

Hücre kültürlerinde primer kültürden sonraki aşama **pasajlama ile subculture (alt kültür)** elde edilmesidir.

Kültürde çoğalan hücreler içinde bulundukları besi ortamındaki bileşenleri büyük ölçüde **tükettikten** yada üreme yüzeyinin tamamını kullandıktan sonra **çoğalma hızları düşer** ve zamanla tamamen durur.

Bu dönemde kültürün bölünmesi yapılması gerekli en doğru işlemdir.

Bu işleme **subkültür yada pasaj** adı verilir.

İlk pasajdan sonra devam eden kültürler **cell line** olarak tanımlanır. Bu dönem farklı ve benzer birçok hücre hattını kapsar.

Klonlama, fiziksel hücre ayırma, seleksiyon gibi tekniklerle bu kültürde spesifik özellikteki hücrelerin büyük bir kısmı tanımlanabilir.

Bunun sonucunda **hücre hatları** belirlenir.

İki alt kültürden sonra **sekonder kültürler**, bundan sonra da **tersiyer kültürler** ve diğer alt kültürler elde edilir. Her alt kültür elde edilmesi sırasında da **pasajlama** yapılır.

Pasajlamayla hücrelerin bir kaptan başka bir kaba veya bir hacimden daha büyük bir hacme geçmesi sağlanır.

Primer kültür için geçerli olan tüm unsurlar subkültür içinde geçerlidir.

Yapılan subkültürden (pasajlamadan) sonra hücre tipine bağlı olarak genellikle hücrelerde **% 80** ve üzerinde **proliferasyon** gerçekleşir.

Hücrelerin üretilmesi, üretilen bu hücrelerin karakterize edilmesi, hücrelerin depolaması, birbirine benzer sayıdaki hücrelerin potansiyel artışı ve bu hücrelerin geniş kapsamlı deneylerde kullanılmasına olarak sağlaması subkültürün biyolojik bakımından önemini ortaya koymaktadır.

Hücrelerin pasajlanabilmesi için hücre kültür flakslarının yüzeyini kaplamış olmalıdır.Böyle flakslara **konfulent** flakslar denir.

Pasajlama işlemi hücreler sıkışık konumda olduğu için yapılır.Ve daha geniş alana yayılır.

Pasajlama işlemi besi ortamı içerisindeki hücrelerin nutrientleri tüketmesinden dolayı üreme hızlarının düşmesini ölümlerini önlemek amacı ile yapılır

Sonlu ve Sonsuz Hücre Hattı

Sonlu (Finite) Hücre Hattı

- Normal hücreler proliferasyon yeteneklerini kaybetmeden önce genellikle sınırlı sayıda bölünebilmektedir. Bu nedenle hücre hatları **sonludur (finite)**.

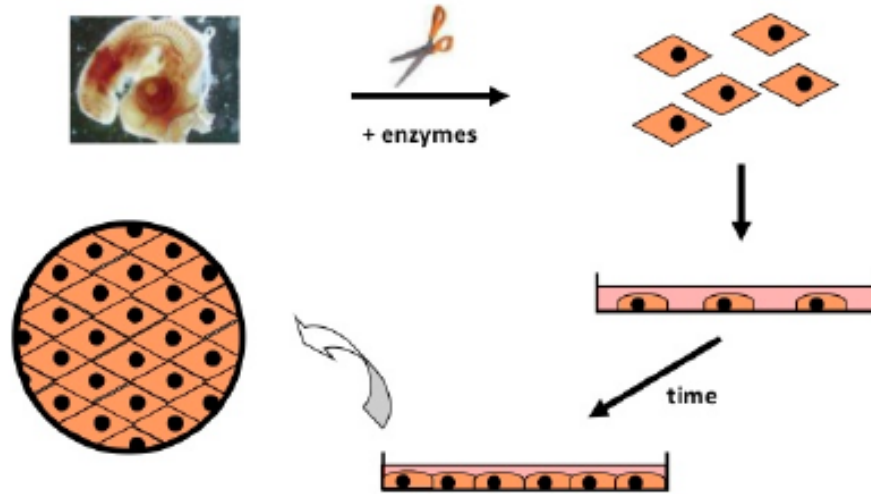
Sonsuz (Continuous) Hücre Hattı

- Eğer hücre hattı kimyasal veya viral olarak *in vitro* koşullarda transforme edilirse **devamlı (continuous) hücre hattı** adını almaktadır.
- Bu durum **hücre hatlarının ölümsüzleştirilmesi** olarak da bilinmektedir.

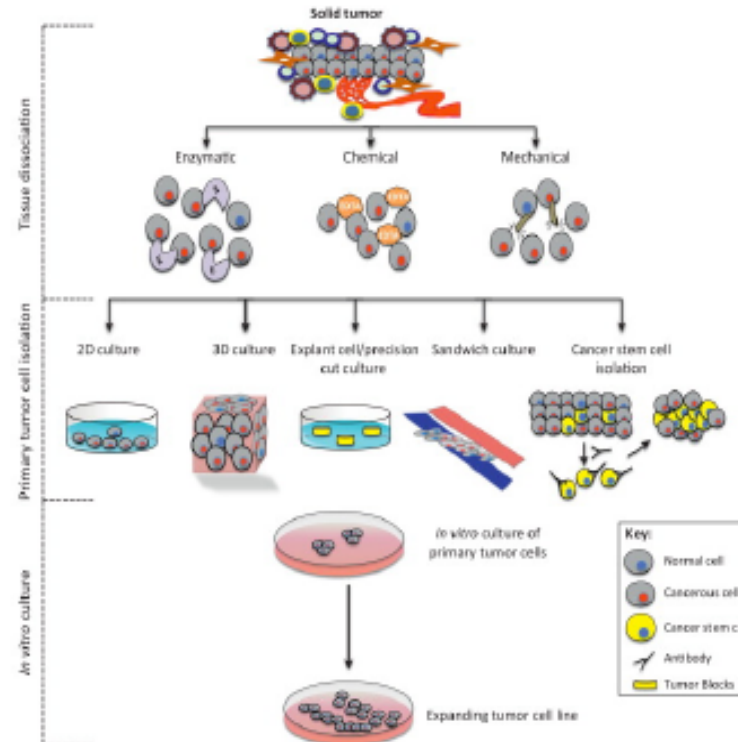
Primer Kültür

- Cerrahi müdahale sonrasında alınan, fiziksel ve enzimatik parçalama neticesinde dokuyu oluşturan hücrelerin tek tek hücre haline getirilerek uygun besi yeri ve çevresel koşullarda bir yüzeye tutunması ve çoğaltılması işlemine primer kültür denilir.

Primary cell culture

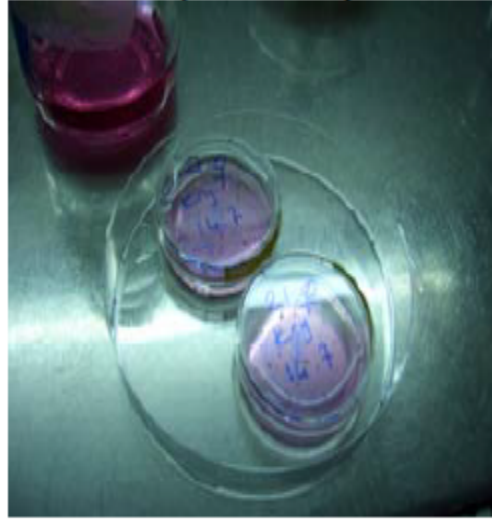
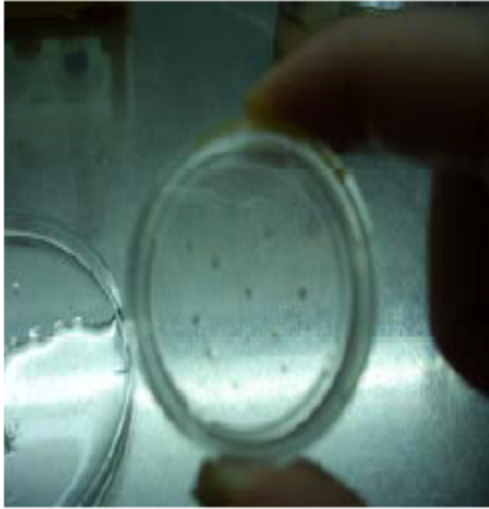


- Primer kültür hücrelerinin yaşamları sınırlıdır.
- Heterojen bir hücre popülasyonundan oluşur.
- Primer hücre kültürleri kullanılarak hücre hatları oluşturulur.





Şekil 1: Antibiyotikli PBS içerisindeki işlenmemiş doku örneği

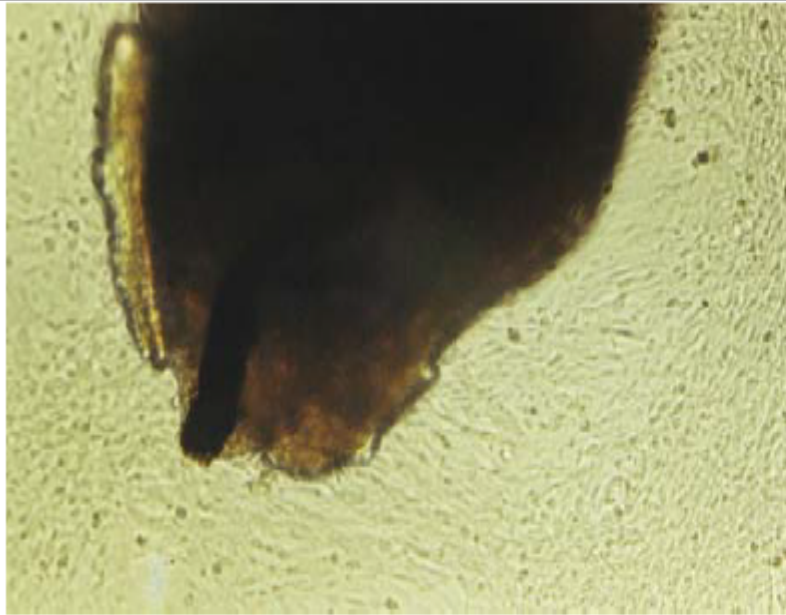


Şekil 2: Doku petrilerine ekilen doku parçacıkları (toplu iğne başı büyüklüğünde)

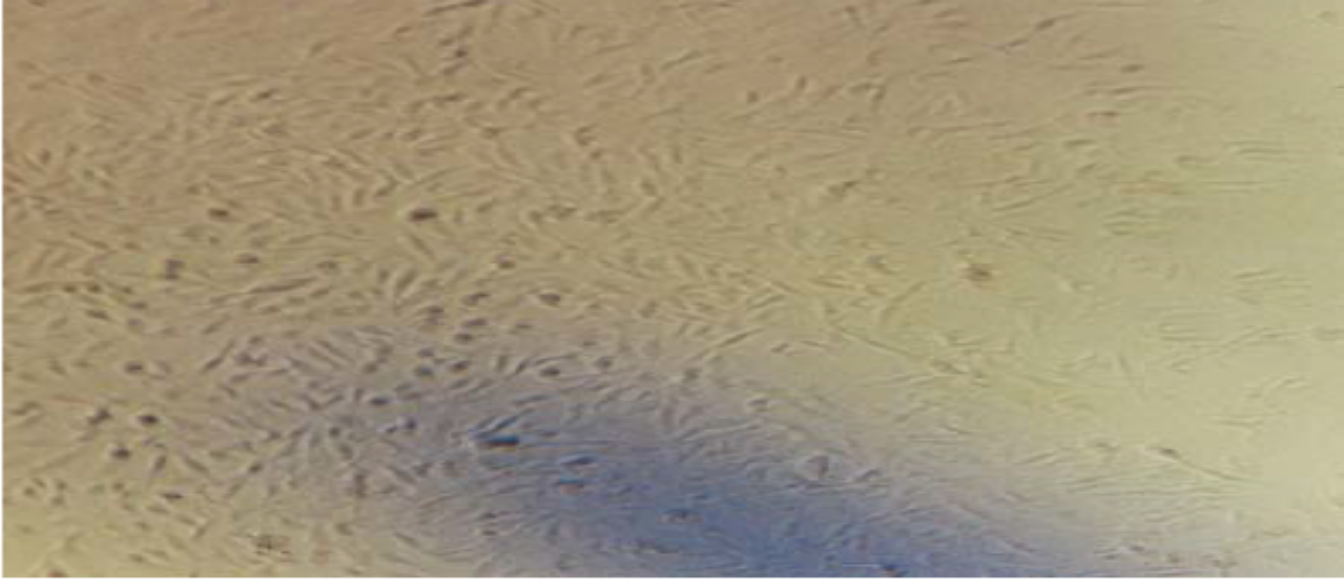
Primer mezanşimal (kıkırdak, fibroblast) hücre kültürü

