

# Ökaryotik Hücre Kültürü

## Kültür ve Hücre Hattı Çeşitleri

Hücre kültürleri iki özellikleriyle tanımlanır:

- Hücrelerin kökenleri
- Büyüme şekilleri

## Hücre Kökenine Göre Sınıflandırma

-Primer Hücre Hatları

-Sınırlı Hücre Hatları

-Transforme Hücre Hatları

-Hibridomalar

- **Primer hücre hatları hayvan ve bitki dokularından izole edildikten sonra kültüre edilir.**

Bir hücre bir kez bölündükten sonra sınırlı hücre hattı olur, fakat ölümsüz olma potansiyeli de vardır.

Normal hücrelerden türemiş sınırlı bir hücre hattının tekrarlanan pasajı, daha hızlı büyüyen ve sürekli hücre hattı olabilecek varyantları seçecek şekilde yapılır. Bu olay, kendiliğinden transformasyon olarak düşünülür.

Primer ve sınırlı hücre kültürünün kökeni büyüme şeklini etkiler. Eğer bir fibroblast hücreyse yapışkan bir şekilde büyüyecektir. Fakat, hücre transforme edilirse, büyüme şekli orijinal primer hücreyle artık aynı olmayabilir.

- **Sürekli hücre hatlarının sınırlı hatlardan daha yüksek büyüme hızları, daha yüksek klonlanma verimleri, artmış tümörjenisitetleri ve daha çeşitli kromozom komplementleri vardır.**

Sürekli hücre hatları genellikle belli bir fenotipi sergileyen hücre hatlarına dönüştürülmek üzere transforme edilirler. Hücre hatları ne kadar farklılaşmış olurlarsa büyümeleri de o kadar yavaş olur.

### ***Sık Kullanılan Bazı Hücre Hatları***

<b>Hücre Hattı</b>	<b>Hücre Hattı ve Kökeni</b>	<b>Yapışkan ya da Süspansiyon Büyüme</b>
3T3	Fibroblast (fare, embryo)	Yapışkan
BHK21	Fibroblast (Suriye hamster, böbrek)	Süspansiyon
MDCK	Epitel hücresi (kopek, böbrek)	Yapışkan
HeLa	Epitel hücresi (insan, adenokarsinoma)	Süspansiyon ya da Yapışkan
PtK1	Epitel hücresi (sıçan, kangru, böbrek)	Yapışkan
L6	Myoblast (sıçan, iskelet kası)	Yapışkan
PC12	Chromaffin hücresi (sıçan, adrenal feokromasitoma)	Yapışkan
Sf9	Ovari (tırtıl) Bakülovirüs enfeksiyonu	Süspansiyon
SP2	Plazma hücresi (fare, myeloma)	Süspansiyon
	Hibridoma için füzyon	

➤ **Transforme olmuş hücreler normal hücreden kanser hücrelerinin birçok özelliğini taşıyan hücelere dönüşürler.**

Bu hücrelerin bazıları tümörlerden türemiş; bazılarıysa kültürde kendiliğinden mutasyonla oluşmuştur. Hücreler kimyasal yolla veya tümör-indükleyen virüsle transforme edilebilirler. Bu tip virüsler, hücre büyümesi için gereken bir proteini ya fazla üretecek ya da onun hatalı kopyasını üretecek genler taşırlar. Transformasyon yöntemi ne olursa olsun, sonuçta oluşan hücre değişmiş işlev, morfoloji ve büyüme özellikleri sergiler. Bu özellikler şöyle listelenebilir:

- Yüksek hücre yoğunluğunda büyüme
- Büyüme faktörlerine ve seruma daha az ihtiyaç duyma
- Daha az yüzeye bağlanma gereksinimi duyma
- Sonsuz büyüme yeteneği

➤ Hibridomalar, ortama monoklonal antikor salarlar. Genellikle, antikor konsantrasyonu süpernatantın hibridizasyon için doğrudan kullanılmasına yetecek kadar çöktür.

## **Büyüme Şekline Göre Sınıflandırma**

Hücreler, sıvı ve yarı katı ortamda büyüme şekillerine göre sınıflandırılırlar. Büyüme karakteristikleri hücrelerin işlevsel tanımlıyıcılarıdır ve hücre kökenine bağlıdır.

