



KÜLTÜR KAPLARI

BESİYERLERİ

SERUMSUZ ORTAM

KÜLTÜR KAPLARI



KÜLTÜR KAPLARI

Substrat Materyalleri: Normal hücre hatlarının büyük bölümünün kültür ortamında yaşaması ve çoğalması için **yüzeye tutunması** gerekir.

CAM: Cam; optik ve yüzey özelliklerinden dolayı tercih edilmekteydi. Ancak son yıllarda çoğu laboratuvar da **sentetik plastikler**, genellikle **polistiren** kullanılmaktadır.

- ✓ Ucuz,
- ✓ Kolay yıkanabilir,
- ✓ Kurutma veya ısı ile hızlıca sterilize edilebilir,
- ✓ Optik açıdan berraktır.

Kuvvetli bazlar kullanıldığında bu baz camı eritebilir ve bir asit ile yıkanmadığı takdirde kültürün kalitesinin düşük olmasına neden olur.

TEK KULLANIMLIK PLASTİK

Tek kullanımlık steril **polistiren** kaplar, kültür için basit, tekrar kullanılabilen substratlar sağlar.

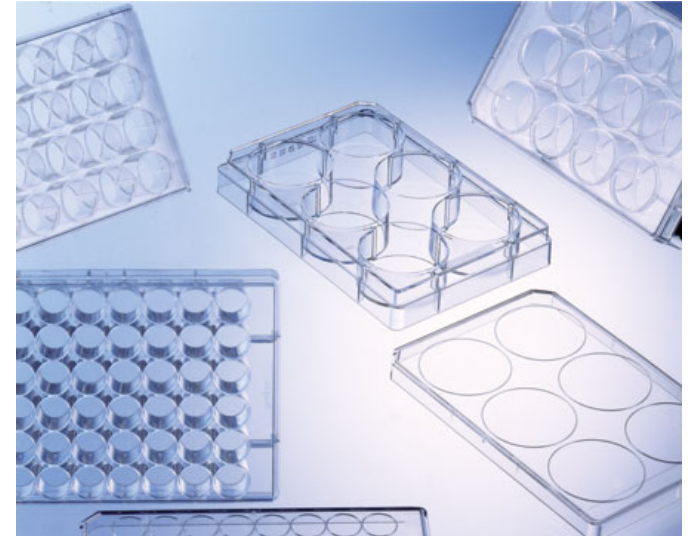
- ✓ Optik açıdan kaliteli malzemelerdir,
- ✓ Büyüme yüzeyleri düzdür, bu nedenle düzgün dağılmış ve tekrarlanabilir tek tabakalı kültürler elde edilmesini sağlamaktadırlar.
- ✓ Yapısal olarak, polistiren hidrofobiktir ve hücre bağlanması için uygun bir yüzeyi yoktur. Kimyasal işlemlerle yüzeyi hücre kültürüne uygun hale getirilir. Kullanılacak besiyerinin optimum koşullarda hazırlanması gerekir, çünkü yüksek konsantrasyonda hazırlanan besiyerleri plastikte hasarlar meydana getirir.
- ✓ Polistiren en ucuz ve en çok kullanılan materyal olmasına rağmen, hücreler **polivinilklorür (PVC), polikarbonat, politetrafloroetilen (Teflon), Melinex, Thermanox (TPX)** gibi plastik malzemelerden oluşan kültür kaplarında da çoğaltılmaktadır.

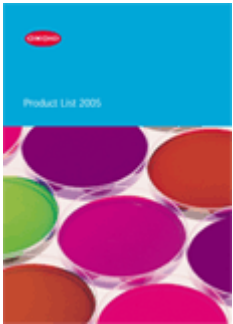
KÜLTÜR KAPLARININ SEÇİMİ

Kültür kabı seçiminde önemli hususlar şunlardır:



- ✓ Hücre konsantrasyonu
- ✓ Hücrenin süspansiyon ya da monolayer olarak büyütülmesi
- ✓ Kültürün açık veya kapalı olması
- ✓ Örneklem sıklığı
- ✓ İstenen analizin çeşidi
- ✓ Maliyet.

