer laboratuvar 2 odadan oluşuyorsa bunlardan birini **hazırlık odası**, diğerini de **steril çalışma odası** olarak ayırmak gerekir.

HAZIRLIK ODASINDA

- ✓ Sterilizatörler
- ✓ Otoklav
- ✓ Kurutma Etüvü
- ✓ Saf ve deionize su cihazı, buzdolabı, derin dondurucu bulunmalıdır.
- ✓ Doku kültürü laboratuvarında eğer hücreler dondurularak saklanıyor ise **-70 oC lik derin dondurucu veya sıvı azot içinde saklama kapları** da bulunmalıdır.
- ✓ Bütün cam malzemelerin yıkanma işlemleri de bu oda da yapılmalıdır.

STERİL ÇALIŞMA ODASINDA

- Laminar Flow (Steril Çalışma Kabini)
- İnkübatör (37 oC lik)
- Santrifüj
- Dengeleme Terazisi
- Su Banyosu
- Mikroskop
- CO₂ tüpü
- Temiz ve steril kültür kaplarının ve cam eşyanın saklanacağı dolaplar bulunmalıdır.
- Ayrıca odayı steril etmek için **UV lambalarının** olması gerekir.

DOKU KÜLTÜRÜ LABORATUVARI ARAÇ VE GEREÇLERİ



LAMİNAR HAVA AKIŞLI KABİN (STERİL ÇALIŞMA KABİNİ)

- ✓ Çok önceleri doku kültüründe ki steril çalışma alanları, etrafı camla çevrili bir kabinden oluşurdu.
- ✓ Kabinin içerisinde bir UV lambası bulunurdu ve çalışmaya başlamadan önce ½-1 saat lamba yakılarak kabin steril edilirdi.
- ✓ Çalışma sırasında da %70 alkol ile kabinin içinde ki yüzeyler silinirdi.

- ✓ Hücre kültürü laboratuvarında genellikle **yatay ve dikey akışlı** olmak üzere **2 çeşit laminar hava akışlı kabin (Laminar Flow)** bulunur.
- ✓ Her iki çeşit laminar hava akışlı kabinde de havada ki partikülleri uzaklaştıran **HEPA (High Efficiency Particle) filtre** kullanılır.
- ✓ **Yatay hava akışlı kabinler** ortamı steril edip, vasatların, solüsyonların hazırlanması, filtre edilmesi işlemlerinde kullanılırken, **dikey hava akışlı kabinlerde** steril edilen havanın akışı çalışılan ortamın önünden aşağıya doğrudur ve **iç ortam ile dış ortamın karışmasını engellemektedir**. Tüm hücre kültür çalışmaları bu tip kabinlerde yapılmaktadır.

- ✓ Ortamda kısa dalga boylu **UV ışığı** da sterilizasyona katkı da bulunur.
- ✓ Çalışmaya başlamadan **önce ve çalışma bitiminde** daima **UV 10-20 dakika** çalıştırılmalıdır.
- ✓ Her kullanımdan sonra ortam **dezenfektan ve %70 lik etanol** ile temizlenir.
- ✓ Çalışma öncesi UV ile yüzey sterilizasyonunun arkasından kabin en az **15 dakika steril hava dolaşımını sağlamak amacıyla boş çalıştırılmalıdır.**

- ✓ Kabin ile yapılan çalışmalar da **UV ve HEPA** filtrelerin kullanım süresinin aşılmamasına dikkat edilmeli, gerekli kontroller yapılmalıdır.
- ✓ Ayrıca haftada bir genel kabin temizliği yapılmalıdır.