- 1) Kulak %70 alkol ile temizlenmeli ve alkol ile iyice temizlenmiş kulak pensi ile doku alınmalıdır. Hayvandan alınan dokular, + 4 derecede %5 antibiyotik içeren PBS solüsyonunda işleneceği laboratuara gelene kadar saklanır. Dokuların alınması sırasında steriliteye özen gösterilmelidir. Bu şekilde muhafaza edilen doku örnekleri 3-4 gün canlılığını muhafaza edebilir.
- 2) Laboratuara ulaşan doku örnekleri laminar kabin içinde %5 antibiyotikli PBS'den %2 antibiyotikli PBS içerisine aktarılırlar. Kulak doku parçalarının üzerindeki kıllı deri bisturi ucu yardımı ile temizlenir, kıkırdak ve bağ dokusu temiz bir petriye aktarılır ve kurumaması için üzerine az miktarda PBS damlatılır.
- 3) Steril bisturi ve pensler ile dokular iğne başı kadar küçük parçalara ayrılır. Bu parçalar 35 mm'lik hücre kültür petrilere aktarılır. Dokuların kültür petrisine yapışması için bir süre (2-3 dakika) beklenir.
- 4) Hücre kültür medyumunu petrinin kenarından yavaş bir şekilde dokuların üzerini kaplayacak şekilde uygulanır.
- 5) Ekim yapılan kültür petrilere inkübatöre yavaşca kaldırılır. Petriyi sarsmamaya özen gösterilmelidir aksi takdirde ekilen dokuların yerlerinden kalkma olasılığı vardır.
- 6) Petriler her gün dışarıdan kontrol edilir. Eğer petrilere kontaminasyon tespit edilirse, kontamine petri % 70 alkolle kaplanır ve tıbbi atık olarak bertaraf edilir. **(Kontaminasyon: medyum renginin sarıya dönmesi, bulanıklaşması, tortu oluşması)**

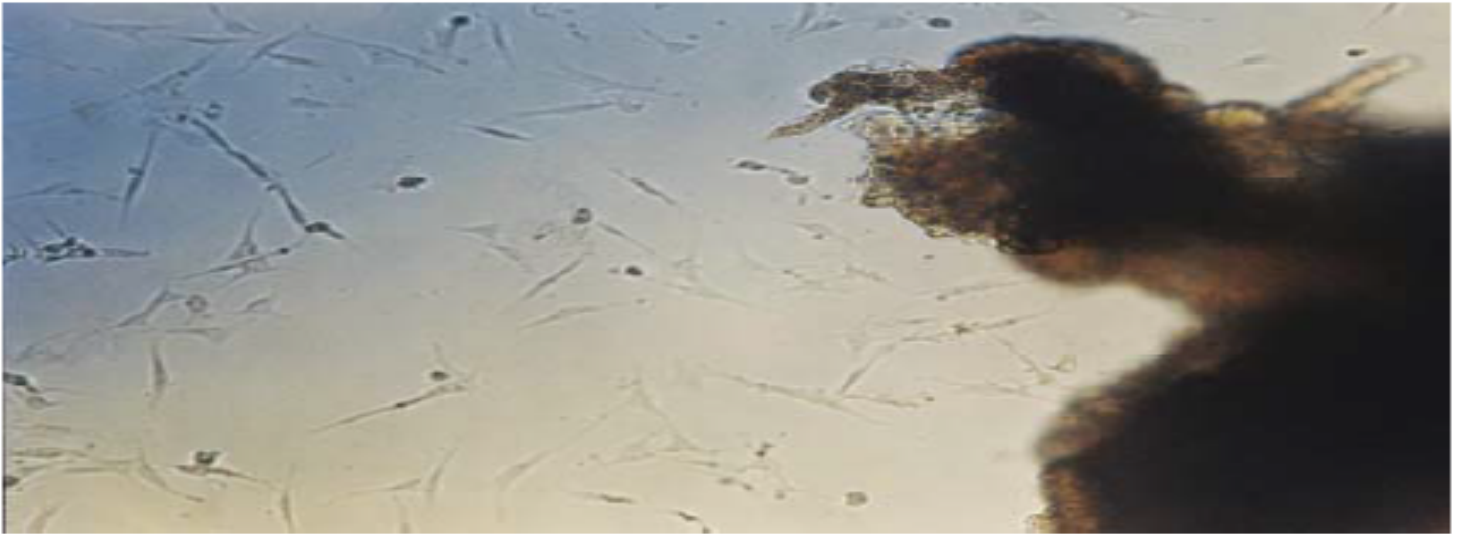
- 7) Ekimi takiben 7 gün boyunca petriler yerlerinden oynatılmadan kültüre edilmelidirler. 7. günde petriler invert mikroskop altında kontrol edilir ve hücre üremesi olanlar tespit edilir. İlk olarak primer kültür petrilerinin medyumunu 7. günde tazelenir ve 2 gün ara ile medyum değişimleri tekrarlanmalıdır. Hücrelerin petriyi kaplamasının ardından; doku parçaları pastör pipeti ile toplanır ve petrilere tripsin uygulanır ve hücreler pasajlanır. Eğer hücreler hemen kullanılmayacaksa dondurma işlemi gerçekleştirilir.



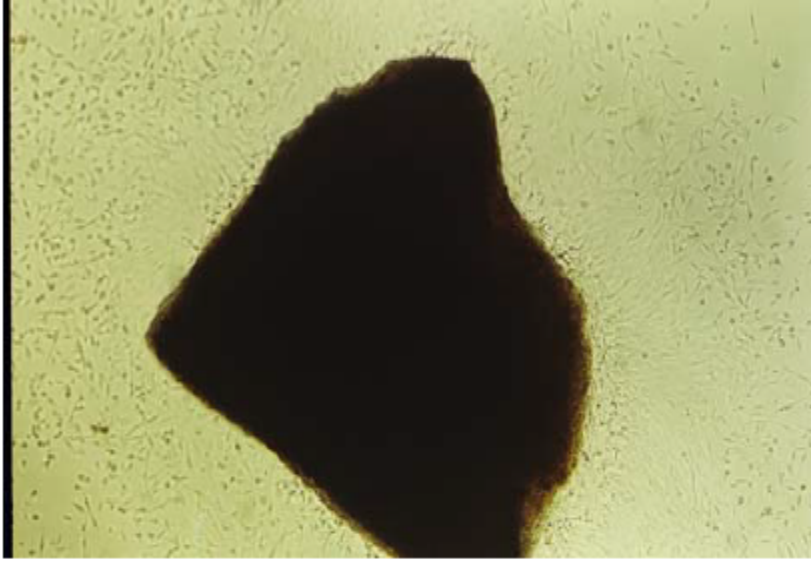
Şekil4: Keçiye ait primer kültür. Keçiye ait kıkırdak dokusu ve çevreye yayılan hücreler



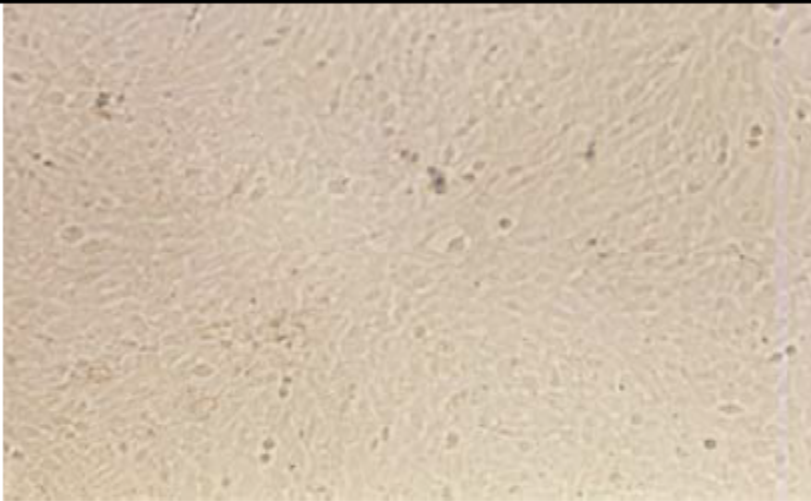
Şekil5: Keçi primer kültürdeki elde edilen hücreler



Şekil6: Sığıra ait primer kültür. Kültürün 7.günü



Şekil 7: Koyuna ait primer kültür



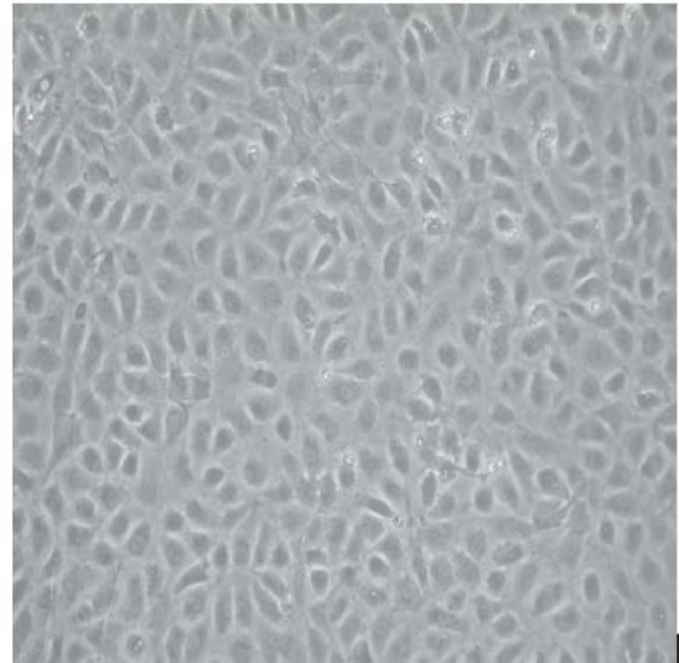
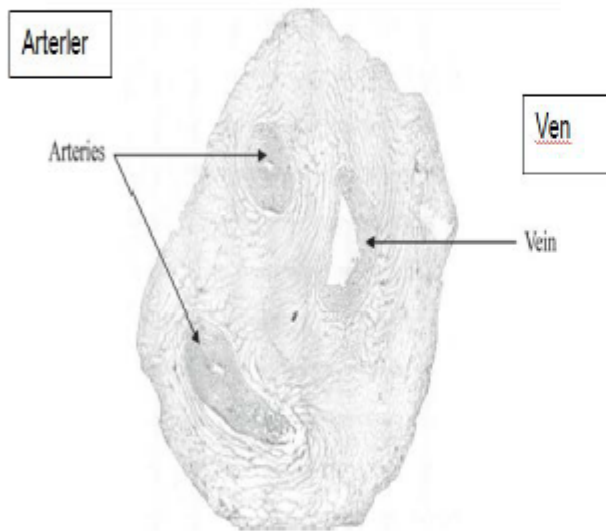
Şekil8: Primer kültürdeki elde edilen konfluent hücreler

Derivation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) Abnova



Loosen the hemostatic clamp and pour the collagenase solution into 50 ml tube

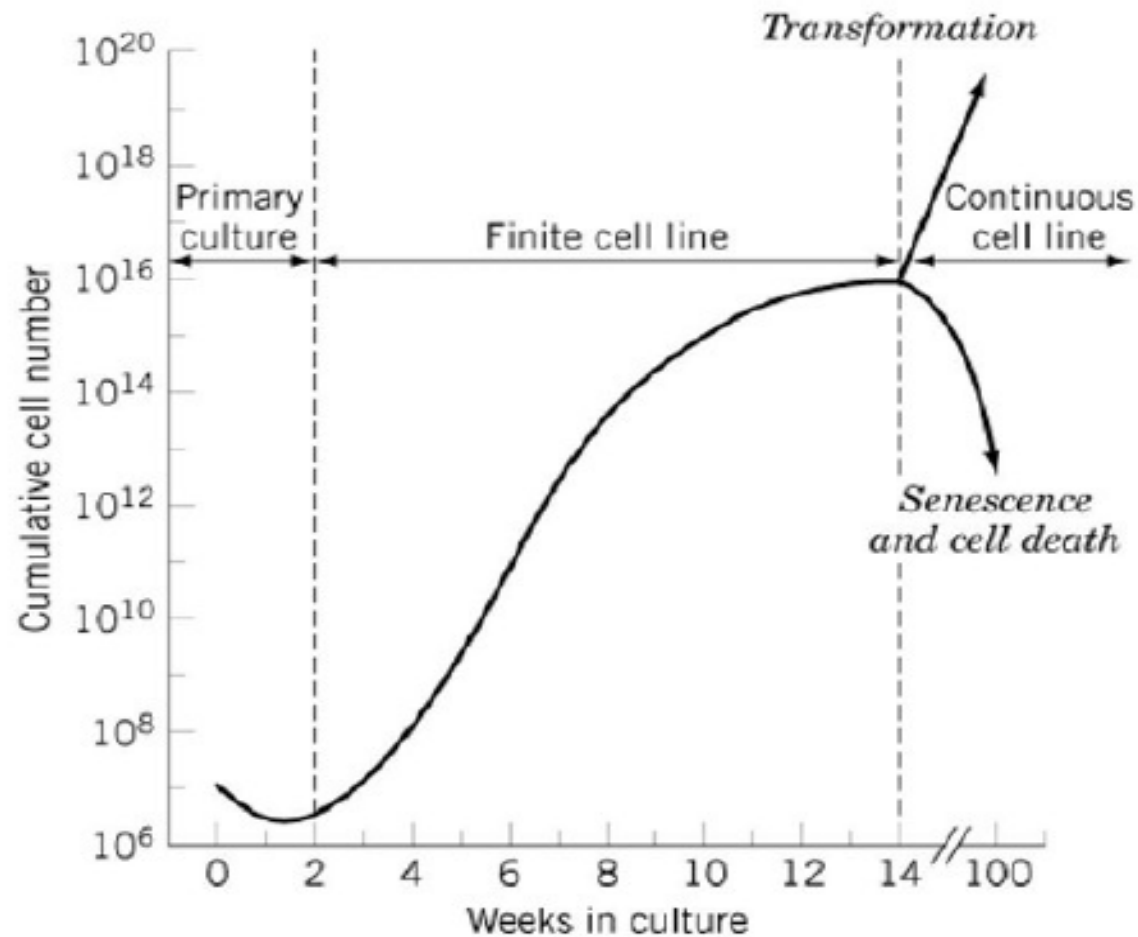
HUVEC



Sonsuz Hücre Hatları

- Çoğu hücre hatları sınırlı sayıda bölünme gerçekleştirdikten sonra ölür.
- Hücre hatları kendiliğinden oluşabileceği gibi kimyasal ya da viral yöntemlerle de oluşturulabilir.
- Sonsuz hücre hatlarının karakteristik özellikleri
 - Daha küçük, daha yuvarlaktırlar ve de tutundukları yüzeye çok sıkı bağlanmazlar.
 - Hızlı bölünürler, dolayısıyla anormal kromozom sayısı görülür.
 - Bir süre sonra orijin dokunun özelliklerini kaybetmeye başlarlar.