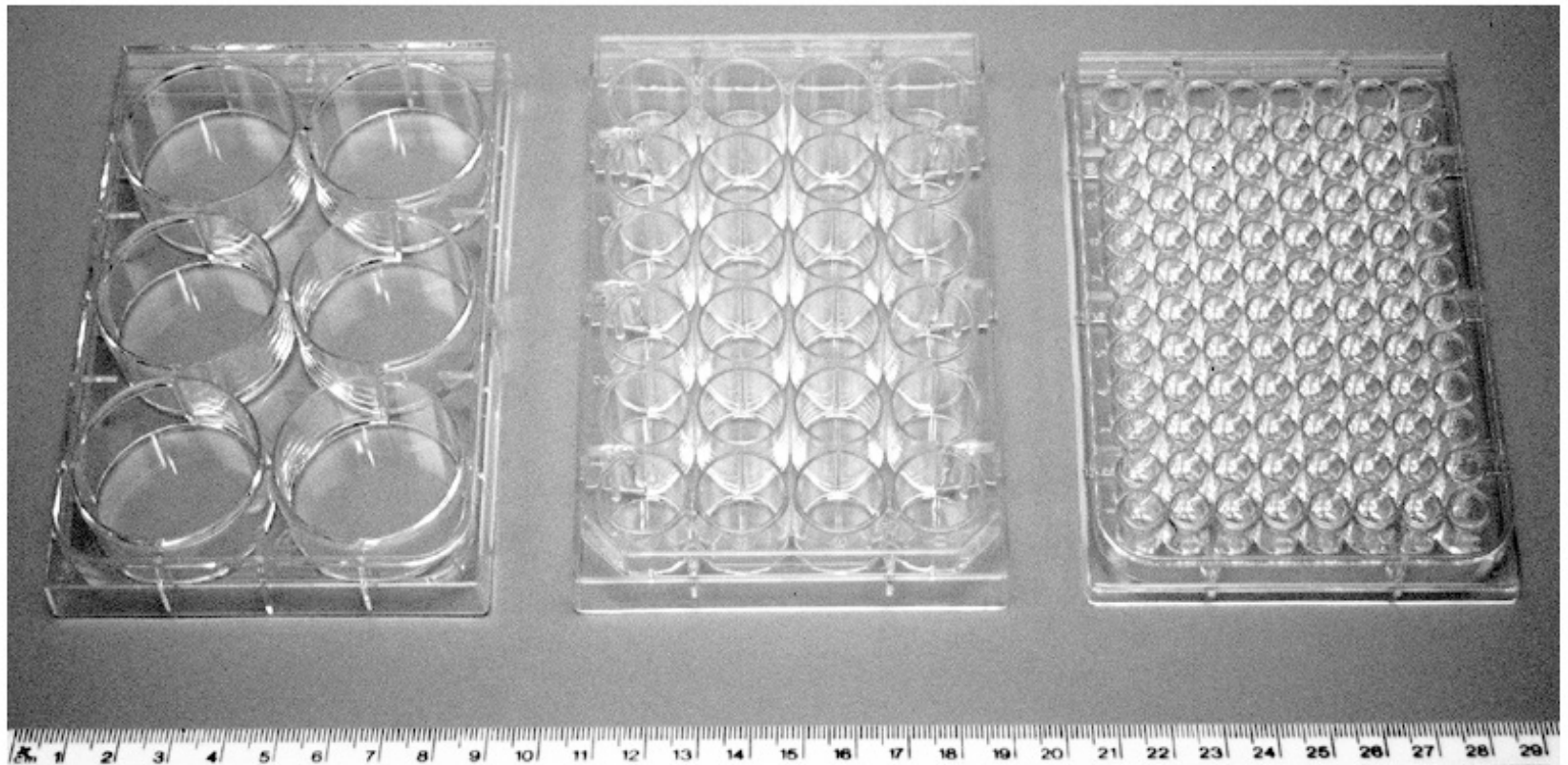




Petri Kapları



Plastik Flasklar



Multiwell Plates

TABLE 8.1. Culture Vessel Characteristics

Culture vessel	Replicates	mL	cm ² *	Approximate cell yield (HeLa)
Multiwell plates				
Microtitration	96	0.1	0.3	1×10^5
Microtitration	144	0.1	0.3	1×10^5
4-well plate	4	2	2	5×10^5
6-well plate	6	2	10	2×10^6
12-well plate	12	1	3	7.5×10^5
24-well plate	24	1	2	5×10^5
Petri dishes				
3.5-cm diameter	1	2	8	2×10^6
5-cm diameter	1	4	17.5	4×10^6
6-cm diameter	1	5	21	5×10^6
9-cm diameter	1	10	49	1×10^7
Flasks				
10 cm ² (T10)	1	2	10	2×10^6
25 cm ² (T25)	1	5	25	5×10^6
75 cm ² (T75)	1	25	75	2×10^7
175 cm ² (T175)	1	75	175	5×10^7
225 cm ² (T225)	1	100	225	6×10^7
Roller bottle	1	200	850	2.5×10^8
Stirrer bottles				
500 mL (unsparged)	1	50		5×10^7
5000 mL (sparged)	1	4000		4×10^9

*These figures are approximate; actual areas will vary by source.

BESİYERLERİ



KÜLTÜR MEDYUMLARI

- Kültürde yetişen hücre ve dokular için en önemli faktör medyumdur.
- In vitro da yetiştirilen hücre kültürünün şartlarının in vivo da ki şartlara uyması gerekir.
- Bu şartlar **sıcaklık, oksijen ve CO₂ konsantrasyonu, pH ve beslenmedir.**
- Pek çok hücre kültürü medyumu tek başına hücrelerin büyümesini destekleyemez.

KÜLTÜR MEDYUMLARI

- Medyumun içine **hayvan serumu** ilave edilir.
- Hücre medyumlarının esas fonksiyonu, hücrenin canlılığı için gerekli olan **enerji ve besini** sağlamaktır.
- Hücre kültürlerini **temperatürü, oksijen ve CO₂ miktarı** devamlı olarak kontrol edilmelidir.

KÜLTÜR MEDYUMLARI

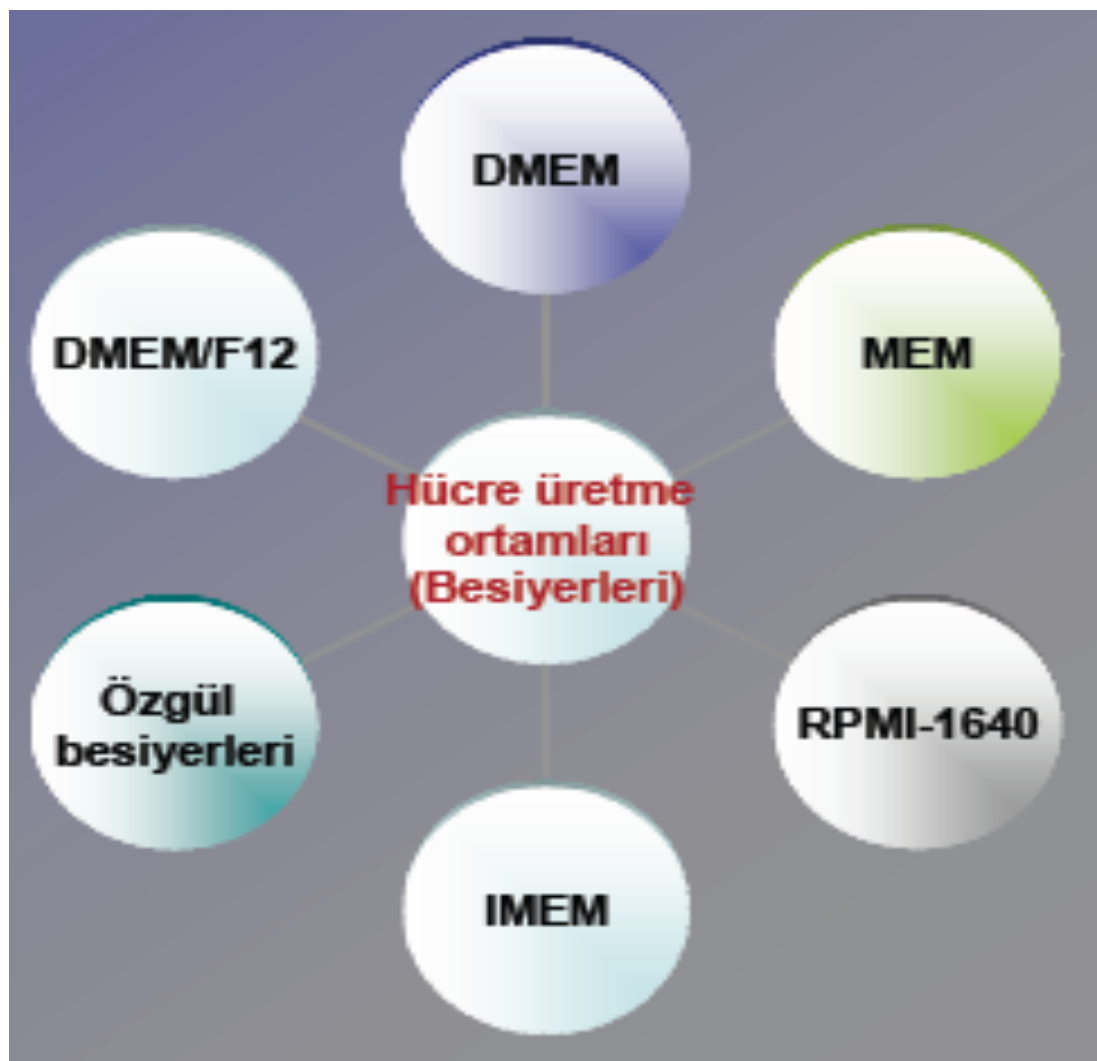
- Tam bir hücre kültürü medyumunu iki farklı kısmın bireşmesi olarak düşünülebilir.
- ✓ **Basal medyum:** Hücrelerin bütün besin gereksinimlerini karşılar.
- ✓ **Bileşikler:** Basal medyum içinde bulunurlar ve hücrelerin büyümesini ve diğer gereksinimlerini karşılarlar.