### ➤ **Süspansiyon veya yapışkan büyüme**

Hücre büyümesini tanımlayacak ilk ve en pratik yol, hücrelerin sıvıda nasıl davrandıklarıdır. Bu bilgi her zaman hücre hattı ve hücre kökeniyle birlikte verilir; ve hücre hattını tanımlayan önemli bir faktördür.

- **Süspansiyon hücreler** ortamda asılı durmuş şekilde büyürler. Bu hücreler, kültür şişesine bağlanmadan hayatta kalabilir ve çoğalabilirler. Kan, dalak, kemik iliği ve özellikle tam gelişmemiş hücreler süspansiyon şeklinde büyüme eğilimindedirler. Süspansiyon içindeki hücreler küçük toplar gibi görünürler. Süspansiyon büyümenin avantajı çok sayıda hücreyi büyütebilmek ve kolayca kültürden toplayabilmektir.
- **Yapışkan hücreler** tek tabaka halinde, yüzeye tutunarak büyürler. Ektodermal ve endodermal embryonik hücre tabakalarından türeyen hücreler yapışkan bir şekilde büyüme eğilimindedirler. Bunlar, fibroblast ve epitel hücrelerini içerir. Yapışkan hücreler değişik şekillerde olabilirler, fakat genellikle düzdürler. Süspansiyon halde büyütülen aynı hücreler yuvarlak olabilirler. Yapışkan büyümenin avantajı, hücreleri lamel gibi yüzeylere yayabilmek ve yapıştırabilmektir. Bu özellikler, mikroskop, hibridizasyon ve fonksiyonel testlerde kolaylık sağlar.

### ➤ **Bağlanma-bağımlı ve bağlanma-bağımsız büyüme**

Yapışkan büyümenin bir alt grubu bağlanma-bağımlı ve bağlanma-bağımsız büyümedir. Bağlanma-bağımlı ve bağlanma-bağımsız büyüme, büyüme koşullarıyla değiştirilemeyecek özelliklerdir.

- **Bağlanma-bağımlı hücreler** çoğalmak için yüzeye tutunmaya ihtiyaç duyarlar.
- **Bağlanma-bağımsız hücreler** çoğalmak için yüzeye tutunmaya ihtiyaç duymazlar. Bu, çoğunlukla transforme olmuş hücrelerin özelliğidir. Bağlanma-bağımsız hücrelerin büyümesi, hücre kültürü kaplarında daha gelişmiş ve rastgele görünür.

## Hücreleri Gözleme

Hücreler, yeni şişelere her transfer edileceklerinde veya deneyler için her kullanılacaklarında mikroskopik ve makroskopik olarak gözlenmelidir. Eğer hücreler sağlıklı değilse, deneyler de yolunda gitmez.

Hücre kültürü şişesi inkübatörden çıkarıldığında şunlar dikkatle incelenmelidir:

- **Ortamın rengi:** Birçok besiyeri ortamında asidik koşullarda sarıya, bazik koşullarda ise mora dönüşen pH indikatörü vardır. Fazlasıyla asidik, ya da bazik ortam, kontaminasyonun, fazla büyümüş kültürün, ölü kültürün ya da hatalı CO<sub>2</sub> dağılımının göstergesi olabilir.
- **Ortamın bulanıklığı** kontaminasyonu veya aşırı büyümüş kültürü haber verir.
- **Öbeklenmiş hücreler** (süspansiyon kültürde) ya da **yüzeyden sıyrılmış hücreler** (yapışkan kültürde)

Hücreler, şişede veya petri kabında büyütülüyorsa ters mikroskopta 40X'te gözlemlendikten sonra deneylerde kullanılmalıdır. Yapışkan hücreler, yüzeyde düz bir tabaka şeklinde yayılmış olmalıdır. Süspansiyon hücreler ise küreseldir, fakat bazı hücreler yüzeye tutunmuş olabilir.

