

60733

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PRİMER TAVŞAN BÖBREK HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN
KRİOPREZERVASYONU

TEZ YÖNETİCİSİ
PROF. DR. EROL AKAN

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
NİZAMİ DURAN

ADANA/1997

KABUL ve ONAY SAYFASI

Ç.Ü.SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Nizami Duran'ın Master tezi olarak hazırladığı "Primer tavşan böbrek hücre kültürünün krioprezervasyonu" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Gereğini arz ederiz.

24.01.1997

Başkan :Prof. Dr. Erol AKAN

Üye :Prof. Dr.Fatih KÖKSAL

Üye :Doç. Dr. Fügen YARKIN

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 22.1.97 gün ve 3/11-2 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Güneş T. Yüreğir
Enstitü Müdürü
Prof. Güneş YÜREĞİR

İÇİNDEKİLER

KONU	SAYFA
TABLO LİSTESİ	I
ŞEKİL LİSTESİ	II
ÖZ	III
ANAHTAR KELİMELER	
ABSTRACT	IV
KEY WORDS	
1-GİRİŞ VE AMAÇ	1
2-GENEL BİLGİLER	3
3-GEREÇ VE YÖNTEMLER	34
4-BULGULAR	45
5-TARTIŞMA VE SONUÇ	54
6-KAYNAKLAR	60
7-ÖZGEÇMİŞ	66

TABLO LİSTESİ	SAYFA
TABLO-I: Pasaj öncesi tavşan böbrek hücre kültürünün gelişmesi ile ilgili faktörler	46
TABLO-II: 1. pasaja ait primer tavşan böbrek hücre kültürünün gelişmesi ile ilgili faktörler	47
TABLO-III: 2. pasaja ait primer tavşan böbrek hücre kültürünün gelişmesi ile ilgili faktörler	48
TABLO-IV: 1. Metod sonrası hücrelerin canlılık oranları	51
TABLO-V: 2. Metod sonrası hücrelerin canlılık oranları	51
TABLO-VI: 3. Metod sonrası hücrelerin canlılık oranları	52
TABLO-VII: 4. Metod sonrası hücrelerin canlılık oranları	52
TABLO-VIII: 5. Metod sonrası hücrelerin canlılık oranları	53

ŒEKİL LİSTESİ

SAYFA

- ŒEKİL-1:** Primer tavşan böbrek hücre kültüründe 36.saatte tespit edilmiş telofaz safhası (X1000) 49
- ŒEKİL-2:** Monolayer tarzda üremiş primer tavşan böbrek hücre kültürü (X100) 49
- ŒEKİL-3:** Monolayer tarzda üremiş primer tavşan böbrek hücre kültürü (X400) 50



PRİMER TAVŞAN BÖBREK HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN KRİOPREZERVASYONU

ÖZ

Bu çalışma primer tavşan böbrek hücre kültürünün gelişmesiyle ilgili faktörlerin araştırılması ve hücrelerin krioprezervasyonunun optimizasyonu için yapılmıştır. Hücrelerin üremeleri ile ilgili faktörler (Na^+ , K^+ , O_2 , CO_2 , H^+ , pH, hücrelerin canlılık oranı ve hücre sayısı) değerlendirildiğinde primer tavşan böbrek hücre kültürünün devam ettirilmesi için %10 dana serumlu Hanks besiyerinin uygun olduğu görülmüştür. Hücrelerin krioprezervasyonu için en iyi metodun hücrelerin Hanks besiyeri ve fetal dana serumundan (1:1) oluşan %10 DMSO'lu dondurma solüsyonunda $+4^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika, sonra styrofoam kutu içinde -20°C 'de 1 saat ve -70°C 'de 1 gece tutulduğu ve sıvı azotta 40 gün bekletilen metod olduğu tespit edilmiştir. Bu metodla hücrelerin %84 oranında canlılığını koruduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Primer tavşan böbrek hücre kültürü,
Krioprezervasyon, Hanks besiyeri, Na^+ , K^+ ,
 O_2 , CO_2 , H^+

CRYOPRESERVATION OF PRIMARY RABBIT KIDNEY CELL CULTURE

ABSTRACT

This study was performed for investigation the factors associated with propagation of primary rabbit kidney cell culture and to optimize cryopreservation of the cells. When the factors (Na^+ , K^+ , O_2 , CO_2 , H^+ , pH, cell viability rate, cell count) related with growth of cells were evaluated, it was observed that Hanks' medium with 10% fetal bovine serum was appropriate for maintenance of primary rabbit kidney cell culture. It was detected that the best method for the cryopreservation of cells was the method with which the cells in the freezing medium containing fetal bovine serum and Hanks' medium (1:1) and %10 DMSO were holded at $+4^\circ\text{C}$ for 30 minutes, then at -20°C for 1 hour and at -70°C overnight in a styrofoam box and stored in liquid nitrogen for 40 days. The cell viability was found to be 84% with this method.

Key Words: Primary rabbit kidney cell culture, Cryopreservation,
Hanks' medium, Na^+ , K^+ , O_2 , CO_2 , H^+ .

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Virus enfeksiyonları gerek patogenez ve prognoz gerekse epidemiyolojik özellikleri yönünden diğer mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlar kadar önemlidir. Epidemiyolojik çalışmalar solunum yolu ve gastrointestinal sistem enfeksiyonlarının en azından %50-%70'inin viral etyolojiye bağlı olduğunu göstermektedir (50,57).

Virus enfeksiyonlarının tanısında örneklerde viral partiküllerin veya antijenlerin direk tespiti ile enfeksiyon ajanına karşı antikor cevabının değerlendirildiği serolojik deneyler pratik ve hızlı metodlar olduğundan daha çok tercih edilmesinin yanısıra son yıllarda moleküler biyolojik yöntemlerin de yaygın olarak tanı amacıyla kullanılmasına rağmen tanıda "altın standart" hastalık etkeni olan virusların hücre kültürlerinde izolasyonudur. Bu sebeple hücre kültürlerinin kullanılması vazgeçilmez bir ihtiyaçtır (2,3).

Hücre kültürleri ayrıca antiviral kemoterapi konusunda in vitro çalışmalar, viral aşuların üretimi, virus ve konak hücre arasındaki ilişkilerin araştırılması ile virusların biyolojik özelliklerinin öğrenilmesinde de son derece önem taşımaktadır. Moleküler biyolojide yapılan araştırmalar hücre kültürüne verilen değeri daha da artırmıştır. Son yıllarda, sitokinler, özellikle de interferon gibi biyolojik aktif maddelerin elde edilmesinde de hücre kültürlerinden yararlanılmaktadır (13,15,23).

Hücre kültürlerinin gelişimindeki bazı başarılarla rağmen, hazırlanmasında kullanılan yöntemler standart olmadığından laboratuvar şartlarına göre değişmektedir. İnsan sağlığı için önemli virusların (HSV, CMV, enterovirus gibi) üretilmesinde primer insan embriyonik hücre kültürü ve diploid insan akciğer fibroblast hücre kültürü ile HeLa, HEp-2 ve Vero gibi devamlı hücre kültürleri en çok kullanılan hücre kültürleridir. Bu hücre kültürleri ile yapılan pek çok araştırmaya rağmen hücrelerin laboratuvar şartlarına adaptasyonu ve kültürlerin uzun süre devam ettirilmesine etki eden faktörler henüz tam olarak bilinmemektedir. Bunlar fiziksel ve kimyasal faktörler olabilirken, hücrelerin bugüne kadar belirlenmemiş biyolojik özellikleri de olabilir (13,15,50).

Viroloji laboratuvarlarında gerektiğinde kullanılmak üzere çeşitli primer ve devamlı hücre kültürlerinin krioprezervasyonunun yapılması hücrelerin temini için oldukça önemlidir. Çeşitli hücre kültürlerini laboratuvar şartlarında muhafaza etmek amacıyla bu hücrelerin kültürlerini sürekli olarak pasaj yapmak birçok problemi de beraberinde getirmektedir. Hücre kültürlerinin sürekli olarak yapılmasının zorluğu ve hücrelerin üretilmesi için kullanılan besiyerleri ile fetal serum gibi reagenlerin sarfiyatından kaynaklanan ekonomik kayıp bu problemlerden önemli olan iki tanesidir. Ayrıca primer hücrelerin uzun süre in vitro şartlarda pasajlarını yaparak saklamak mümkün olmamakta biyolojik özelliklerindeki değişiklikler sebebiyle ancak birkaç pasaj yapılabilir. Bu sebeplerden dolayı canlı hücrelerin krioprezervasyon metodlarının geliştirilmesi gerekmektedir (8,15).

Bu çalışma ile laboratuvar şartlarında ürettiğimiz primer hücre kültürlerinin gelişmesine etki eden faktörlerin araştırılması ve hücrelerin krioprezervasyonunun optimizasyonu için en uygun metodun tespitini amaçladık. Çalışmada primer hücre kültürü modeli olarak tavşan böbrek hücre kültürlerini kullandık.

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Fonunca SBE.95.19 nolu proje olarak desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Viral enfeksiyonların tanısı, virusların izolasyonu ve identifikasyonu, viral immünoloji ve fizyolojisi, aşı üretimi ve antiviral kemoterapinin oluşturulmasında hücre kültürü tekniği vazgeçilmez bir öneme sahiptir (1,52,59,61).

TARİHÇE: Hücre kültürleri ile ilgili ilk çalışmalar 19. yüzyılda başlamış, fizyologlar çeşitli organ ve dokuların organizmanın ölümü ile birlikte hemen ölmediklerini, metabolizmalarının bir müddet daha devam ettiğini tespit etmişlerdir. Wilhelm Roux ilk defa (1885) tavuk embriyosunun sinir hücrelerini 37°C'de tuzlu suda bekletmiş ve bu hücrelerin organizma dışında bir iki gün kadar canlı kaldığını görmüştür. Aynı dönemde Arnold, tuzlu su içindeki kurbağa lökositlerinin aktivitelerini koruduğunu gözlemiştir. Loeb (1897) kan yapan hücreleri ve bağlayıcı dokuları in vitro olarak uzun süre yaşatmıştır. Ljunggren ise insanlara ait deri parçalarını asit sıvısı içinde canlı olarak haftalarca muhafaza edebilmiştir (3,7,29).

Modern anlamda doku kültürü tekniği ilk defa 1907 yılında Harrison tarafından geliştirilmiştir. Harrison aseptik olarak çıkardığı kurbağa sinir dokusunu koagüle kurbağa lenfi içinde haftalarca yaşatmış ve sinir hücrelerinin geliştiklerini gözlemiştir. Zamanla hücre kültürü teknikleri geliştikçe bakteriyel kontaminasyon problemi görülmüş ve deneysel cerrahi çalışmaları ile Nobel ödülü kazanan Alexis Carrel (1927) hücre kültürlerinin hazırlanması için aseptik teknikler kullanarak bakteri kontaminasyonlarını önlemiş, böylece antisepsi ve sterilizasyonun önemini göstermiştir. Carrel, ayrıca hücre üretilmesi için uygun besiyeri yapılmasına yönelik araştırmalarına da başlamıştır. Bu çalışmaları daha sonra Baker ile birlikte yürütmüştür. Bu çalışmaların ışığında sentetik besiyerleri yapılmaya başlanmış ve ilk defa 1933 yılında Vogelaar ve Ehrlichmann pepton, hemin, sistin, insülin, tiroksin ve glukozdan oluşan bir sentetik besiyeri hazırlamışlardır (3,29,50).

Böylece ilk defa 1907 yılında başlayan hücre kültürü çalışmaları, bakteriyel kontaminasyonlarla mücadeledeki güçlük ve hücre kültürlerinde üreyen virusların nasıl tespit edileceğinin bilinmemesi gibi sebeplerle 1947 yılına kadar gerçek anlamda değerini

bulamamıştır. Antibiyotiklerin kullanım alanına girmesinden sonra kontaminasyon önlenerek hücre kültürlerinin yapılabilmesi mümkün olmuştur (29,34).

DOKU KÜLTÜRÜ

Doku kültürü; hücre, doku ve organ parçaları veya bir organın tümünün kültürü anlamında kullanılan genel bir terimdir.

Doku veya organ kültürü doku veya organ parçalarının genel özellik ve normal fonksiyonlarının korunarak kültüvasyonudur. Organ kültüründe in vitro doku bütünlüğü ve hücreler arası ilişki in vivo durumdakine çok yakındır. Organın yapısı, fonksiyonları, histolojik ve biyokimyasal özellikleri korunur. Organ kültürü kısa ömürlüdür, günlerce bazen haftalarca üremeyen stabil bir durumda kalır ve in vitro olarak çoğaltılamaz. Organ parçacıkları şişe yüzeyinde veya petri kutusuna konan koruyucu, tespit edici ve besleyici görevi olan plazma üzerine yerleştirilebileceği gibi koruyucu bir madde olmadan önceden ısıtılmış (45°C) şişenin yüzeyine de konularak dokunun yüzeye yapışması sağlanabilir. Organ kültürü özellikle deri, beyin, solunum ve özefagusun kirpikli epiteli ile fetal barsak epitelinden yapılmaktadır. Bu kültür çoğunlukla viral enfeksiyonlardan sonra meydana gelen histopatolojik değişiklikleri incelemek amacıyla kullanılır. Solunum yolu epitelinin organ kültürlerinden solunum virusları ile enfeksiyonların histopatogenezinin çalışılmasında faydalanılır (2,3,7,8,39).