BASAL MEDYUM

- Kültür medyumunu, kültürü yapılan hücreler için çok önemli tek faktördür.
- Bu medyumun fonksiyonu, **hücrelerin canlılıklarını sürdürebilmek için gerekli olan maddeleri** sağlamaktır.
- Çok eskilerde doku kültürü medyumunu olarak **doğal maddeler, plasma, lenf, serum ve doku ekstraktı** kullanılırdı.
- Sonraları hücrelerin büyümesi için gerekli olan bütün maddeleri içeren, **sentetik basal doku kültürü medyumları** kullanılmaya başlandı.

BASAL MEDYUM

- Memeli hücreleri için 3 grupta toplanan basal medyum çeşidi vardır.
- 1. **Eagle medyum ve çeşitleri:** **BME** (Basal Medium Eagle), **EMEM** (Minumum Essential Medium with Earle's Salts), **AMEM** (Minumum Essential Medium with AlphaModificaton), **DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle Medium) vb.
- 2. **RPMI Medyum:** Bu medyumun da **RPMI 1629, RPMI 1630 ve RPMI 1640** gibi çeşitleri vardır.
- 3. **CMRL 1060, Ham's F10, TC 199, MCDB, NCTC** gibi medyumlar bulunmaktadır.



Çeşitli Besiyerleri

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

MEM : Minimum Essential Medium

IMEM : Ivecu's Modified Eagle's Medium



BASAL MEDYUMU OLUŞTURAN ELEMANLAR

İnvitro da yetiştirilen hücre kültürünün şartlarının invivodaki şartlara uyması gerekir.

Bu şartlar **sıcaklık, oksijen, CO₂ konsantrasyonu, pH ve beslenmedir.**

1. BALANCED SALT SOLUTION (BSS)

- BSS in vitro hücre kültürlerinde çok eski zamanlardan beri kullanılmaktadır.
- BSS fizyolojik **pH sı ve osmotik basıncı dengelenmiş inorganik tuzların bileşiminden** oluşmuştur.
- Buna ilaveten **hücrelerin yapışmasında ve enzim reaksiyonlarında kofaktör** olarak rol oynayan ve membran potansiyelinin devamında önemli fizyolojik rol oynayan **inorganik iyonlar** kullanılır.
- İnorganik iyonların başlıcaları **Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} Cl^{-1} , SO_4^{-2} ; PO_4^{-3} ve HCO_3^-** dir.

1. BALANCED SALT SOLUTION (BSS)

- Yalnız BSS uzun zaman hücrelerin besin ihtiyacını karşılayamaz, hücrelerin büyümesi için **glukoz** içermelidir.

4 tip BSS vardır.

- ✓ **Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)**
- ✓ **Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)**
- ✓ **Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)**
- ✓ **Eagle's Spinner Salt Solution (ESSS)**

2. TAMPON SİSTEMLERİ

pH:



- ✓ Hücrelerin büyük bir çoğunluğu **pH 7.0-7.4 te büyürler.**
- ✓ İndikatör olarak genellikle **Fenol kırmızısı** kullanılmaktadır.
- ✓ **pH 7.4 te kırmızı renk** gözlenmektedir ve **pH 7 de turuncuya, pH 6.5 te sarıya, pH 6.5 in altında limon sarısına, pH 7.6 da pembeye, ve pH 7.8 de mor renge** dönüşür.

2. TAMPON SİSTEMLERİ

Kültür besiyeri şu koşullarda tamponlanmalıdır:

- ✓ Kültür kabı açıksa ve ortamda CO_2 bulunuyorsa **pH yükselir.**
- ✓ pH azaldığında, yüksek hücre konsantrasyonlarında **laktik asit ve CO_2 hücrelerde fazla üretilir.**
- ✓ Kültür medyumların tamponlara da ihtiyaçları vardır.

Tampon **besiyerinin stabilize edilmesini** sağlar.

2. TAMPON SİSTEMLERİ

CO₂ ve Bikarbonat: Fizyolojik pH da bikarbonat tamponu zayıf tamponlama etkisi göstermektedir.

- ✓ Gaz fazındaki karbondioksit besiyerinde çözünerek **pH' ı düşürür.**
- ✓ Çözünmüş karbondioksit HCO₃⁻, ve pH birbiriyle ilişkilidir.
- Medyumlar için genellikle konsantrasyonu **24 mM olan bikarbonat tamponu** kullanılır.
- Bikarbonat hem ucuzdur, hem de hücreler için **toksik değildir.**

2. TAMPON SİSTEMLERİ

- ✓ Daha etkili tampon olarak, alt ve üst sınırları belli olan organik tamponlar kullanılabilir.
- ✓ Bunlardan çok yaygın olarak kullanılan **Hepes** (N-2hydroxyethylpiperazine-N-2ethanesulphonic acid)'dir.
- ✓ Hepes pH sınırını **7.2-7.6** arasında tutan etkili bir tampondur ve çabuk pH değişikliğine bikarbonattan daha çok dirençlidir ve **10-20 mM konsantrasyonlarında kullanılır.**
- ✓ Bazı medyumlar da hem bikarbonat hem Hepes kullanılır.
- ✓ Hepes hem pahalıdır, hem de **100 mM üzerindeki konsantrasyonları hücreler için toksiktir.**



3. ENERJİ KAYNAKLARI

- Karbonhidratlar kültür hücreleri için **enerji kaynağıdır.**
- Bunlardan en sık kullanılanı **glukozdur.**
- Diğerleri ise **maltoz, sukroz, fruktoz ve galaktoz** dur.
- **Glutamine** de bazı hücrelerin gerekli enerjilerinin bir kısmını karşılayabilir.

4. AMİNOASİTLER

- Hücre kültüründe başlı başına gereksinim duyulan amino asitlerin bir hücre türünden diğerine değişmesine rağmen, kültürde kullanılan esansiyel amino asitler (vücutta sentezlenmeyen) **sistein, arginin, glutamin ve tirozindir.**
- Hayvan hücrelerinin çoğunun kendi içinde sentezleyemedikleri aminoasitlerine ihtiyaçları vardır.
- İnsan da bunlar; **Arginine, Cystine, Histidine, İsoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Threonine, Tryptophan ve valine** dir.
- Yine pek çok hayvan hücrelerinin çok miktarda **Glutamine** ihtiyacı vardır.
- Glutamine hem bir **enerji kaynağı** olarak, hem de **nükleik asitlerin sentezinde karbon kaynağı** olarak hareket eder.

