
KRİYOPREZERVASYON

KRİYOJENİK DEPOLAMA

- ✓ Sonsuz hücre hatlarının pasaj numaraları arttıkça genellikle stabiliteleri azalmaktadır.
- ✓ Bu yüzden hücreler ile çalışırken stok hazırlamak ve bu stokları kriyojenik olarak depolamak gereklidir.

HÜCRELERİN DONDURULARAK SAKLANMASI

- Hücre hatlarının kültür ortamında sonsuza kadar devam ettirilmesi mümkün değildir.
- İn vitro kültivasyon nedeniyle özelliklerinde bazı değişiklikler oluşur.
- Bu ve buna benzer istenmeyen ve özellikle geri dönüşümü olmayan değişiklikler ve bozulmalarla karşılaşmamak için **hücrelerin kısa veya uzun süreli stoklanması** gerekir.

HÜCRELERİN DONDURULARAK SAKLANMASI

- Hücre kültürlerinin dondurularak saklanması konusundaki çalışmalar 18. yüzyılda başlamıştır.
- Reaumur (1736) ve Spalanzani (1787) böcek ve hayvan sperm ve ovumunu dondurarak saklamayı denemişler ancak başarılı olamamışlardır.
- Daha sonra 1949’ da Polge ve arkadaşları kriyoprotektan olarak **gliserol** kullanmış ve sperm hücrelerini düşük ısılarda saklamayı başarmışlardır.

HÜCRELERİN DONDURULARAK SAKLANMASI

- Bu konudaki çalışmalar çeşitli kriyoprotektanların kullanımı, dondurma proseslerindeki değişiklikler, farklı sıcaklıkların, hücre yoğunluklarının denenmesi gibi alternatif yöntemlerle sürdürülmüştür.
- Günümüzde her ne kadar temel prensipler belirlenmiş ise de bazı özel hücreler için alternatif yöntem arayışları halen sürdürülmektedir.

HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN STOKLANMASININ YARARLARI

1. Değerli hücre hatlarının korunabilmesi;
2. Pasaj sayısının ilerlemesine bağlı fenotipik değişimlerin önlenmesi;
3. Çalışmalar sırasında güvenli geriye dönebilme olasılığı;
4. Aynı pasaj seviyesindeki hücre toplulukları ile değişik zamanlarda çalışabilme olanağı.

HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN SAKLANMA KOŞULLARI

Sıcaklık		Kültür Şartları		Süre
>0 °C	Oda sıcaklığı (20-22 °C)	Taze besi ortamı (üretme vasatı)	Monolayer kültür	1 hafta
			Süspanse kültür	1-2 saat
	4-10 °C	Monolayer kültür		>24 saat
		Süspanse kültür		1 hafta
< 0 °C	-70 -86 °C	Kriyoprotektan kullanılarak		6 ay- 5 yıl
	< -150 °C	Kriyoprotektan kullanılarak		x

- Hücrelerin uzun süre saklanabilmesi için en uygun yöntem **– 130 ^{0}C in altında dondurma** işlemidir.
- Böylece **biyolojik stabiliteleri** sağlanabilir.
- Bu amaçla **sıvı azot içinde saklama metodu** uygun ve önerilen tekniktir.
- Genellikle **logaritmik üreme fazında** ki aktif hücre kültürleri dondurulur.

- Dondurma sırasında **dimetilsulfoksit (DMSO)** yada **gliserol** gibi **kriyoprotektanlar** kullanılır.

- Bunlar **suda eriyebilen maddelerdir.**

- Donma sürecinde oluşan **buz kristali miktarını ve elektrolit konsantrasyonundaki artışı kontrol** eder, optimal değerlerin üzerine çıkmasını engeller.

- Bir hücre süspansiyonu dondurulmak üzere soğutulmaya başlanıldığında **hücre dışı sıvıda ki erir madde konsantrasyonu hızla artar**.
- Plazma membranının bir tarafından diğer tarafına doğru osmotik gradient oluşumuna neden olur.
- Plazma membranının yarı geçirgen yapısından dolayı, bu gradienti dengelemek üzere **hücre dışına doğru bir su akışı** gerçekleşir ki, bunun sonucunda **hücre büzülmeye** başlar.

- **Yavaş dondurma** işleminde buz kristalleri içermeyen büzülmüş hücreler oluştuğu için başarı şansı yüksektir.
- Büzülmeye fırsat bulamadan hücre içi buz kristallerinin oluştuğu **hızlı dondurma** yönteminde daha düşük başarı sağlanabilir.
- **Çok yavaş dondurma** yöntemlerinde ise yüksek elektrolit konsantrasyonuna bağlı plazma membranının stresi sonucu **aşırı hücre büzüşmesine bağlı yıkım** görülür.

HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN SAĞLIKLI BİR ŞEKİLDE SAKLANABİLMESİ İÇİN GEREKLİ KOŞULLAR

- **Hücre içi metabolik aktivitenin** olabildiğince **yavaşlaması** ve hatta durması gerekir.
- **pH değişimi** hücre canlılığını etkileyecek boyutta olmamalıdır.
- **Soğutma hızı** termal şoka neden olmayacak şekilde düzenlenmelidir.
- Soğuma ve çözdürme sırasında **hücre dışı ve hücre içi sıvılarda kristalleşme** dikkate alınmalıdır.
- Çözdürme sırasında **dilüsyon şoku** riskine karşı önlem alınmalıdır.

✓ **Metabolik aktivite -79 °C' nin altındaki sıcaklıklarda yavaşlar, -196 °C' de minimum düzeydedir**.

✓Madde alışverişinde önemli işlevi olan hücre membranındaki **Na-K pompasında bozulmalar başlar**.

✓ Bunun sonucu, **hücreler şişerler, membrandaki lipidlerin ve enzimlerin aktiviteleri bozulur, az çözünen materyaller presipite olur ve buna bağlı olarak pH değişiklikleri** oluşur.

✓ **Hızlı soğuma sonucu oluşan ısı kaybı termal şoka neden olur**. Bu olayın nedeni henüz kesin olarak belirlenmemiştir.

✓ Hücre içi ve dışı sıvılarda **dengesiz kristalleşme**, **hücre membranına ve hücre içi cisimciklere** zarar verir.

✓ Donma sırasında gelişen olaylar, çözülme sırasında tersine oluşur.

✓ Ekstrasellüler ortam intrasellüler ortamdan önce süzülür ve ani olarak serbest sıvı salınır, **ekstrasellüler sıvı hipotonik** karakter kazanır. Sonuçta hipotonik hücre şişerek patlar.

KRİYOPROTEKTANLAR

- Hücreler hızlı dondurulduğunda ortamdaki **tuz konsantrasyonu aniden artar** (0.15 M' den 5.2 M NaCl' e kadar yükselir).
- Hücreler osmotik basınçtaki artış sonucu **büzüşür ve ölür**.
- Soğuma sırasında ortamdaki **NaCl** soğuma hızı ile ters orantılı olarak **çevresine ısı yaymaya** başlar ve bu da hücrelere zarar verir (**termal hasar).**
- NaCl içeren ortam hızla soğutulduğunda ise (> -20 °C/dak) **hücre içi sıvıda kristelleşme görülür, hücre parçalanır, ölür.**

•

KRİYOPROTEKTANLAR

- Çözüm, **su moleküllerini bağlamak, suyun kristelleşmesini yavaşlatmak**, kristalizasyonun solutlerle eş zamanlı olmasını sağlamaktır.
- Bu da **kriyoprotektan** denilen **bağlayıcı ajanların kullanılmasıyla** mümkündür.
- Böylece, kristalizasyon hızı yavaşlar, ani osmotik basınç artışı engellenir.
- NaCl solüsyonu düşük ısılarda da **izotonik** kalır.

Dondurma sırasında kriyoprotektan kullanılmazsa tahribat nedenleri şunlardır:

- ✓ **Buz kristallerinin oluşumu**
- ✓ **Elektrolit konsantrasyonu**
- ✓ **Dehidrasyon**
- ✓ **pH değişimi**
- ✓ **Proteinlerin denaturasyonu**
- ✓ **Henüz tam olarak anlaşılmamış faktörler.**

Bu zararları önlemek için alınması gerekli tedbirler:

✓ **Kriyoprotektan ilavesi (donma noktasını düşürür)**

✓ Yavaş donma hızı (**donmadan önce hücre suyunun dışarıya çıkmasını sağlar**)

✓ -130 °C' nin altında muhafaza (**buz kristallerinin oluşumunu geciktirir**)

✓ Hızlı çözdürme (-50 ile 0 °C arası tehlikeli ısıya hızlı geçmesini sağlar).