- ✓ Son yıllarda ise doku kültürü laboratuvarlarının çoğunda steril çalışma alanı olarak **Laminar Flow** kullanılmaktadır.
- ✓ Bu odanın içi **tamamen steril edilmiş hava** ile doludur.
- ✓ Bu oda steril olmayan bir havayı dışarı atmak için devamlı **pozitif basınç** sağlar.
- ✓ Laminar flow, havada bulunan **bakteri ve mantar partiküllerini filtresi ile tutarak havayı steril eder.**
- ✓ Steril edilen havayı da çalışma ortamına **dikey veya yatay** olarak üfler ve **steril olmayan havanın kabin içerisine girmesini önler.**



İNKÜBATÖR (37 °C lik ETÜV)

- Kùltùrleri yapılmış hücreleri, kullanılan canlının vùcut sıcaklığında en iyi şartlarda laboratuvarda **yetiştirilmesini ve muhafaza edilmesini** sağlayabilen özel yapılmış etüvlerdir.
- Laboratuvarlar da kullanılan inkübatörler; **ısı, gaz düzeyi ve nemlilik** gibi 3 temel faktörü kontrol eder.

➤ Bu cihazlara yerleştirilen kültür kapları çevre ve insan sağlığına zararlı patojen mikroorganizmaları, hücreleri içerebileceğinden herhangi bir bulaşma, dökülme vb. den şüphelenildiğinde cihaz derhal boşaltılarak uygun bir dezenfektan ile silinmelidir.

- Memeli hücrelerinin çoğunun büyümesi **için 37 °C** **lik** sıcaklık gereklidir.
- Bunun yarım derece altına düşerse bu tölare edilebilir. Fakat **39 °C olursa hücreler hızlı bir şekilde ölürlər.**
- Kuşların vücut sıcaklıkları yüksek olduğu için bunların hücreleri ile çalışıldığı zaman inkübatörün derecesi yüksek sıcaklığa ayarlanır.

- Hücre kültürünün çalışmalarının çoğunda hücrelerin **CO₂ içeren bir atmosferde inkübe edilmesi** gerekir.
- Etüvün içindeki CO₂ karışımı ayarlanır ve bu bir tüpten manometre yardımı ile etüve verilir.
- CO₂ li inkübatör; hücreler çoğunlukla **%5-10 CO₂ li** ortam da çoğaldığından önemlidir.
- Ortamın **CO₂ içeriği**, kültür kabında ki ortamın **NaHCO₃ /H₂CO₃** dengesinde önemli rol oynar.
- Böylece kültür medyumlarının **pH ları (7.2-7.4) CO₂ veya medyuma bikarbonat buffer ilave edilmesi** ile ayarlanır.
- BU etüvlere sürekli **eşit miktarda CO₂ verildiği için pH da değişme olmaz.**
- Bu nedenle kültüre alınan **kültür kaplarının kapakları gaz giriş çıkışlarına uygun** olmalı, yada **gevşek** olarak kapatılmalıdır.



- İnkübatörün kapısı uzun süre **açık tutulmamalı, sıcaklık düşüşü, ortam gaz dengesinin bozulma, kontaminasyon riski** unutulmamalıdır.
- İnkübatör de ki nem de inkübatörün alt kısmına konulan **içi su dolu tepsi** ile sağlanır.
- İnkübatörün çoğun da fan vardır. Böylece nemli hava etüvün her tarafına dağılmaktadır.
- Tepside ki suyun mikroorganizma içermesini önlemek için **Thimersol** gibi uçucu olmayan sitostatik ajanlar kullanılır.
- Ama yine de nemli inkübatörler **de mantar üreme** riski vardır.
- Cihazların elektrikle çalıştığı unutulmamalı, gerekli önlemler dikkate alınmalı ve uyulmalıdır.