Sonlu ve Sonsuz Hücre Hattı



HÜCRE HATLARININ ADLANDIRILMASI

Yeni adlandırılacak hücre hatlarına **bir kod numarası yada isim** verilir.

Örneğin; **NHB >>> Normal Human Brain**

Eğer aynı kökenden farklı hücre hatları üretilirse bu hücre hattı **NHB 1, NHB 2.....** şeklinde adlandırılır.

Ayrıca bu hücre hattı klonlanırsa **NHB1-1, NHB1-2...** şeklinde adlandırılır.

Bir hücre hattı seçerken;

- Kolay kültür devamlılığı sağlanabilen**
 - Hızlı büyüyen**
 - Kolay klonlanabilen**
 - Her bir flaskta yüksek oranda ürün veren**
 - Serumsuz medyumlara kolayca adapte olabilen**
- hücreler seçilir. Ayrıca seçilen hücre hatlarının biyolojik riski az olmalıdır.**

TABLE 13.1. Commonly Used Cell Lines

Cell line	Morphology	Origin	Species	Age	Ploidy	Characteristics	Reference
Finite, from Normal Tissue							
IMR-90	Fibroblast	Lung	Human	Embryonic	Diploid	Susceptible to human viral infection; contact inhibited	Nichols et al., 1977
MRC-5	Fibroblast	Lung	Human	Embryonic	Diploid	Susceptible to human viral infection; contact inhibited	Jacobs, 1970
MRC-9	Fibroblast	Lung	Human	Embryonic	Diploid	Susceptible to human viral infection; contact inhibited	Jacobs, et al., 1979
WI-38	Fibroblast	Lung	Human	Embryonic	Diploid	Susceptible to human viral infection	Hayflick & Moorhead, 1961
Continuous, from Normal Tissue							
293	Epithelial	Kidney	Human	Embryonic	Aneuploid	Readily transfected.	Graham et al., 1977
3T3-A31	Fibroblast		Mouse	Embryonic	Aneuploid	Contact inhibited; readily transformed	Aaronson & Todaro, 1968
3T3-L1	Fibroblast		BALB/c Mouse Swiss	Embryonic	Aneuploid	Adipose differentiation	Green & Kehinde, 1974
BEAS-2B	Epithelial	Lung	Human	Adult			Reddel et al., 1988
BHK21-C13	Fibroblast	Kidney	Syrian hamster	Newborn	Aneuploid	Transformable by polyoma	Macpherson & Stoker, 1962
BRL 3A	Epithelial	Liver	Rat	Newborn		Produce IGF-2	Coon, 1968
C2	Fibroblastoid	Skeletal muscle	Mouse	Embryonic		Myotubes	Morgan et al., 1992
C7	Epithelioid	Hypothalamus	Mouse			Neurophysin; vasopressin	De Vitry et al., 1974
CHO-K1	Fibroblast	Ovary	Chinese hamster	Adult	Diploid	Simple karyotype	Puck et al., 1958
COS-1, COS-7	Epithelioid	Kidney	Pig	Adult		Good hosts for DNA transfection	Gluzman, 1981
CPAE	Endothelial	Pulmonary-artery endothelium	Cow	Adult	Diploid	Factor VIII, Angiotensin II converting enzyme	Del Vecchio & Smith, 1981
HaCaT	Epithelial	Keratinocytes	Human	Adult	Diploid	Cornification	Boukamp et al., 1988
L6	Fibroblastoid	Skeletal muscle	Rat	Embryonic		Myotubes	Richler & Yaffe, 1970
LLC-PK1	Epithelial	Kidney	Pig	Adult	Diploid	Na ⁺ -dependent glucose uptake	Hull et al., 1976; Saier, 1984
MDCK	Epithelial	Kidney	Dog	Adult	Diploid	Domes, transport	Gaush et al., 1966; Rindler et al., 1979
NRK49F	Fibroblast	Kidney	Rat	Adult	Aneuploid	Induction of suspension growth by TGF- α, β	De Larco & Todaro, 1978
STO	Fibroblast		Mouse	Embryonic	Aneuploid	Used as feeder layer for embryonal stem cells	Bernstein, 1975
Vero	Fibroblast	Kidney	Monkey	Adult	Aneuploid	Viral substrate and assay	Hopps et al., 1963
Continuous, from Neoplastic Tissue							
A2780	Epithelial	Ovary	Human	Adult	Aneuploid	Chemosensitive with resistant variants	Tsuruo et al., 1986
A549	Epithelial	Lung	Human	Adult	Aneuploid	Synthesizes surfactant	Giard et al., 1972
A9	Fibroblast	Subcutaneous	Mouse	Adult	Aneuploid	Derived from L929; Lacks HGPRT.	Littlefield, 1964b
B16	Fibroblastoid	Melanoma	Mouse	Adult	Aneuploid	Melanin	Nilos & Makarski, 1978
C1300	Neuronal	Neuroblastoma	Rat	Adult	Aneuploid	Neurites	Liebermann & Sachs, 1978
C6	Fibroblastoid	Glioma	Rat	Newborn	Aneuploid	Glial fibrillary acidic protein, GPDH	Benda et al., 1968

TABLE 13.1. Commonly Used Cell Lines (*Continued*)

Cell line	Morphology	Origin	Species	Age	Ploidy	Characteristics	Reference
Caco-2	Epithelial	Colon	Human	Adult	Aneuploid	Transports ions and amino acids	Fogh, 1977
EB-3	Lymphocytic	Peripheral blood	Human	Juvenile	Diploid	EB virus +ve	Epstein & Barr, 1964
Friend	Suspension	Spleen	Mouse	Adult	Aneuploid	Hemoglobin	Scher et al., 1971
GH1, GH2, GH3	Epithelioid	Pituitary tumor	Rat	Adult		Growth hormone	Buonassisi et al., 1962; Yasamura et al., 1966
H4-11-E-C3	Epithelial	Hepatoma	Rat	Adult	Aneuploid	Tyrosine aminotransferase	Pitot et al., 1964
HeLa	Epithelial	Cervix	Human	Adult	Aneuploid	G6PD Type A	Gey et al., 1952
HeLa-S3	Epithelial	Cervix	Human	Adult	Aneuploid	High plating efficiency; will grow well in suspension	Puck & Marcus, 1955
HEP-G2	Epithelioid	Hepatoma	Human	Adult	Aneuploid	Retains some microsomal metabolizing enzymes	Knowles et al., 1980
HL-60	Suspension	Myeloid leukemia	Human	Adult	Aneuploid	Phagocytosis	Olsson & Ologsson, 1981
HT-29	Epithelial	Colon	Human	Adult	Aneuploid	Neotetrazolium Blue reduction	
K-562	Suspension	Myeloid leukemia	Human	Adult	Aneuploid	Differentiation inducible with NaBt	Fogh & Trempe, 1975
L1210	Lymphocytic		Mouse	Adult	Aneuploid	Hemoglobin	Andersson et al., 1979a,b
L929	Fibroblast		Mouse	Adult	Aneuploid	Rapidly growing; suspension	Law et al., 1949
LS	Fibroblast		Mouse	Adult	Aneuploid	Clone of L-cell	Sanford et al., 1948
MCF-7	Epithelial	Pleural effusion from breast tumor	Human	Adult	Aneuploid	Grow in suspension; derived from L929	Paul & Struthers, personal communication
MCF-10	Epithelial	Fibrocystic mammary tissue	Human	Adult	Aneuploid	Estrogen receptor +ve, domes, α -lactalbumin	Soule et al., 1973
MOG-G-CCM	Epithelioid	Glioma	Human	Adult	Aneuploid	Dome formation	Soule et al., 1990
P388D1	Lymphocytic		Mouse	Adult	Aneuploid	Glutamyl synthetase	Balmforth et al., 1986
S180	Fibroblast		Mouse	Adult	Aneuploid	Grow in suspension	Dawe & Potter, 1957; Koren et al., 1975
SK/HEP-1	Endothelial	Hepatoma, endothelium	Human	Adult	Aneuploid	Cancer chemotherapy screening	Dunham & Stewart, 1953
WEHI-3B D+	Suspension	Marrow	Mouse	Adult	Aneuploid	Factor VIII	Heffelfinger et al., 1992
ZR-75-1	Epithelial	Ascites fluid from breast tumor	Human	Adult	Aneuploid	IL-3 production	Nicola, 1987
						ER-ve, EGFr+ve	Engel et al., 1978

MCF-7

Cell line: MCF-7

Cell type: human breast adenocarcinoma

DSMZ no.: ACC 115

Origin: established from the pleural effusion of a 69-year-old Caucasian woman with metastatic mammary carcinoma (after radio- and hormone therapy) in 1970; cells were described of being positive for cytoplasmic estrogen receptors and having the capability to form domes

References: Soule et al., J Natl Cancer Inst 51: 1409-1413 (1973), PubMed ID [4357757](#)

Depositor: obtained from ATCC (HTB 22), Rockville, Maryland, USA

DSMZ Cell Culture Data

Morphology: epithelial-like cells growing as monolayers

Medium: 90% RPMI 1640 + 10% FBS + MEM non-essential amino acids + 1 mM sodium pyruvate + 10 µg/ml human insulin

Subculture: split confluent culture 1:2 to 1:4 every 2-6 days using trypsin/EDTA; seed out at ca. $0.1-0.2 \times 10^5$ cells/cm²

Incubation: at 37 °C with 5% CO₂

Doubling time: ca. 50 hours (range 30-72 hours)

Harvest: about $20-25 \times 10^6$ cells/175 cm²

Storage: frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about $1-2 \times 10^6$ cells/ampoule