En sık kullanılan kriyoprotektif maddeler:

- ✓**Dimetil sülfoksit (DMSO)**
- ✓**Gliserol**

DİMETİL SÜLFOKSİT (DMSO)

✓Günümüzde en çok ve güvenle kullanılan kriyoprotektan **DMSO'** dur.

✓Oda şartlarında sıvı, +4 °C'de katı haldedir.

✓DMSO; havanın neminden ve ışıktan etkilenir.

✓Bu nedenlerle koyu renkli şişelerde, az miktarlarda saklanır.

✓Hücreleri dondururken kullanılan **DMSO, hücreler donarken suyun kristalize olup hücrenin çatlamasını engeller.**

DİMETİL SÜLFOKSİT (DMSO)

✓Genellikle hücreler; **%90 serum ve %10 DMSO** içeren **kriyotüplerde**, **-196 °C'de sıvı azot** içerisinde saklanır.

✓Ancak, hücrelerin **4 °C'de 24 saat, 37 °C' de 1 saatten fazla DMSO ile temas etmemesi** gerekir.

✓Daha uzun süreli temas **toksik** etkiye neden olur.

✓DMSO' nun toksik etkisinden korunmak için bir başka önemli nokta da bu maddenin **doğrudan hücre süspansiyonu ile temas ettirilmemesidir**.

✓Hücre dondurma solüsyonu ayrıca hazırlanmalı ve hücre bu karışım üzerine eklenmelidir.

Kriyoprotektan seçimi çalışılan hücre kültürü türlerine göre de değişiklikler gösterir:

Derideki epitel hücreleri	% 20-30 gliserol
Derideki fibroblast hücreleri	% 10 gliserol
Sivrisinek hücreleri	% 1 gliserol
İnsan kan hücreleri	PVP
İnsan kök hücreleri	% 5 DMSO + %6 HES (1°C/dak)
Genel kural	**% 5-10 gliserol veya DMSO (1-10 °C/dak)**

- ✓ **Hücreler, büyüme çözeltileri %10-20 serum ve %5-10 gliserol yada DMSO iceren bir çözelti ile dondurulurlar**

HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN DONDURULMASI SIRASINDA GEÇİRDİĞİ EVRELER

A)Likit Faz

- İşleme başlanması ile donma işleminin başladığı zaman arasındaki süreçtir.
- **Hücrenin iç ve dış ortamının dengelenmesi** bu fazda gerçekleşir.

B) Faz Geçiş Zamanı

- **Donma işleminin başladığı andan, donmanın tamamlandığı** ana kadar olan süreçtir.
- Dondurma işleminin en kritik periyodudur.
- Su sıvı halden katı hale geçerken bir ısı yayar.
- Bu ısının hücreye zarar vermesi, ortam ısısının -20 ° C' ye ulaşıncaya kadar -15 ile 20 °C/dak olacak şekilde düzenlenmesi ile önlenebilir.

C) Donma Sonrası Soğutma Fazı

- Donmanın gerçekleştiği noktadan, saklama ısısına ulaşılıncaya kadar geçen süreçtir.
- Bu dönemde **-50 °C' ye kadar 5 °C/dak, -80 °C'den sonra 1-3 °C/dak** olması uygundur.
- Buradan sonra hücreler sıvı azot içerisine transfer edilebilir.

D) Depolama Fazı

✓Bu fazda önemli bir hücre hasarı oluşmaz.

✓Hücre türüne ve saklama ısınına bağlı olarak bazı değişiklikler görülebilir.

✓En az hasar **sıvı azot içerisinde (-196 °C)** dir.

✓ Hücreler bu ortamda teorik olarak **sonsuza kadar saklanabilir**.

✓Bazı araştırıcılar azot buharının daha uygun bir ortam olduğunu savunmaktadırlar.



- ✓ Hücreler sıvı azot icinde -196°C' de, bu duşuk sıcaklığa dayanacak özel plastik tüpler **(cryo tüp)** yada cam vialler icinde saklanır.





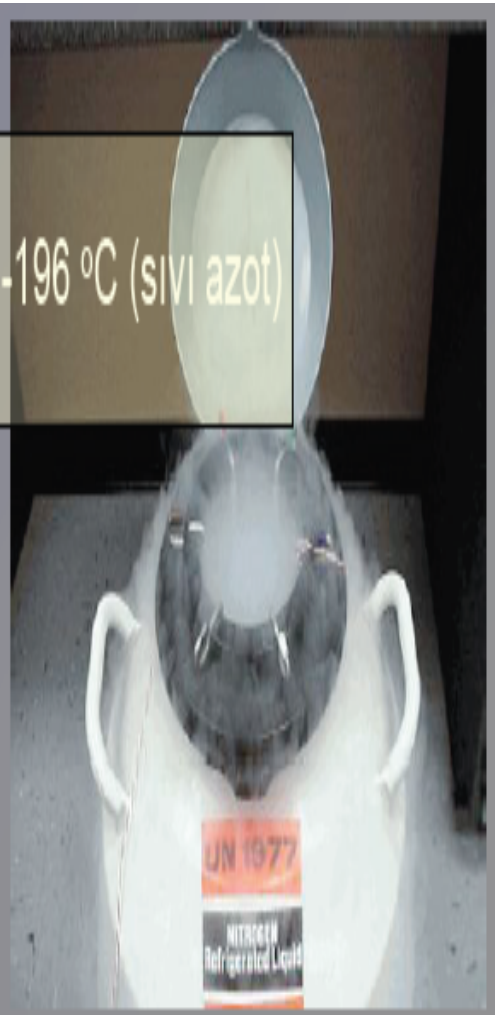
+4 °C
(buz üzerinde)

→

-20 °C

→

-196 °C (sıvı azot)



DONDURMA EKİPMANLARI

- ✓ Sıvı nitrojen
- ✓ Sıvı faz (-196 ^{0}C)
- ✓ buhar fazı (-156 ^{0}C)
- ✓ Sıvı nitrojen kabı
- ✓ Sıvı nitrojen taşıyıcıları




CLASSIC-21

HÜCRE DEPOLAMA KAPLARI

✓ Genellikle elektrikli ve elektriksiz olarak 2 farklı özellikte kap kullanılır. Elektrikli depolama kapları **-86 °C' ye kadar soğutan derin dondurucudardır.**

✓ Hücreler -20°C veya -80°C dondurucuda saklandıklarında canlılıkları hızla düşmektedir.

✓ En önemli dezavantajları hücrelerin sağlıklı saklanma sürelerinin **maksimum 5 yıl ile** sınırlı olması ve **elektrik arızası halinde tüm stokun kaybedilmesi ri**skidir.

✓ Elektrik akımına bağlı olmayan kaplar, **buhar veya sıvı fazda azot içeren özel depolama** sistemleridir.

✓Bunların en önemli riskleri ise, **düzenli azot gereksinimi ve ürünün bazı mikroorganizmalarla kontamine** olma riskidir.

✓Azot kaplarında en sık görülen kontaminantlar arasında **aspergillus, stafilokok, enterokok, pseudomonas, HBV, HCV** sayılabilir.

✓Önlem olarak ampullerin ikinci bir koruyucu içerisine konulması önerilmektedir.



HÜCRELERİN DONDURULMASI

- ✓ Hücre kültürünün uzun süre devam etmesi kontaminasyon ve üreme hızının düşüşü gibi olumsuzluklara yol açar.

- ✓ Bunun önüne geçebilmek için hücreler dondurulur.

- ✓ **Dondurma işleminin başarısı,çözdürme işleminin sonunda hücre canlılık oranının yüksek olması ile orantılıdır**

DONDURMA PROSEDÜRÜ

- ✓ Su banyosu 37C ye ısıtılır.
- ✓ Hücre besi ortamı ve serum su banyosunda 37 C ye ısıtılır
- ✓ Hücre Pasajlanması protokolünde belirtildiği şekilde hücre pelleti elde edilir.
- ✓ Hücre pelleti, **1 ml dondurma ortamı** içinde süspande edilir ve **cryovial** adı verilen tüplere konulur.
- ✓ Hücrelerin bulunduğu tüpler dondurma kabına konulur ve -**80C 'de bir gece bekletilir.**
- ✓ Ertesi gün **sıvı azot tankına** transfer edilir.

HÜCRELERİN DONDURULMASI

1) Petri üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır.

2) Hücreler serumdan arındırılmak için **PBS** ile yıkanır.

3) PBS aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler inkübatörde **tripsinle** 5 dakika inkübe edilir.

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

5) Canlı hücre sayımı yapılır. Dondurulacak hücrelerin %20'sinden fazlasının ölü olmamasına dikkat edilir.