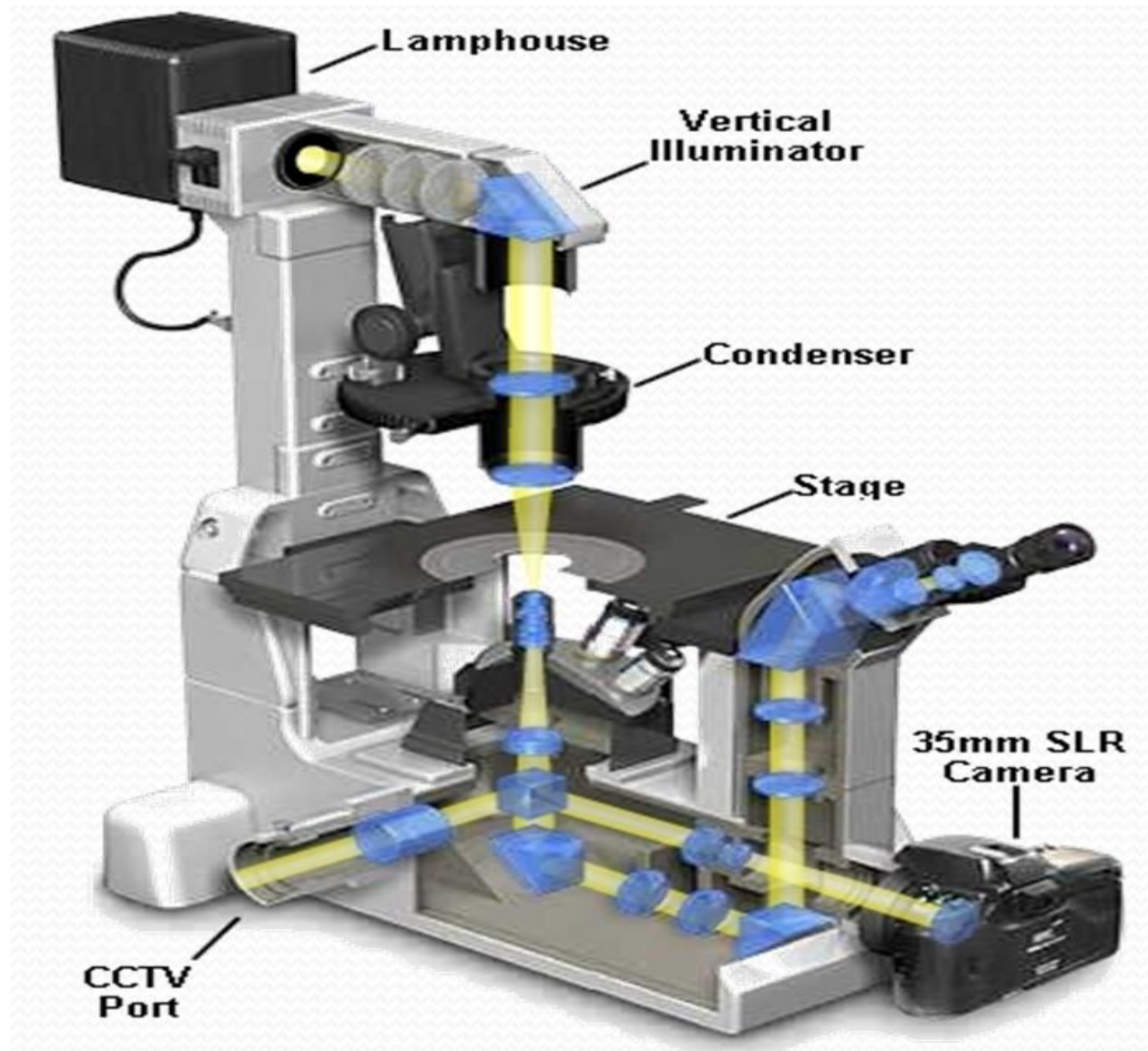
- Etüv suyu haftada bir değiştirilmeli, 3 ayda bir genel bakım yapılmalıdır.
- CO₂ li etüvde sıcaklık ve CO₂ tüpünün bitmesi durumunda **tüm flaskların kapakları sıkıca kapatılmalı** ve yeni tüp hızlı bir şekilde takılmalıdır.
- Etüv kapısı açılmadığı taktirde tüpün bitiminden itibaren **var olan hava kültürleri 24 saat koruyacaktır.**