Doku veya organ parçalarının in vitro olarak fizyolojik tuzlu suda 24-72 saat muhafaza edilmesine "canlı kalmış doku" denir. Doku 37°C'de inkübasyona bırakılır, hücre üremesi meydana gelmez (29).

Hücre kültürü ise bir doku veya organdan hücrelerin izole edilip in vitro olarak üretilmesi ve devam ettirilmesidir. Hücreler, dokudan mekanik veya enzimatik yollarla ayrıştırılarak üretilebileceği gibi şişe yüzeyine eksplante edilen doku parçasından spontan migrasyonla şişe yüzeyine yayılarak da üreyebilir (3,15,34).

Hücre kültüründe hücreler artık doku organizasyonu göstermez. Bu sebeple genellikle histiotipik yapılarını ve sıklıkla bununla ilişkili olarak biyokimyasal özelliklerini kaybetmişlerdir. Hücre kültüründe genellikle özel şartlar sağlandığı takdirde hücreler çoğalmadan canlılıklarını korurlar. Buna karşılık hücreler çoğaltılarak fazla miktarda hücre

elde edilebilir. Hücreler karakterize edilebilir, seçici besiyerinde üretilerek, fiziksel hücre seperasyonu yapılarak veya klonlama ile fenotipik veya genotipik olarak purifiye edilebilir ve belirli bir hücre popülasyonu dondurularak saklanabilir. Hücre kültürleri genellikle **primer hücre kültürü, diploid hücre kültürü ve devamlı hücre kültürü** olmak üzere 3 gruba ayrılır (15,22,23).

Primer hücre kültürü: Organizmadan alınan taze organ ve dokulardan ilk üretilen hücre kültürüdür. Primer hücre kültürü, organ veya dokulardan mekanik yöntemler, enzimatik yöntemler veya primer eksplant tekniği ile hazırlanabilir. Canlı hücreler, içinde besiyeri bulunan kültür şişelerine inoküle edildiğinde şişe yüzeyine yapışır ve çoğalmaya başlar. Hücreler birbirine değdiğinde kontakt inhibisyon ile çoğalma durur ve böylece tek tabakalı hücre kültürü gelişir. Transforme olmayan hücreler için düz bir yüzeye yapışmak esastır. Bu sebeple hem primer hem de diploid hücre kültürlerinin süspansiyon kültürleri yapılamamıştır (2,37,57,61).

Primer kültürlerde metabolik aktivite düşük olduğundan besiyerlerinde asit birikimi yavaştır. Primer hücreler en fazla 8-10 pasaj devam ettirilebilir. Bu hücreler genellikle orijinal hücrelerin karakteristik diploid kromozomuna sahiptir. Primer hücre kültürü genellikle epitelyal, fibroblast veya hem epitelyal hem fibroblast hücrelerin bulunduğu heterojen yapı gösterir. Her ne kadar, özellikle echoviruslar veya ortomyxovirusların izolasyonu için faydalı ise de, primer kültür teknikleri bazı dezavantajlara sahiptir. Kültürler taze doku örneklerinden hazırlanmalıdır. Primer hücre kültürlerinin hazırlanması güçtür, özel ihtimam gerektirir. Kontaminasyon veya konak hücrede endojen virusların latent halde bulunması hücrenin üremesi ve virus izolasyonunda zorluklar yaratabilir (8,23).

Eksplant Metodu: Bu metodla primer hücre kültürü hazırlanmasında dokular küçük parçalara ayrılır ve kültür şişesine yerleştirilir. Metod ilk kez 1907 yılında Harrison tarafından tanıtılmıştır. Harrison normal embriyo kurbağa sinir dokularını kullanmıştır. Gey ve arkadaşları 1951 yılında insan servikal kanserinden hücre kültürü başlatmış ve HeLa dizisini üretmişlerdir. Eksplant metodu özellikle küçük doku örnekleri için uygundur. Dışa göç eden ilk hücreler fibroblast hücreler olup daha sonra epitelyal hücrelerdir. Bu metodun

esas amacı, dışarıya alınan doku parçasının kenarında oluşacak hücre proliferasyonunu uyarmaktır. Bu metod fibroblast benzeri hücre kültürleri ile ayrıştırılmayan dokulardan hücre kültürü hazırlamak için oldukça elverişlidir. Genç donörlerden alınan eksplantların kültüründe başarı oranı daha yüksektir. Pek çok eksplant kültüründe ilk 24 saat içinde hücreler çoğaldığı halde, bazı kültürlerde 10 güne kadar hiçbir ilerleme gözükmez (7,13,15,39,52).

Eksplant kültürü yapılırken, doku parçalarının büyüklüğü ve hazırlanışlarına, üredikleri yüzeye yapışmalarına ve uygun kültür besiyerinin seçimine özellikle dikkat edilmelidir. Doku parçalarının büyüklüğü 1-3 mm³ arasında olmalıdır. Küçük parçalarda çok az sayıda hücre bulunur. Büyük parçalarda ise hem besiyerindeki besleyici maddelerin dokuya difüzyonunda, hem de toksik metabolitlerin dokudan atılmasında güçlükler olabileceğinden nekrotik alanlar gelişebilir. Bu sebeplerle gerek küçük, gerek büyük parçalarla başarılı sonuçlar alınmaz. Dokular kesilirken, dokuların ezilmesinden ve yırtılmasından kaçınılmalıdır. Düzgün kenarlı dokular çıkartabilmek için küçük, keskin makas ve aletlerin kullanılması gerekir. Aslında, organ kültüründe her zaman muntazam kenarlı dokuların çıkartılması önemli olmayabilir. Çünkü muntazam olmayan kenarlar hücre çoğalmasını uyarırlar. Hazırlama safhasında ezilme ve zedelenmelerden kaçınılmalıdır. Bu durum hücre gelişimini ve hayatiyetini engelleyebilir. Dokuların yüzeye sıkıca bağlanmasını sağlayabilmek için dokular plazma pıhtısı üzerine yerleştirilebilir. Bazı metodlarda ise kullanılan besiyerinin hacmi kısıtlanır. Böylece kapiller hareketle dokular yüzeye tutunmuş olur. Besiyerine serum ilave edilmediği sürece kültürlerin başarılı sonuçlar vermesi pek mümkün değildir. Yaygın olarak %10 veya %20 fetal serumlu besiyerleri kullanılmaktadır. Primer kültürlerin yapımında tek hücre veya ufak hücre grupları elde edildiğinde genellikle eksplant metodundan daha hızlı hücre çoğalması sağlanır. Dokulardan tek tek hücreler veya hücre grupları elde edebilmek için fiziksel veya enzimatik metodlar uygulanır. Hangi metodun seçileceği, kullanılacak hücrenin özelliğine bağlıdır (3,15,29,37).

Fiziksel Ayrıştırma: Hücrelerin birbirlerine veya stromaya gevşek bağlandığı dokularda fiziksel metodlar oldukça uygundur. Lasforges ve Ozzelo'nun 1958'de, Lasforges'in 1975 yılında kullandıkları meme kanser dokularından hücre ayrıştırma metodu örnek olarak verilebilir. Bu metoda göre önce donör dokusu kültür besiyerinde parçalara

ayrılır. Daha sonra sedimentasyon yoluyla filtre edilerek dökülen hücreler toplanır. Benzer bir yöntem Lechner tarafından insan neonatal prostatik epitelinden tek sıralı hücre kültürlerinin elde edilmesinde için kullanılmıştır. Bazı organlarda perfüzyon metodu primer kültürler için gerekli sayıda hücrenin elde edilebilmesini sağlar. Primer hepatosit kültürleri ve sıçanların pankreas adacıklarının hücre kültürleri bu yolla hazırlanmaktadır. Perfüzyonla ayrıştırmak için verilen bu iki örnek, aynı zamanda fizyolojik tuzlu su ile perfüzyon sırasında veya bunu takiben enzimatik ayrışma aşamasını da kapsar. Sedimentasyon için kısa süre bırakılan venöz kan lökosit açısından zengin çöküntülere yol açar. Bu da, kısa süreli kültür gerektiren durumlarda ve karyolojik çalışmalarda rutin olarak kullanılır.

Sözö edilen birkaç örnekten de anlaşılacağı gibi fiziksel hücre ayrıştırma metodları bir veya daha fazla aşamadan oluşmaktadır. Doku kesilir veya parçalara ayrılır, perfüze edilir veya mekanik olarak parçalanır, hücreler filtrasyon, sedimentasyon veya santrifüj ile toplanır (8,10,39).

Enzimatik Ayrıştırma: Donör dokusundan hücreleri ayrıştırmak için kullanılan metodların hücrelere hasar vermemesi temel unsurdur. Çok değişik tür donör dokularından hücrelerin ayrıştırılması için enzimatik veya diğer kimyasal metodlar rutin olarak kullanılmaktadır. Özellikle enzimatik aktivite, ayrıştırma tekniğinin önemli bir parçasıdır. Ayrıştırma işlemi ilk olarak donör dokusunun 1-3 mm³'lük parçalara ayrılmasıyla başlar. Bu işlem yapılırken hem enzimatik aktivasyonun etkileyebileceği maksimum yüzey alanı elde edilebilmeli, hem de mümkün olduğu kadar hücreler zarar görmeden dokunun parçalanmasına dikkat edilmelidir. Daha sonra bu parçalar kan ve hücre kalıntılarının temizlenmesi için dengeli tuz solüsyonları ile yıkanır, parçalanmış dokular, uygun konsantrasyondaki enzim solüsyonuna aktarılır ve karıştırılır. Enzim konsantrasyonu ve karıştırma hızı her sistem için deneysel yollarla belirlenmelidir (10,15,23,37).

Tek bir peryod yerine kısa ve fazla sayıda enzimle karıştırma peryodu tercih edilmelidir. Bu işlem enzimlerin hücrelere verdiği hasarın azalmasını sağlar. Daha sonra, primer kültürü başlatmak için toplanan hücreler uygun hücre üretme besiyeri ilave edilerek inkübasyona bırakılır.

Primer hücre kültürünün hazırlanmasında en sık kullanılan enzimler; tripsin,

kollagenaz, elastaz, hiyaluronidaz, DNaz, pronaz, dispaz veya bu enzimlerin değişik kombinasyonlarıdır (2,15,61). Dokuların ayrıştırılması için fazla saf olmayan enzim preparatları tercih edilmektedir. Tripsin, memeli pankeasından elde edilen bir preparat olup içerisinde tripsin ve tripsinojenin yanısıra önemli miktarda kemotripsin, kemotripsinojen, elastaz, amilaz, DNaz, RNaz bulunur (32,39).

Hücreler en iyi tripsin ve pronaz ile ayrıştırılabilir. Fakat bu enzimler hücrelere zarar verebilir. Belirli tip dokuların ayrıştırılmasında *Clostridium histolyticum*'un kollagenaz preparatı da yaygın olarak kullanılmaktadır. Kollagenaz ve dispaz tam olmayan bir ayrışma sağlar. Ancak hücreler için daha az zararlıdır. Hücreler arası bağ dokusunu sindirmek için hiyaluronidaz ve kollagenaz birlikte kullanılabilir. Kollagenazın çalışması için Ca^{+2} iyonu gereklidir. Bu sebeple Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonları ya tek başına veya etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)'e bağlı olarak ortama eklenir. Doku ayrışmasında uygun enzimi seçebilmek için çalışılacak hücrelerin birbirlerine veya donör dokusuna ne şekilde bağlandıklarının bilinmesi gereklidir. En uygun ayrıştırma şartlarını seçebilmek için mümkün olduğu kadar kontrollü deneylerin yapılması gerekmektedir (3,8,23).