5. VİTAMİNLER

- **B grubu** vitaminlerinin pek çoğu **hücre büyümesi ve çoğalması** için gereklidir.
- Vitaminlerin çoğu basal medyuma **para amino benzoik asid, biotin, choline, folic acid, nicotinic acid, pantothenic acid, pyridoxal, riboflavin, thiamine ve inositol** olarak ilave edilir.
- Su da çözünen diğer vitaminlerin önemi daha azdır.
- B 12 vitamini, bazı hücreler için temeldir ve F12 medyumunda vardır.
- Medyumda yağda eriyen vitaminlerin rolü ile ilgili bilgi azdır.
- Medyum 199, **hem A vitamini, hem de E vitamini** içerir.

6. HORMONLAR VE BÜYÜME FAKTÖRLERİ

- Hormonların ve büyüme faktörlerinin hücre üzerine çeşitli etkilerinin olduğu gösterilmiştir.
- Bunlar bazı medyumlar da (genellikle serumsuz medyumlarda) nispeten düşük konsantrasyonlar da bulunur.
- **İnsülin ve Hidrokortison** esas örnekleridir.
- Fakat büyüme faktörleri olarak **NGF (Sinir Büyüme Faktörü), EGF (Epitel Büyüme Faktörü) ve FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü)** kullanılır.

7. PROTEİNLER VE PEPTİDLER

- ✓ Proteinlerin ve polipeptidlerin yokluğunda hücrelerin büyümesini hızlandıran birkaç formül belirlenmiştir.
- ✓ Kullanılan protein tamamlayıcıları, **fetuin, albumin, fibronectin, α -globulin ve transferindir.**

8. YAĞ ASİTLERİ VE LİPİDLER

- ✓ Proteinler ve peptidler gibi hücre kültüründe ki lipidlerin temel rolü hakkında bir görüş yoktur.
- ✓ Buna rağmen yağ asitleri ve lipidler serumsuz medyumların en önemli unsurlarıdır.

9. YARDIMCI FAKTÖRLER

- Bunlar arasında eser elementler özellikle **demir, çinko, bakır ve selenyum** gelmektedir.

10. ANTİBİYOTİKLER

- Antibiyotikler doku kültürü laboratuvarında rutin olarak kullanılmaktadır.
- Doku kültüründe kullanılan antibiyotikler medyum ve BSS içerisine karıştırılır.
- **Antibakteriyel** ajan olarak en çok **Penicilline (100 IU/ml) ve streptomycin (50 µg/ml)** kullanılmaktadır.
- Ayrıca **Gentamycin (50 µg/ml)** de kullanılır, biraz daha pahalıdır.
- **Mantarlara** karşı **Amphoterecin B (2.5 µg/ml)** kullanılır, fakat bazı böcek hücreleri için sitotoksiktir.
- **Nystatin (25 µg/ml)** doku kültürü medyumunda **mantarlara** karşı etkilidir.

10. ANTİBİYOTİKLER

Antibiyotikler kültür ortamının kontaminasyonunun tekrarını önlemek için kullanılmaktadırlar. Laminar-flow kullanımı ve aseptik tekniklerle antibiyotik kullanımına gerek kalmaz.

Gerçekten de, antibiyotik kullanımının önemli dezavantajları vardır:

- (1) Antibiyotiğe dirençli organizmaların gelişimini teşvik ederler.
- (2) Düşük düzeydeki gizli kontaminantları gizleyerek kültür koşullarını değiştirir.
- (3) Mikoplazma enfeksiyonlarını gizleyebilir.
- (4) Antimetabolik etkiye sahiptirler.
- (5) Aseptik tekniklerin etkilerini zayıflatırlar.

- ✓ Medyumlar, üretici firmalar tarafından **toz veya sıvı** halinde satılırlar.
- ✓ Toz karışımlar tarifinde belirtilen şekilde tartılarak saf veya deionize suda eritilip steril edildikten sonra kullanılırlar.
- ✓ Sıvı halde olanlar genellikle x10 konsantre olarak satılırlar. Kullanılırken saf veya deionize suyla sulandırılıp steril edildikten sonra kullanılırlar.
- ✓ Toz veya sıvı halindeki medyumlar son kullanma tarihine kadar **+4 °C** de buzdolabında saklanırlar.
- ✓ Kullanılacak medyum türü, hücre tipine uygun olmalıdır.
- ✓ Medyumun seçimi, hücrenin alındığı kaynağa bağlı olarak literatürden veya deneysel olarak farklı medyumlar test edilerek yapılır.

SERUM



NİÇİN SERUM KULLANILIR?

- İlk doku kültürü deneyleri sırasında hücrelerin büyümesini sağlayan **lenf** gibi hayvan vücut sıvısı kullanılmıştır.
- 1950 lerde EAGLE ve arkadaşları; mineraller, vitaminler, karbonhidratlar ve aminoasitler içeren basal medyumunu ürettikleri zaman vücut sıvısı da ilave ederek medyumlarını tamamlıyorlardı.

SERUM

- Serum, **hücre çoğalmasını, adezyon faktörlerini ve antitripsin aktivitesini arttıran büyüme faktörlerini** içerir.
- Serum aynı zamanda proteine bağlanan **mineraller, lipidler ve hormonların kaynağıdır**.
- Serum çoğunlukla doku kültüründe kullanılmaktadır.
- Oluşturulmuş hücre hatlarında yaygın olarak serum içeren medyum kullanılır.

SERUM

- Serum büyüme faktörleri bakımından zengindir.
- Serumda pıhtı oluşumu hücre çoğalmasını stimüle eder. Bu artış “platelet-derived growth factor (PDGF)” nin salınımına bağlıdır. **PDGF**, mitojenik aktivitesi olan polipeptidlerden biridir ve serumda başlıca büyüme faktörüdür.
- **Fibroblast büyüme faktörleri (FGFs), epidermal büyüme faktörleri (EGF) endotel büyüme** faktörleri gibi diğer büyüme faktörleri dokulardan izole edilir veya besiyeri içindeki hücre kültürlerinden salınırlar.

NİÇİN SERUM KULLANILIR?

- Fakat hücre büyümesi için başka temel faktörlere de gereksinim vardır.
- Daha sonra medyuma %20 hayvan serumu ilave edilerek kullanım yaygınlaştı.
- Çünkü **serum büyüme faktörleri** bakımından zengindir ve **δ -globulin** içermektedir.
- Standart supplement olarak **Fetal Bovine Serum (FBS)** **daha sıklıkla ve %10 konsantrasyonunda** kullanılmaktadır.

SERUM KULLANMANIN AVANTAJLARI

- ✓ Hücrenin **çoğalması ve devamı için gerekli olan faktörlerin** çoğu serumda bulunur.
- ✓ Serum hemen hemen pek çok hücreyi etkileyen **büyüme maddesidir**. Bu nedenle de serumla desteklenmiş medyum kullanmak incelenen **her hücre tipi için optimal medyum formülasyonu** geliştirmek için gereken zamanı kısaltır.
- ✓ Serum; **hücre kültür sistemini, pH değişikliği, ağır metal iyonlarının varlığı, proteolitik aktivite veya endotoksin gibi toksik etkilere** karşı kısmen korur.