MİKROSKOP

- ✓ Doku kültürü laboratuvarının temel araçlarından biri, iyi kaliteli bir inverted faz kontrast mikroskoptur.
- ✓ Inverted faz kontrast mikroskobu; hücre kültürü çalışmalarında **kültür devam ederken, hücrelerin büyümesi, morfolojik özellikleri, yayılma derecesi, granülleşme, zarlarda şişme, çok nukleuslu olma durumu, vakuolleşme** incelemelerinde kullanılır.
- ✓ Hücrenin morfolojisi, kültür şartlarının değişmesine karşı çok hassastır.
- ✓ Faz Kontrast mikroskobu ile kültürdeki kontaminasyon belirtisi hemen tayin edilebilir.
- ✓ Fotoğraf çekebilme özelliği olan faz kontrast mikroskobu önemlidir.

- Işık mikroskobu (floresan ataşmanlı) kültür sonrası testler, (canlılık, sitogenetik, FISH vb.) için gereklidir.
- Mikroskop seçiminde önemli bir nokta uzun çalışma aralıklı kondansöre sahip olmasıdır. Bu sayede flasklar incelenebilecektir.
- Mikroskobu kullanırken çalışma sonrası mikroskop lambasının kapalı olduğuna dikkat edilmelidir.
- Zira bu lambanın belli bir kullanım ömrü vardır.
- Mikroskop lensleri kirletilmemeli, tozdan korunmalıdır.





SANTRİFÜJ

- ✓ Doku kültürü laboratuvarlarında ki santrifüj, **alt kültürlerin hazırlanması, hücrelerin konsantre edilmesinde, dondurma işlemi, hücrelerden besi ortamı, tripsin gibi enzimler, DMSO vb. uzaklaştırılmasında, analiz** vs gibi çalışmalarda süspansiyon haline getirilen hücrelerin belirli bir hızla çökmesi için kullanılır.
- ✓ Bu işlemler için santrifüj **80-100 g de veya 1000-3000 devir/dakika da** çalışmalıdır.
- ✓ Hücrelerin özellikle uzun süre santrifigasyonuna bağlı olarak oluşan ısıdan etkilenmesi nedeniyle soğutmalı olması tercih edilmektedir.

- ✓ Santrifüj kullanılırken; tüpler, mikropipetler simetrik olarak yerleştirilmeli hacim/ağırlığın eşit, dengede olmasına dikkat edilmelidir.
- ✓ Ayrıca santrifüjün kullanım öncesi ve sonrasında temiz olduğu kontrol edilmelidir.
- ✓ Düşük sıcaklıklarda ki santrifüjleme sonrası cihaz içerisinde soğutmaya bağlı oluşacak sıvı giderilmeden cihaz kapatılmamalıdır.



BUZDOLABI VE DERİN DONDURUCULAR

- Doku kültürü laboratuvarında buzdolabı bulunması şarttır.
- Çünkü kullanılan **toz veya solüsyon halinde ki bütün medyumlar, çeşitli çözeltiler ve diğer kimyasal maddeler** buzdolabında saklanır.
- Besiyerleri ve bazı kimyasallar vb muhafazasında **+4 ° C** buzdolabı kullanılmaktadır.
- Derin donduru **-20 ° C lik ve -85° C lik derin dondurucular** olmalıdır.
- **Serumlar ve kollegenaz** gibi enzimler -20 ° C de saklanır.
- **Dondurulmuş hücre stokları** ise -85 ° C de saklanır.

- ✓ -85 ° C derin dondurucular aynı zamanda dondurma işlemi sırasında **ara kademe olarak ve bazı kitlerin muhafazasında** da kullanılmaktadır.
- ✓ Bu ısılarda saklanan materyalin eldivenle tutulması, doğrudan cihazın iç duvarlarına temas edilmemesi olası soğuk yanıklarından korunmada alınacak önlemlerin başında gelir.
- ✓ Ayrıca bu cihazlar ısı dengeleri bozulacak şekilde uzun süre açık tutulmamalı, belli aralıklarla da çözündürülüp temizliği yapılmalıdır.
- ✓ Buz oluşturmayan buzdolabı ve derin dondurucular tercih edilmektedir.
- ✓ Ayrıca laboratuvarımızın aletlerinin bağlı olduğu ve elektrik kesilmesi anında devreye giren bir jeneratöründe bulunması şarttır.