HÜCRELERİN DONDURULMASI

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

6) Hücre süspansiyonu santrifüjlenir **(1000-1500 rpm 5 dakika), süpernatan uzaklaştırılır.**

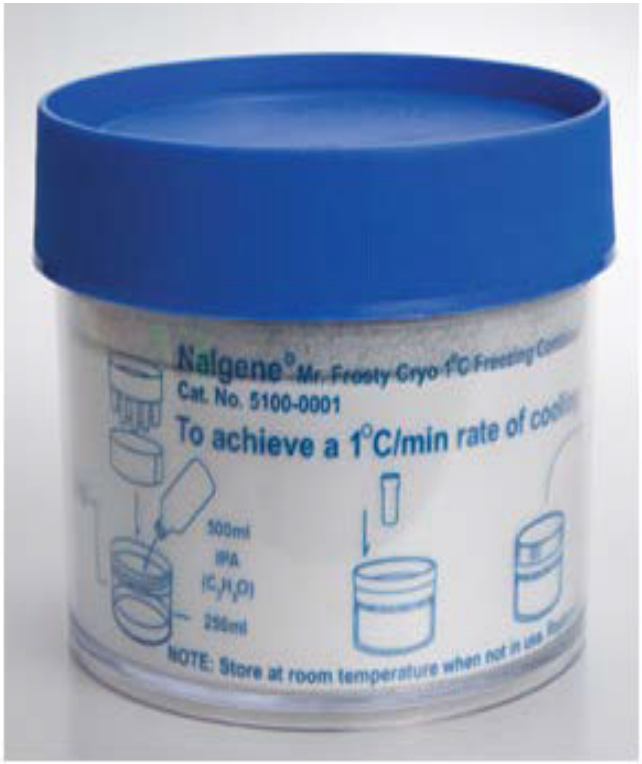
7) Pelet 1 ml besiyerinde sulandırılarak sayılır.

8) Ne kadar hucreye ve cryo tüpe ihtiyac duyulacağına karar verilir. Her tüp, 1ml ortam icinde **1 x 10^7 (ya da 4 X 10^6 ile 2 X 10^7 hucre arası)** hucre alabilir.

8) Dondurma tüpleri içerisine 1:1 oranında dondurma medyumu ve hücre çözeltisi konur

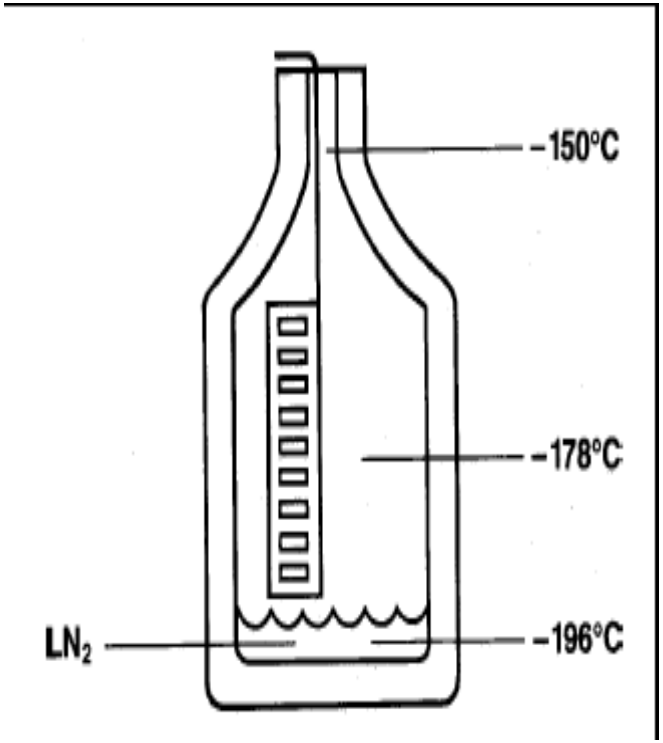
9) Tüpler dondurma kabına yerleştirilir ve kap - 80 derin dondurucuya konur. 24 saat sonra dondurma tüpleri sıvı nitrojen tankına transfer edilir.

- ✓ Hücre süspansiyonu tercihen yüksek bir konsantrasyonda olmalı ve yavaşça, **dakikada 1°C hızıyla** dondurulmalıdır.
- ✓ Kontrollü yavaş dondurma işlemi için vialler **izopropanole gömülür ve takiben -80°C'lik derin dondurucuya kaldırılması ile her dakikada 1- 3°C düşme sağlanır.**
- ✓ Kaliteli bir dondurma sağlayabileceği gibi -80°C'de hücreler ortalama 6 ay 1 yıl saklanabilir.


Nalgene
Cat. No. 5100-0001
To achieve a 1°C/min rate of
500ml
IPA
(C3H8O)
250ml
NOTE: Store at room temperature when not in use.




MVE Millennium 2000
XC 20


-150°C
-178°C
LN_2
-196°C

DONDURULMUŞ HÜCRELERİN KÜLTÜRE EDİLMESİ

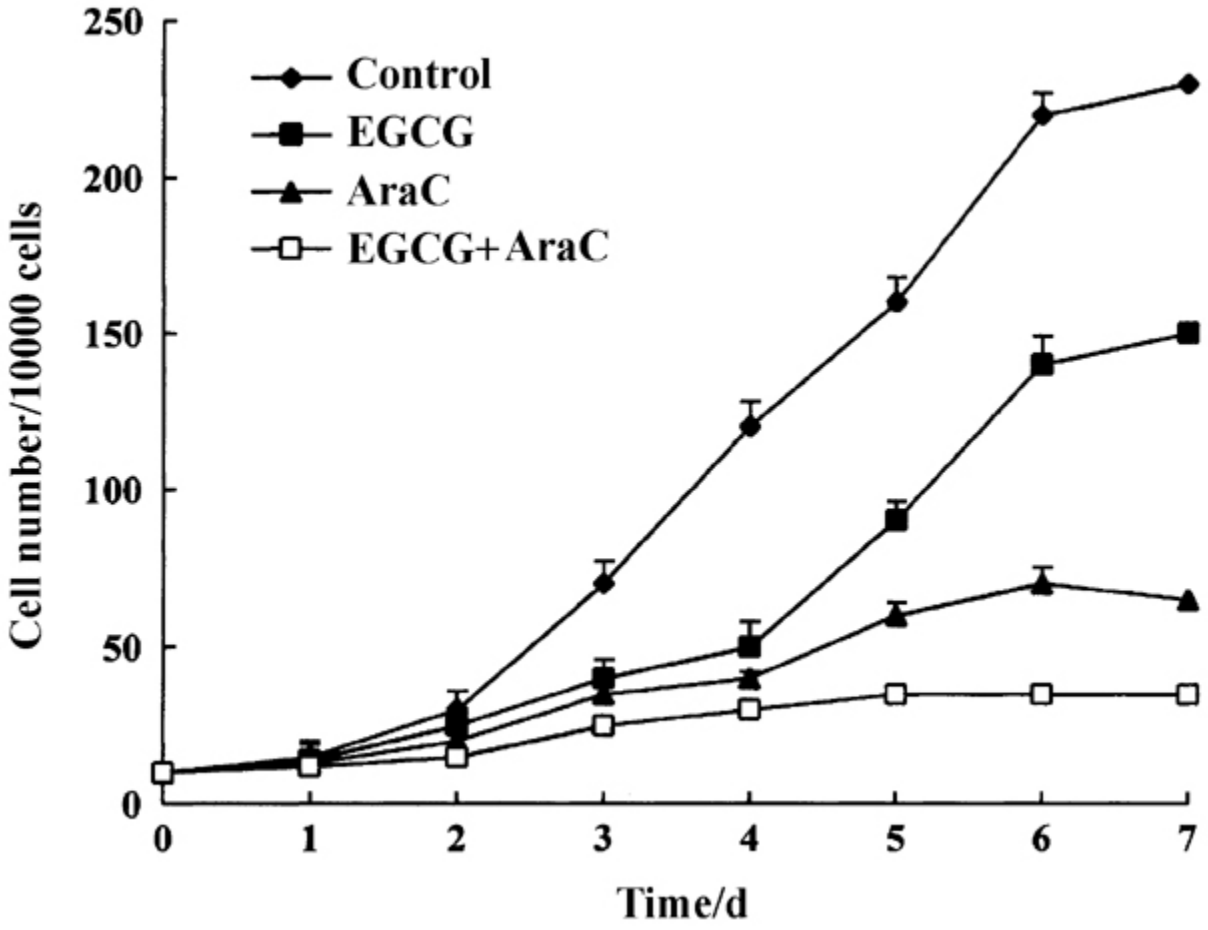
- ✓ Ökaryotik hücreler serumlu besiyeri ve dondurucu ajan (DMSO) varlığında dondurulup sıvı nitrojende (-196^{o}C) saklanır.
- ✓ Dondurulmuş hücreler **kuru buzda** transfer edilir.
- ✓ Dondurulmuş hücrelerin hızlıca çözülüp derhal kültüre edilmesi hücrelerin hayatiyetlerinin sağlanması için esastır