SERUM TİPLERİ

- Medyumlara ilave edilen serum çoğunlukla **FBS** dir ve oldukça pahalıdır.
- Fetal Bovine Serum (FBS) a alternatif olarak daha ucuz olan çeşitli serumlar mevcuttur.
- **Calf serum**, çok yaygın olarak endüstride de kullanılmaktadır.
- **Newborn Calf Serum (biotin seviyesi yüksek) δ -globulin seviyesi yüksektir.**
- Bazen yetişkin bovin serum kullanılır. Fakat FBS veya Calf serum kadar etkili olmaz.

SERUM TİPLERİ

- ✓ Bazı insan hücre tipleri için **at serumu** da kullanılır.
- ✓ Bazı insan hücre tipleri için insan serumunun kullanılması önerilse de insan serumunun FBS den daha iyi olduğu açıkça gösterilmemiştir.

SERUM TİPLERİ

- ✓ FBS genellikle mezbahada aseptik şartlarda kalpteki delikten toplanır.
- ✓ Calf serum ve at serumu ise özel “**donör**” **hayvanlar** tarafından üretilir.
- ✓ Bu hayvanların sağlığı sürekli kontrol altındadır.
- ✓ Belirli aralıklarla hayvanlardan kan alınarak kontrolleri yapılır.

SERUM TİPLERİ

Bu sistemin mezbahadan alınan kana göre avantajları

- ✓ Hayvan daha iyi kontrol edilir
- ✓ Hayvanların sağlığı hakkında geniş bilgi edinilir.
- ✓ Toplanan kanın kontrolü ve işlenmesi büyük fabrikamsı yerlerde yapılmaktadır.
- ✓ Serumun kalitesi, devamlı olarak iyileştirilmeye çalışılmaktadır.

SERUM TİPLERİ

- ✓ Büyüme faktörleri konsantrasyona ve hücre tipine bağlı olarak **hücreyi stimüle veya inhibe** edebilir.
- ✓ Serumun farklı tipleri değişik oranlar da farklı büyüme faktörleri içerir.
- ✓ Örneğin **albumin** serumun ana protein bileşiğidir. Ve kültürdeki **hücrelerin büyümesine** katkıda bulunur. Albuminin fonksiyonu, özellikle **lipidler gibi küçük molekülleri taşıyıcı rol** oynar. En önemli rolü **yağ asitlerini** taşır.

SERUMUN SAKLANMASI

- ✓ Serum -20°C de hızlı donma özelliğine sahiptir. Ve **2 yıl -20°C de** saklanabilir.
- ✓ Kullanılacağı zaman **37°C** su banyosunda çözülür.
- ✓ Serum **$+4^{\circ}\text{C}$ de ancak 2-3 hafta** saklanabilir.
- ✓ Dondurup çözdükten sonra tekrar dondurulmamalıdır hemen kullanılmalıdır.

TABLE 9.5. Constituents of Serum

Constituent	Range of concentration ^a
Proteins and Polypeptides	40–80 mg/mL
Albumin	20–50 mg/mL
Fetuin ^b	10–20 mg/mL
Fibronectin	1–10 µg/mL
Globulins	1–15 mg/mL
Protease inhibitors: α_1 -antitrypsin, α_2 -macroglobulin	0.5–2.5 mg/mL
Transferrin	2–4 mg/mL
Growth factors:	
EGF, PDGF, IGF-I and -II, FGF, IL-1, IL-6	1–100 ng/mL
Amino acids	0.01–1.0 µM
Lipids	2–10 mg/mL
Cholesterol	10 µM
Fatty acids	0.1–1.0 µM
Linoleic acid	0.01–0.1 µM
Phospholipids	0.7–3.0 mg/mL
Carbohydrates	1.0–2.0 mg/mL
Glucose	0.6–1.2 mg/mL
Hexosamine ^c	6–1.2 mg/mL
Lactic acid ^d	0.5–2.0 mg/mL
Pyruvic acid	2–10 µg/mL
Polyamines:	
Putrescine, spermidine	0.1–1.0 µM
Urea	170–300 µg/mL
Inorganics:	0.14–0.16 M
Calcium	4–7 mM
Chlorides	100 µM
Iron	10–50 µM
Potassium	5–15 mM
Phosphate	2–5 mM
Selenium	0.01 µM
Sodium	135–155 mM
Zinc	0.1–1.0 µM
Hormones:	0.1–200 nM
Hydrocortisone	10–200 nM
Insulin	1–100 ng/mL
Triiodothyronine	20 nM
Thyroxine	100 nM
Vitamins:	10 ng–10 µg/mL
Vitamin A	10–100 ng/mL
Folate	5–20 ng/mL

SICAKLIK

➤ Hücre kültüründe optimum sıcaklık:

- ✓ Hücrelerin hangi hayvandan elde edildiyse o hayvanın vücut ısısında olmasına,
 - ✓ Sıcaklıktaki herhangi bir anatomik değişime,
 - ✓ İnkübatördeki minor hatalar için güvenlik faktörünün birleşimine bağlıdır.
- Çoğu insan ve sıcakkanlı hayvan hücreleri için gerekli sıcaklık, vücut ısıımıza yakın olan **37 °C'dir**. Ancak kuşların vücut ısıları yüksek olduğu için kuşlara ait hücreler **38.5 °C' de** çalışılmaktadır. Memeli hayvanların hücre kültürleri **4 °C' de birkaç gün canlı kalırlar, ve -196°C' de dondurularak saklanabilirler.**

TAMAMLANMIŞ BESİYERİ

- **Tamamlanmış besiyeri**, tüm bileşen ve tamamlayıcıları eklenmiş besiyeri anlamına gelmektedir.
- Ancak bazı çalışmalarda bileşenlerden bir ya da birkaçı çalışmaya başlamadan önce ilave edilir. (**Örn: glutamin, serum, büyüme faktörleri, veya hormonlar vb.** gibi).
- Kompleks besiyeri, farklı amino asitler, vitaminler tuzlar, metabolitler içerir.
- Medyumlar +4 °C de buzdolabında saklanır.

Besiyesi Bileşenleri

Amino asitler	Vitaminler	Tuzlar	Diğerleri	Proteinler (serum yerine)
Arjinin Sistin Glutamin Histidin İzolösin Lösin Lizin Metiyonin Fenilalanin Treonin Tryptofan Tirozin Valin	Biotin Kolin Folat Nikotinamid Pantotenat Pridoksal Tiamin Riboflavin	NaCl KCl NaH ₂ PO ₄ NaHCO ₃ CaCl ₂ MgCl ₂	Glukoz Penisilin Streptomisin Fenol kırmızıS1 Tam serum	İnsülin Transferrin Büyüme faktörleri

SERUMSUZ ORTAM



SERUMSUZ ORTAM

- Günümüzde hücre kültürleri, serumsuz besiyerleri kullanılarak yapılmaya başlanmıştır.
- Çünkü besiyerlerinde serum kullanılmasının dezavantajları vardır
- Serumun albumin, transferrin gibi ana bileşenleri bilinmektedir, ancak serum küçük miktarda başka bileşenleri de içermektedir. Bu bileşenler, amino asidler, şekerler, nükleozidler, peptid büyüme faktörleri, hormonlar, mineraller ve lipidler olabilir ve bu bileşenlerin etkileri bilinmemektedir.
- Her serumun raf ömrü ve kararlılığı farklıdır
- Serumlar için birçok test uygulanmaktadır.