SU BANYOSU

- ✓ Elektrik ile çalışan, suyu ısıtarak istenilen dereceye ayarlayan bir cihazdır.
- ✓ Kullanılan su distile su olmalı ve belli aralıklarla değiştirilmelidir ki, kontaminasyon kaynağı haline gelmesin.
- ✓ Doku kültüründe kullanılan **medyum ve çözeltilerin 37 ° C** de ısıtılması için kullanılır.
- ✓ Su banyosu içindeki suda bakteri çoğalmasını önlemek için düzenli olarak içine **Thimersol** gibi sitostatik ilave edilir.
- ✓ Bazı araştırmacılar kontaminasyondan dolayı su banyosunu tercih etmezler.
- ✓ Kullanılacak medyum ve çözeltileri küçük kuru etüvlerde ısıtırlar.



SIVI AZOT TANKLARI

- Ortamın havasını azot kaçağına bağlı olarak olumsuz etkileyebileceğinden mutlaka laboratuvar dışında iyi havalandırılan bölümlerde bulundurulmalıdır.
- Sıvı azotla çalışırken olası kazalardan biride **soğuk yanığıdır.**
- **Nitrojen özellikle sıçrayabilir, gözlere ve vücuda da ciddi zararlar verebilir.**
- Çalışırken **-200 ° C soğuğa dayanıklı özel eldiven, gözlük veya yüz koruyucu kasklar** kullanılmalıdır.
- Sıvı azot yada donmuş objelere kesinlikle **çıplak elle** dokunulmamalıdır.

- ✓ Tankların azot seviyesi **5-10 günde** bir kontrol edilerek **buharlaşan azotun takviyesi** yapılmalıdır.
- ✓ Tankların ağızları sıkı sıkıya kapatılmayıp bir miktar **gaz kaçağı yeri bulundurulmalıdır.**
- ✓ Bu tankların üretiminde fabrika çıkışında kapakları yeterli miktarda gaz kaçağına izin verecek şekilde düzenlenmiştir.



FİLTRASYON APARATLARI

- ✓ Solüsyon halinde olan sıvıların steril edilmesi için **bakteriyolojik filtre** bulunmalıdır.
- ✓ Bakteriyolojik filtre **hüni, üst kısım ve alt kısım** olmak üzere üç parçadan oluşmuştur.
- ✓ **Üst ve alt kısım arasına asbest veya membran filtre** yerleştirilir.
- ✓ Bu filterinin üzerinde ki gözenekler **bakteri büyüklüğünden küçüktür.**
- ✓ Filtrenin tamamı otoklavda steril edildikten sonra bir **vakum pompasına** bağlanır.
- ✓ Hunisine de steril edilmesi istenilen çözelti koyularak süzülür ve böylece steril edilmiş olur.

- ✓ Küçük hacimli çözeltileri veya sıvıların sterilizasyonu için **milipore filtre** kullanılır.
- ✓ Bu filtreler **disposable ve steril** olarak satılır.
- ✓ Enjektörün ucuna takılacak şekilde yapılmıştır.
- ✓ Filtrenin porları **0.2 μm - 0.1 μm** kadardır.
- ✓ Mikroorganizmaları tuttuğu gibi mikoplazmaları da tutar.
- ✓ Sıvıların sterilizasyonu için **0.2 μm** por yeterlidir.

- ✓ Filtreler nem almayacak uygun yerlerde muhafaza edilmelidir.
- ✓ Filtre aparatları kullanım sonrası ultra pure suyla mutlaka temizlenerek bırakılmalıdır.
- ✓ Filtre tipini ve özelliklerini belirlerken filtre edilecek sıvının yapısına ve amaca göre doğru tercihin yapılmasına dikkat edilmelidir.