DSMZ Scientific Data

Mycoplasma: negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays

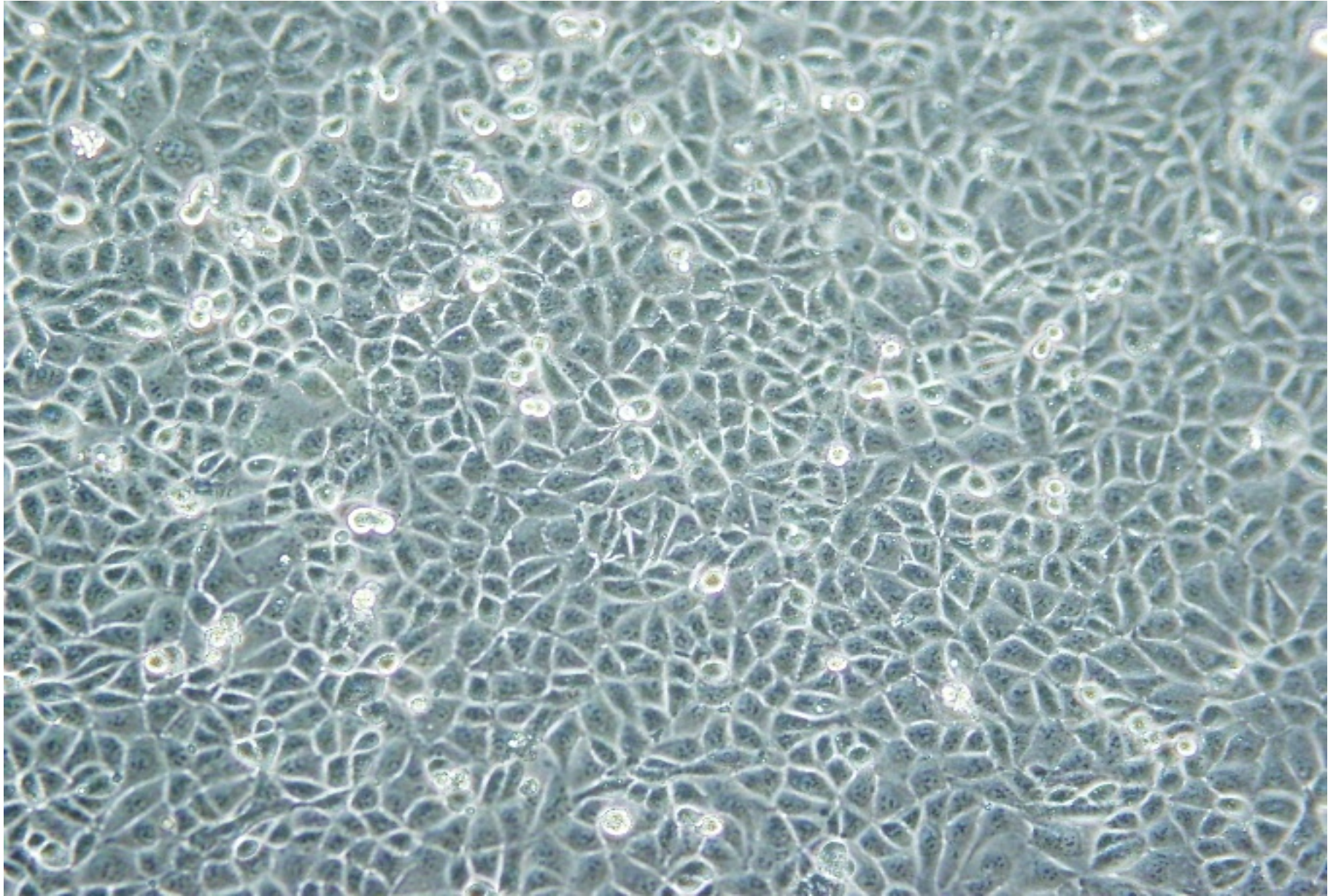
Immunology: cytokeratin +, cytokeratin-7 -, cytokeratin-8 +, cytokeratin-17 -, cytokeratin-18 +, desmin -, endothel -, GFAP -, neurofilament -, vimentin -

Fingerprint: multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile

Species: confirmed as human with IEF of AST, MDH

Cytogenetics: human hypotetraploid karyotype with 8% polyploidy - 86(80-87)<4n>XX, -X, -X, -1, -1, +6, +7, -9, -10, -10, -12, -13, -13, +14, -17, -17, -18, -18, -20, -20, -20, -22, +6-8mar, add(X)(q27), add(2)(q35-37)x1-2, add(5)(p15), del(6)(q25)x1-2, add(7)(p11), add(7)(p14;hsr), add(10)(q23), del(11)(q21q23), add(15)(p11), i(15q), add(16)(q24), add(19)(q13), add(19)(p13)x1-2 - corresponds to published karyotype

Molec. Genetics:



%100 yüzey kaplaması yapmış MCF 7 hücreleri

L-929

Cell line: L-929

Cell type: mouse connective tissue fibroblast

DSMZ no.: ACC 2

Origin: established from the normal subcutaneous areolar and adipose tissue of a male C3H/An mouse; used as target in TNF detection assays

References: Earle, J Natl Cancer Inst 4: 165-212 (1943),
Sanford et al., J. Natl. Cancer Inst. 9: 229-246 (1948),

Depositor: Dr. H. G. Drexler, DSMZ, Braunschweig, Germany

DSMZ Cell Culture Data

Morphology: fibroblasts growing as monolayer

Medium: 90% RPMI 1640 + 10% FBS

Subculture: split confluent cultures 1:5 to 1:10 using trypsin (do not use trypsin/EDTA); after 2-3 days monolayer will be confluent; split 2-3 times a week; seed out initially at about $1.0\text{-}2.0 \times 10^6$ cells/25 cm²

Incubation: at 37 °C with 5% CO₂

Doubling time: ca. 21-24 hours

Harvest: ca. $4\text{-}8 \times 10^6$ cells/25 cm²

Storage: frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about $1\text{-}2 \times 10^6$ cells/ampoule

DSMZ Scientific Data

Mycoplasma: negative in DAPI, microbiological culture, PCR assays

Immunology:

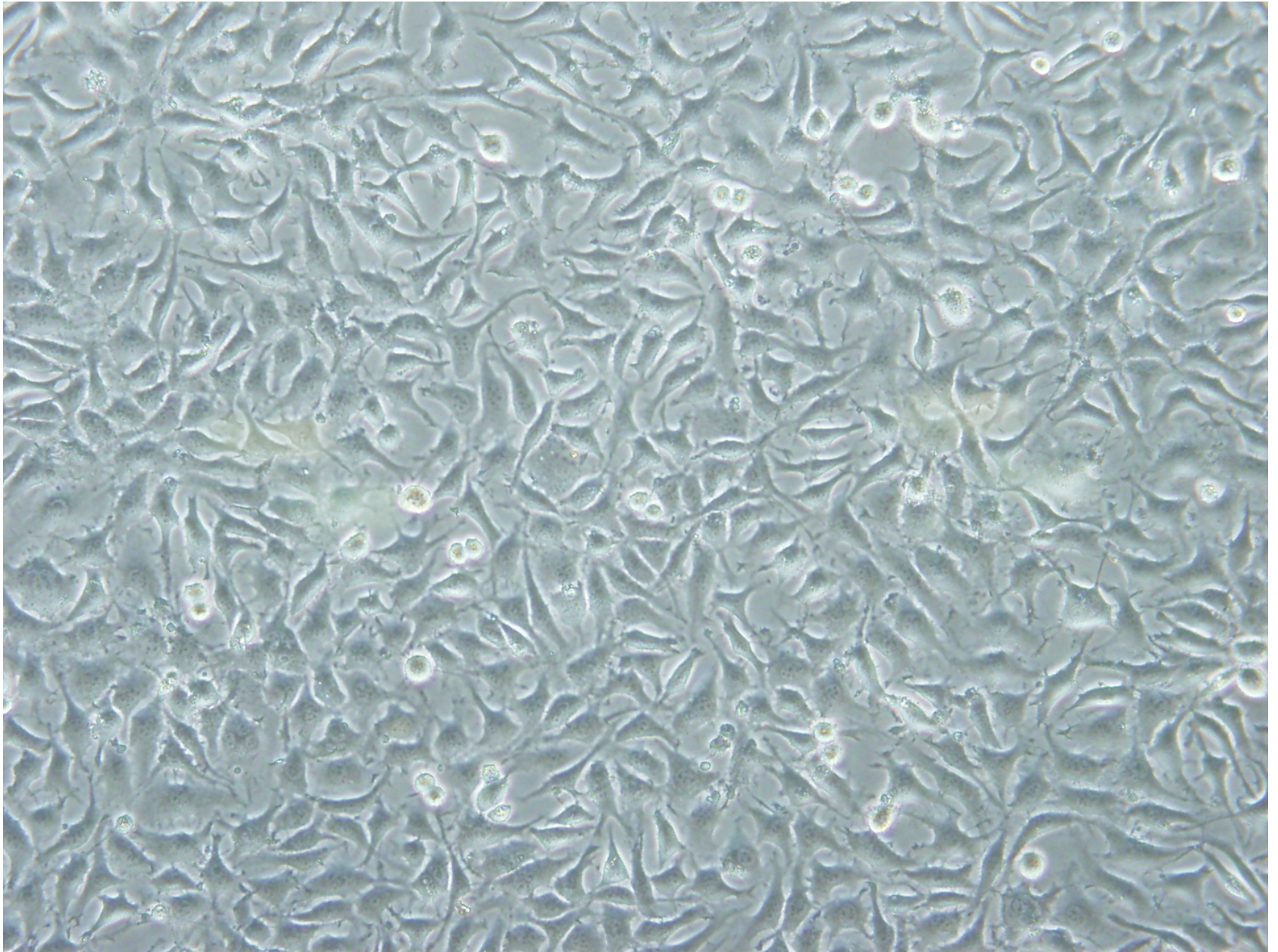
Fingerprint:

Species: confirmed as mouse with IEF of AST, MDH, PEP B and by species PCR

Cytogenetics: murine hypertriploid karyotype - 61-67, 12-16 centric fusion markers present

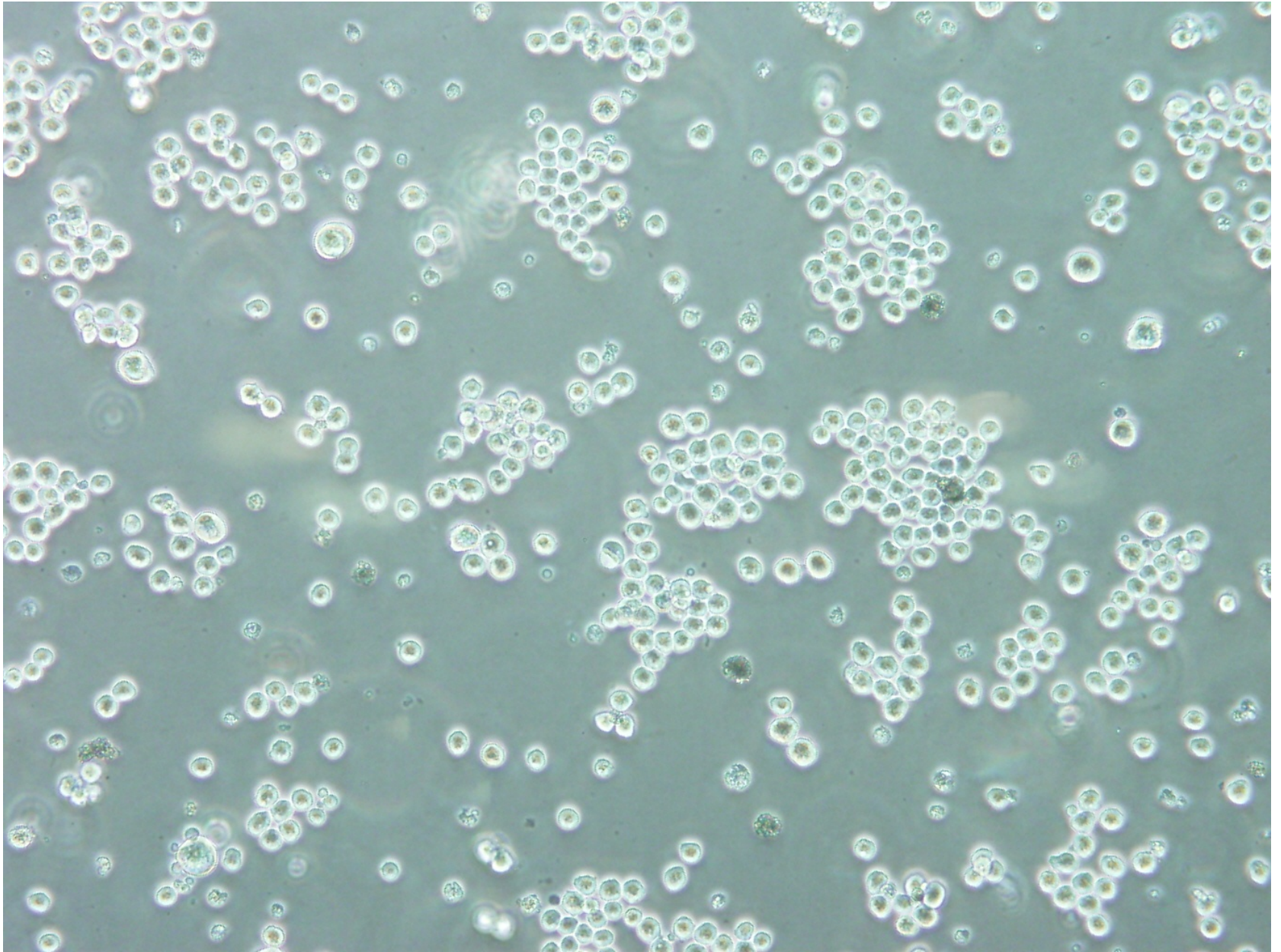
Molec. Genetics:

Viruses: ELISA: reverse transcriptase negative



48 Ssaatlik L-929 HÜCRELERİNİN MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ

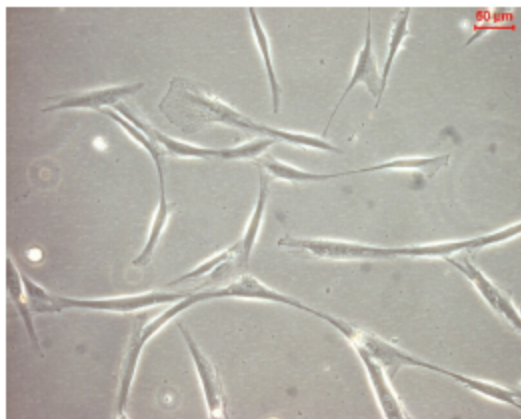
X63AG8.653	
Cell line:	X63AG8.653
Cell type:	mouse myeloma
DSMZ no.:	ACC 43
Origin:	X63AG8.653 is a non-secreting clone derived from P3X63AG8 (a Balb/c myeloma) and is recommended as fusion parent for production of hybridomas
References:	Kearny et al., J Immunol 123: 1548-1550 (1979), PubMed ID 113458
Depositor:	Dr. J. Wehland, GBF, Braunschweig, Germany
DSMZ Cell Culture Data	
Morphology:	single, round, large cells in suspension
Medium:	90% Dulbecco's MEM or RPMI 1640 + 10% FBS
Subculture:	maintain at 0.1-1.0 x 10 ⁶ cells/ml; optimal split ratio of 1:10 to 1:20 every 48 hours; seed out at about 1 x 10 ⁶ cells/ml
Incubation:	at 37 °C with 5% CO ₂
Doubling time:	about 30-50 hours
Harvest:	maximal density of ca. 1.5-2.0 x 10 ⁶ cells/ml
Storage:	frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about 5 x 10 ⁶ cells/ampoule
DSMZ Scientific Data	
Mycoplasma:	negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays
Immunology:	
Fingerprint:	unique Hinf I-(gtg) ₅ DNA profile
Species:	confirmed as mouse with IEF of LDH, MDH, NP
Cytogenetics:	
Molec. Genetics:	
Viruses:	ELISA: reverse transcriptase positive



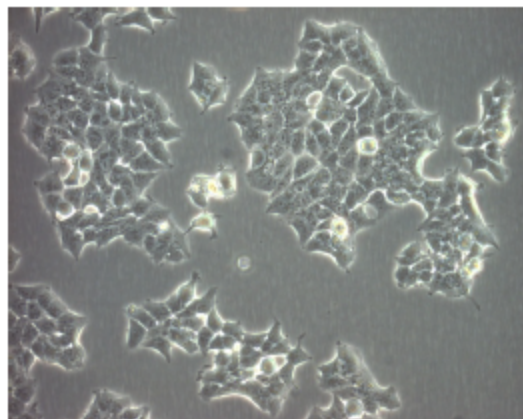
48 SAATLİK X63AG8.653 HÜCRELERİNİN MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ

Cell morphologies vary depending on cell type

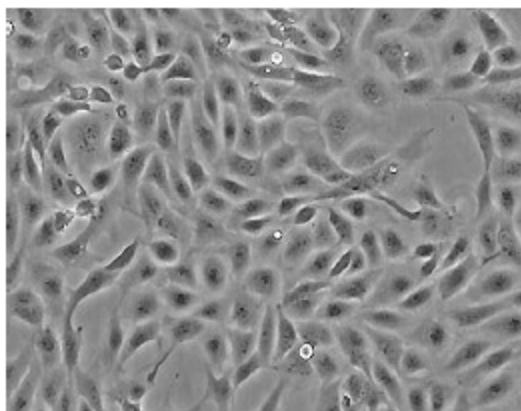
Fibroblastic



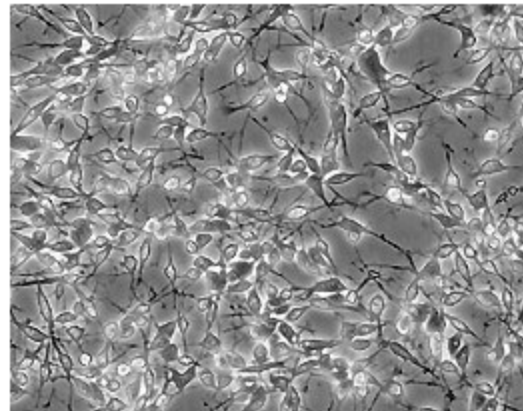
Epithelial



Endothelial



Neuronal



HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE ÜREME EĞRİLERİ

1. Lag Fazı : Hücrenin pasajlanmasından sonraki subkültürü takip eden evredir.

Bu evre hücrelerin ortama alışma evresidir.

DNA polimeraz ve hücresel proteinlerin miktarında artış olur.

HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE ÜREME EĞRİLERİ

2. Log Üreme Fazı : Logaritmik üreme evresidir.

Hücrelerin geometrik artış gösterdikleri fazdır.

Bu evrede üreme yoğunluğu % 90-100 ulaşır.

Hücrelerin canlılık oranıda en yüksek seviyededir.

HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE ÜREME EĞRİLERİ

3. Plato (Durgunluk) Fazı : Logaritmik fazın sonuna doğru kültürler **konfulent** **hale** gelmeye başlarlar. Artık kültür kabının tüm yüzeyini kaplarlar. Bu durumu takiben hücrelerin büyüme oranı düşer. Bu fazda üreyen hücre sayısı ölen hücre sayısı ile aynı olduğundan toplam hücre kütlesi zamana bağlı kalmadan aynı kalır.

HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE ÜREME EĞRİLERİ

4. Litik Faz : Durgunluk fazının sonunda besiyerindeki canlı hücre sayısı veya hücre kütlesinin zamana bağlı olarak azaldığı gözlenir.

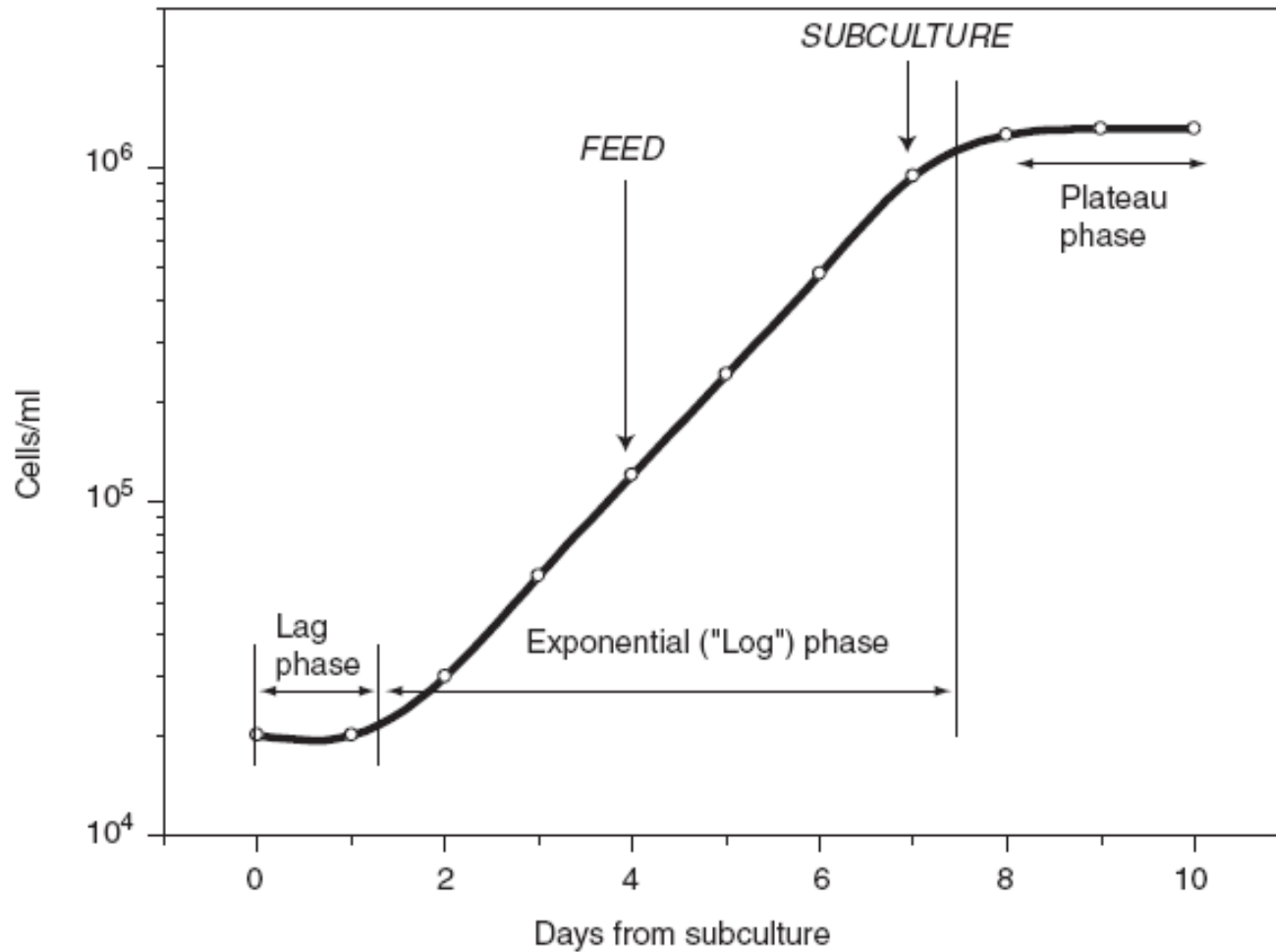


Fig. 13.2. Growth Curve and Maintenance. Semilog plot of cell concentration versus time from subculture, showing the lag phase, exponential phase, and plateau, and indicating times at which subculture and feeding should be performed (see also Section 21.9.2 and Fig. 21.6).

SUBKÜLTÜR DE ÜREME EĞRİSİ

KÜLTÜRÜN RUTİN BAKIMI

İster primer kültür ister subkültür olsun
eğer kültür hücrelerinde **proliferasyon varsa**
hücrelerin periyodik medyumunun değişimine
veya beslemeye ihtiyaç vardır.

KÜLTÜRÜN RUTİN BAKIMI

Proliferasyonu olmayan kültürlerde de hücreler periyodik medyum değiştirilmesine ihtiyaç duyarlar. Çünkü hücreler medyumun bazı bileşenlerini ve tüketmiş yada azaltmış olabilir.

Sonuçta **hücrelerin büyüme oranına göre hücreler ya transforme olur yada medyum değiştirilir.**

KÜLTÜRDE MEDYUM DEĞİŞTİRME

Üremiş hücre kültürünün devam etmesi için hücrelerin beslenmesi gereklidir. Buda **besiyerlerinin değiştirilmesi** ile olur. Besiyerine değiştirme hücrenin türüne göre değişmekle **birlikte 1 haftalık kültürde 2-3 günde bir** yapılır.

Besiyerinin değiştirilmesine ilişkin ilk ve en önemli sinyal **ortam pH sınırın düşmesi** ve buna bağlı olarakta **besiyeri renginin değişmesidir**. Eğer medyum **rengi kırmızıdan oranja ve sarı renge geçerse** **değiştirilmelidir**.

pH: 7'den pH:6.5 düştüğünde hücrelerde büyüme durur ve pH: 6 ile pH: 6.5 arasında hücreler canlılığını kaybetmeye başlarlar.

Kültür de pH:7 den günde 0.1 ünite pH düşerse hücre açısından zararlı olmaz.

0.4 ünite pH düşerse medyum 24 ile 48 saat arasında değiştirilmelidir.

Hücre Konsantrasyonu yüksek olduğu kültürlerde medyum daha hızlı kullanılır. Bu faktör pH değişimini etkiler. Bu nedenle de besiyeri daha kısa sürelerde değiştirilir.

Besiyeri değiştirme açısından **hücre tipi** önemlidir. Çünkü normal hücrelerde hücre yoğunluğu yüksek olduğundan besiyerinde bölünme faktörleri azalır ve besiyeri değişmezse **bölünme durur.**

SUBKÜLTÜRDE HÜCRE KONSANTRASYONU

Genel kural olarak subkültürde hücrenin büyüme eğrisi dikkate alınarak hücre sayısı 1.10^4 ile 5.10^4 hücre/ml arasında olduğu belirlenmiştir.

HÜCRE MORFOLOJİSİ

Hücre kültüründe hücrelerde kötüleşme, mikrobiyal kontaminasyon, serum ve medyumda toksiklik yada yetersizlik gibi birçok problemle karşılaşılabılır.

HÜCRE MORFOLOJİSİ

Bir kültürdeki hücrelerin bozulmasının ilk belirtisi genellikle **hücrelerin morfolojik karakterindeki** değişiklikleridir. Morfolojik gözlem hücrelerin en basit ve direkt inceleme yöntemidir. **Mikroskopla hücrenin morfolojik durumu** değerlendirilir.

HÜCRE MORFOLOJİSİ

Kültür kabındaki hücrelerin **stoplazmik boşluklarına, nukleustaki granüllerine, hücrelerin yuvarlaklığına ve kültür kabında yüzeyden ayrılmasına** bakılır.