Diploid Hücre Kültürü: Primer hücre kültürlerinin subkültürü ile elde edilen hücre kültürlerinin histolojik olarak tek hücre tipinden oluşan az sayıda pasajı yapılabilen hücre kültürleri sonlu ve devamlı hücre kültürleri olmak üzere iki çeşidinin olduğu bilinmektedir. Bunlardan az sayıda pasajı yapılabilen hücre kültürleri sınırlı sayıda subkültürden sonra üreme yeteneklerini kaybederler. Devamlı hücre kültürleri ise sınırsız bölünme kapasitesine sahiptirler. Bu hücrelerin sonsuz sayıda subkültürleri yapılabilir. Az sayıda pasajı yapılan hücre kültürleri **diploid hücre kültürü** olarak da adlandırılır. Diploid hücre kültürü genellikle iğ şeklindeki fibroblastoid hücrelerden oluşur. Bu hücreler insan embriyonik dokularından veya yeni doğan sünnet derisinden elde edildiğinde 50-100 pasaj yapılabilir. İlk pasajlara ait hücre kültürleri sıvı nitrojende saklanabilir ve bu hücreler viral duyarlılıkta değişme meydana gelmeden önce 8-10 pasaja kadar kullanılabilir. Primer hücreler gibi bu hücrelerin en azından %75'i orijinal olarak elde edildiği normal hücre türü ile aynı karyotipe sahiptir. Diploid hücre kültürleri bazı viruslar için primer kültürler kadar duyarlı değildir. Ayrıca, çok sayıda pasaj yapılmış kültürlerde virus replikasyonu yeterli olmayabilir. Diploid hücre kültürlerine örnek

olarak insan akciğer fibroblast kültürleri olan MRC-5 ve WI-38 verilebilir (2,61).

Devamlı hücre kültürü: Sonsuz üreme özelliği olan ölümsüz hücrelerden oluşur. Devamlı hücre kültürleri in vitro olarak hücrelerin spontan veya kimyasal ajanlarla transformasyonu sonucu veya tümörlerden alınan hücrelerden elde edilir (2,52). Normal hücre kültürünün devamlı hücre kültürü olabilmesi için en az 50 veya daha fazla subkültürünün yapılmış olması gerekir. Genellikle in vitro uzun hayat süreleri boyunca geçirdikleri mutasyonlar sonucu gerek morfolojik gerekse biyokimyasal özellikleri bakımından orijinal hücrelerden farklılık gösterirler. Genellikle poligonol, bal peteği şeklinde epitelyal hücre morfolojisi görülür. Devamlı hücreler genellikle kromozom sayıları bakımından aneuploiddirler (13,57,61).

Devamlı hücre kültürü, primer veya diploid hücre kültürü ile kıyaslandığında cam veya plastik yüzeyde kültürünün başlatılması için gereken hücre sayısı daha azdır, üreme oranı daha hızlıdır ve kontakt inhibisyon kaybolmuştur. Sonuç olarak bu hücreler aşırı üremeye eğilim gösterirler.

Devamlı hücre kültürleri tanı laboratuvarlarında sıklıkla kullanılır. Bunlar HeLa (insan servikal epitelyal karsinoma) HEp-2 (insan larinks epitelyal karsinoma), BHK 21 (Bebe hamster böbreği; Baby Hamster kidney), MDCK (köpek böbreği; canin kidney), RK 13 (tavşan böbreği; rabbit kidney), Vero (Afrika yeşil maymun böbreği) ve RD (insan rabdomiyosarkom) hücre kültürü kültürüdür. HeLa ve HEp-2 hücreleri HSV, adenovirus, poliovirus, coxsackievirus gibi virusların üretilmesi için kullanılır. Bazı HeLa hücrelerinin özel klonları (HeLa Bristol veya Ohio) RSV ve bazı rhinoviruslar için duyarlıdır. Vero hücreleri bu virusların üremesi için uygun olup arbovirusların üretilmesinde BHK 21 hücrelerine ilaveten kullanılır. RK 13 hücreleri ve BHK 21 hücreleri rubella virusunun üretilmesi ve izolasyonu için uygundur. RD hücreleri Coxsackie A virusunun izolasyonunda kullanılır (8,23,59).

Kültürleri Yapılan Hücrelerin Üretilmesi

Hücre kültürleri genelde embriyonik dokulardan hazırlanır. Embriyonik doku erişkin dokuya göre daha uzun süre yaşatılır ve çoğaltılır. Bu durum muhtemelen embriyoda çoğaltılması

prekürsör veya kök hücrelerin varlığına ve differensiyasyonun daha düşük düzeyde olmasına bağlıdır. En yaygın kullanılan embriyonik hücre dizileri MRC-5 ve diğer insan embriyonik akciğer fibroblast hücre kültürleridir. Mezodermal hücrelerin (fibroblast, endotelyum ve miyoblast) kültürünü yapmak epitelyuma (nöronlar ve endokrin doku) göre daha kolaydır (15,22,23). Erişkin dokuların genellikle daha düşük üreme oranına sahip olması çoğalmayan differensiyasyon hücrelerin yüksek oranına bağlıdır. Erişkin dokular daha organize yapı gösterir ve zor ayrışır. Kültürün gelişmesi ve hücrelerin çoğalması başlangıçta daha uzun zaman alır ve kültürün hayat süresi daha kısadır. Erişkin dokularında endojen virusların olma ihtimalinin fazla olması hücre kültürü yapımı için bir dezavantajdır (37).

Hücrelerin içinde veya üzerinde ürediği ortam tek tabakalı hücre kültürünün üretildiği plastik ve cam şişeler gibi katı bir yüzey, kollajen veya agar gibi jel içerisinde üretilmesinde yarıkatı veya süspansiyon kültüründe olduğu gibi sıvı şeklinde olabilir. Hücrelerin çoğu proliferasyon için bir yüzey üzerinde yayılma ihtiyacı duyarlar. Fazla üreme, yüzeye yetersiz yayılma veya zayıf yapışmaya bağlı olarak hücre proliferasyonu inhibe olur. Hücrelerin üremesi için yüzeye yapışma ihtiyacına **tutunma bağımlılığı** (anchorage dependent) denir. Transformasyona uğrayan hücreler çoğunlukla yüzeyden ayrılıp serbest hale geçebilirler ve bu hücreler süspansiyon halindeki besiyerinde veya agar gibi yarıkatı besiyerinde ve süspansiyonlarla agarın birlikte kullanıldığı sistemlerde üretilebilirler (21,22,23,39).

Kültürü yapılan hücreler katı bir yüzeye, mesela şişenin veya buldukları kabın yüzeyine yapışarak veya besiyerinde hücre süspansiyonu halinde iki şekilde üretilebilir. Bunlardan birincisine "**stasyonel kültürler**", ikincisine "**süspansiyon kültürler**" denir (29,50).

Stasyonel kültürler **monolayer hücre kültürü** yani tek tabakalı hücre kültürü de denir. Bu terim uygun bir tabana yapışmış ve burada çoğalmış olan bütün hücre kültürleri için kullanılır. Stasyonel kültürler sabit veya döner kültür şeklinde yapılırlar. Sabit kültürler şişenin veya tüpün bir yüzünde üretilen hücre kültürüdür. Döner kültürler kendi eksenini etrafında dönen silindirik şeklindeki şişe veya tüplerde hazırlanır. Bu teknikte şişe veya tüpün bütün yüzeyinde hücre kültürü gelişmektedir. Fazla miktarda hücrenin gerekli olduğu durumlarda kullanılır.

Normal, yani non-transforme hücreler bir yüzeye yapışarak çoğalırlar. Süspansiyon

şeklinde üremezler. Bu hücrelerin hücre yoğunluğu artıp tek tabaka haline geldiklerinde üremeleri durur. Non-transforme hücreler kontakt-inhibisyon denen fenomene hassastırlar. Diğer taraftan transforme hücreler, daha değişik bir çoğalma yolu izlerler. Bu hücreler, tek tabakalı durumdan çok tabakalı (multilayer) duruma geçerler. Kontakt inhibisyon fenomeni yoktur. Teorik olarak devamlı çoğalabilirler. Transforme hücreleri süspansiyon kültürler halinde fazla miktarda üretmek mümkündür (2,50,61).

Süspansiyon kültürlerin avantajı tripsinizasyona ihtiyaç olmadan hücrelerin devamlı yenilenebilmeleri, hücre ve virus üretimini çok miktarda ve ekonomik olarak mümkün kılmalarıdır.

Primer kültürler direkt olarak organizmadan alınan taze organ ve dokulardan hücrelerin izole edilmesi ve üretilmesi ile elde edilir. Subkültür veya pasaj ise hücrelerin bir kaptan diğer bir kaba geçirilerek üretilmeleri anlamını taşır. Primer hücreler en fazla 9-10 subkültüre kadar orijin aldıkları hücrenin karyotipini korurlar. Oysa devamlı hücre kültürünü sürekli pasajlar yaparak devam ettirmek mümkündür ve bu sebeple viroloji laboratuvarlarında virus izolasyonu ve identifikasyonu için en sık kullanılan hücre dizileri devamlı hücrelerdir (37).

Kültürdeki Hücrelerin Morfolojisi

Kültürü yapılan hücrelerin morfolojisi in vivo ortamdakine göre değişiktir. İn vitro çoğaltılmak istenen hücre bu sırada 4 fazdan geçer (8,15,22).

1. Ayrılma Fazı (Dispersiyon): Direkt olarak insan, hayvan veya kültürden temin edilen hücreler, süspansiyon halinde iken normal şekilleri nasıl olursa olsun tek tek veya çok sayıda kümeler halinde birarada toplanmış yuvarlak ve ışığı fazla kıran yüzeyler şeklinde görülürler. Bunlar sıvıda bir arada veya tek tek serbest durumdadır. Orjinal şekillerinden farklı olarak protoplazmalarının kontraksiyonu sonucu yuvarlak şekle gelmişlerdir. Buna dispersiyon veya ayrılma fazı denir.

2. Yapışma Fazı: Süspansiyon halindeki serbest ve yuvarlak hücreler katı yüzey ile temas geldiklerinde buraya yapışır ve hücrenin yapısına göre poligonal veya fusiform şekle dönüşürler. Bu yapışma esnasında hücre çoğalması olmaz fakat hücre mitoz için hazırlanmaya başlar ve oldukça yüksek metabolik aktivite gösterir. Süspansiyon haldeki hücre 37°C'de 2 saat içinde katı yüzeye yapışır ve 24 saat içinde hücreler artık yerleşmiş ve açılmışlardır (8).

Embriyonal dokulardan hazırlanan hücreler 24 saat içinde yüzeye yapışarak karakteristik şekillerini alırlarken, yetişkin insan orijinli hücreler çok daha yavaş bir şekilde bu işlemi tamamlarlar. Yapışma süresi hücrenin tipine, doku türüne veya hayvanın orijinine bağlı olarak değişir. Mesela; maymun böbrek hücresinin ve genelde epitel hücrelerinin yüzeye yapışma süresi kısadır. Dana ve tavşan böbrek hücresinde bu süre biraz daha uzundur.

3. Çoğalma Fazı: Cama yapıştıktan birkaç saat sonra hücreler çoğalma fazına girerler. İstisnai durumlar dışında her hücreden 2 hücre meydana gelir. Amitoz çoğalma, kromozom formasyonu olmadan nükleusun bunu takiben de stoplazmanın ikiye bölünmesidir. Bu tip çoğalma genellikle azdır. Fakat in vitro çoğalan hücrelerde oldukça sık görülür.

Mitoz çoğalma en sık görülen replikasyon şeklidir. Kromozomlar bölünmeden önce ikiye ayrılır ve yavru hücreler diploid sayıda kromozom ihtiva ederler. Normal hücrelerde bulunan çift set kromozom diploid, şayet 3 set, 4 set veya daha fazla set ise triploid, tetraploid, heteroploid şeklinde isimlendirilirler. Bazen bipolar bölünme yerine multipolar bölünmeler meydana gelebilir. Bilhassa kanser hücrelerinde bu tip bölünmeler söz konusudur. Bir diğer anomali de hücrelerin normal diploid kromozom sayısı yerine aneuploid şeklinde çoğalmasdır. Mesela; HeLa hücrelerinde kromozom sayıları tesadüfidir. Bu durum aneuploid olarak isimlendirilir. Aneuploid predominanttır ve nesilden nesile bu tip hücrelerin meydana çıkma ihtimali bu şekilde kültürü yapılan hücrelerde yüksektir. Stabilite muhtemelen genetik faktör tarafından etkilenmiştir. Tümörlü dokulardan üretilen hücreler, normal yetişkin dokulardan üretilenlere nazaran daha az stabildir. Fakat bu kesin bir kural değildir.

4. Dejenerasyon Fazı: İn vitro kültürü yapıp çoğaltılan hücreler bir süre sonra ya gerekli maddelerin besiyerinde kullanılarak azalmasından veya aşırı toksik katabolitlerin ortamda birikmesinden dolayı dejenere olurlar.

HÜCRE KÜLTÜRÜ LABORATUVARININ ÖZELLİKLERİ

Bir hücre kültürü laboratuvarının ve burada kullanılan bazı malzemelerin diğer laboratuvarlardan farklı özellikleri vardır.

Hücre Kültürü Çalışma Alanları

Hücre kültürü uygulamalarının yapıldığı ortamın steril olması ve kontaminasyon ihtimalinin en düşük düzeye indirilmesi gerekir. Hücre kültürü laboratuvarının çalışma

alanları steril odalar veya laminar akım kabinleridir. Birçok mikroorganizmanın hava ve tozlarla taşındığı düşünülürse çalışma alanının mümkün olduğu kadar bunlardan arınmış olması gerekir. Bu sebeple çalışma sahalarında hava akımlarına neden olabilecek sık giriş ve çıkışlardan sakınmak gerekir (50).