- Doku kültüründe kullanılan medyum ve diğer çözeltilerin hazırlanmasında pH metre, magnetik karıştırıcı ya ihtiyaç vardır.
- Terazı miligram ve mikrogram eviyesinde olmalıdır.



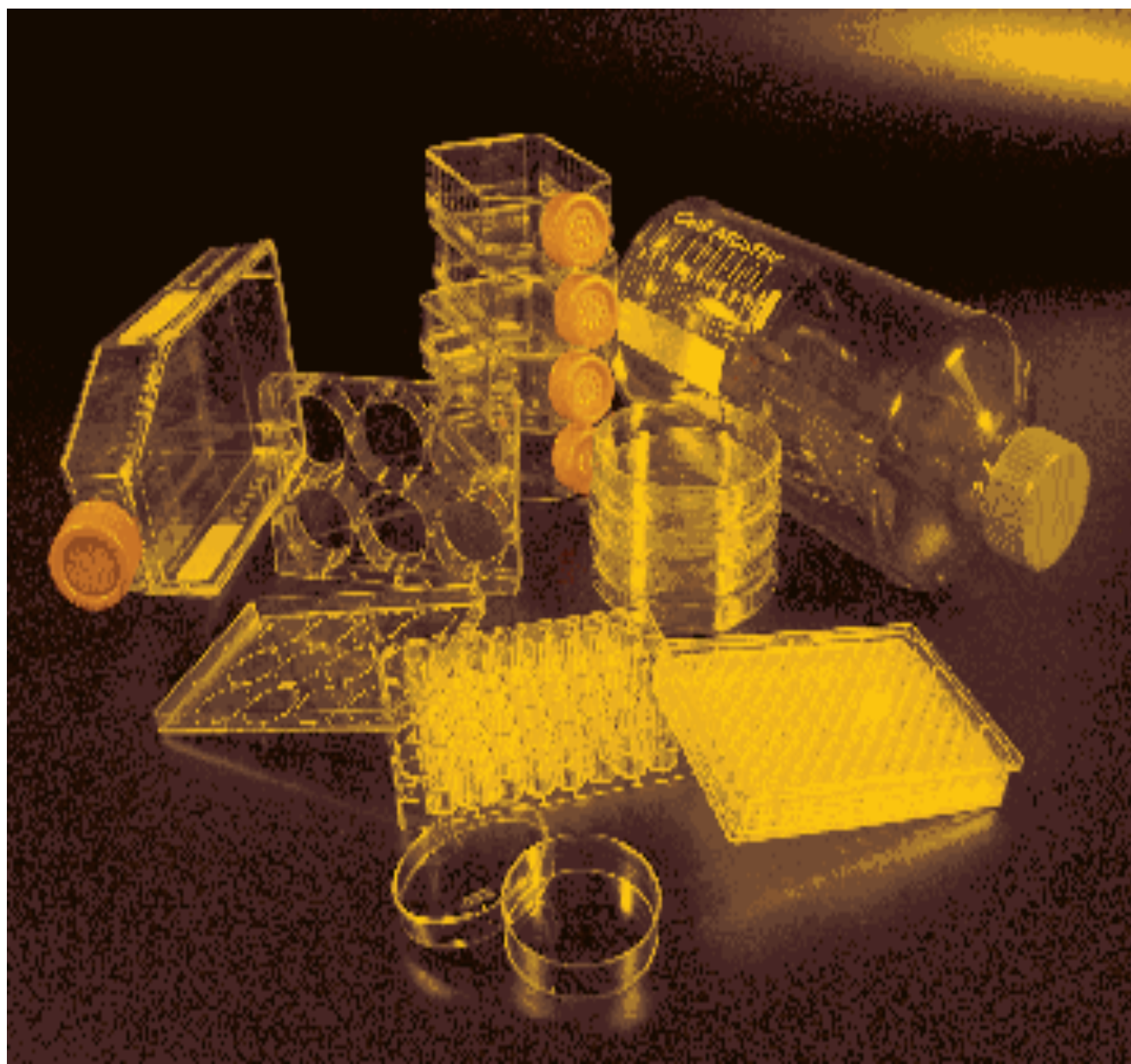
- ✓ Doku kültürü laboratuvarında sürekli kullanılan **cam, plastik ve metal malzemeler** de vardır.
- ✓ Bunlar çeşitli tipte **cam ve plastik (polystyrene) kültür şişeleri, çeşitli hacimler de beher, erlen mayer, tüpler, santrifüj tüpleri, ölçü kapları, pipetler, petri kutuları, huniler, toksik olmayan silikon tıplar, lam ve lamel, paslanmaz malzemedan yapılmış pens, makas, bisturi, magnetik çubuk** gibi malzemelerdir.
- ✓ Hücrelerin tutunmaları ve büyümeleri için fiziksel bir yüzeye ihtiyaçları vardır.
- ✓ Bunlar **cam ve plastik** gibi yüzeylerdir.