SERUMSUZ ORTAM

- ✓ Her hücre tipi için farklı serumlar kullanılmaktadır.
- ✓ Kullanılacak serumun uygunluğu, hastalık çeşitleri, ekonomik ve politik nedenlerden dolayı sınırlıdır.
- ✓ Serum varlığında ürün saflaştırılması zorlaşır ve bu ürünün farmasötik uygunluğunu sınırlar.
- ✓ Serum virüsler tarafından sıklıkla kontamine olur. Bu da kültürün zarar görmesine neden olabilir.
- ✓ Serum büyümeyi ilerleten aktiviteye sahip olduğu gibi büyümeyi engelleyen aktiviteyede sahiptir.
- ✓ Serum standardizasyonunun deneysel ve üretim protokolleri oldukça zordur ve serum çeşidine göre farklı laboratuvarlar gerektirebilir.

SERUMSUZ BESİYERİNİN AVANTAJLARI:

- ✓ Serumsuz besiyerleri her hücre tipi için seçici ortamlar kullanılmasını sağlar. Bu da büyümeyi ilerleten aktiviteyi arttırır.
- ✓ Spesifik bir hücre seçilip konsantrasyon, büyüme faktörleri, diğer teşvik edici bileşenler kullanılarak büyümeyi arttıran besiyerine konur.
- ✓ Bileşenler farklı kullanılarak hücre büyümeyi arttıran besiyerinden alınıp farklılaşmayı teşvik eden besiyerine konabilir.

SERUMSUZ BESİYERLERİNİN

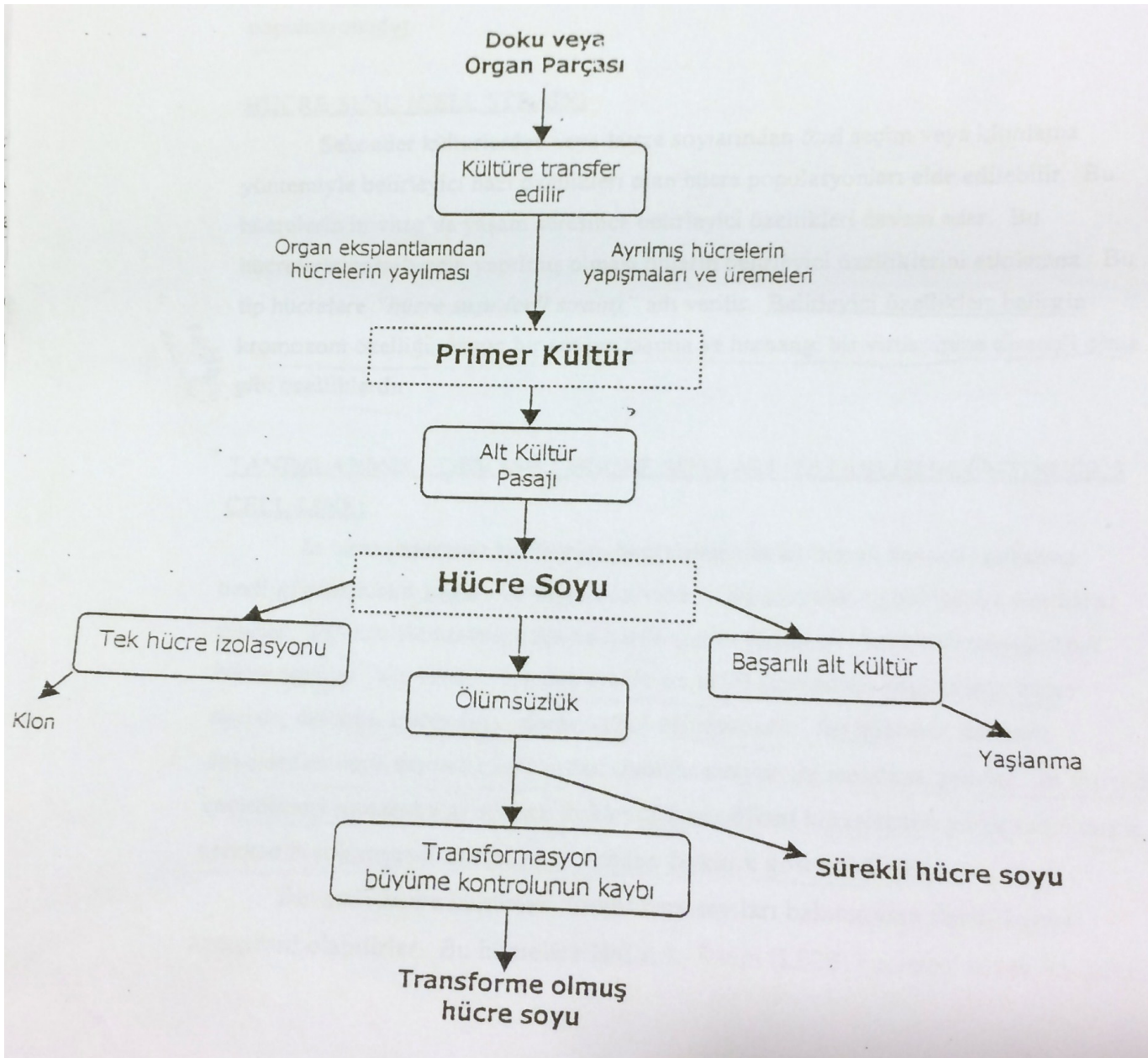
DEZAVANTAJLARI

- Her hücre tipi için farklı yöntemler gerekir. Besiyerlerinin çeşitliliği ile aynı hücre farklı laboratuvarlarda farklı kaynaklardan elde edilebilir.
- Serumsuz ortama geçiş ne yazık ki görüldüğü gibi kolay değildir. Bazı hücreler populasyon için seçici özellik gösterirler. Bunlar için farklı metotlar gerekebilir.
- Serumun uzaklaştırılması sırasında kullanılan reaktiflerin ve suyun saf olması gerekir.
- Serumsuz ortamda genellikle büyüme yavaşlar.
- Serumsuz ortamın kalite kontrolü sınırlıdır ve ürünler serum bulunan besiyerine göre daha pahalıdır.

DOKU ve HÜCRE KÜLTÜRÜ TERMİNOLOJİSİ

PRİMER KÜLTÜR

- Hücrelerin besiyerine ekilerek üretilmesine **kültür**, yalnız bir hücreden oluşmuş ve kuramsal olarak tek bir hücreden türemiş olduğu varsayılan kültüre **saf kültür** denir.
- Organizmadan alınan organ, doku veya hücreler bir ortama eksplante edildikten sonra kendi tip ve özelliklerini koruyarak in vitro da üreme gösteren kültürlere **primer kültür** denir.