Kullanılan Cam Malzemeler ve Temizliği

Bir hücre kültürü laboratuvarında kullanılan cam malzemelerin kalitesi çok önemlidir. Yumuşak cam (soda şişeleri) ve sodyum bikarbonat-kalsiyum oksit'den yapılmış malzemeler su ve tuz solüsyonlarında önemli ölçüde çözünür ve kısa sürede yıpranır. Sert cam ise potasyum karbonat veya aliminyum borosilikat'dan yapılmış malzeme olup yüksek pH ve ısı dışında çözünmeye daha dirençlidir. Yumuşak camdan yapılmış malzemeler, solüsyonların kısa süreli (1-2 hafta) saklanması sırasında kullanılabilirse de uzun süreli saklama ve kültür için en uygun olanı, payreks veya kimaks ticari isimleri ile bilinen sert camdan yapılmış malzemelerdir.

Cam malzemedeki kaynaklanan toksisite çok sık görülen bir olaydır. Bir diğer toksisite, cam malzemenin yıkanmasından kaynaklanır. Uygun deterjanın seçimi ve yıkamadan sonra ortamda deterjan artığının kalmaması için distile su ile bol bol durulama çok önemlidir.

Hücre kültürü laboratuvarlarında, yüksek kaliteli camlar olan borosilikatlı şişeler veya soda şişeleri kullanılırsa da daha çok borosilikatlı şişeler tercih edilir. Çünkü bu camlar güçlü deterjanlarla bile temizlenebilir. Bu şişeler hücrelerin yapışması ve üremesi için nötral yüzeye sahiptir ve otoklavda tekrar tekrar sterilize edilebilir. Soda şişeleri daha ucuzdur. Fakat otoklavda sık sık sterilize edilemezler. Aşırı sodayı uzaklaştırmak için şişeler asitle (%2'lik HCl) yıkanmalıdır.

Cam malzemelerin temizliğine çok önem verilmelidir. Önceki kültürden kalan hücre parçacıkları hücre kültürü tüplerinden uzaklaştırılmalıdır. Kullanılmış kültür tüpleri açıkta kovada kurutulmaya bırakılmamalıdır. Sodyum hipoklorite batırılmalı veya deterjanda bir gece bekletilmelidir. Bunu çok sayıda mekanik fırçalama işlemi izlemeli ve sonra 8-10 defa çeşme suyundan geçirilmeli ve en az beş defa saf su ile yıkanmalıdır. Cam malzeme kurutulduktan sonra kuru sıcak havada 180°C'de 1.5 saat sterilize edilir. Kontamine cam malzemelere de otoklavda steril edildikten sonra aynı yıkama işlemi uygulanır (22,23,38).

Kültür Şişeleri

Hücre kültürleri için rutin olarak cam ve bir kez kullanılıp atılan disposable polistiren plastik şişeler kullanılır. Plastik şişeler gama radyasyonda sterilize edilebilir. Plastik şişelerin optik kalitesi yüksektir ve hücrelerin şişe yüzeyine yapışması daha kolaydır.

Mikrotitrasyon plakları virus nötralizasyon testleri için kullanılır. Çünkü tüpteki kültürlere göre daha az besiyeri, serum ve hücre kullanılır (22,50).

Laminar Akım Kabinleri

Laminar akım kabinleri ile hava yoluyla mikrobiyal bulaşma minimuma indirilebilir. Bu kabinler "high efficiency particulate air" (HEPA) filtreleri ile donatılmıştır ve bu filtreler kabinden geçen havayı sterilize eder. İnfekte olmamış kültürlerle çalışıldığında horizontal veya vertikal akıma sahip pozitif basınçlı laminar akım kabinleri kullanılabilir (15).

Mikroskop

Cam veya plastik şişelerdeki hücre kültürlerinin direk muayenesi için invert bir mikroskop gereklidir. Faz kontrasta uygun bir mikroskop veya bir Nomanskin differensiyel interferens iluminasyon sistemi, hücre yapılarının daha net gösterilmesinde faydalıdır. Virus inoküle edilen tek tabakalı hücre kültürlerinde viral sitopatik etki 50 büyütme ile binoküler mikroskopla, kondansatör aşağıda ve iris diaframı kapalı iken kontrast temin edilerek incelenebilir (50).

İnkübatörler

Memeli hücre kültürlerinin optimal üremesi 35-37°C'de olur. CO₂'li ve CO₂'siz olmak üzere iki tip inkübatör kullanılır. Petri kutusu, mikrotitrasyon plakları veya diğer açık kültür şişeleri kullanılacaksa CO₂ kaybı ve besiyerinin buharlaşması nemli ve %5 CO₂'li ortamda inkübe etmekle önlenir (23).

Deiyonize Su Aletleri

Deiyonize su, kültür besiyerinin ve hücrelerle ilişkisi olan tüm solüsyonların hazırlanması, cam pipetlerin, kültür ve saklama kaplarının son durulanması için gereklidir (23).

İletkenlik Metreleri (Conductivity Meters)

Suyun iyonik kontaminasyon ölçümü ve deiyonize su aletinin fonksiyonunun devamlı monitorizasyonu için kullanılır. Besiyerinin metalik iyonlarla çok az kontaminasyonu bile

hücrenin üremesi ve devam ettirilmesinde problem yaratabilir. Organik ürünlerle kontaminasyon da aynı şekilde sıkıntı yaratabilir. Sterilize edilmiş solüsyonlardaki rezidüel bakteri ürünleri (endotoksin gibi) proliferen olan makrofaj veya lenfositlerin aktivasyonuna veya diğer tetkiklerde ters etkilere yol açabilir. Bundan dolayı saf suyun viroloji, bakteriyoloji ve hücre biyolojisi için önemi çok büyüktür (23).

Filtrasyon Aleti

Hücre kültürü laboratuvarlarında solüsyon ve kültür besiyerlerinin sterilizasyonunda sıklıkla nitrosellüloz membran filtreleri kullanılmaktadır. Disk çapları 13 mm'den 293 mm'ye kadar değişen ve delik genişliği 8 μ m ile 0.22 μ m arasında değişen ve otoklavda steril edilebilen membran filtreleri kullanılabilir. Bazı filtreler ıslatıldığında filtrenin çözülebilir bazı maddeleri hücre üremesini etkileyebilir. Bu tip etkiler filtreyi distile sudan geçirmekle azaltılabilir (23,50).

KÜLTÜRDE HÜCRELERİN GELİŞİMİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Kültürde hücrelerin gelişimi birçok temel faktörün etkisi altındadır.

1. Sıcaklık
2. Osmotik Basınç
3. Hidrojen iyonu konsantrasyonu
4. Diğer inorganik iyonlar
5. Temel metabolitler
 - a. Karbonhidratlar
 - b. Gazlar
 - c. Amino asitler
 - d. Vitaminler
 - e. Proteinler ve peptitler
6. Destekleyici metabolitler
 - a. Amino asitler
 - b. Vitaminler
 - c. Nükleozitler
 - d. Peptitler
7. Hormonlar
8. Enzimler

1. Sıcaklık: Hücre kültürü için optimal sıcaklığın ayarlanmasında hücrelerin elde edildiği kaynağın sıcaklığı dikkate alınmalıdır. Hücreler 45°C sıcaklıkta birkaç saat içinde ölürlür, 42°C'de 12-24 saat yaşayabilirler. İnsan deri hücrelerinden hazırlanan kültürler 37°C'den daha az bir ısıya ihtiyaç duyarlar. Balık hücrelerinden hazırlanan kültürler 20°C'de ürerler.

Birçok hücrenin çoğalabilmesi için 36.5-38°C'ye ihtiyaç vardır, 20-25°C'lerde üremeleri yavaşlar. Hattâ 4°C'de zarar görmeden fakat bölünmesi gecikerek muhafaza edilebilir. Donma noktasına kadar soğutulursa, buz kristallerinin oluşmasından dolayı hücre parçalanır. Bunu önlemek için besiyerine gliserol veya dimetil sülfoksit (DMSO) gibi koruyucu maddeler ilave edilerek ve kademe kademe dondurularak -70°C veya daha düşük ısılarda aylarca muhafaza edilebilir (38).

2. Osmotik Basınç: Osmotik basınç memeli hücrelerinde 7.6 atm. (300 mosm)dir. Bu değer 300 mosm \pm %10 olursa hücrelerde hasar meydana gelmez. Süspansiyon kültürler osmotik şoklara daha dayanıksızdır. Besiyerlerinin osmololitesinin ölçümü için osmometre kullanılır (38).

3. Hidrojen İyonu Konsantrasyonu (pH): Kültürde hücrelerin üremesi, tampon ilavesi ile kültürün pH'sının 7.0 civarında tutulmasına, besiyerinin değiştirilmesine veya her ikisine birden bağlıdır. Bunlar yapılmazsa hücreler ölür veya birbirinden ayrılır. Yani hücreler metabolik dejenerasyona uğrarlar. Memeli hücreleri pH 6.8-7.6 arasında yaşayabilirler. Optimum pH 7.1-7.5 arasındadır (33). pH HEPES(N-2-hidroksi etilpiperazin N-2 etansulfonik asit)-sodyum hidroksit ilavesi veya bikarbonat tamponunun CO₂ ile desteklenmesi ile ayarlanır. Kültür besiyerlerinin çoğunda pH'nın devamlılığı için bikarbonat buffer sistemleri (CO₂ / HCO₃) kullanılır (26). Bu besiyerlerinde NaHCO₃ ve CO₂ bulunur. CO₂ ya hücrelerin metabolik ürünü olarak açığa çıkar ki bu durumda kültür şişesinin kapağı sıkıca kapatılmalıdır veya CO₂'li atmosferi sağlamak için CO₂'li etüv kullanılmalıdır (35,39). Kültür ortamındaki pH'nın kontrolü için kullanılan diğer tampon solüsyonları arasında sodyum fosfat, potasyum fosfat gibi fosfat tampon solüsyonları yer alır. Ancak bu solüsyonların fizyolojik pH'ı tamponlama kapasitesi oldukça zayıftır. Besiyerine 10-25 mM konsantrasyonunda sentetik bir tampon olan HEPES'in ilavesi pH'nın dengesi için oldukça başarılı bulunmuştur. Bu konsantrasyonlar hücre ve viruslar için toksik değildir. HEPES kullanıldığında CO₂ ile

zenginleştirilmiş atmosfer gerekmemektedir. HEPES'den sonra diğer tüm tamponlar önemini kaybetmiştir. Bu özellik petri kutuları içinde yapılan hücre kültürleri gibi açık hücre kültürlerinin nemlendirilmiş ortamda inkübasyonunu sağlar. Organik tampon olan Tris (hidroksimetil) amino metanın etkisi zayıf bulunmuştur (7,15).

4. Diğer inorganik İyonlar: Hücre kültüründe Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Fe , HCO_3 , PO_4 ve SO_4 , hücrelerin gelişmeleri açısından önemli iyonları oluştururlar. Bu iyonların hücre içi ve hücreler arası sıvıda çeşitli fonksiyonları vardır. Ca^{+2} ve Mg^{+2} hücrelerin camın yüzeyine yapışmasını sağlar. Ayrıca Ca^{+2} hücre stoplazmasının gelişiminde K^+ da hücre zarının potansiyelinde önemli görev alırlar (24).

Kalsiyum, plazma membranının önemli bir kısmını oluşturur. Hücre zarında Ca^{+2} proteinlerle ve diğer anyonlarla da bulunmuştur. Ca^{+2} 'un büyük bir kısmı glikokaliks diye isimlendirilen ve eksternal bir kılıf olan ekstraselüler glikoprotein tabakası içinde bulunmaktadır. EDTA ve Tripsin karışımıyla muamele edildiğinde Ca^{+2} 'un %90'ından çoğu plazma membranının bütünlüğü bozulmadan HeLa hücrelerinden uzaklaştırılabilir. Ca^{+2} ve Mg^{+2} hücrelerin cam veya plastik yüzeye yapışmasında önemli rol oynarlar. Çünkü eksternal matriks ile negatif yüzey arasında köprü görevi yaparlar (11).

Magnezyum hücreler içindeki enzimatik reaksiyonlarda bir kofaktör olarak görev yapar. Aynı zamanda ribozomların bütünlüğünün devamı için de önemlidir.