Yapışma

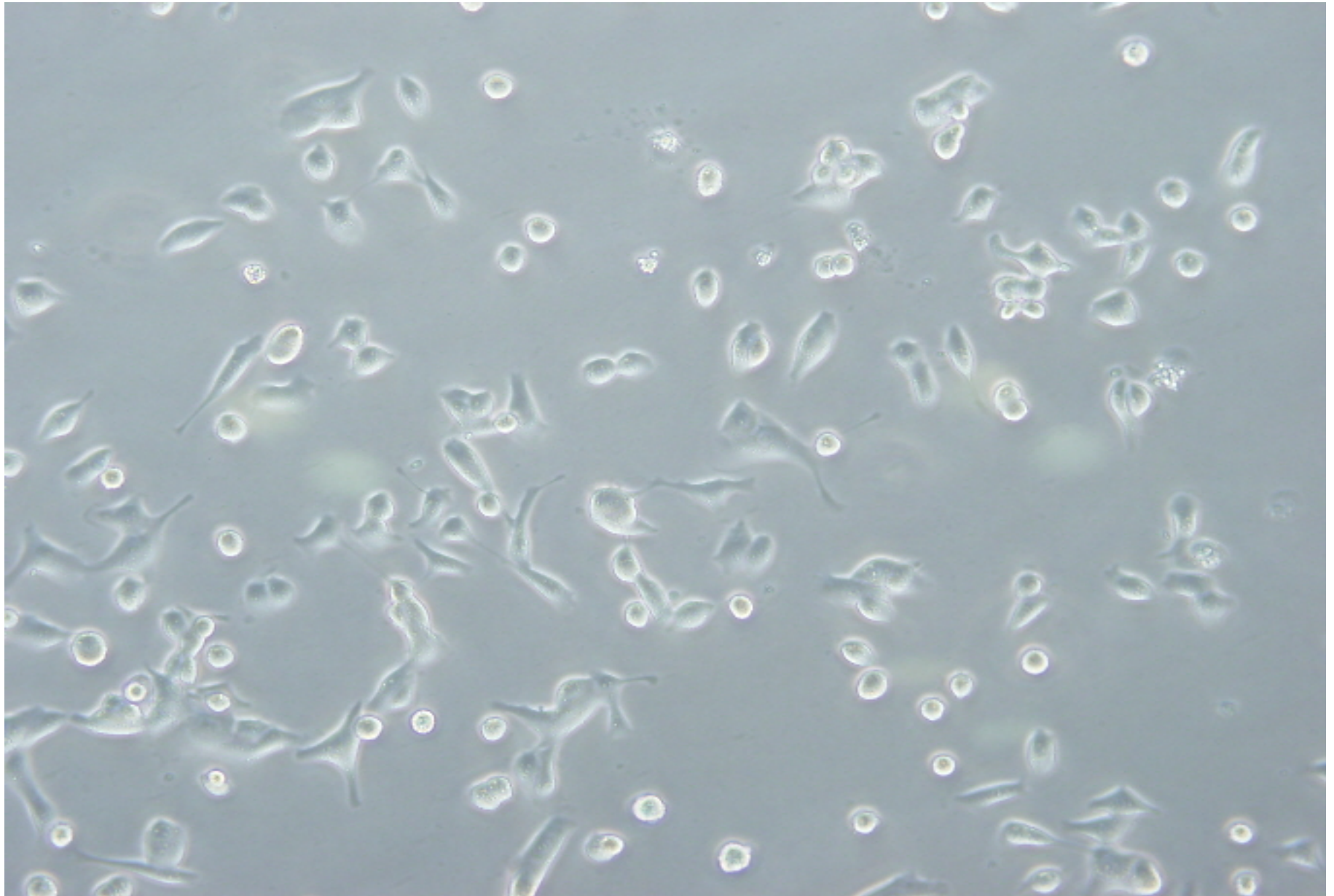
Fazı

Süspanse haldeki bu serbest veya yuvarlak hücreler katı yüzey ile temasa geldiğinde buraya yapışır.

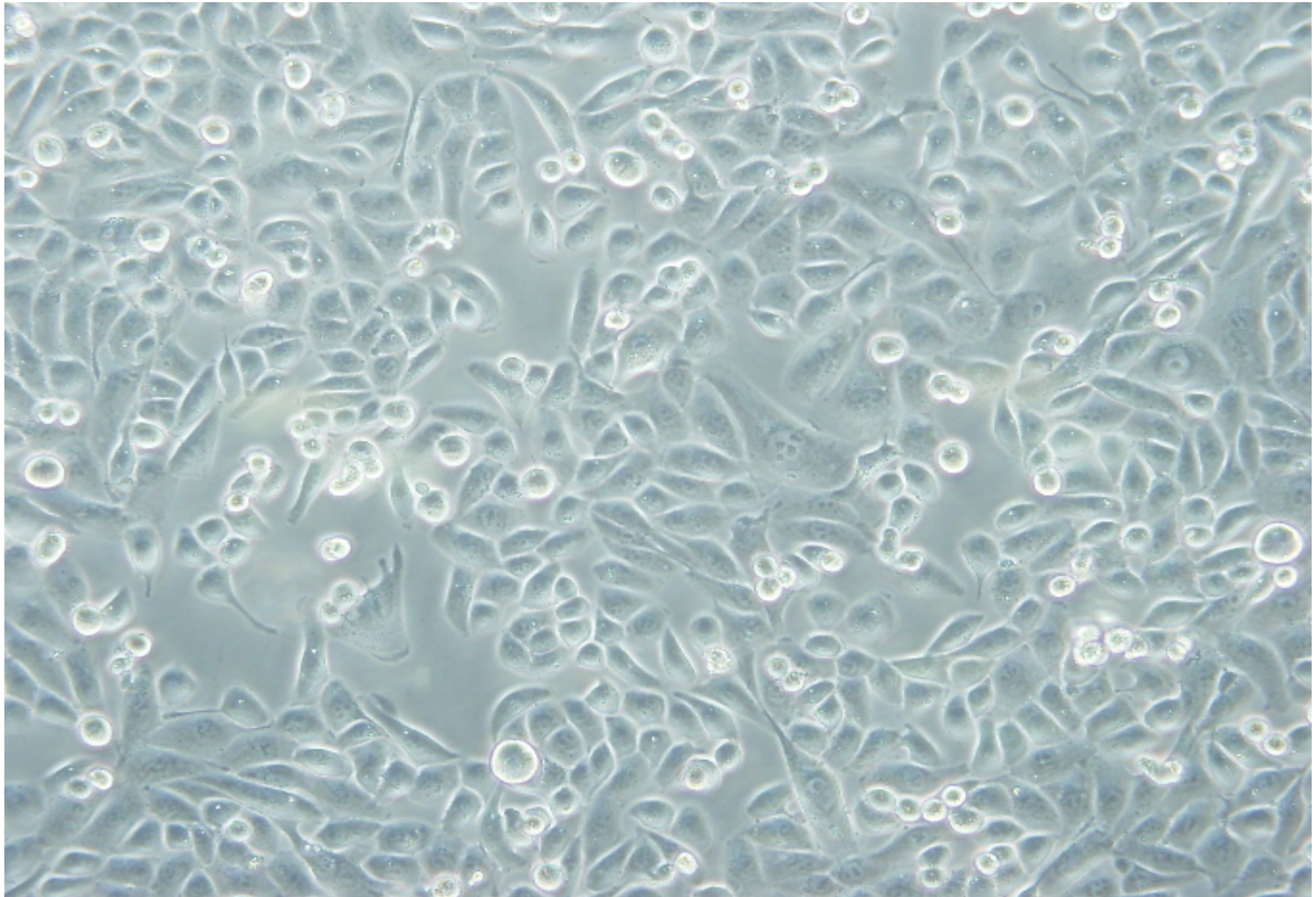
Hücrenin yapısına göre poligonal veya fusiform şekle dönüşürler. Bu yapışma esnasında hücre çoğalması olmaz ancak mitoz için hazırlanmaya başlar ve oldukça yüksek metabolik aktivite gösterirler. Süspanse haldeki hücre 37°C de 2 saat içinde katı yüzeye yapışır

Dejenerasyon Fazı

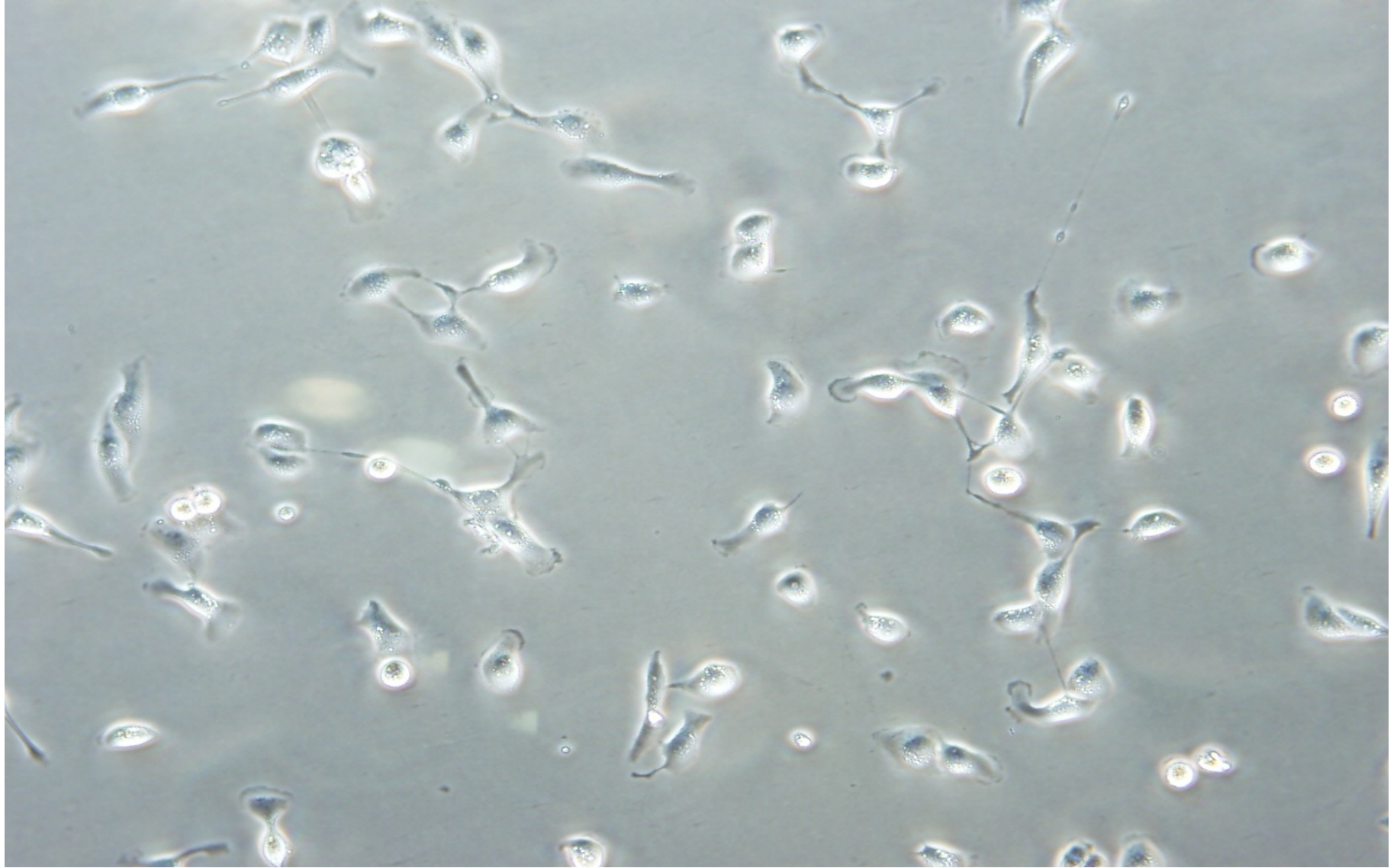
İnvitro kültürü yapıp çoğaltılan hücreler bir süre sonra ya gerekli maddelerin besiyerinde kullanılarak azalmasından veya aşırı toksik katabolitlerin ortamda birikmesinden dolayı **dejenere** olurlar.