SEKONDER ALT KÜTÜR

- Primer kültürlerin, bulundukları ortamda çoğaldıktan sonra başka bir ortama, 2 veya daha fazla kültür kabına, bölünerek aktarılması olayına «**pasaj**» adı verilir.
- Primer kültürün pasajı yapılarak oluşturulan kültüre de «**sekonder (alt kültür)**» denir.

HÜCRE SOYU (CELL LINE)

- Hücre soyu **primer kültürün birinci sekonder kültüründen** elde edilen hücre popülasyonudur.

HÜCRE SUŞU (CEL STRAIN)

- Sekonder kültürlerden veya hücre soylarından özel seçim veya klonlama yöntemiyle belirleyici bazı özellikleri olan hücre populasyonları elde edilebilir.
- Bu hücrelerin in vitro da yaşam süresince belirleyici özellikleri devam eder.

HÜCRE SUŞU (CEL STRAIN)

- Bu hücrelerin pasajlarının yapılmış olması onların belirleyici özelliklerini etkilemez.
- Bu tip hücrelere «**hücre suşu (cell strain)**» adı verilir.
- Belirleyici özellikler; **belirgin kromozom özelliği, özgün bir antijen taşıma ve herhangi bir virüs tipine dirençli olma** gibi özelliklerdir.

TANIMLANMIŞ-DEVAMLIL HÜCRE SOYLARI (ESTABLISH-CONTINUOUS CELL LINE)

- In vitro yaşamları sınırlı olan hücrelerden farklı olarak **devamlı çoğalma** özelliği olan hücre suşları ve soyları da vardır.
- Bu hücreler de belirleyici özellik taşırlar.
- In vitro da sınırsız çoğalan hücre soy ve suşlarına **«tanımlanmış devamlı hücre soyları»** adı verilir.

TANIMLANMIŞ-DEVAMLIL HÜCRE SOYLARI (ESTABLISH-CONTINUOUS CELL LINE)

- Üç gün ara ile **en az 70 kere pasajı** yapılabilen hücre soyları **devamlı hücre soyu** olarak kabul edilmektedir.
- Bu hücreler **kanserli dokulardan veya diploid** hücrelerden transformasyon ile meydana gelirler.

TANIMLANMIŞ-DEVAMLIL HÜCRE SOYLARI (ESTABLISH-CONTINUOUS CELL LINE)

- In vitro da geçirdikleri **mutasyonlar** sonucu köklendikleri orijinal hücrelerden gerek morfolojik gerekse biyokimyasal özellikler açısından farklılık gösterebilirler.
- Devamlı hücre kültürleri, kromozom sayıları bakımından diploid veya aneoploid olabilirler.
- Bu hücrelere HeLa, L-Strain (L929) hücreleri örnek verilebilir.

TEK TABAKALI KÜLTÜR (MONOLAYER CULTURE)

- Tek tabaka kültürü, plastik veya cam yüzey üzerinde hücrelerin **tek tabaka** halinde yayılması olarak tarif edilir.

IN VİTRO DA HÜCRE YAŞLANMASI

- Normal hücre soyu, iki kat olma özelliğine sahiptir.
- Yani hücre popülasyonu belirli bir sayının altında büyüyemez.
- Örneğin normal diploid fibroblastları 50-70 kere bölünebilirler.

IN VİTRO DA TRANSFORMASYON

- In vitro da yetiştirilen hücreler, bazı faktörlerin etkisiyle transformasyona uğrayabilirler.
- Bu faktörler, **kimyasal karsinogenler, iyonize edici radyasyon, DNA tümör virüslerinin** enfeksiyonu vs dir.
- Hücrede ki değişim aynı zaman da kendi kendine olur ve bu hücreler normal hücrelere göre daha hızlı çoğalmaya başlarlar.

SÜSPANSİYON HÜCRE KÜLTÜRÜ

- Bazı tümör hücreleri veya histotipik hücre topluluğu, yüzeye yapışmaktan hoşlanmazlar.
- Öyle durumlar da **hidrofobik yüzey** kullanılır.
- **Bakteriyolojik algrade polystyrene** yapışmayan hücreler için uygun olabilir.
- Fakat bazı hücre tipleri de bu petrilere tutunabilirler.
- Hücrelerin yapışması ancak petrilerin belirli devirde sallanan inkübatörde tutulmasıyla engellenebilir.

PRİMER KÜLTÜR VE ESTABLISH CELL LINES

- Doku kültürü laboratuvarında çok geniş olarak kullanılan hayvan hücre soyları, literatür de tarif edilmiştir ve bu hücrelerin çoğu İngilterede ki **European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC)** den ve Amerika da ki **American Type Culture Collection (ATCC)** den elde edilmiştir.
- Bu hücre soyları insan da dahil olmak üzere farklı hayvan türlerinden elde edilmiştir ve son zamanlar da böceklerden alınan hücre türlerinin de sayısı artmaktadır.

ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN ELDE EDİLEN PRİMER KÜLTÜRLERİN TESPİTİ

- Primer hücre kültürü herhangi bir dokudan elde edilebilir.
- Kültürdeki hücrelerin davranışları ve hücrelerin içinde bulundukları şartlar , seçilen materyalden etkilenecektir.
- ✓ Hücrelerin normal ve tümörlü dokudan alınmış olması
- ✓ Dokunun erişkin veya embriyo dokusu olması
- ✓ Canlının türü

HÜCRELERİN İZOLASYONU

- **Kan dokusundan** çok kolaylıkla hücre elde edilebilir.
- Çünkü hücreleri birbirinden ayırma problemi yoktur, hücreler kan sıvısından bağımsız olarak bulunurlar.
- Buna karşılık deri, karaciğer vb. gibi katı doku içinde organize olmuş olan hücrelerin eldesi zordur, bu hücrelerin birbirinden ayrılması için işlem yapmak gerekir.

HÜCRELERİN İZOLASYONU

- Bunun için kullanılan metodlar da meteryalin miktarına ve dokunun yapısına bağlı olarak değişir.
- En iyi netice **taze dokudan** elde edilir.
- Fakat +4 ° C de tutulan bazı dokular da kullanılabilir.
- Bu dokuların kan hücrelerinden tamamen yıkanmış ve yağ dokusundan da arındırılmış olması gerekir.

İNSAN KANINDAN MONONÜKLEAR HÜCRELERİN AYRILMASI

1. Heparinlenmiş şırınga ile kan toplanır.
2. 10 ml kan, 10 ml'lik Histopaque (1077) Sigma üzerine veya LSM (Lymphocyte Separation Medium) üzerine dikkatli bir şekilde konur. Bu işlem, 50 ml'lik polypropylene santrifüj tüpünde yapılır. Histopaque, daha önceden oda sıcaklığına getirilmelidir.
3. Oda sıcaklığında 30 dakika 400 g'de santrifüj edilir.