HÜCRELERİ DONDURMADAN ÖNCE

- ✓ ATCC kataloğundan kullandığınız hücrenin dondurulma protokolünü kontrol edin. Laboratuvarda uygulanan prosedürü öğrenin. Olası modifikasyonları ATCC protokolü ile karşılaştırarak tespit edin.
- ✓ Eğer yeni bir hücre hattı ise hattı geliştiren lab ile irtibata geçin veya literatüre bakın.
- ✓ Hücreler kryotüplerde dondurulup sıvı nitrojen tanklarında saklanır. Saklama için kullanılan sıvı nitrojen tanklarının raklı sistemde olması gerekir. Tüpler bu tanklara kataloglanarak yerleştirilmelidir.
- ✓ Nitrojen tanklardaki sıvı nitrojen tankın özelliğine bağlı bir hızda buharlaşır. Periyodik olarak nitrojen seviyesinin kontrolü ve tamamlanması gerekmektedir.
- ✓ **Sıvı nitrojen buharı solunmamalıdır**. Elinizle oluşan buharı dağıtmamaya gayret edin.

HÜCRE PROLİFERASYONU VE TESTLERİ

HÜCRE PROLİFERASYONU VE TESTLERİ

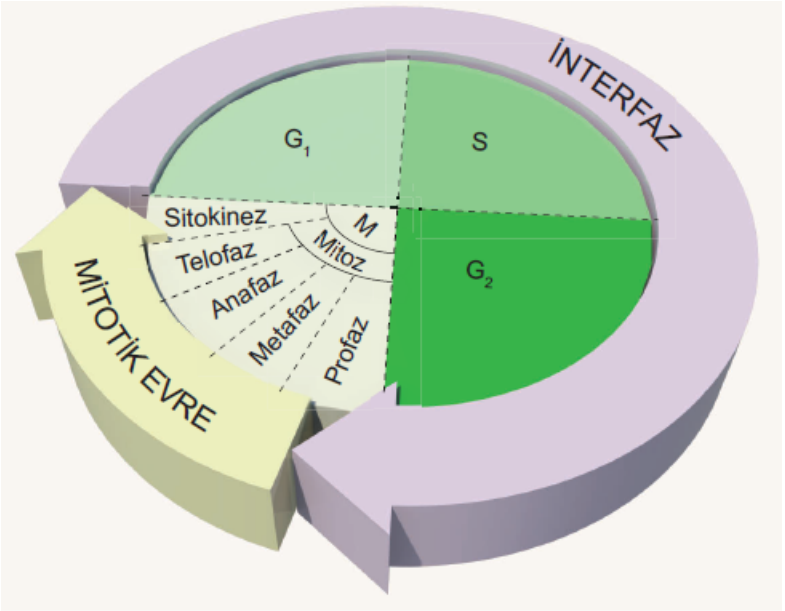


NORMAL HÜCRE ÇOĞALMASI

- ✓ Normal dokularda, hücre bolunmesi ve çoğalması organizmanın devamlılığı için bir gerekliliktir.
- ✓ Hücre çoğalmasının olması gerekenden farklı olması patolojik durumlara yol acar.
- ✓ Örneğin, kanser; hücrelerin kontrolsuz bir şekilde hızlı bölünmesi

HÜCRE DÖNGÜSÜ

- Bir hücrenin bölünmeye başlamasından itibaren onu takip eden diğer hücre bölünmesine kadar gecen zaman aralığına **hücre döngüsü denir.**



Şekil 2.1. Hücre döngüsü

HÜCRE PROLİFERASYONU VE CANLILIK

Canlı hücre sayısının ve hücre çoğalmasının doğru ve hızlı bir şekilde değerlendirilmesi birçok deneysel yaklaşımda önemlidir.

– Buyume faktorlerinin analizi

– Genlerin fonksiyonel analizleri

– İlac denemeleri

– Sitotoksisite calışmaları

– Biyouyumluluk

– İmplantlar

– Kozmetik

– Toksik ajanların belirlenmesi





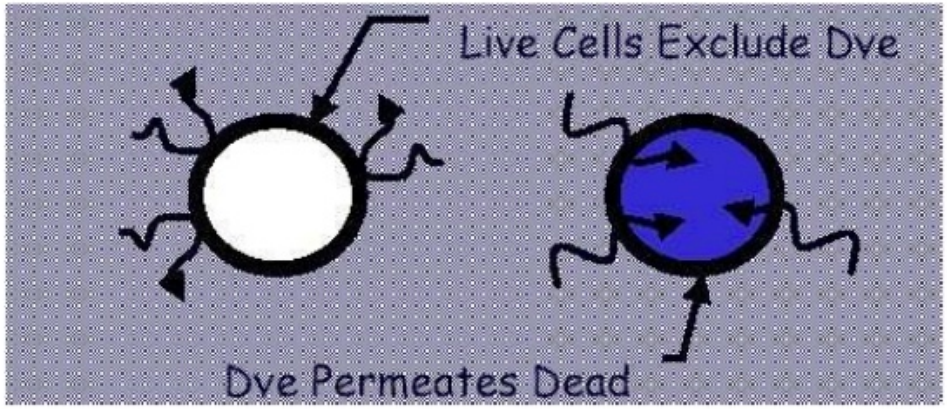
HÜCRE PROLİFERASYONU VE CANLILIK

Hücre Canlılığı (Cell Viability); Örnekteki canlı hücre sayısı.

- **Hemositometre ile sayım**
- **Metabolik testlerle ölçüm (MTT, XTT, WST1)**

Hücre Canlılığı

Principle



Trypan Blue dye Exclusion Methods

MTT, Sulforhodamine B, Coomassie blue gibi boyalarla boyanan hücreler bize hücre sayısı hakkında da bilgi verir.

MTT ile hücreyi boyamak birçok avantaj sağlar. Bu boya sadece canlı hücreleri boyar, ölü hücreleri boyamaz

Süspansiyondaki hücrelerin canlılığının tespit edilmesi **Trypan mavisi (%0.5-1) ve Erythrocin B** gibi ölü hücreleri boyayan boyaların yardımı ile yapılabilir. Bu boyaların %0.9' luk tuzlu suda hazırlanmış solüsyonları hücre süspansiyonuna eklenir ve Thoma lamı gibi bir hemositometre yardımıyla canlı hücreler sayılarak tespit edilir.

MTT testi indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir. **Hücre canlılığını ve üremesini** ölçen bu yöntemin, diğer sitotoksik test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir olması, uygulamasının kolay, hızlı ve sayılabilir olması avantaj olarak belirtilmiştir.