5. Temel Metabolitler

a. Karbohidratlar: Glukoz kültür ortamında enerji kaynağı olarak mutlaka bulunması gerekli olan bir metabolittir. Glukoz yerine fruktoz, mannoz, galaktoz ve bunların fosfatları kullanılabilir (3).

b. Gazlar: Oksijen (O_2) ve karbondioksit (CO_2) kültürler için gerekli olan gazlardır. CO_2 'siz yaşayabilen kültür yoktur. Hücre kültürü için CO_2 kaçınılmaz bir faktördür ve CO_2 bulunmadığı zaman hücre üremesi durur. Çünkü CO_2 kültürde tampon görevi yapar (3).

c. Amino Asitler: Kültür ortamında sistin, tirozin, methionin ve fenil alanin gibi temel aminoasitler mutlaka bulunması gereken esansiyel metabolitlerdir. Ayrıca hücrelerin enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılan ve nükleik asit sentezinde de rolü olan glutamine ihtiyacı vardır (3).

d. **Vitaminler:** Hücrelerin çoğalmaları için B grubu vitaminleri olan Para-aminobenzoik asit, folik asit, piridoksin (piridoksal), B₆, B₂, B₁ (thiamin) gereklidir. Çoğu, metabolizma için gerekli olan ko-enzimlerin temel yapısını oluşturur. Diğer vitaminlerin serumdan karşılanabileceği kabul edilir. Ancak bazen serum bulunsa da özellikle düşük hücre yoğunluklarının kullanıldığı klonlama çalışmalarında vitamin ilavesi gerekli olabilir (3).

e. **Proteinler ve Peptitler:** Protein ve peptitlerin hücre için in vitro fonksiyonları tam olarak belli değildir. Bununla birlikte α Fetiun, fibronektin, LETS (large external transformation substrate) ve CSP (Cell surface protein-Hücre yüzeyi proteini) gibi bazı proteinlerin hücrelerin camın yüzeyine yapışmasını sağlaması, hücrelerin çoğalmalarını hızlandırması ve bazı tampon görevleri olduğu bilinmektedir. Bazı proteinler mineraller, yağ asitleri ve hormonlar için taşıyıcı görevi görür. Transferrin demiri bağlayarak daha az toksik olmasını sağlar. α 2-makro globulin tripsini inhibe eder (3,22).

6. **Destekleyici Metabolitler:** Bu metabolitler olmadan da hücreler canlılığını sürdürebilirler. Ancak destekleyici metabolitler hücre kültüründe potansiyelin tam olarak açığa çıkmasını sağlar.

a. **Amino Asitler:** Glisin çok önemlidir. Ortama eklenmesi büyük fayda sağlar. Ekim için gerekli hücre sayısı çok azsa ortama serin ve prolin eklenmelidir.

b. **Vitaminler:** Ortamda bulunmaları spesifik işlemler için gereklidir. Örneğin kirpikli silindirik epitel kültüründe kirpikli yapıyı görebilmek için ortama A vitamini koymak gerekmektedir.

c. **Nükleozitler:** Ortama katılmadıklarında olumsuz yönde hiçbir etkileri olmamasına karşılık, katıldıklarında potansiyel güç tam olarak ortaya çıkmaktadır.

d. **Peptitler ve Ara Maddeler:** Bunların esas görevleri, amino asitler arasındaki dengesizliği gidermektir. Doğal pıhtı serumu seruma göre hücre proliferasyonunu daha çok artırır. Bu durum daha çok pıhtılaşma sırasında trombositlerden (platelet) polipeptid salınımına bağlı olabilir. Plateletlerden derive edilen büyüme faktörü (PDGF-Platelet Derived Growth Factor) olarak bilinen bu polipeptid mitojenik aktivite gösteren polipeptid gruplarından biridir ve muhtemelen serumdaki major büyüme faktörüdür. PDGF fibroblast ve glia hücrelerinin çoğalmalarını uyarır (23).

7. Hormonlar: Hormonlar hücreler üzerinde değişik etkilere sahiptir ve bu hormonların metabolik yollardaki anahtar rolünü tanımak oldukça güçtür. İnsülin glukoz ve aminoasitlerin hücrelere alımını kolaylaştırır ve bu özelliği ile mitojenik etkiye sahiptir. İnsuline benzeyen üreme faktörü (Insulin like growth factor) 1 ve 2 gibi bazı büyüme faktörleri hücre yüzeylerindeki insülin reseptörlerine bağlanırlar ve benzer etki gösterirler. Büyüme hormonu serum içerisinde özellikle fetal serumda bulunabilir ve somatomedinlere bağlı olarak mitojenik etkiye sahiptir. Hidrokortizon da serum içerisinde değişik miktarlarda mevcuttur. Hücrelerin yüzeye tutunmasını ve hücre proliferasyonunu artırır. Ancak yüksek hücre yoğunluğunda sitostatik olabilir ve hücre differensiyasyonunu stimüle edebilir. Serum içerisinde bulunabilen diğer hormonlar da kültür için gerekebilir (3,15,23).

8. Enzimler: İki tip enzim vardır; Birinci tip enzimler hücrenin gerek duysa da duymasa da yaptığı enzimlerdir ve bunlar hücrenin organizasyonunu sağlarlar. İkinci tip enzimler ise; hücrenin gerek duyduğu zaman sentez ettiği enzimlerdir. Bunlar da hücrelerin ortama adaptasyonlarını sağlarlar (3).

HÜCRE KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN BESİYERLERİ VE REAGENLER

Hücrelerin in vitro şartlarda üretilmeleri ve sübkültürlerinin yapılabilmelerinin keşfi ile bu alandaki çalışmalar hücrelerin üretilmesi için daha uygun besiyerlerinin temini ve embryo ekstraktları, protein hidrolizatları, lenfe benzer doğal besiyerlerinin hazırlanmasına yönelmiştir (7,8,23).

Çeşitli hücre tipleri için birçok sentetik besiyeri geliştirilmiş ve modifiye edilmiştir. Diagnostik viroloji laboratuvarlarında en çok kullanılanı, Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)'dur. Diğer bir besiyeri, Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) EMEM'un bir modifikasyonu olup daha zengin bir besiyeridir. Basit bir besiyeri; dengeli tuz solüsyonu, temel amino asitler, vitaminler ve diğer besleyici maddelerden oluşur. Besiyeri içine hücrelerin gelişmeleri ve çoğalmaları için %5-10, hücrelerin en düşük seviyede aktivitelerini sürdürüp canlılıklarının devamı için ise %2 oranında hayvan serumu ilave etmek yeterli olmaktadır (21,35,50).

Viroloji laboratuvarlarında kullanılan diğer önemli iki besiyeri de; Medium 199 ve Raswall Park Memorial Institute (RPMI)'tür.

Diagnostik virolojide kullanılan bütün besiyerleri ticari olarak satılmaktadır. Birçok laboratuvar bu besiyerlerini steril bir şekilde hazırlanmış olarak satın almaktadır. Bu besiyerlerinin toz şeklinde ticari olarak satılanları da mevcut olup bunların steril bir şekilde hazırlanmaları genelde oldukça güçtür. Besiyerlerini steril etmek için delik çapı 0.22 μm olan filtre sistemlerinden faydalanılır (5,8,9,35).

1. EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium): Hücrelerin üreme ve devamlılığı için kullanılan temel bir besiyeridir. BSS (Balanced salt solution-Dengeli tuz solüsyonu) veya HBSS (Hank's BSS), içerisinde 12 temel amino asit, yedi temel vitamin, glukoz, tuz, bikarbonat buffer sistemi ve fenol red bulunur. Bu besiyerlerinin 1x ve 10x solüsyonu ticari olarak temin edilebilir. Bu besiyerinde glutamin bulunmaz. Bu temel besiyeri uzun süre saklanabilir. Kullanılmadan önce bu besiyerine serum, sodyum bikarbonat ve glutamin gibi maddeler katılmalıdır.

Hücre kültürleri için L-glutamin temel bir aminoasittir. Çünkü sıvı besiyerlerinde L-glutamin bulunmaz. L-glutamin normal olarak kullanılmadan hemen önce final konsantrasyona 2 mM düzeyde katılır. Toz haldeki besiyerlerinde genellikle L-glutamin bulunur. Bazen hücre kültürlerine bağlı olarak L-glutamin konsantrasyonu artırılabilir. Hücrelerin üremeleri için gerekli olan amino asit ve vitaminler ticari olarak satılan bu besiyerlerinde mevcuttur. Eğer gerekliyse bazı özel prosedürler için ticari olarak temin edilen amino asit karışımları eklenebilir (21,35).

2. SERUM: Serum; albumin, globulin, üreme uyarıcıları ve üreme inhibitörlerinin bulunduğu son derece zengin bir kaynaktır. Serumda hücrelerin gelişmesi için bulunan önemli komponentler α -globulin fraksiyonunda yer alır. Serumda hücrelerin üremesini stimüle eden insülin, glukokortikoidler (hidrokortizon, deksametazon) ve tiroid hormonları gibi hormonal faktörler hücrelerin yüzeye tutunması ve yayılmasını sağlayan fibronektin, fetuin gibi proteinlerle kortizol, hormonlar, Fe^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} gibi mineraller ve prostoglandinler, kolesterol ve linoleik asit gibi lipidleri taşıyan albumin ve transferrin gibi proteinler bulunur.

Serumda ayrıca DNA sentezini ve hücre bölünmesini stimüle eden fibroblast üreme faktörü ve epidermal üreme faktörü gibi faktörler bulunur. Serumun tripsin aktivitesini inhibe etmesi, bakteri toksinleri gibi bazı inhibitör bileşiklerin detoksifikasyonu ve hücre mebranından substratların transportu gibi rolleri de vardır (15,50).

Hanks gibi dengeli tuz solüsyonları sadece serum, laktalbumin hidrolizat veya diğer supplementlerle desteklendiğinde hücre üremesini sağlar. Serumda esansiyel aminoasitler, nükleik asit prekürsörleri, hormonlar ve yağ asitleri bulunur. Serum, hücrelerin ayrıştırılması için kullanılan proteazları inhibe eder. Hücre üremesi için genellikle %5-15 konsantrasyonlarda tek tabakalı hücre kültürlerinin devamı için ise %0-2 konsantrasyonda fetal veya yenidoğan buzağı serumu kullanılır. Dana, at ve insan serumu en fazla kullanılanlar arasındadır. Fetal Calf(sığır) serumu (FCS) zor üreyen hücreler için tavsiye edilir. FCS oldukça yüksek oranda biotin ihtiva eder. Biotin EMEM gibi bazı besiyerlerinde yoktur. Bu sebeple FCS kullanılması uygun olur (7).

Doku kültürlerine ilave edilen serumlar mycoplazma kontaminasyonu için en önemli kaynaktır. Bu sebeple kullanıma geçmeden önce serumların sitotoksik etkileri yönünden kontrolünün yapılması gerekmektedir. Serumlar -70°C 'de saklanmalıdır. Hazır serumlar satın alınmadan önce hücreleri üretmesi yönünden teste tabi tutulmalıdır (23,35,59).

Hücrelerin gelişmeleri için %7.5-10 FBS (fetal bovine serum) eklenirken metabolik aktivitelerin devamı için %2 oranında FBS yeterli olmaktadır. Kullanılan serum insan veya hayvan serumu olabilir, tercih edileni FBS'dir. Çünkü erişkin serumlarında hücrelerin çoğalmalarını engelleyen birçok enfeksiyöz ajanlar bulunabilir. Serumu kullanılan hayvan genç ve sağlıklı olmalıdır. Serumdaki bazı maddeler ısıtılarak da inaktive edilebilir.

Ayrıca, ticari olarak sağlanabilen ve serum yerine geçen (hormonlar, matriks proteinleri gibi) bazı maddelerin kullanılmasıyla, besiyerlerindeki FBS'un konsantrasyonu azaltılabilir. Bu reagenlerin kullanımı FBS'un kullanımından daha ekonomiktir. Organ ve hücre fonksiyonlarını regüle eden endokrin faktörleri in vitro şartlarda daha doğru tespit etmek ve antikor purifikasyonu için hem daha ucuz, hem daha pratik olan serumsuz kültürleri kullanmak oldukça avantajlıdır. Serumlu besiyerlerinin kullanımının bazı dezavantajları vardır. Serumlar en fazla bir yıl süreyle saklanabilir. Serumun yapısında zamanla bozulmalar olabilir ve tekrar gerektiğinde öncekine benzer olması tercih edilir. Eğer birden fazla hücre tipi kullanılacaksa

her biri için farklı serum gerekebilir. Bu da çok sayıda serumun aynı zamanda muhafazası demektir. Dolayısıyla aynı anda elde çeşitli serum tiplerinin olması problem yaratabilir. Diğer bir dezavantaj da serumda hücrelerin üremesi üzerine inhibitör etkileri tam olarak bilinmeyen birçok maddenin bulunmasıdır (23,35).

3. HEPES: Hücre kültürü besiyerlerinde çok sık kullanılan bir organik tampondur. Çünkü, sodyum bikarbonatın pH'yı tamponlama kapasitesi sınırlıdır. İçerisinde hem HEPES hem sodyum bikarbonat bulunan besiyerleri, yalnızca HEPES ilave edilmiş besiyerlerinden daha etkili bir şekilde tamponlanmışlardır. Final konsantrasyona 10-25 mM HEPES ilave etmek, meydana gelebilecek pH değişimlerini durdurmak için yeterli olacaktır. Sodyum bikarbonat ve HEPES'in konsantrasyonları besiyeri çeşitlerine göre değişmektedir. Fakat özellikle CO₂ kullanıldığı zaman HEPES'in konsantrasyonu sodyum bikarbonatın konsantrasyonunun 2 katından daha fazla olmalıdır. HEPES ilave edilmiş besiyerleri hem açık, hem de kapalı kültür kapları için kullanılabilir (7,15,23,35).