CAM YÜZEYLER

- ✓ Çok önceleri araştırmacılar hücreleri cam yüzeyler üzerinde, camdan yapılmış kültür şişelerinde yetiştirirlerdi.
- ✓ Özellikle cam yüksek oranda **borosilikat** içerdiğinden gerçekten de hücreler cam yüzeye iyi yapışırlar.
- ✓ Doku kültürünün yakın tarihçesinde araştırmacılar cam kültür şişelerini invert mikroskoplara koyarak canlı hücrelerin gelişmesini inceleyip, analizlerini yapabilmektedir.
- ✓ Cam lamel veya lamalar da ışık mikroskobunda en iyi görüntüyü vermektedirler.
- ✓ Deneyler de petri içine yerleştirilmiş lamellere hücreler, ekilerek de kullanılır.

PLASTİK YÜZEYLER

- 1960 lı yılların sonlarına doğru hücrelerin iyi yapışmasını sağlayan **plastik yüzeyler** geliştirildi.
- Hücre kültürleri için en çok kullanılan plastikler **polystyrene** dir.
- Polystyrene oldukça hidrofobiktir.
- Bazı hücre tipleri bu plastik yüzeylere yapışmayabilirler.



Plastik yüzeyler de kullanılan malzemenin ana maddeleri şunlardır:

- Kültür şişeleri, **polyster capolymer** 'den (PETG, Poly (ethylene) terephthalate glycol) yapılmışlardır. Bu madde polystyrene den daha kolay kesilir ve hücreler için de bazı avantajları vardır.
- Polystyrene organik çözücülere karşı çok hassastır.
- **Thermanox plastik** lameller, ksilene ve asetona dirençlidir.

PIPETLER

Doku kültürü laboratuvarında kullanılan üç farklı pipet vardır.

- ✓ Mikropipetler
- ✓ Pastör Pipetleri
- ✓ Volumetrik pipetler

- ✓ Mikropipetler çeşitli hacimlerde olabilirler. 1-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l gibi. Ayrıca uçları sivri olduğu için dar tüplere kolaylıkla girebilirler.
- ✓ Dikati kullanmak gerekir ve otoklavda steril edilebilir. Pastör pipetlerinin yuvarlak ve cam olanları vardır. Cam olanları yıkanıp, kuru sterilizasyon yapılır. Genellikle laboratuvarda bir kere kullanılan disposable pipetler tercih edilir.
- ✓ Volumetrik pipetler camdır. 1 ml den 25 ml ye kadar olanları vardır. En çok kullanılan 5 ml lik ve 10 ml lik pipetlerdir. Bu pipetler yıkanarak pipet taşıyıcısı denilen kapların içinde kuru sterilizasyon yapılarak tekrar kullanılır.