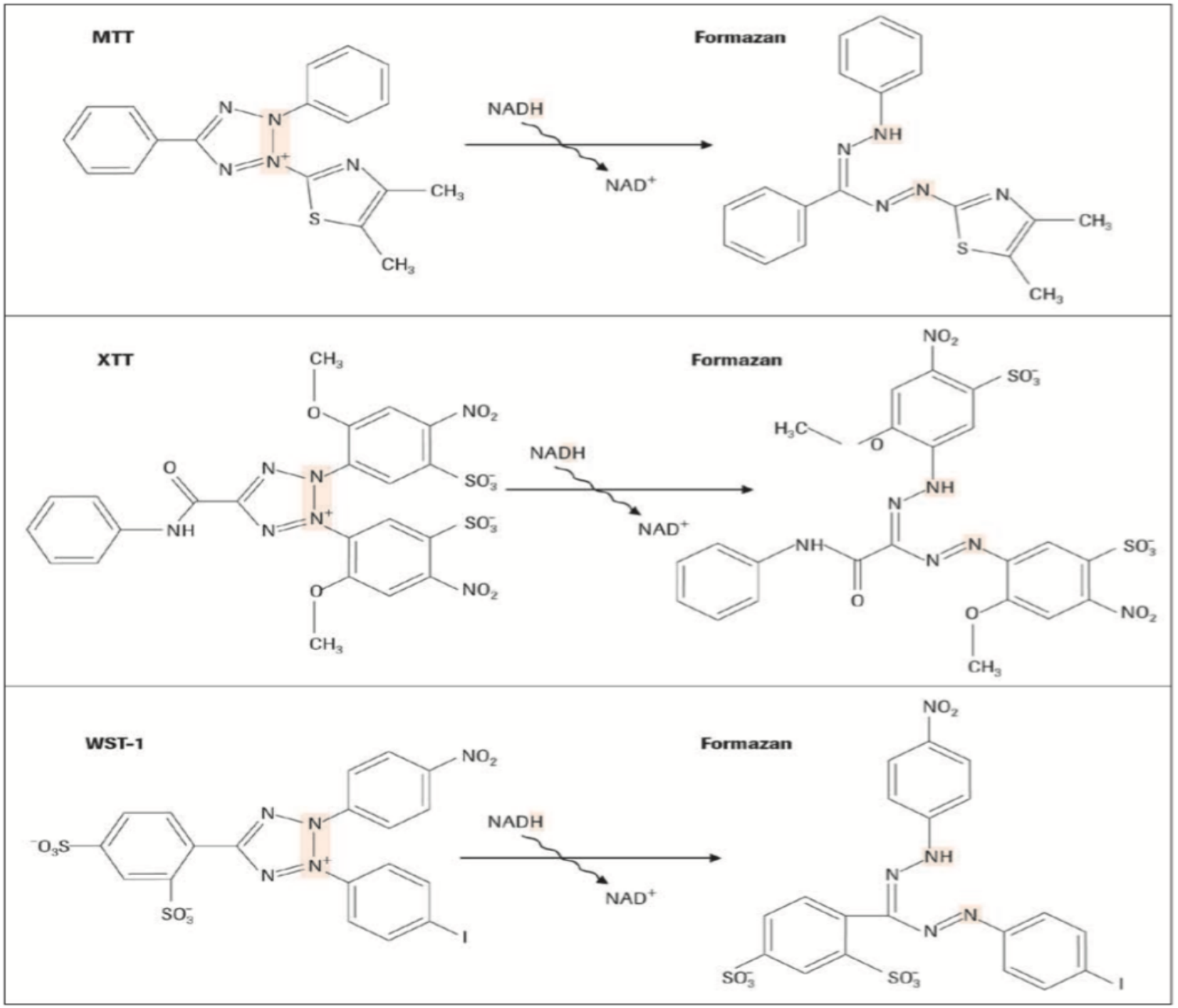
İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan, daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid **(MTT) yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi** için çok sık kullanılan pratik bir yöntemdir.

MTT yöntemi ile bir hücre topluluğunda ki canlı hücrelerin oranı **kalorimetrik yöntemle kantitatif olarak** saptanabilmektedir.

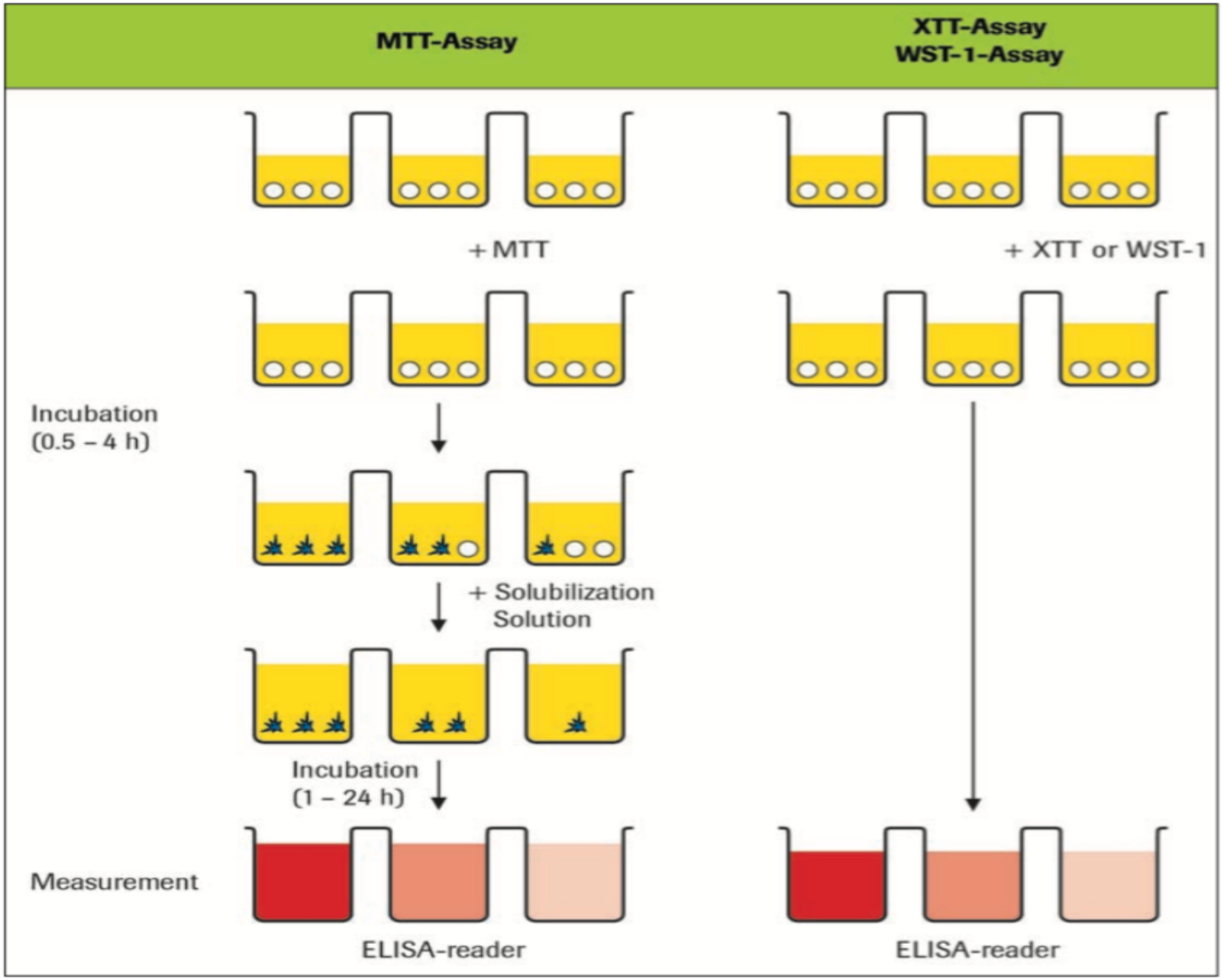
Arjan ve arkadaşları, MTT test yönteminin sitotoksisitenin belirlenmesinde kullanışlı, hassas ve hızlı bir metod olduğunu, ayrıca radyoaktif izotop kullanmaya gerek kalmadığını belirtmişlerdir.