4. DEİYONİZE SU: Besiyerleri ve besiyerlerinin supplementleri steril edilmiş deiyonize suyla hazırlanır. Kültür için kullanılan suda minerallerin bulunmaması kültür sisteminin başarısı için gereklidir. Laboratuvarlarda suyun deiyonizasyonu ve distilasyonunda hiçbir problemin olmaması gerekmektedir (22,23).

5. DENGELİ TUZ SOLÜSYONU (Balanced Salt Solution; BSS): BSS ister HBBS (Hanks' BSS), isterse EBSS (Earle's BSS) olsun, inorganik tuzlar ile sodyum bikarbonat tampon sisteminden oluşur. Bunlar temel besiyeri içinde osmotik basınç ve pH'nın fizyolojik şartlarda devam ettirilebilmesi için izotonik solüsyonlar olarak kullanılırlar. Hatta BSS, viral transport besiyerinde diluent ve komponent olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Sodyum bikarbonat tamponlayıcı rolünün yanında, besleyici bir komponenti olarak da bulunur ve çoğu hücreler için gereklidir. BSS, normalde glukoz da ihtiva eder. HBSS'li besiyerlerinde düşük düzeyde sodyum bikarbonat bulunur ve kapalı sistemlerde kullanılır. Yani kültür şişesinin kapağı sıkıca kapatılmalıdır. EBSS gibi içinde yüksek düzeyde sodyum bikarbonat bulunan besiyerleri ise açık sistemler için uygundur. Kültür şişesinin kapağı gevşek bırakılır ve bu kültürler %5

CO₂'li ortamlarda inkübe edilmelidir. CO₂'li ortamlarda inkübasyonda kültür kaplarının kapaklarının gevşek bırakılmaları dikkat edilmesi gereken önemli bir noktadır (23,35).

6. FENOL RED: Hücre kültürü besiyerlerinde pH indikatörü olarak BSS içinde litreye 10-20 mg fenol red konulmalıdır. Hücre dizilerinin çoğu, rengi açık pembe olan 7.2-7.4 arası pH'daki besiyerlerinde iyi ürerler. Hücrelerin gelişmeleri ve çoğalmaları neticesinde besiyerinin rengi pembeden (pH-7.4) portakala (pH-7.0) veya sarımsı bir renge (pH-6.5) döner. Bu durumda aşırı bir asit üretimi olmuştur. Böyle durumda ya yeni besiyeri konmalı veya pasajının yapılması gereken hücrelerin pasajları yapılmalıdır. Besiyeri genellikle mavimsi kırmızı (pH-7.6), mor (pH-7.8) rengi aldığı anda alkalileşmiştir. Böyle bir durumda ya hücre metabolizmaları uygun değildir veya tamponlama sistemi çalışmamaktadır. Bu durumda besiyeri derhal değiştirilmelidir. Besiyerlerinde kullanılan indikatörler kültive edilmiş hücrelerin gelişiminin makroskobik olarak incelenmelerine imkan vermektedir (15,39).

7. ANTİBİYOTİKLER: Antibiyotikler kültür ortamındaki bakteri ve mantar kontaminasyonlarını önlemek için ilave edilir. Bu amaçla kullanılan antibiyotikleri antibakteriyel ajanlar ve antimikotikler olmak üzere iki başlık altında incelemek mümkündür.

Antibakteriyaller; bakteri ve mantar kontaminasyonunu kontrol edebilmek amacıyla hücre kültürü besiyerine toksik olmayan antimikrobiyal ajanlar katılmalıdır. Kültürde genellikle antimikrobiyal ajanların kombinasyonları kullanılır. Ticari kaynaklardan steril olarak temin edilebilirler. Antimikrobiyal ajanların hücreye olabilecek toksik etkilerini göz ardı etmemek gerekir. Doku kültürlerinde penicillinin rutin kullanımı bakterilerin L-formlarının ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (7,15,37).

Antibiyotik kullanımında bir diğer dezavantaj da bakteri veya mantar enfeksiyonlarının maskelenmesi ve kültürde kronik veya latent bir enfeksiyonun sürmesidir. Antimikrobiyal ajanlar dokulardan hücrelerin ayrıştırılması sırasında klinik numunelerin kültüre inokülasyonu gibi kontaminasyon riskinin yüksek olduğu şartlarda mutlaka kullanılmalıdır. Hücre kültürlerinin subkültürleri sırasında antimikrobiyal ajan kullanılmasından kaçınılmalıdır. Böyle durumlarda aseptik teknikler kullanılarak mikrobiyal kontaminasyon riski ortadan kaldırılmalıdır. Mikrobiyal kontaminasyonu önlemek amacıyla yüksek konsantrasyonda

antibiyotik kullanımı tercih edilmemelidir. Ayrıca, laboratuvarlarda gelişigüzel antibiyotik kullanımı sınırlanmalıdır. Aksi halde bakteri ve mycoplazmaların dirençli suşları oluşabilir. Antibiyotik kullanılırken geniş spektrumlu antibiyotikler seçilir. Sıklıkla streptomycin, penicillin ve Amphotericin B (fungizone) veya gentamycin, Amphotericin B ve Nystatin (10 U/ml) kombinasyonları kullanılmaktadır (7).

— Laboratuvarlarda antibiyotikler koruyucu ajanlar olarak kullanılırlar. Eğer antibiyotikler rutin olarak kullanılıyorsa, kontamine kültürleri tespit edebilmek amacıyla kullanıma ara verilmelidir.

Penicillin: Penicillin hücre kültürü besiyerine 0.2-1.5 unit/ml oranında konulduğu zaman gram pozitif bakterilerin çoğunun üremesini durdurur. Gram negatif bakteriler ise daha yüksek konsantrasyona duyarlıdır. Her ml'ye 50 unit penicillin konulması gram negatif bakterilerin üremesini durdurur. Kontaminasyon varlığında ml'ye 100 unit penicillin G konulması tavsiye edilir. Yüksek dozda kullanmak gerektiğinde besiyerine ilave edilen penicillin 37°C'de 2 gün inkübasyon ile inaktive edilebilir. Hazırlanan penicillin solüsyonu 0.22 µm delik çaplı nitroselüloz filtrelerden geçirilerek steril edilir (7,15).

Streptomycin: Streptomycin sülfat ve dihydrostreptomycin gram negatif bakterilerin üremelerini etkin bir şekilde baskılar. Hücre kültürlerine hücrelerin üremelerini etkilemeyecek oranlarda ilave edilmeleri tavsiye edilir. Streptomycin sülfat veya dihydrostreptomycin'in ml'ye 100 mg katılması etkin bir koruma için kafidir. Hücre kültürü besiyerinde streptomycin sülfatın yarılanma ömrü 4 gün dolaylarında iken, dihydrostreptomycin 37°C'de aylarca stabildir. Antibiyotik solüsyonu penicillin solüsyonunda olduğu gibi filtrasyonla steril edilir (7,15).

Gentamycin: Gentamycin gram negatif ve gram pozitif bakterilerin üremelerini önleyen, hücre kültürlerinde oldukça çok kullanılan bir antibiyotiktir. Aynı zamanda hücre kültürleri için büyük bir problem olan mycoplazma kontaminasyonu için de koruyucu bir antibiyotiktir. Gentamycin solüsyonu otoklavda sterilize edilebilir. 37°C'de en az 15 gün etkinliğini korur. Tavsiye edilen konsantrasyonu 50-100 mg/ml'dir (15).

Diğer Antibiyotikler

Chlorotetracycline hydrochloride solüsyonundan ml'ye 5 mg konur. Kanamycin, neomycin ve polymyxin B solüsyonlarından da ml'ye 10 mg ilave etmek yeterlidir. Chlorotetracycline hydrochloride'in 100 x stok solüsyonu hazırlanır. Kültür besiyerinin 99 ml'sine 1 ml ilave edilir. Kanamycin, neomycin ve polymyxin B'nin de 100 x stok solüsyonundan kültür besiyerinin 99 ml'sine 1 ml konur. Vancomycin kullanılacaksa ml'ye 100 mg ilave edilir (15).

Antimikotikler

Fungizone: Fungizone sıvı besiyerleri içinde çözünen Amphotericin B'nin sodyum deoxycholate kompleksidir. Birçok maya ve mantarın üremelerini etkili bir biçimde baskılar. Fungizone maya ve küf mantarlarının üremesini inhibe etmek amacıyla ilk defa Hempehill ve arkadaşları tarafından (1958) kullanılmıştır. Kültürdeki hücrelerin üremelerini etkilemeyecek veya çok az oranda etkileyecek konsantrasyonda kullanılması tavsiye edilir. Besiyerinin ml'sine konulacak 20 µg fungizone, hücrelere zarar vermeksizin, maya ve küf mantarlarının üremelerini önlemede yeterlidir. Fungizone besiyeri içinde 37°C'de çok yavaş bir şekilde inaktive olur. Yarılanma ömrü 4 gün civarındadır (15).

Besiyerleri ve Hücre Kültürlerinin Mikrobiyal Kontaminasyon

Yönünden Teste Tabi Tutulması

Hücre kültürleri ve besiyerleri birçok mikroorganizma tarafından kontamine edilebilir. Kontaminasyon kaynakları; hücrelerin izole edildiği kaynaktan yani dokudan, serumdan, besiyerleri ve reagenlerden, çevreden ve çalışan kişiden kaynaklanabilir. Bakteri ve mantar kaynaklı kontaminasyon kontrolü amacıyla şu yollar izlenir.

1. Yeni hazırlanmış besiyerine antibiyotik katılmadan besiyerinin %2-5 kadarı alınıp oda ısısında veya 35°C'de 7 gün inkübe edilir.
2. Bu numunelerden thioglycollate'lı buyyon ve sabouraud'nun sıvı besiyerine (SLM) 1 ml inoküle edilir. Ayrıca, kanlı agar, sabouraud agar ve deoxycholate agar besiyerine de ekimler yapılır.

3. Eğer hücre kültürünün kontaminasyonundan şüphe ediliyorsa, hücreler besiyerinden uzaklaştırılıp süspansiyon inokulum gibi kullanılır.
4. Ekim yapılmış SLM tüplerinin bir kısmı oda sıcaklığında bir kısmı da 35°C'de, thioglycollate'lı buyyon tüpleri ve kanlı agar plakları 35°C'de inkübe edilmeli, kültürler 14 gün boyunca hergün kontrol edilmelidir (6,8,12).

Mycoplasmalar çok küçük olmaları (0.25-1.0 μm) ve hücre duvarları bulunmaması sebebiyle karakteristik mikroorganizmalardır. Hücre kültürleri için mycoplasmalar çok büyük problemdir. Çünkü, mycoplasma kültür besiyerlerinin bir komponenti olarak kullanılan serum içerisinde oldukça fazla miktarda bulunabilir veya laboratuvar şartlarında, çalışma sırasında kültürü kontamine ederler. Bazen kültürde hiçbir değişiklik meydana getirmezken, bazen de sitopatojenik etkiler oluşturabilirler. Mycoplasmayı tespit etmede kullanılan kültür metodları tam güvenilir değildir. Çünkü bu organizmalar hücresel çevreye oldukça iyi adapte olmaktadır. Bu sebepten kültür prosedürüne ilaveten morfolojik ve biyokimyasal metodlar da kullanılmalıdır. Biyokimyasal teknikler genellikle daha çok tercih edilir (16).

TOZ HALİNDEKİ BESİYERLERİNİN KULLANILMASI

Laboratuvarlarda sıvı besiyeri kullanmak yerine, ticari olarak satılan ve sıvı besiyerlerine nazaran daha ucuz olan toz besiyerleri tercih edilir. Eğer toz besiyerleri kullanılıyorsa, mutlaka sterilizasyon sistemine ihtiyaç olacaktır. İşlem 7 adımda tamamlanır (35).

1. Oda ısısı sıcaklığındaki 900 ml deiyonize suya toz besiyeri ilave edilir ve eriyene kadar çalkalanır.
2. Hazırlanan bu sıvıdan bir miktar alınır ve orijinal besiyeri ambalajına dökülür. Çalkalanarak ambalajındaki kalan eser miktardaki besiyeri tozları da alınmış olur. Sonra bu sıvı tekrar orijinal solüsyonla karıştırılır.
3. Besiyerine %7.5'lük sodyum bikarbonat solüsyonundan 29.3 ml ilave edilir ve karıştırılır.
4. Karıştırma sırasında 1 N NaOH veya 1 N HCl ilavesi ile arzu edilen pH'ya (7.2-7.4 \pm 0.1-0.3) ayarlanır. Bunun için uygun bir pH metre kullanılmalıdır. İstenilen pH'dan 0.1-0.3 daha aşağı pH ayarlanmasının sebebi vakum filtrasyonu esnasında pH'nın az da olsa yükselebileceği ihtimalidir.