### Protokol

#### Donmuş Hücreleri Kültüre Etme

##### *Temel Bilgiler*

Ökaryotik hücreler genelde serum ve dondurma işleminde kullanılan katkı maddesi içeren ortamda, sıvı nitrojen içinde -196°C'de saklanır. Hücreler, eğer bir firmadan satın alındıysa kuru buz içindeki bir ampülde ulaşır. Donmuş hücreler, maksimum canlılık elde etmek için en kısa zamanda hızlı bir şekilde çözülmalıdır. Dondurmak için kullanılan katkı maddesinden kurtulmak için ortam 24 saat sonra değiştirilmelidir.

##### *Materyaller*

- Kültür ortamı ( 37°C'ye ısıtılmış)
- Kültür şişesi
- Küçük bir beherde %70 etanol

- 1ml ve 10ml'lik pipet, pipetör ve uçlar

### **Prosedür**

1. Ampül, 37°C'lik su banyosunda tutulur ve hızlıca çalkalanır. 1 dakika içinde buzu çözülecektir.
2. Buzları çözülmüş olan ampül, %70 etanol içeren beherin içine bırakılır ve laminar akımlı kabine yerleştirilir.
3. Ampül, etanolün içine girmesi engellenecek şekilde açılır.
4. Ampülün içi kültür şişesine boşaltılır ve hemen ardından üzerine ısıtılmış ortam eklenir.
5. Kültür şişesinin kapağı kapatılır ve 24 saat inkübe edilir.
6. Şişedeki ortam yenileneir.
7. 2-3 gün ya da belirtilen süre boyunca inkübe edilir.

## **Hücre Bakımı**

### **Hücre Hatlarının Rutin Bakımı**

- **Besleme:** Büyümeleri sırasında, hücreler bazı maddeleri tüketirler; bunlar belli aralıklarla yenilenmelidir.
- **Aktarım:** Hücre sayısı büyüme boyunca artar ve kültür şişesinin kapasitesini aşar. Bu yüzden, hücreler belli aralıklarla yeni şişelere aktarılmalıdır.
- **Dondurma:** Her ne zaman yeni bir hücre hattı elde edilirse bir kısmı dondurularak saklanmalıdır. Bu hücreler, kullanılan kültürün kontamine olması ya da zarar görmesi halinde yedek olarak kullanılacaklardır.

### **Besleme ve Aktarım**

Hücreler, ne kadar hızlı büyürlerse o kadar sık beslenmeli ve yeni şişelere aktarılmalıdır. Yeni bir hücre hattı elde edildiğinde, şu soruların yanıtları araştırılmalıdır:

- Antibiyotik kullanılacak mı?
- Hücreler nasıl büyüyor?
- Hangi ortam hücreler için en uygundur?
- Hücreler seruma ihtiyaç duyuyor mu?
- Hücreler ne sıklıkla beslenmeli ve aktarılmalı?

Antibiyotikler, kontaminasyona karşı bazı lablarda rutin olarak kullanılır; fakat aseptik kuralara gereğince uyuluyorsa antibiyotik kullanımına gerek olmayabilir.

Hücre kültüründe kullanılan iki standart antibiyotik:

**-Gentamisin** 5-10 mg/ml stok, 50µg/ml son konsantrasyonda

**-Penisilin** (10.000 ünite)/ **Streptomisin** (10mg/ml) stok, 100 ünite/ml ve 100µg/ml son konsantrasyonda

## **Protokol**

### **Yapışkan Hücrelerin Bölünmesi ve Aktarılması**

1. Hücre tabakasının üzerindeki ortam çekilir.
2. PBS ve serum içermeyen kültür ortamı 37°C'ye ısıtılır. Ortam, doğrudan hücrelerin üzerine değil kültür şişesinin duvarına doğru pipetlenir. Böylelikle tam yapışmamış hücreleri yerinden oynatmaktan kaçınılmış olur.
3. PBS ve ortam hücre tabakasının üzerinden çekilir.
4. Hücrelerin yüzeyini kaplayacak miktarda %0,25 tripsin/PBS eklenir.
5. Tripsin yaklaşık 10-30 saniye sonra hücrelerin üzerinden çekilir.
6. Hücreler oda sıcaklığında 5-15 dakika boyunca inkübe edilir. Bu süre içinde birkaç dakikada bir tüm hücre tabakasının yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edilir. Bu basitçe hücre şişesini eğerek hücre tabakasının hareketi gözlenerek yapılabilir. Eğer tüm tabaka ayrıldıysa inkübasyon bitirilebilir. Alternatif olarak, daha sonra hücreler 37°C'de 5 dakika süreyle inkübe edilebilir.
7. Hücrelerin üzerinden çekilen kadar yeni ortam eklenir ve hücre öbeklerini kırmak için şiddetli bir şekilde pipetaj yapılır.
8. 1 ml hücre mikrofüj tüpüne alınır.
9. Hücreler mikroskopta sayılır.
10. Hücrelerin ne kadar seyreltilmesi gerektiğine ve ekim konsantrasyonuna karar verilir.
11. Karar verilen miktarda hücre, yeni şişeye aktarılır.
12. Hesaplanan miktarda önceden 37°C'ye ısıtılmış yeni ortam, hücrelerin üzerine eklenir.
13. Kültür şişesi nazikçe çevrilir ve hücrelerin eşit şekilde dağılması sağlanır.
14. Kapağın kapalı olduğundan emin olunduktan sonra hücreler inkübatöre yerleştirilir.

### **Süspansiyon Hücrelerin Bölünmesi ve Aktarılması**

1. Kültür şişesi yavaşça sallanır ve hücrelerin eşit dağılması sağlanır. 1 ml hücre mikrofüj tüpüne alınır.
2. Hücreler, mikroskopta sayılır. Sayım sırasında hücrelerin genel durumu da kontrol edilir.
3. Hücrelerin ne kadar seyreltilmesi gerektiğine ve ekim konsantrasyonuna karar verilir.
4. Karar verilen miktarda hücre, yeni şişeye aktarılır.
5. Hesaplanan miktarda önceden 37°C'ye ısıtılmış yeni ortam, hücrelerin üzerine eklenir.
6. Kapağın kapalı olduğundan emin olunduktan sonra hücreler inkübatöre yerleştirilir.
7. Orijinal şişe de yedek olarak üzerine ortam eklenmeksizin inkübatöre tekrar koyulur. Her aktarım sırasında orijinal şişenin yedek olarak saklanması olası bir kontaminasyona karşı önlem olarak kullanılır. Her aktarımdan sonra daha önceki yedek şişe atılır ve yeni yedek şişe onun yerine inkübe edilir.

### **Canlı Hücrelerin Mikroskopta Sayılması**

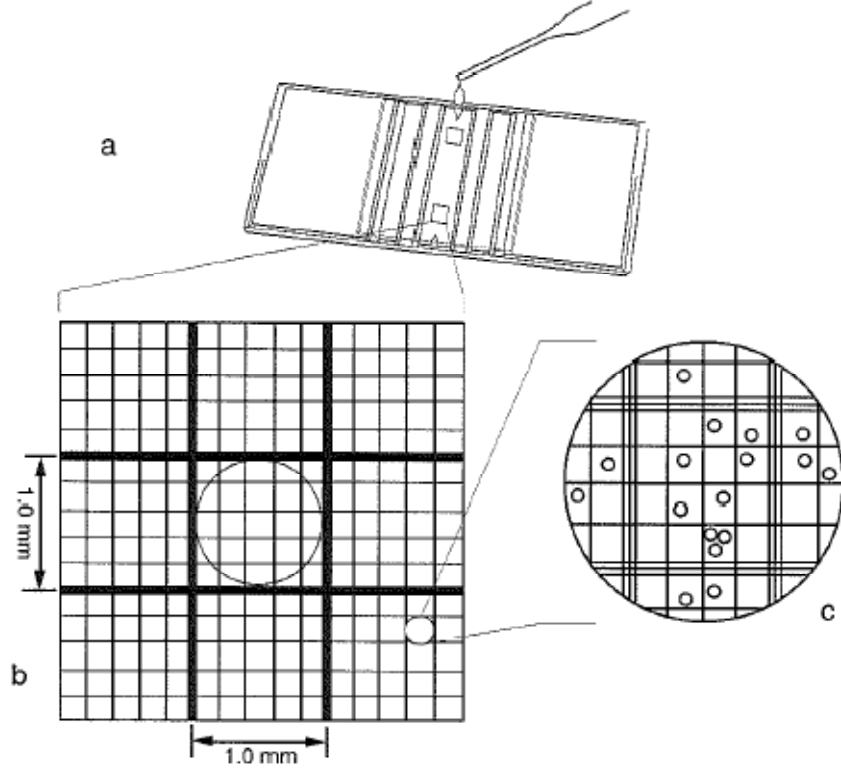
İncelenecek hücreler tripan mavi ile boyanır. Bu boya, canlı hücreler tarafından dışarı atılırken ölü hücreleri koyu mavi renge boyar. Hücreler, hematositometre olarak adlandırılan bir çeşit bölmeli lama damlatılır ve bunun üzerinde mikroskop altında tek tek sayılır.