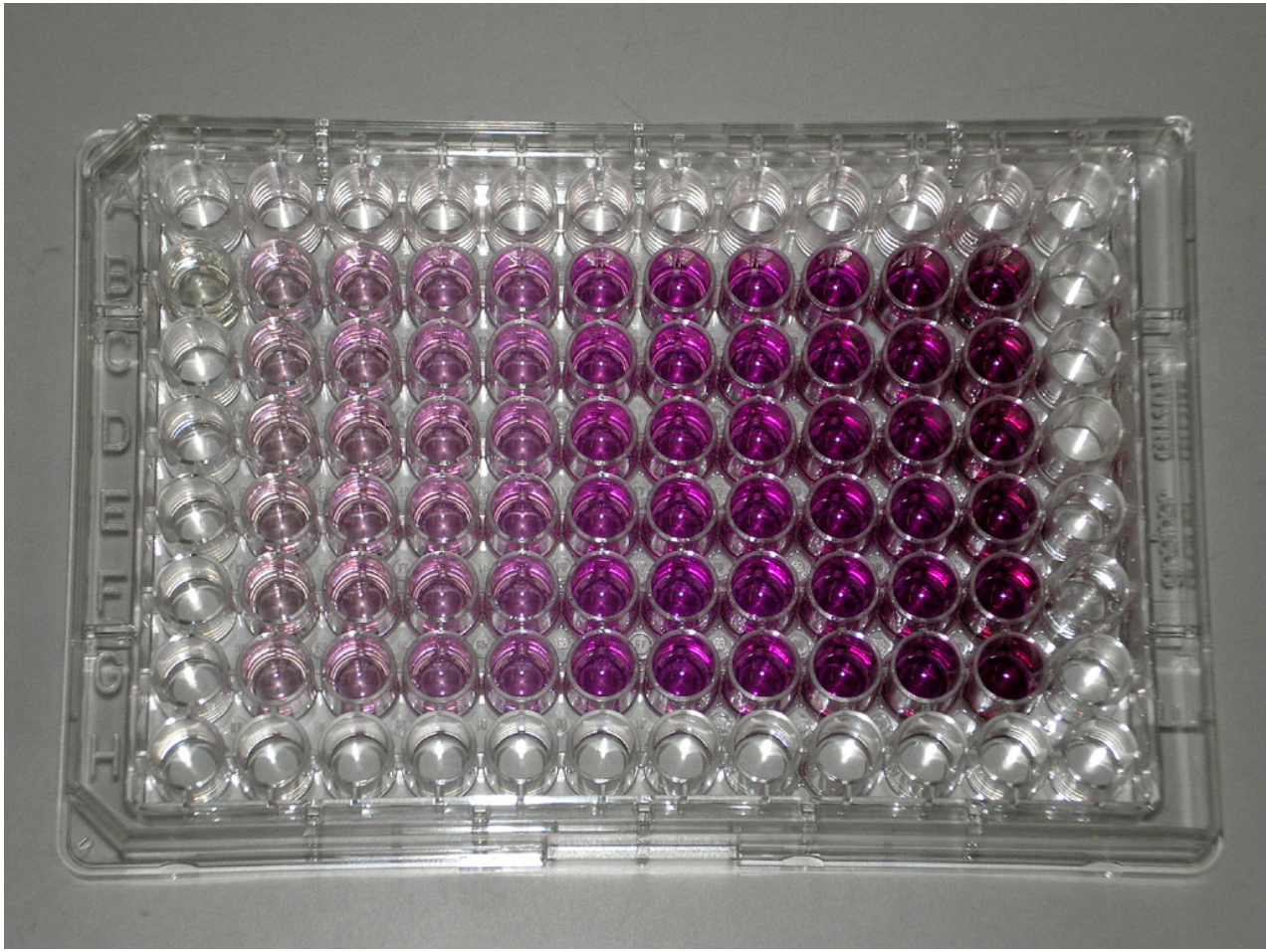
Wilson ve arkadaşları, MTT'den üreyen formazonun yoğunluğunun direkt olarak yaşayan hücrelerin sayısıyla bağlantılı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu yöntemi, kanserli hastaların tedavisinde kullanılan ilaçlar üzerinde denemişler ve elde ettikleri klinik sonuçların, MTT sonuçlarıyla paralel olduğunu belirtmişlerdir.

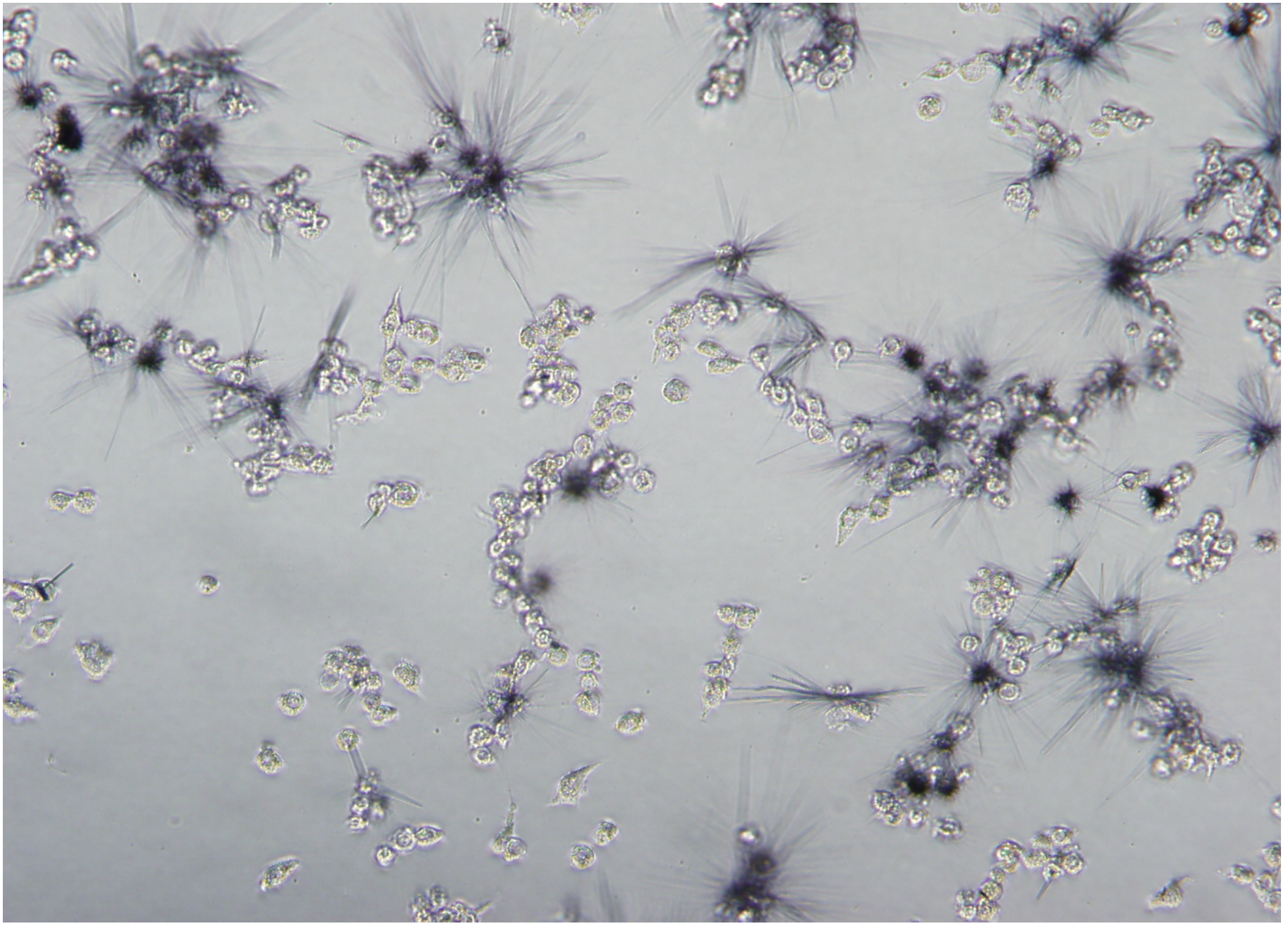
- **Tetrazolium tuzları** substrat olarak kullanılır.
- **WST-1, XTT ve MTT solusyonlarının canlı veya apoptozun** erken evresindeki hucrelerin **mitokondrileri a**racılığıyla ile oluşturduğu reaksiyonda, solusyonlarda bulunan **tetrazolium halkası hucre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz** enzimlerince parcalanarak **renkli formazan kristalleri** oluşturur.
- WST-1, XTT ve MTT yontemi, sağlam hucrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parcalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır.


MTT
Formazan
NADH
NAD+
XTT
Formazan
NADH
NAD+
WST-1
Formazan
NADH
NAD+

- Tetrazolium halkasının parcalanması sonucu **soluk sarı renkli MTT** boyası **koyu mavi-mor formazan urununе** donuşmektedir.
- Sonuc olarak **canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hucreler mor renkte boyanmakta, olu ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hucreler boyanmamaktadır.**


MTT-Assay
XTT-Assay
WST-1-Assay
+ MTT
+ XTT or WST-1
Incubation
(0.5 – 4 h)
+ Solubilization
Solution
Incubation
(1 – 24 h)
Measurement
ELISA-reader
ELISA-reader