4. Santrifüjden sonra pastör pipeti ile üst kısım çekilip atılır. Dipte 5 mm içinde mononükleer hücreler içeren mat kısım kalır.
5. Pastör pipeti kullanarak dipteki bu kısım, yeni steril bir santrifüj tüpüne nakledilir.
6. Hücreler, 3 defa 30 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) ile veya serumsuz medyum ile yıkanır ve 5-10 dakika 250-300 g'de santrifüj edilir.
7. Süspansiyon hale gelmiş hücreler, tekrar yıkandıktan sonra RPMI 1640 medyum + %10 Fetal Bovine Serum içine alınırlar.

EKSPLANT KÜLTÜRLER

- Eksplant kültürler deri gibi bazı dokulardan **biyopsi parçası** olarak alınıp kültür ortamına adapte edilen hücre kültürleridir.
- Bunun için genellikle **doku, steril bir makas veya bisturi** ile kesilir.
- Küçük bir doku parçası steril pensle tutularak içinde **medyum bulunan bir petri** içine konur

EKSPLANT KÜLTÜRLER

- Dokudan hücrelerin ayrılması ve petriye yapışması için birkaç saat beklenir.
- Eğer herşey çok iyi gider, hücreler dokudan ayrılıp petri yüzeyine yapışırlarsa bir süre sonra **tek tabaka hücre** oluşur.

Bu işlem için takip edilecek yol şöyledir:

1. Doku parçasından steril şartlarda çıkarılan 1 mm çapındaki parça, steril petri içinde iyice yıkanır.
2. Parçalar, genellikle serum:suz medyum ile yıkanır.
3. İçinde %50 serum ^{FS} içeren ve çok az miktarda medyum bulunan 60 mm çapındaki kültür petrisine 25-30 tane doku parçası konur.
4. Parçaların petri içinde eşit olarak dağılması sağlanır, sonra dokuların petriye tutunması, yapışması için nemlendirilmiş 37°C'lik etüve bırakılır.
5. Muhtemelen etüvde bir gece geçiren parçalar, 5 mm'lik medyum içinde yavaş yavaş çoğalmaya başlayacaklardır.
6. Her 5-7 günde düzenli olarak medyum değiştirilir. Bu işlem, hücrelerin doku parçasından ayrılıp büyüdüğü görülünceye kadar devam eder.
7. Eğer hücreler, çoğalıp, bulundukları ortama sığamaz hale gelirlerse doku parçalarını yeni şişeye aktarabiliriz.
8. Hücreler, kültür şişesinin yüzeyinin %50'sini kapladıkları zaman tripsin ile hücreleri kaldırıp, sulandırıp yeni şişelere ekebiliriz.

PRİMER KÜLTÜR

- Organizmadan doğrudan doğruya alınan hücrelerin in vitroya ekilmesi sonucunda oluşan kültürlere **primer kültür** denir.
- Primer kültürler, **memelilerin embriyonik ve ergin dokularından (fare, sıçan, insan), piliç embriyosundan ve insan biyopsi materyallerinden** hazırlanabilir.

EMBRYONİK FARE FİBROBLAST (EFM) TEK TABAKA HÜCRE KÜLTÜRÜ HAZIRLANMASI

- ✓ Embriyonik hücre kültürü hazırlamak için öncelikle kullanılacak **embriyonun yaşı** önem taşır.
- ✓ Bu yaş embriyonun nispeten büyük olduğu ve oldukça yüksek oranda farklılaşmamış mezenşim hücresi içerdiği **13. gündür**.
- ✓ Normal olarak fare embriyosunun yaşı (farenin gebelik süresi) 19-21 gündür.

1. Uygun yaştaki embriyoları taşıyan gebe fare, ya bayıltılır veya servikal dislokasyonla öldürülür.
2. Açılacak olan ventral yüzey, bol alkol ile iyice silinir.
3. Ventral deri, enine kesilerek dış yöne doğru sıyrılır.
4. Ortaya çıkan abdominal ventral yüzey steril makasla yanlara açılır. Bağırsaklar, karın boşluğundan dışarı çıkarılarak embriyo ile dolu uterus görülür.
5. Embriyolu uterus, dikkatlice kesilerek içinde BSS bulunan petrinin içine konur.
6. BSS içindeki uterus, steril pens ve makas yardımı ile kesilerek içinden embriyolar dikkatli bir şekilde çıkarılarak başka bir petri içindeki BSS içine aktarılır. Bu petri içinde embriyolar, iyice yıkanarak kan hücrelerinden temizlenir.
7. Kan hücrelerinden temizlenen embriyolar, yeni BSS içeren petriye alınırlar ve burada disekte edilirler, yani farklılaşmış organlar (baş, kalp, ciğer, ekstremiteler ve kuyruk) çıkartılıp, BSS'de yıkanılırlar.
- Kalan embriyo, steril keskin makas veya bistüri ile ufak parçalara ayrılır. Embriyo parçaları, içinde tripsin çözeltisi ve magnetik çubuk bulunan erlene nakledilir. Bu karışım, magnetik karıştırıcıda düşük hızda 20-30 dakika karıştırılır. Karışımın kabın dibine çökmesi beklenir ve üstteki bulanık hücreli sıvı alınıp santrifüj yapılır. Santrifüjden önce tripsinin aktivitesini durdurmak için erumlu medyum ilave edilir.

10. Santrifüj sonrası üstteki sıvı dikkatlice dökülüp, dipte kalan hücre pelleti üstüne serumlu medyum ilave edilerek pipetaj ile hücre süspansiyonu yapılır. Bu süspansiyon, içine daha önceden medyum konulmuş kültür şişelerine ekilip 37°C 'lik inkübatöre kaldırılır.

- Böylece Embriyonal Fare Fibroblast **primer hücre kültürü** hazırlanmış olur.
- Bu kültür, bir yüzeye yayılıp çoğalan **tek tabaka hücreleri** oluşturacaktır.
- Bu nedenle bu tip kültüre **«tek tabakalı hücre kültürü (monolayer cell culture)»** adı verilir.

- ✓ Hazırlanan kültür dokunulmadan (hücrelerin yüzeye yapışıp çoğalmaları için) **24-48 saat** inkübatör de bırakılır.
- ✓ Bu süre sonunda kültür invert mikroskopta incelenebilir.
- ✓ Genellikle 24-48 saat sonra çok farklılaşmış olan ve yapışmayan medyumda yüzen hücrelerin kültürden alınabilmesi için kültür şişesinde ki medyum alınıp şişe **BSS ile** yıkandıktan sonra yeni medyum ilave edilir.

- Hücrelerin tek bir tabaka oluşturması için beklenir.
- Bekleme süresi ekimden itibaren **72-96 saat** gibi bir süredir.
- Bu sürenin sonunda kültür şişesini tam dolduracak şekilde hücreler, tek tabaka oluşturdukların da bu **primer kültürden sekonder kültür** yapılır.