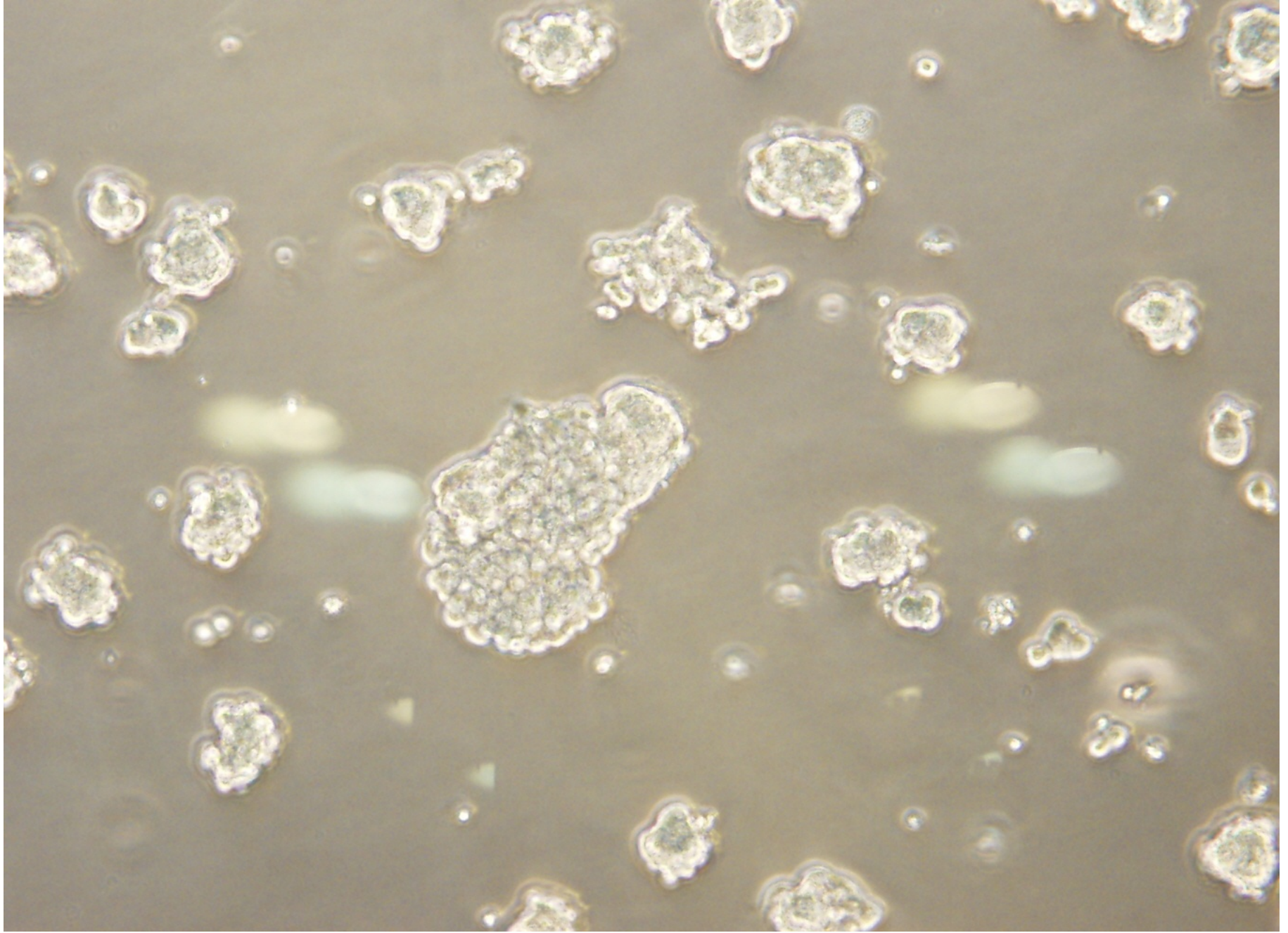
31.01.07 MCF 7 FCS (-)



31.01.07 MCF 7 FCS (+)



Morfolojisi bozulmuş sağlıksız MCF 7 Hücresleri



Toksik ajanlarla muamele edilmiş MCF 7 hücreleri

MONOLAYER

VE

SÜSPANSİYON

KÜLTÜRLERDE

PASAJLAMA

Monolayer hücreler üreyebilmeleri için tutunacakları bir yüzeye ihtiyaç duyarlar.

Bu nedenle de yüzeye bağımlı bir yoğunluk sınırlaması vardır.

Hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılmaları gerektiği için pasajlama tripsinizasyon ile birlikte yapılır.

MONOLAYER

VE

SÜSPANSİYON

KÜLTÜRLERDE

PASAJLAMA

Süspanse hücreler ise **gaz alışverişinin ve besin maddelerinin transferinin** yeteri kadar sağlanabildiği bir medyum içersinde üreyebilirler.

Süspanse kültürlerde pasajlama **medyum santrifüjle uzaklaştırıldıktan sonra hücre sayısı belirlenir ve taze besiyeri ilavesiyle hücre uygun hücre konsantrasyonu** oluşturabilecek oranda dilüe edilmesiyle yeni kaplara bölünür.

HÜCRE PASAJLAMASI

- 1) Hücreler pasajlanabilmeleri için hücre kültür petrilerinin yüzeyini tamamen kaplamış olmalıdır. Böyle petrilere 'konfluent petriler' denir.
- 2) Konfluent petrilerin üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır.
- 3) Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkanır,
- 4) PBS aspire edilerek uzaklaştırılır.Hücreler inkübatörde tripsinle 5 dakika inkübe edilir.

100 mm petri için 2 ml tripsin

6 mm petri için 1 ml tripsin

35 mm petri için 0,5 ml tripsin uygulanır.

***Farklı hücre tiplerinin tripsine duyarlılığı farklıdır. Bu yüzden tripsin uygulanan hücrelerden bazıları 5 dakikadan daha az sürede petri yüzeyinden ayrılabilir. Mikroskopta aralıklarla kontrol edilmelidir.

- 5) Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edilir.

***100 mm petri için 2 ml tripsin 4 ml besiyeri

6 mm petri için 1 ml tripsin 2 ml besiyeri

35 mm petri için 0,5 ml tripsin 1ml besiyeri uygulanır.

***Farklı hücre tiplerinin tripsine duyarlılığı farklıdır. Bu yüzden tripsin uygulanan hücrelerden bazıları 5 dakikadan daha az sürede petri yüzeyinden ayrılabilir. Mikroskopta aralıklarla kontrol edilmelidir.

5) Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edilir.

***100 mm petri için 2 ml tripsin 4 ml besiyeri

6 mm petri için 1 ml tripsin 2 ml besiyeri

35 mm petri için 0,5 ml tripsin 1ml besiyeri uygulanır.

6) Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilir ve bir falkon tüpe aktarılır. Tüpe 2-3 ml daha medyum ilave edilir.

7) Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (1000-1500 rpm 5 dakika), süpernatant uzaklaştırılır.

8) Hücreler 1 ml besiyerinde sulandırılır ve sayılırlar.

9) Petrilere ekimler yapılır.

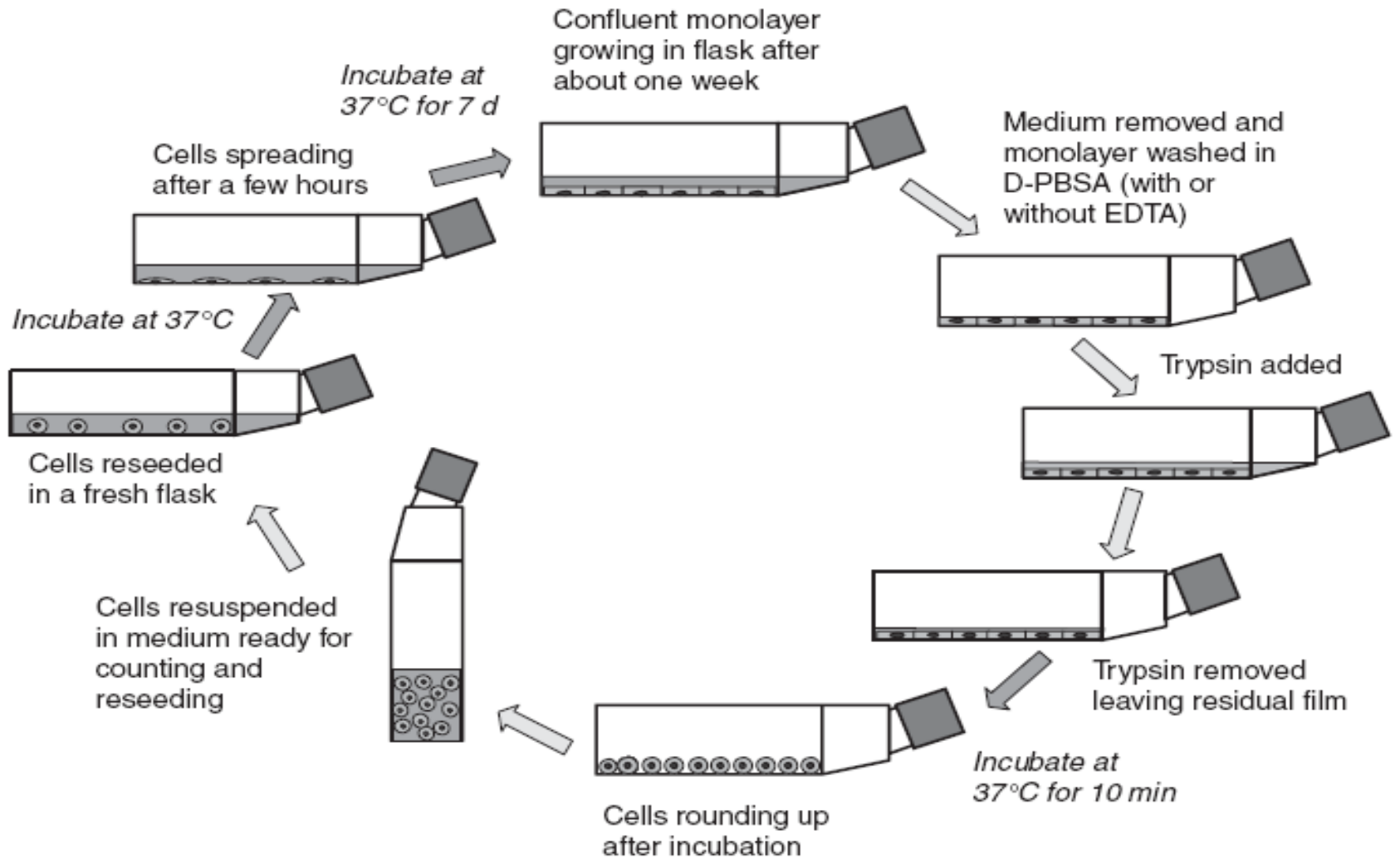


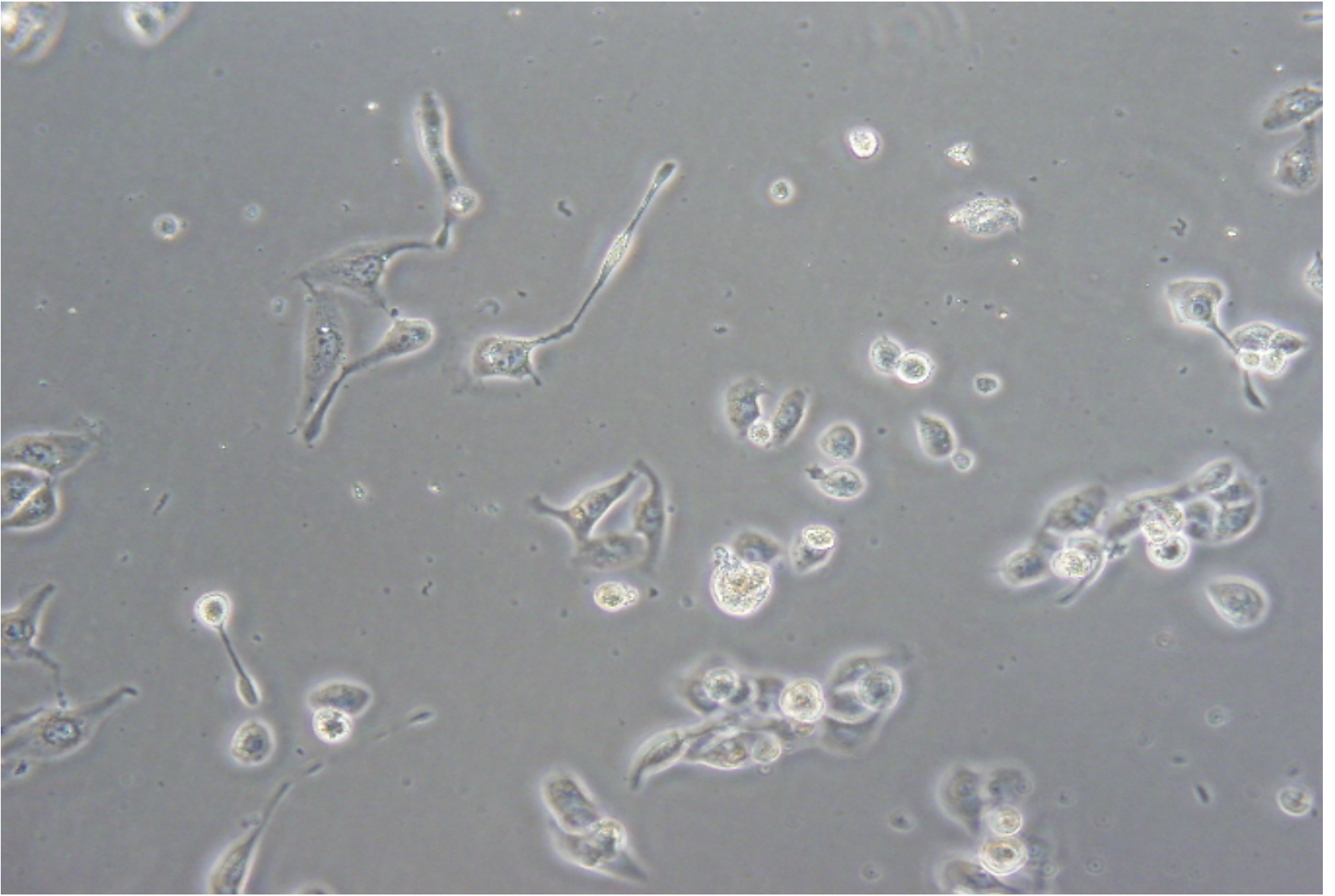
Fig. 13.3. Subculture of Monolayer. Stages in the subculture and growth cycle of monolayer cells after trypsinization (see also Plates 4, 5).