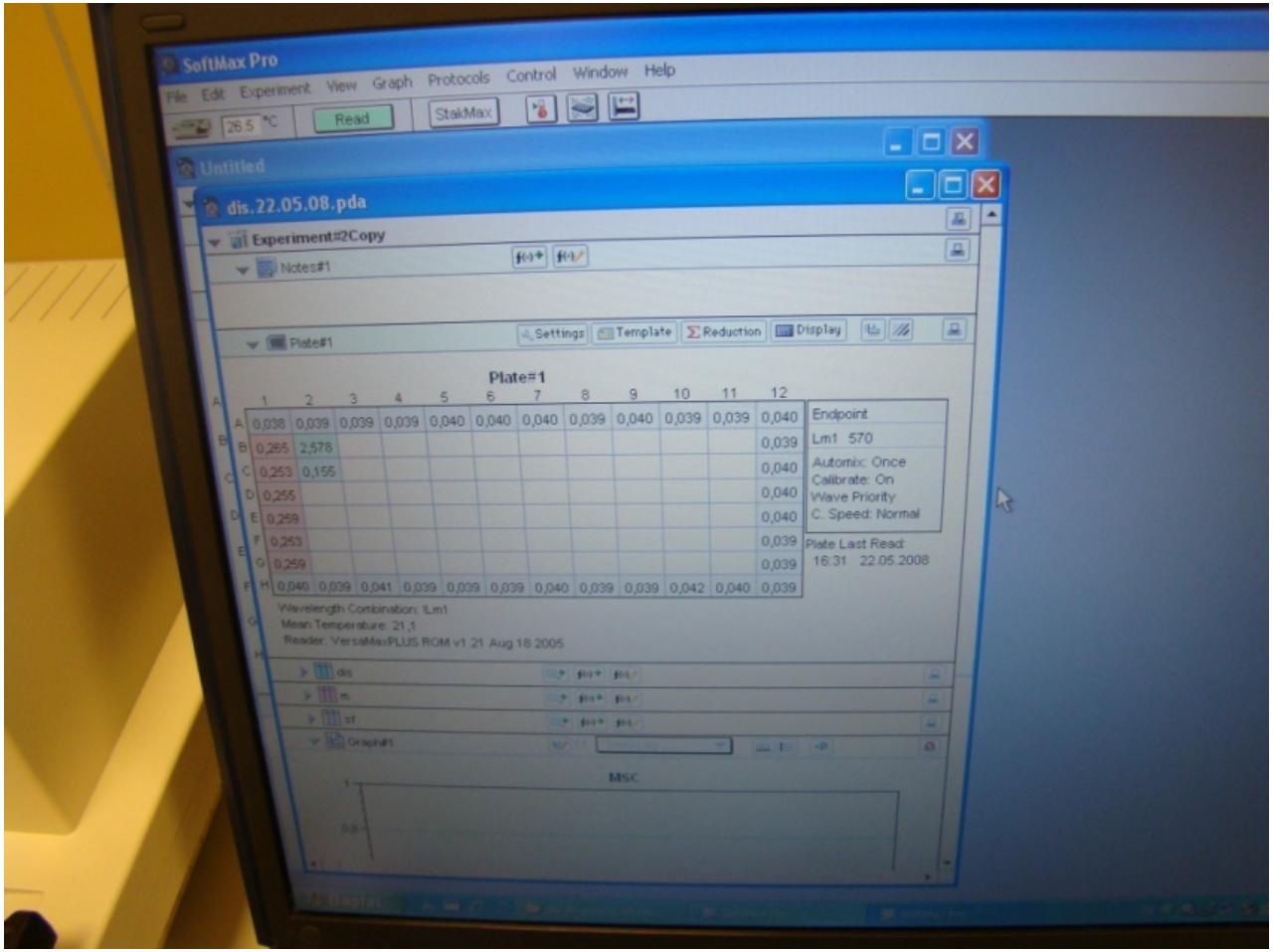


MTT (570 nm)

XTT (450-490 nm)

WST-1 (420-480 nm)


TOSHIBA


SoftMax Pro
File Edit Experiment View Graph Protocols Control Window Help
26.5 °C
Read
StakMax
Untitled
dis.22.05.08.pda
Experiment#2Copy
Notes#1
Plate#1
Settings
Template
Reduction
Display
Plate#1
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A 0,038 0,039 0,039 0,039 0,040 0,040 0,040 0,039 0,040 0,039 0,039 0,040
B 0,265 2,578 0,039
C 0,253 0,155 0,040
D 0,255 0,040
E 0,259 0,040
F 0,253 0,039
G 0,259 0,039
H 0,040 0,039 0,041 0,039 0,039 0,039 0,040 0,039 0,039 0,042 0,040 0,039
Endpoint
Lm1 570
Automix: Once
Calibrate: On
Wave Priority
C. Speed: Normal
Plate Last Read:
16:31 22.05.2008
Wavelength Combination: \Lm1
Mean Temperature: 21,1
Reader: VersaMaxPLUS ROM v1.21 Aug 18 2005
dis
m
s1
Graph#1
MSC

- Bolunen hucreler bolunmeyen hucrelere gore metabolik olarak daha aktif oldukları icin **WST-1, XTT ve MTT testleri** hucre proliferasyonunun değerlendirilmesi icin de uygundur.

MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan ve **mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen** bir maddedir.

Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir.

Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve **MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile** korelasyon gösterir.

Sonuç olarak **canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır.**

Hücrelerin Sayılması



Otomalize Cihazlar



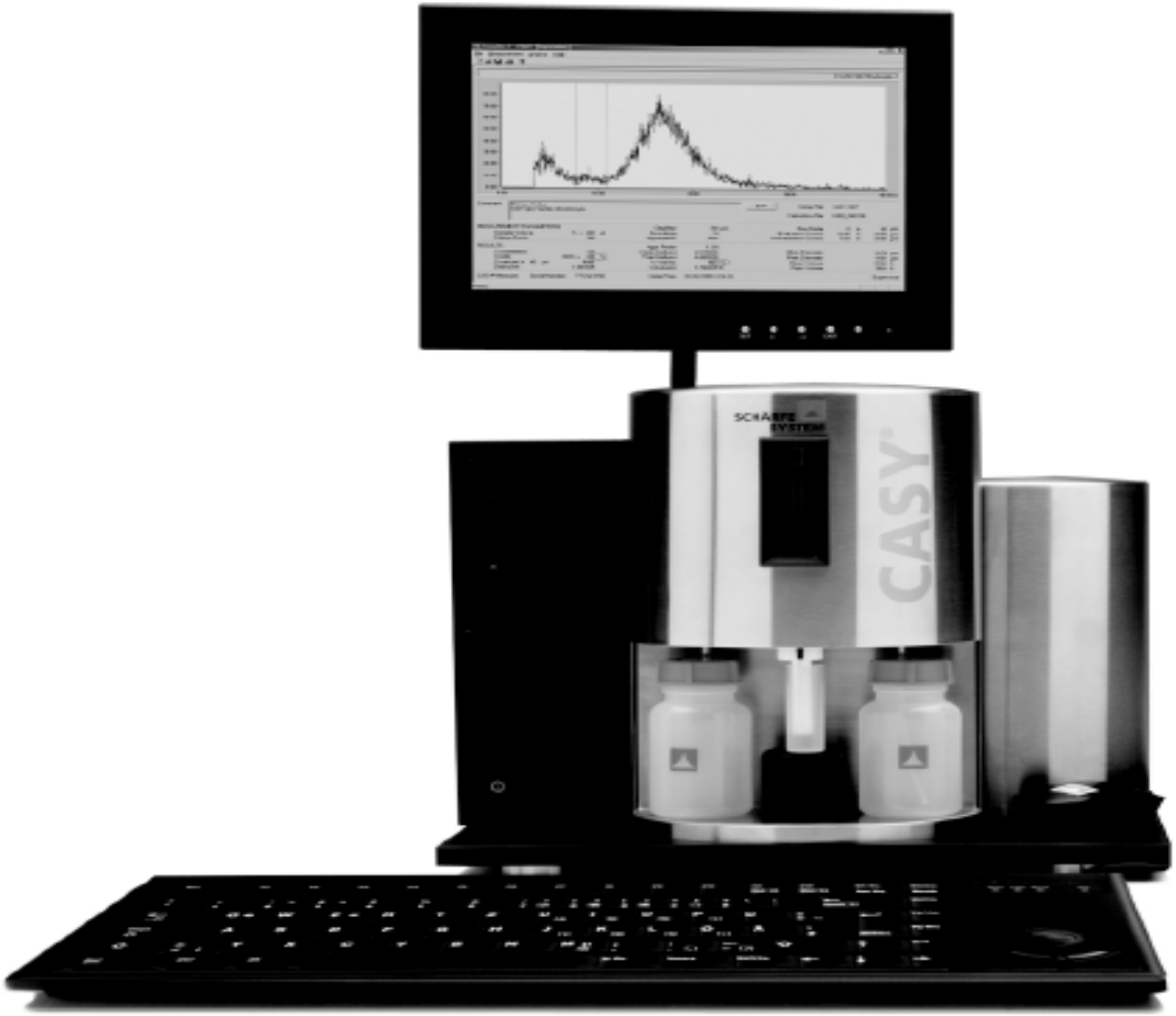


Fig. 21.2. CASY Electronic Cell Counter. CASY 1 (Schärfe Systems) cell counter, also suitable for cell sizing and discrimination between viable and nonviable cells, and single cells and aggregates. (Courtesy of Schärfe Systems).

CASY ELEKTRONİK HÜCRE SAYICISI

CASY Elektronik Hücre Sayıcısının 3 temel parçası vardır.

1.Bir adet delikli tüp, bu tüp üzerindeki delikler 150 µm dir.

2.Bu delikli tüpe bağlı bir pompa.

3.Skala bağlı 2 elektrod, analizör ve yükseltici.

Ayrıca her bir parametrede hücre sayısını gösteren anolog ve dijital okuyucuda vardır.