### **Materyaller**

- *Hematositometre* (gelişmiş Neuer tipi) her seferde temizlenir ve kurulanır.
- *Hematositometre lameli* tekrar kullanılabilir, fakat her seferinde temizlenmeli ve kurulanmalıdır.
- *PBS'de çözülmüş %0,4 tripan mavi (w/v).*
- *Hücre sayıcı*
- *Süspansiyon halinde hücreler;* ya süspansiyon kültürden ya da yapışkan hücreleri tripsinize ederek elde edilmiş.
- *Pipetörler, uçlar.*
- *Mikrofüj tüpleri*
- *Faz kontrast mikroskop ve 10X objektif*
- *Dilüsyonlar için steril hücre ortamı*

## Prosedür

1. Lamel, hematositometrenin tam ortasına gelecek şekilde yerleştirilir.



2. 500µl hücre, ortamla birlikte mikrofüj tüpüne alınır. Eğer örnek hacmi azsa 100µl de alınabilir.
3. 50µl hücre, 50µl tripan mavi ile birlikte mikrofüj tüpüne koyulur. Tüpe hafifçe vurularak karışmaları sağlanır.
4. 50µl hücre/tripan mavi karışımı pipetörle çekilir. 20µl'si, pipetörün ucundaki damla kılcal hareketle lamele emdirilerek lamın her kenarına yayılır.
5. Hematositometre hemen mikroskoba yerleştirilir ve düşük güçte hematositometrenin çizgileri bulunur. Sadece bir 1-mm'lik karedeki hücreler sayılacaktır; bu yüzden lamın bir köşesine odaklanılır ve daha fazla büyütme oranı olan bir objektife geçilir.
6. 1mm'lik alandaki 25 karenin içindeki hücreler kabaca sayılır ve hücrelerin ne kadar seyreltilmesi gerektiğine karar verilir. İdeal olarak, 1mm'de 30 ile 300 hücre olmalıdır. Eğer daha fazla hücre varsa, 1:5 veya 1:10 seyreltme yapılır.



7. 1mm'lik karedeki canlı hücreler sayılır. Ölü hücrelerin her tarafı maviye boyanacaktır, canlı hücreler boyanmayacaktır.
8. 3 farklı 1mm'lik kare sayıldıktan sonra toplam hücre sayısı üçe bölünür ve ortalama alınır.
9. Böylelikle ml başına düşen hücre sayısı hesaplanır. 1 ml'ye düşen ortalama hücre sayısı x 10.000X dilüsyon oranı = Orijinal örnekte 1ml'ye düşen hücre sayısı
10. Orijinal kültürdeki canlı hücrelerin yüzdesi hesaplanır. 3 tane 1mm alandaki canlı hücre sayısı canlı olmayan hücre sayısına bölünür ve 100 ile çarpılır.

## **Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması**

Hücreler büyüdükçe fenotipleri değişebilir. Hücrelerin değişmeden tahmin edilebilir bir durumda bulunmaları gerektiği için hücreler en kısa zamanda dondurularak saklanmalıdır.