MONOLAYER ÜREYEN BİR KÜLTÜRÜN TRİPSİNİZASYONU

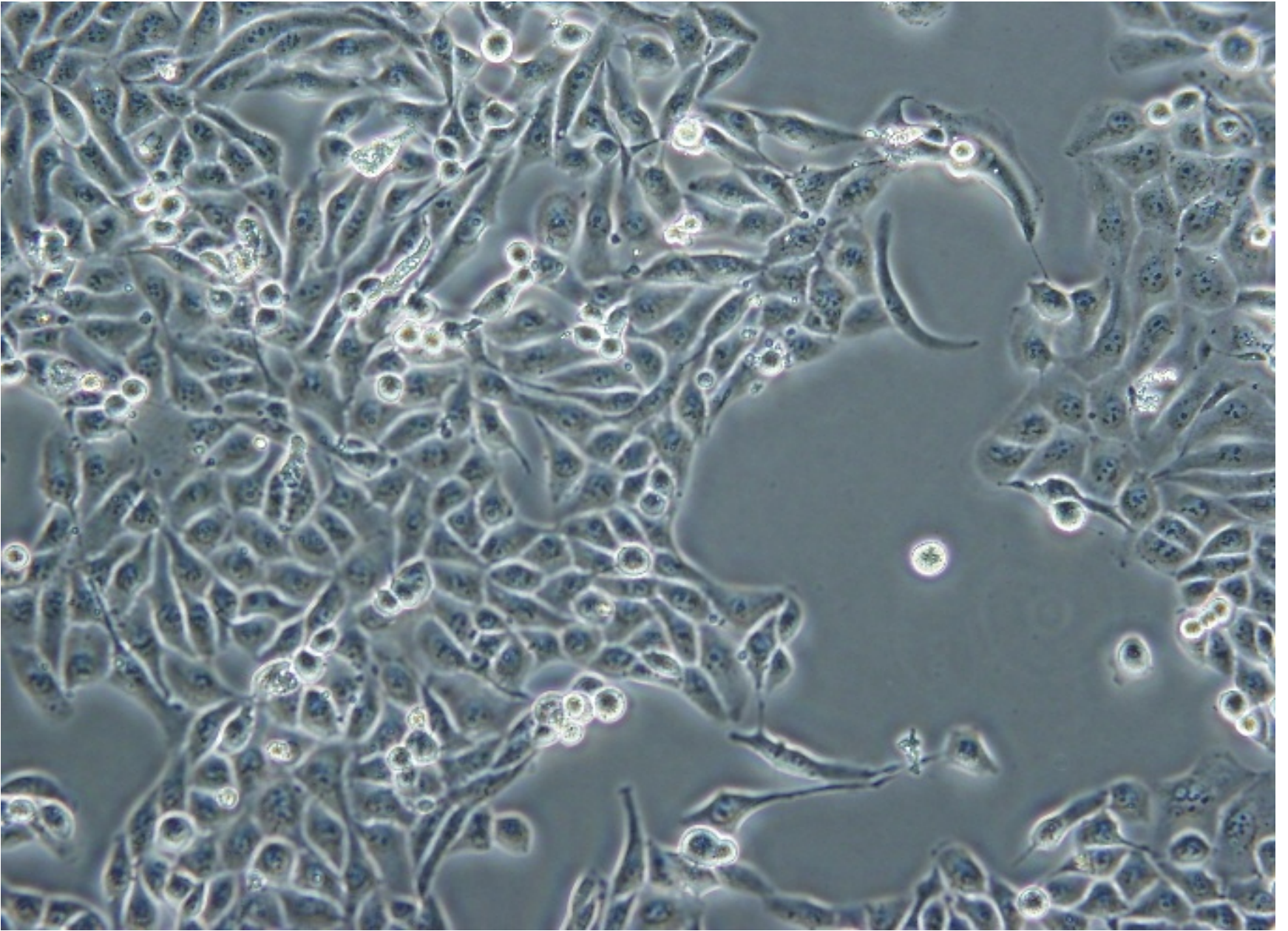
Tripsinin alternatifleri olarak **proteaz, pronaz, dispaz ve kollagenazdan** biri kullanılabilir.

Bunlar arasında proteaz ve pronaz en etkili olanıdır fakat bazı hücreler için toksik olabilir.

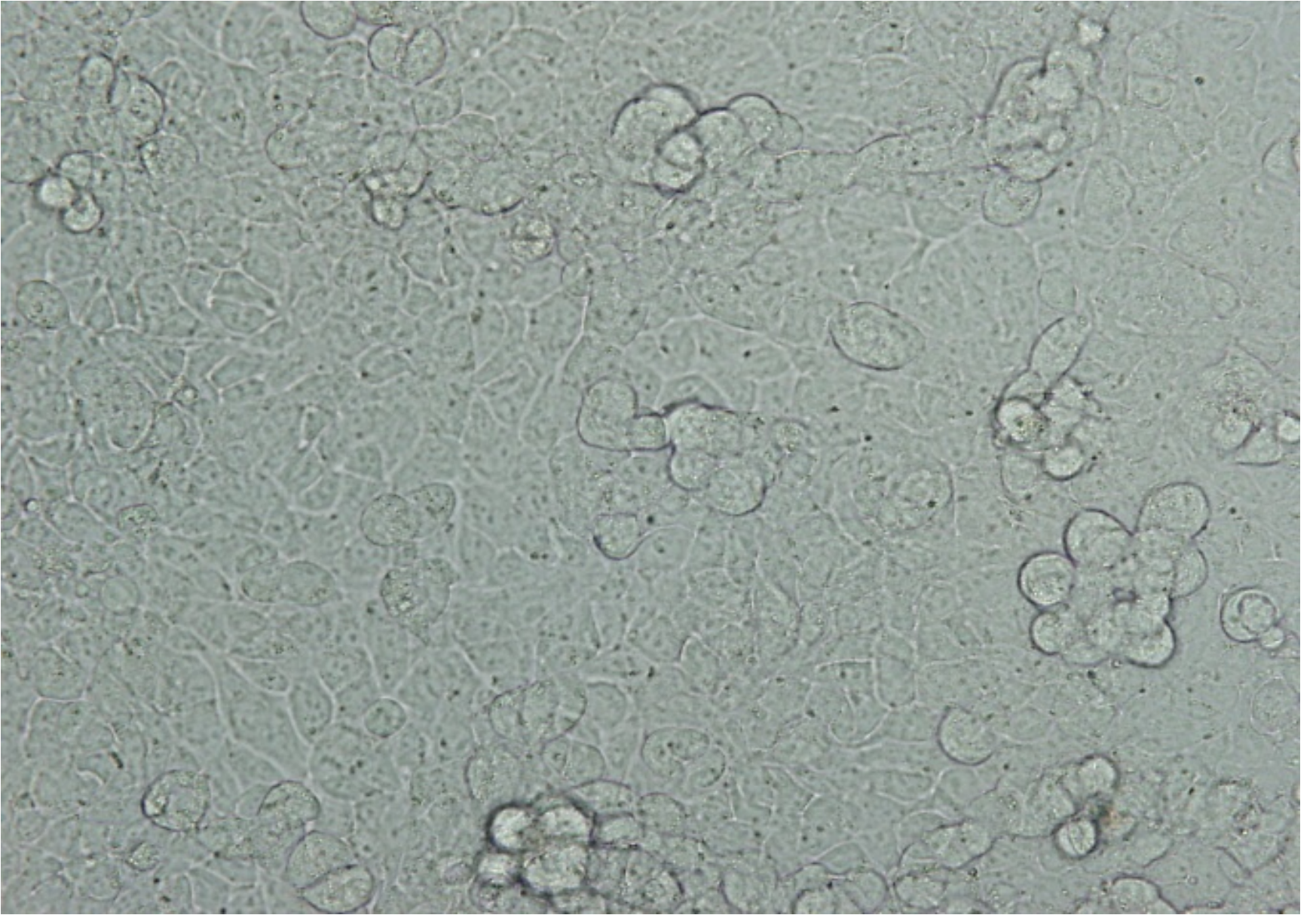
Dispaz ve kollagenaz tripsinden daha az toksiktir fakat daha çok epitelial tarzı hücreleri ayırır.



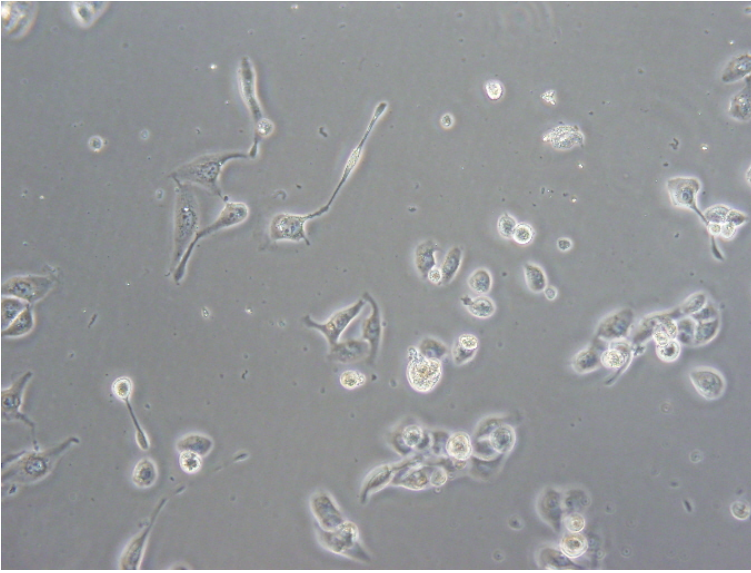
**MCF 7 Hücrelerinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü
(20X)**



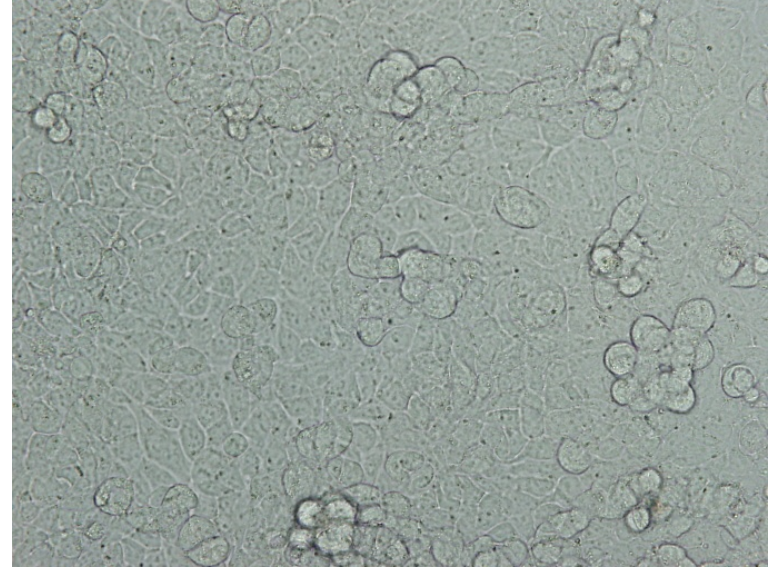
MCF 7 Hücrelerinin 7.gündeki mikroskopik görüntüsü (20X)



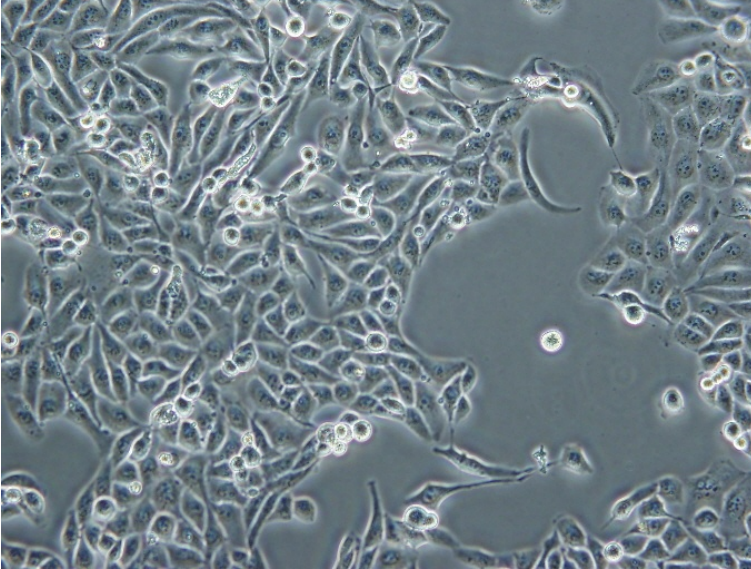
MCF 7 Hücrelerinin 9. günü mikroskopik görüntüsü (40X)



24 saat



9. gün



7. gün