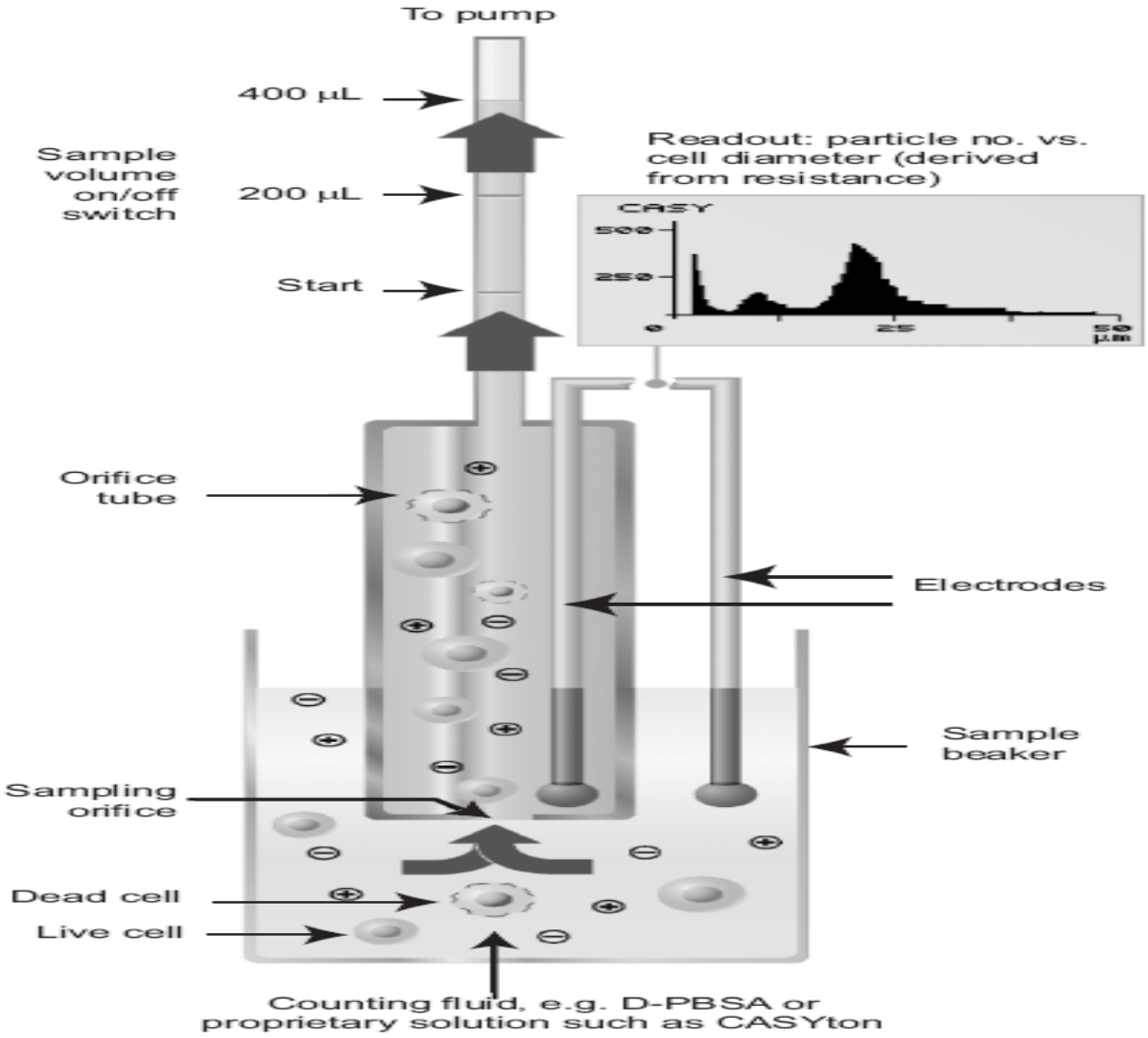


Fig. 21.3. CASY Cell Counter Operation. The electrolyte (e.g., D–PBSA or CASYton) in an orifice tube is connected to a pump and draws a measured volume of the cell sample from a beaker. A cell passing through the orifice alters the flow of current and generates a signal, the amplitude of which is proportional to the volume of the cell. (Courtesy of Schärfe Systems).

Tüpün delikleri boyunca geçen her bir hücre, hücre miktarına orantılı olarak tüp boyunca okunan dirence karşı değişiklik gösterir. Bu direnç değişimi titreşime neden olur ve titreşimi güçlendirerek sayılmasını sağlar. Bu hücre sayıcısı ayrıca uygun boyutlu hücre grubunu canlı yada canlı olmayan hücrelerin arasından ayırır.

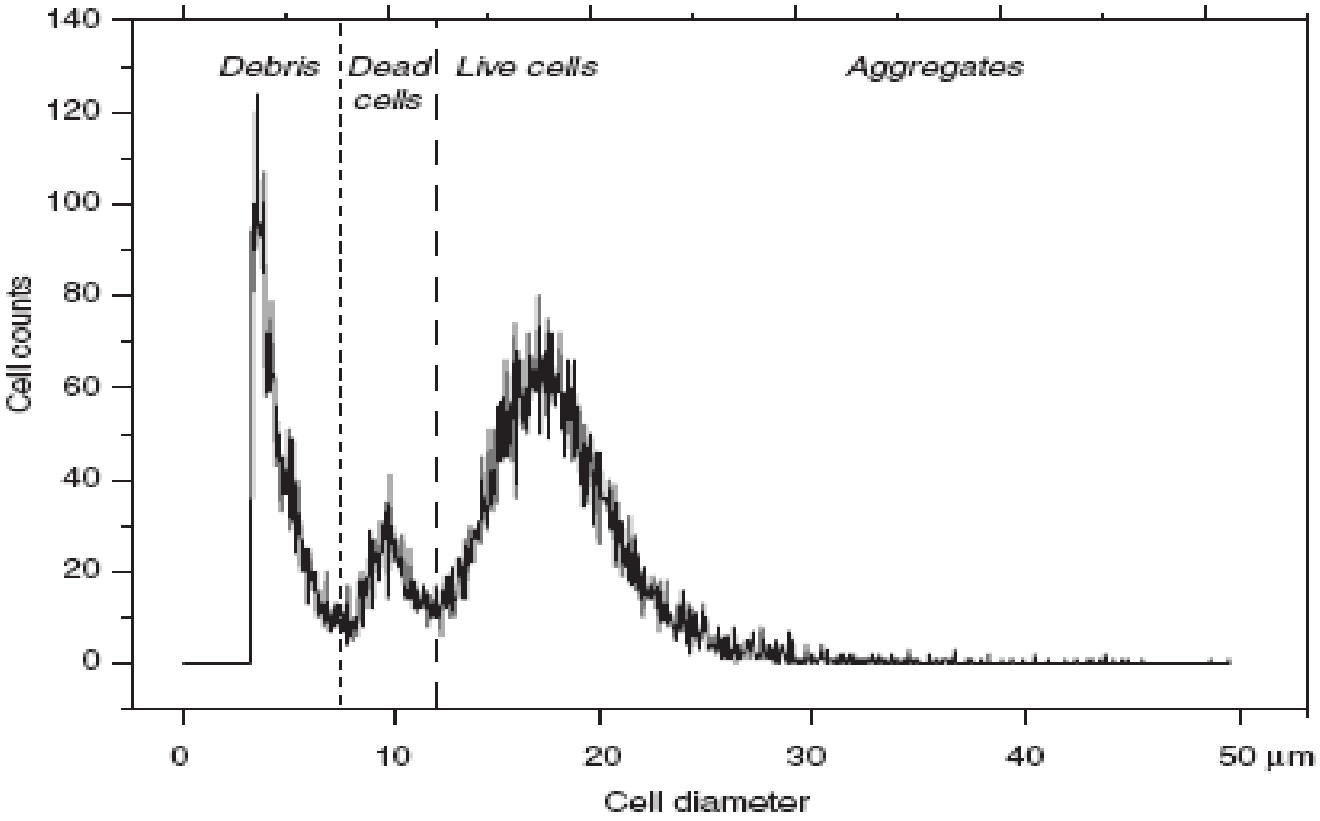


Fig. 21.4. Analog Printout from CASY Electronic Cell Counter. Cell number plotted against cell diameter gives a size distribution analysis that enables the lower threshold (vertical dashed line) to be set. In this display, the upper threshold could be set to 30 µm or set to infinity. The peak below the vertical dashed line and the vertical dotted line represents nonviable cells that can be used with the viable cell count to determine percentage viability. (Data courtesy of Schärfe Systems).