### **Protokol**

#### **Hücrelerin Dondurulması**

1. Hücreler her zaman büyütüldükleri ortam ve serumda logaritmik faza kadar büyütülür.
2. Canlı hücre sayımı yapılır. Dondurulacak hücrelerin %20'sinden fazlasının ölü olmamasına dikkat edilir.
3. Ne kadar hücreye ve ampüle ihtiyaç duyulacağına karar verilir. Her ampül, 1ml ortam içinde  $1 \times 10^7$  (ya da  $4 \times 10^6$  ile  $2 \times 10^7$  hücre arası ) hücre alabilir.
4. Dondurma ortamı her tüpte 1ml artı %10 olacak şekilde hazırlanır. Dondurma ortamı genelde normal kültür ortamı, %10-20 serum ve %5-10 gliserol ve DMSO içerir. Eğer hangi dondurma ortamı kullanılacağına karar verilemiyorsa hücreler %20 serum ve %10 DMSO'da dondurulabilir.
5. Pelet, dondurma ortamında pipetaj yapılarak çözülür.
6. Hücreler, her ampüle 1ml düşecek şekilde ampüllere dağıtılır ve buzda tutulur.
7. Ampüller buzlukta saklanacak bir kutuya yerleştirilir ve  $-60^{\circ}\text{C}$  veya daha düşük bir sıcaklıktaki dondurucuda 16 ile 24 saat arası bekletilir.
8. Bir buz kovasına bir miktar sıvı azot dökülür ve tüpler, sıvı nitrojen tankına aktarılmadan önce burada tutlur.
9. Tüpler yerleştirildikten sonra nereye koyuldukları kaydedilir.

## KONTAMİNASYON

Kontaminasyon bakteriden, mayadan, mantardan, mikoplazmadan ve diğer doku kültürlerinden kaynaklanabilir.

### Kontaminasyonu Nasıl Tanırız?

**Makroskopik olarak:** Kültür şişesini veya kabını ışığa tutularak şunlara dikkat edilerek incelenir:

- *Bulanıklık.* Kültür yoğun olsa bile, ortamın rengi bulanık değil, net bir şekilde görünmelidir. Ortamdaki bulanıklık ve kısım kısım hareket eden renk tonu farklılıkları dikkatle incelenmelidir. Bazı mantarlar ortamda yüzen koloniler oluşturabilirler.
- *Ortamdaki renk değişikliği.* Fenol kırmızısının etkisiyle kırmızı renkli olan kültür, asidik koşullarda sarıya, bazik koşullarda ise mora döner. Bakteriyel kontaminasyon ortamı sarıya, mantar kontaminasyonu ise pembeye dönüştürür.
- *Koku.* Şişenin kapağı açılmadan burun şişeye yaklaştırılır. Birçok kontaminasyonun fark edilebilir bir kokusu vardır.

**Mikroskopik olarak:** Kültür şişesi öncelikle 10X mikroskopta şunlara dikkat edilerek incelenir:

- *Diğer organizmalar.* Düşük büyütme gücünde, mantar miselleri uzun zincirler olarak gözlenir. Bu büyütmede mayalar da küçük toplar halinde, bazen de tomurcuklu bir şekilde görülebilirler.  
Yüksek büyütme gücünde bakteriler gözlenebilir. Bakteriler çubuk, kok, tek veya zincirlenmiş öbekler halinde olabilirler.
- *Zarar görmüş hücreler.* Enfeksiyon, hücreleri öldürebilir. Her hücrenin parçalanmasına ve/veya hücre tabakasının yüzeyde kalkmasına sebep olabilir. Çoğu zaman hücreler normalde olduklarından daha garip görünürler. Daha küçük veya daha büyük ya da koyu renk granüllü olabilirler.

### Çapraz Kontaminasyon

Hücreler, diğer kültürleri enfekte edebilirler. Bu çapraz kontaminasyon oldukça yaygındır; fakat şunlar yapılarak çapraz kontaminasyondan kaçınmak mümkündür:

- Hücreler, daha önceden bilinen ve güvenilen bir yerden alınmalıdır.
- Aynı anda iki farklı hücre hattıyla çalışılmamalıdır.

- Aynı pipet farklı hücre hatları için kullanılmalıdır.
- Aynı ortam ya da tripsin şişesi farklı hatlar için kullanılmalıdır.
- Bir pipet, hücrelerin olduğu şişede kullanıldıktan sonra ortam şişesine tekrar sokulmamalıdır.

Eğer hücreler aniden hızlı bir şekilde büyümeye başlarsa veya normalden farklı davranmaya başlarsa, mikoplazma kontaminasyonu olmadığı tespit edildikten sonra çapraz kontaminasyon için kontrol edilmelidir.