5. Sonra toplam hacim deiyonize suyla 1 litreye tamamlanır ve delik çapı 0.22 μm olan membrandan süzülerek işlem tamamlanır.
6. Arzu edilirse, besiyeri aseptik şartlarda ilave komponentlerle birlikte şişelere taksim edilebilir.
7. Eğer otoklavda sterilize edilebilir bir besiyeri kullanılıyorsa 1. ve 2. maddeler aynen uygulanmalı, sodyum bikarbonat, L-glutamin ve diğer komponentler otoklavda sterilizasyon işleminden sonra besiyerine ilave edilmelidir.

Suplementlerin Hazırlanması

Suplementler ticari olarak satın alınabileceği gibi, laboratuvarında da hazırlanabilir. Bu supplementlerin en önemlileri şunlardır:

1. Toz halindeki L-glutaminden 29.2 g alınarak 1000 ml deiyonize suda çözülür (200 mM). Eriyen bu karışım delik çapı 0.22 μm olan filtrelerden geçirilir ve steril kaplara 10 ml miktarlarda dağıtılır, kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklanır. L-glutamin bozulmadan -20°C 'de iki yıl muhafaza edilebilir.
2. Toz halindeki 260.3 g HEPES 1 lt deiyonize suda eritilir ve 1 M HEPES elde edilir. Bu solüsyon filtrelerden geçirilerek steril edilir ve 100 ml'lik şişelerde saklanır. HEPES solüsyonu oda ısısında bozulmadan 2 yıl saklanabilir.
3. Toz halindeki 75 g NaHCO_3 1 litre deiyonize suda çözülerek %7.5'lük sodyum bikarbonat solüsyonu hazırlanır. Filtrelerden geçirilerek sterilize edilir. Sonra steril kaplara 100'er ml konularak saklanır. Bu solüsyon oda ısısında bozulmadan 2 yıl muhafaza edilebilir.
4. Antimikrobiyal solüsyonlar bu maddelerin toz formlarını deiyonize suda çözerek hazırlanır ve bozulmadan -20°C 'de 1 yıl saklanabilirler.
5. Penicillin-streptomycin ve vancomycin-gentamycin kombinasyonu hazırlanıp solüsyon halinde dondurulabilir. Nystatin ve Amphotericin B diğer antimikrobiyal maddelerden ayrı olarak hazırlanmalı ve saklanmalıdır (34).

Besiyerleri ve Reagenlerin Hazırlanması ve Kullanılması ile İlgili İşlemler

- a. Hücre kültürü besiyeri ve komponentlerinin hazırlanmasında uygun aseptik teknikler kullanılarak işlemler yürütülmelidir.
- b. Besiyerleri laboratuvarlarda uygun volümlere bölünmelidir.
- c. Kullanılmadan önce besiyerlerinin toksisite ve sterilite açısından kontrol edilmiş olmaları gerekmektedir.
- d. Besiyerleri ayrı ayrı kullanılarak, besiyerlerinin özellikleri (toksikite, kontaminasyon) hakkında detaylar toplanmalıdır.
- e. EMEM, diagnostik viroloji laboratuvarlarında bütün kültürler için kullanılabilirse de, gerçekte hiçbir besiyeri bütün kültürler için optimum uygunluk göstermez.
- f. İlk defa kullanılacak olan serum ve besiyerleri daha önce denenmiş serum ve besiyerleriyle kıyaslanması yapılmadan kullanılmamalıdır.
- g. Ticari olarak satılan FBS'ler toksisite ve sterilite yönünden teste tabi tutulmalıdır. Eğer, uygun görülürse alınmalıdır.
- h. Serumun tekrar tekrar dondurulup çözülmesi tavsiye edilmez ve kaçınılması gereken bir husustur. Serum ilk çözülüşünden sonra inaktive edilir. Eğer şişedeki serumun hepsi kullanılmayacaksa steril kaplara bölünerek dondurulmalıdır.
- ı. Eğer besiyeri 3 hafta içinde kullanılmayacaksa besiyerine L-glutamin katılmamalıdır. Çünkü L-glutamin +4°C'de bile oldukça dayanıksız bir maddedir.
- j. L-glutamin dondurulduğu zaman çözülemez hale gelir. Fakat 37°C'nin üzerinde bir ısıda kolaylıkla resüspanse olur. L-glutaminin tekrar dondurulup çözülmesi arzu edilmez.
- k. Kültür besiyerleri karanlıkta saklanmalıdır sivi besiyerindeki Amphotericin B ve aminoasitler floresan ışığa karşı, oldukça duyarlıdır.
- l. FBS, inaktive edileceği zaman benmari içindeki su seviyesi serum seviyesinin üzerinde olmalıdır ki serumun tamamı 56°C'ye eşit düzeyde maruz kalabilsin.
- m. Nystatin suda kolayca erimez. Nystatin'in homojen süspansiyonunu hazırlamak için periyodik olarak karıştırılması gerekmektedir.
- n. Besiyerleri ve komponentleri kullanılacakları zaman mümkünse iş elbiseleri giyilmelidir.
- o. Stok hücre kültürlerinin subkültürleri yapılacağı zaman, antimikrobiyal maddeler kullanılmamalıdır. Bu işlem aseptik şartlar altında yapılmalıdır. Antibiyotikler klinik

numunelerin alınması durumunda kullanılmalıdır.

- p. Besiyerlerinin toksisiteleri komponentlerin dayanıksız oluşları ve bozulmaları yanında reagenlerin içinde sediment, kristal ve presipitatların bulunması ile mikrobiyal kontaminasyondan kaynaklanabilir.
- r. Stok besiyerlerinin pH'sı 7.6'nın üzerinde olmamalıdır. Aksi halde fosfatlar dahil besiyerindeki maddeler presipitat oluşturabilir ve pH artar. Sıvı besiyerleri dondurulmamalıdır. Dondurulduğu takdirde eritme işlemi sonunda sonunda presipitatlar meydana gelebilir ve bu durumda besiyeri atılmalıdır.
- s. Besiyerleri ve solüsyonlar floresan ışığa maruz bırakılmamalıdır. Floresan ışık vitaminlerin ve kofaktörlerin oksidasyonunu hızlandırır. Foto oksidasyon toksik yan ürünlerin oluşumuna yol açar (34).

HÜCRELERİN KRIOPREZERVASYONU

Günümüzde modern viroloji laboratuvarlarınınca kullanılan etkili ve önemli krioprezervasyon yöntemleri hücrelerin sıvı azotta (-196°C 'de) dondurulup saklanması esasına dayanır. Hücrelerin dondurulmaları ve çözölmeleri sırasında hücre içerisinde buz kristallerinin oluştuğunun ve osmotik etkinin hücreler üzerinde öldürücü etkisinin olduğu bilinmektedir. Dimethyl sülfoksid (DMSO) veya gliserol gibi krioprotektif maddelerin kullanılması ve uygun bir dondurma çözme metodunun izlenmesi hücrelerde meydana gelebilecek hasarı en aza indirebilmektedir (18,19,30,31,49,62).

Hücrelerin krioprezervasyonunda en başarılı sonuçlar, programlı dondurma cihazları kullanılarak ve dakikada 1°C soğutma hızıyla yapılan dondurma işlemiyle alınmıştır (47).

Hücrelerin krioprezervasyonundan beklenen faydalar arasında zor elde edilen primer ve devamlı hücrelerin kontaminasyon veya bozulmasına fırsat vermeden saklanabilmesi, kontaminasyona diğer hücre dizilerinden çok daha duyarlı olan HEp-2, HeLa ve WI-38 gibi hücre dizilerinin devamlılığının bozulmadan sağlanabilmesi, bakteri ve mantar kontaminasyonlarının yanısıra farklı orijinli hücreler arasında olması muhtemel kros kontaminasyonun hücre dizilerinin kaybına yol açma sayılabilir.

Hayvan hücrelerinin teknolojisindeki en büyük başarı bu hücrelerin krioprezervasyonunun rutin olarak yapılabilmesidir. Hücrelerin -130°C 'nin altındaki bir ısıda

bozulmadan saklanabilmeleri mümkün olabilmektedir (39,47).

İn vitro üretilen kültür hücrelerini dondurarak saklama ihtiyacı, kültürünün yapılması pratik ve her zaman mümkün olmayan birçok hücrenin istenildiği zaman bulunamaması ve kullanılamaması probleminden kaynaklanmıştır. Kültür hücrelerinin dondurularak saklanabilmesinde kullanılan teknik, ilk olarak sığırıcılıkta kullanılan sperm hücrelerinin krioprezervasyonunda olduğu gibi, hücre süspansiyonuna bir krioprotektan maddenin katılmasıyla yapılmıştır (39,46,60).

Scherer ve Hoogasian (1954), HeLa ve L-Strain Mouse fibroblast devamlı hücre kültürlerinin saklama besiyerlerine gliserol katmak suretiyle -60°C , -70°C 'lerde saklanabileceklerini göstermişlerdir. Araştırmacılar -25°C 'den -70°C 'ye direkt olarak gelinebileceğini bu ısı farkından hücrelerin ciddi bir şekilde etkilenmeyeceğini ispatlamışlardır. Hücreler -190°C 'de sıvı azot içinde daha iyi ve daha uzun süre saklanabilmektedir, çünkü bu ısıda hücrede biyokimyasal reaksiyonlar tamamen durmaktadır (56,60,61).

Daha sonraları birçok hücre çeşidi için uygun bir krioprotektan madde olan DMSO keşfedilmiştir. DMSO hücre dışına ve içine çok daha hızlı bir şekilde diffüze olabilmektedir. Bu özellik hücre prezervasyonunda oldukça önemli bir noktadır. Çünkü, dondurma işlemleri sırasında hücre harabiyetine sebep olabilecek osmotik şok en aza indirilmektedir. DMSO gerçekten etkin bir krioprotektan olup özellikle fibroblast benzeri hücreler ve lenfositler başarılı bir şekilde dondurulmaktadır (5,45,48).

Hücreler krioprotektan madde konulmadan dondurulacaksa, 0°C 'den -25°C 'ye çok yavaş bir hızda dondurulmalıdır. Eğer hücreler hızlı bir şekilde dondurulursa, hücrelerin intraselüler sıvısı donacak ve geniş çapta buz kristalleri oluşacaktır. Bu geçiş fazı fiziksel olarak hücre membranlarının patlamasına ve ölümlere yol açmaktadır. Diğer yandan, nükleer yapı yavaş dondurma sırasında hücre dışındaki sıvı faz gibi aşırı şekilde soğur. Bu da hücre içinden suyun çekilmesiyle yüksek tuz konsantrasyonunun oluşmasına sebep olur. Krioprotektan maddeler hücre içine hızlı bir şekilde diffüze olarak su dengesini korurlar. Böylece hücreler osmotik şoktan korunmuş olurlar. Krioprotektan madde dondurma-çözme sırasında suyu bağlayarak hücre içinde elektrolit miktarını ve aynı zamanda mevcut suyun buz kristallerine dönüşmesini de azaltır (4,42,43,57).

Dondurma cihazları kullanılarak hücreler -70°C 'de kısa süre muhafaza edilebilir. Sıvı

azot içinde (-196°C) veya azot buharında (-120°C) da hücreler muhafaza edilebilir. Sıvı azot soğutucularının kullanılmasındaki avantaj sadece çok düşük bir ısı ortamı yaratmak değil, aynı zamanda mekanik soğutucular kullanılarak muhafazaları riskli olan numunelerin bu yolla çok uzun yıllar saklanabilmeleridir. Bu işlemler sırasında iki önemli noktaya dikkat edilmelidir. Birincisi krioprezervasyon sırasında çok iyi kapanmayan kriotüplerin içine sızan azotun meydana getirebileceği tehlikedir. Böyle bir kriotüpün çözülmesi sırasında kriotüpün içinde hapsedilen azotun buharlaşması sonucu meydana gelebilecek patlama çalışan kişilerde yaralanmalara yol açabilir. Böyle bir durumun meydana gelmemesi için numuneler sıvı azot içinde saklamaya uygun tüplere konmalıdır. Bunun için her 1°C'de yaklaşık 32.0×10^{-7} mm civarında genleşebilen borosilikatli tüpler kullanılmalıdır. Tüpler kapakları kapatıldıktan sonra %0.1'lik metilen mavisi dolu beher içinde +4°C'de 30 dakika tutulmalıdır. Bu süre krioprotektan maddenin süspansiyonda dengelenmesi için oldukça önemli bir noktadır. Ayrıca kapakları yanlış kapatılmış tüpler bu süre sonunda kolayca tespit edilebilir. Kapakları hatalı kapatılmış tüplerin içinin mavi bir renk aldığı görülür. Böyle tüpler güvenlik açısından kesinlikle azot tankına konmamalıdır. Kriotüpler metilen mavisi içinde +4°C'de 30 dakika tutulduktan sonra soğuk çeşme suyuyla yıkanır. Mavi boyanmış tüpler kullanılmaz. Tüpler tamamen kurutulduktan sonra dondurma işlemine başlanır (15,22,38,60,63).

Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı azot tankından çıkarılan kriotüpler 37°C'lik su banyosuna daldırılır ve çabucak erimesi için sürekli sallanır. Çözülme 40-60 saniye içinde gerçekleşir. Sonra kriotüp %70'lik alkolle iyice silinir. Bu prosedür esnasında kapakları uygun kapatılmamış tüplerin sıvı azottan çıkarılıp hücrelerin çözülmesi sırasında muhtemel bir patlamadan korunabilmek amacıyla çalışanların yüz ve boyun kısımlarını kapatacak maske takmaları ve eldiven giymeleri gereklidir.

Kriotüpün kapağı açıldıktan sonra içindeki hücre süspansiyonu pasteur pipeti veya bir şırınga ile alınarak pH'sı 7.2 olan %10 FCS'lu hücre üretme besiyeri içinde çözülür. Krioprotektan maddenin ortamdaki atılması için ertesi gün kültürün besiyeri değiştirilmelidir. Eğer arzu edilirse, kriotüpteki muhteviyat bir santrifüj tüpüne aktarılır ve üzerine 10 ml kadar üretme besiyeri konulur. Besiyeri 1-2 dakika içinde konulmalıdır. Bu hücrenin canlılığı açısından oldukça önemlidir. Üstte kalan sıvı uzaklaştırılıp hücre çökeltisi bir miktar üretme

besiyeriyle süspansiyon edilerek inkübasyona bırakılır (15,20).

Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi

Süspansiyondaki hücrelerin canlılığının tespit edilmesi Trypan mavisi 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.

Trypan mavisi (%0.5-1) veya Erythrocin B bu prosedür için en çok kullanılan boyalardır. Trypan mavisinin solüsyondaki proteinlere olan affinitesi canlı olmayan hücrelere olan affinitesinden daha yüksektir. Eğer hücre süspansiyonundaki serum miktarı %1'den fazla ise bu metodun doğruluğu azalabilir (29).

Erythrocin B solüsyonu kullanılarak yapılan sayımlar daha doğrudur. Bu boyamada mikrobiyal üreme ve presipitatlar daha çabuk görülebilmektedir. Bunları trypan blue için söylemek doğru değildir. Tavsiye edilen boyama yöntemi şöyledir:

Kullanılan standart bir yöntem olmamakla birlikte dondurulmuş hücrelerin boyanıp sayımları düşünülüyorsa kriyotüpdeki hücre örneğinin %5'inin boyanarak sayılması tavsiye edilir. Boyama işlemi iki adımda gerçekleşir.

1. Boya solüsyonuyla hücreler çeşitli oranlarda sulandırılırlar. Erythrocin B'nin 100 mg 100 ml

PBS içinde çözülüp 1 M sodyum hidroksit ile pH 7.2-7.4'e ayarlanır. Daha kolay ve doğru sayım için final yoğunluk $0.3-2 \times 10^6$ hücre/ml olmalıdır.

2. Genel olarak bir örnekten birkaç kez boyama yapılarak sayım yapmak daha doğru ve emin sonuçlar verecektir. İdeal olarak sayma işlemi hücre süspansiyonuyla boyanın karıştırılmasından 1-5 dakika sonra yapılmalıdır.

Sıvı Azot Tankları

Sıvı azot soğutucuları hem azot tüketimi, hem saklama kapasiteleri hem de kullanım kolaylığı dikkate alınarak seçilmelidir. Dar ağızlı azot tankları genellikle daha ekonomiktir. Fakat geniş modelleri kullanım açısından daha uygundur.

Kriyotüpler hem sıvı azot içine daldırılarak hem de azot buharında saklanabilmektedirler. Azot buharında saklamak hatalı kapatılmış tüplerin içine sıvı azotun girmesini önleyerek patlama tehlikelerini ortadan kaldırmaktadır. Fakat uzun süreli muhafaza için bazı

dezavantajları vardır.

Tankın bir yerden bir yere rahatlıkla götürülebilmesi için hareketli bir taban, azot azaldığında azaldığını gösteren bir alarm sistemi, büyük tanklar için tankın kullanılmasında büyük kolaylık sağlayan raf sistemi gibi yardımcı aksesuarların kullanılması çalışmalarda oldukça kolaylıklar sağlamaktadır.

Tanktaki azot seviyesini tespit etmek amacıyla otomatik alarm sistemi kullanılıyor olsa dahi düzenli olarak bir çubuk daldırarak azot seviyesi kontrol edilmelidir. Elektronik göstergenin bazen kullanıcıyı yanıltması mümkün olabilmektedir (15,22).

Dondurma İşleminde Bazı Önemli Noktalar

Donmuş kriotüpleri çözerken eldiven ve koruyucu gözlük takmanın yanı sıra patojen numune bulunan tüpler mutlaka kapalı kaplarda çözülmelidir. Patlamayı önleyebilmek için tüpler çözülmeden 24 saat önce sıvı azot içinden azot buharına alınmalıdır.

Krioprezervasyonun başarısından sözdebilmek için, krioprezervasyon sırasında önemli hücre tipleri için epidermal üreme faktörü veya interleukinler gibi faktörlere dikkat edilmesi gerekmektedir. Kültürde tekrar canlandırma sırasında hücrelerin bir kısmı ölmektedir. Hücre debrislerinin miktarındaki artışa bağlı olarak toksik ürünlerin birikmesiyle hücrelerin ölümünde artma olabileceği unutulmamalıdır (44).

Çözme sırasında CO₂'in solüsyondan ayrılmasıyla pH problemi ortaya çıkabilmektedir. Hücre membranları en çok alkali pH'da bozulabilir. Çözme sırasında oluşan alkali pH'ya ve geniş çapta hücre ölümlerine yol açabilen bu problem, hücrelerin krioprezervasyonu sırasında solüsyona yüksek oranda serum katılmasıyla çözülebilir. Hatta alternatif bir yaklaşım hücreleri krioprotektan ile tam serum karışımı içinde dondurarak saklamaktır. Yani daha stabil bir pH için yüksek protein konsantrasyonu sağlanmalıdır (9,14).

Ayrıca, taze olarak hazırlanmış dondurma karışımları daha çok tercih edilir. DMSO ticari kaynaklardan temin edilip, kullanılmadan önce delik çapı 0.22 µm filtrelerden geçirilerek steril edilir. DMSO'in kullanılacak formu cam kaplara konarak -20°C'de saklanır. Bu DMSO'in oksidasyon problemini ortadan kaldırmaktadır. DMSO'in insan promyelocytic leukemia cell line HL60'da olduğu gibi differensiyasyona sebep olduğu durumlarda gliserol kullanılmalıdır (41,45,53,62).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Primer tavşan böbrek hücre kültürünün yapılması için kullanılan tavşanlar Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma Merkezinden temin edildi. Tavşan böbrek hücre kültürünün hazırlanması için 2 haftalık Albino tavşanlar kullanıldı.

Tavşan böbreğinin çıkarılması ve kültürünün yapılması için 1 adet dişli pens, 1 adet düz pens, 1 adet düz makas, 1 adet eğri makas, spatül ve 2 adet bistüriden oluşan biyopsi seti kullanıldı. Biyopsi setinin sterilizasyonu kuru hava sterilizatöründe 180°C'de 1.5 saat tutularak yapıldı. Primer tavşan böbrek hücre kültürünün yapılması amacıyla çalışmalarımızda payreks camdan yapılmış kültür şişeleri ve tüpleri kullanıldı.

Primer Tavşan Böbrek Hücre Kültürünün Hazırlanması

Çalışmaya başlanılmadan önce laminar akım kabininin ultraviyole lambası yaklaşık 2 saat açık tutularak çalışma alanı steril edildi ve çalışma zemini %70'lik alkolle silindi.

Deneyde kullanılacak hücre üretme besiyeri olan Hanks besiyeri, fosfat buffer solüsyonu (PBS) ve tripsin solüsyonu 37°C'lik su banyosunda yaklaşık yarım saat tutuldu.

Tavşan böbrek hücre kültürünün hazırlanmasında aşağıdaki yol izlendi:

1. Tavşan eterle bayıltılarak, temiz bir tahta üzerine sırt üstü yatırıldı ve bacaklarından tespit edildi.
2. Karın bölgesi makinayla traş edildi. Sonra karın derisi teinture-diode ve %70'lik alkolle temizlendi.
3. Karın derisi bistüri ile sıyrılarak kaldırıldı.
4. Periton makasla kesilerek delindi. Açılan delik önce arkaya, sonra sağa ve sola insizyonlarla genişletildi.
5. Barsaklar sağa ve sola çekilerek makasla kesilen böbrek petri kutusuna konuldu.
6. Böbreklerin üzerindeki yağ tabakası makas ve pens yardımıyla alındı.
7. Böbreklerin kapsülleri sıyrılarak çıkartıldı.
8. Böbrekler petri kutusu içinde PBS ile iyice yıkandı.
9. Böbreklerin kortekslerinden makasla ufak parçalar alındı ve başka bir petri kutusuna konuldu.

10. Böbrek parçaları PBS ile birkaç kez yıkandı.
11. Böbrek parçaları spatül yardımıyla başka bir petriye alınarak çift bistüri sistemi ile daha küçük parçalara ayrıldı.
12. Kıyılmış doku parçaları spatül ile erlenmayer içerisine dikkatli bir şekilde konuldu.
13. Erlenmayer içindeki doku parçalarını eritrositlerden temizlemek için PBS ile 5-6 kez yıkandı.
14. Son yıkamadan sonra doku parçalarının üzerini kaplayacak kadar 37°C'de tutulmuş %0.25'lik tripsin solüsyonu ilave edildi.
15. Erlenmayer içine manyetik çubuk orta şiddette magnetik karıştırıcının üzerine yerleştirildi ve alet orta şiddetle çalıştırıldı.
16. Ön tripsinizasyon işlemi 15-20 dakika sürdürüldükten sonra doku parçalarının üzerindeki tripsin solüsyonu dökülerek atıldı. Böylece yıkama ile giderilemeyen eritrositler ve ölü hücreler ortamdaki uzaklaştırılmış oldu.
17. Daha sonra erlenmayere tekrar dokuların üzerini örtecek kadar tripsin çözeltisi ilave edilerek magnetik karıştırıcıda orta şiddette çalıştırıldı.
18. Tülbentli beherglası süzülen hücreli tripsin çözeltisi +4°C'ye kaldırıldı. Sonra erlenmayere tekrar tripsin çözeltisi konarak magnetik karıştırıcıda 40 dakika tutuldu. Bu süre sonunda doku parçalarından ayrılan hücreler +4°C'de bekletilen tülbentli behere süzüldü. Bu işlem aynı şekilde 3 kez daha yapıldı.
19. Tripsinizasyon işlemi sonunda tülbentli beherglasta toplanan tripsinizasyon solüsyonu ve hücre karışımı santrifüj tüplerine alınarak +4°C'de 800-1000 devirde 5-10 dakika santrifüj edildi.
20. Santrifügasyondan sonra üst sıvı atılarak tüpün dibine çökmüş olan hücrelere tripsinin etkisini azaltmak amacıyla PBS ilave edilip pipetaj yapıldı ve yeniden +4°C'de 800-1000 devirde 5-10 dakika santrifüj edildi.
21. Sonra üstteki PBS döküldü, dipteki hücre çöküntüsü bir miktar Hanks içine alınarak süspanse edildi.
22. Hücreler %0.9'luk NaCl içinde hazırlanmış %0.5-1'lik trypan blue boyasıyla bire bir oranında karıştırıldı. Bu karışım 37°C'de 5 dakika bekletildi. Daha sonra Thoma lamında canlılık tespiti için hücre sayımı yapıldı.

23. Hücre üretme besiyeri olarak kullandığımız ve içerisinde %20 oranında dana serumu bulunan Hanks besiyerinde hücre sayısı ml'de 100.000 olacak şekilde ayarlandı, besiyeri, serum ve hücre karışımı 150 cc'lik hücre kültürü şişelerine 15 cc'lik miktarlar halinde dağıtıldı. Kültür şişeleri kapakları sıkı bir şekilde kapatılmış halde 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
24. Kırk sekiz saat sonra doku kültürü şişelerindeki besiyeri alınarak hücre yüzeyleri PBS ile yıkandı ve hücre kültürü şişesine %10 dana serumlu Hanks besiyeri konuldu.
25. Hücreler şişe yüzeyini kaplayıncaya kadar her gün invert mikroskopta kontrol edildi. Çalışılan bütün şişelerde hücrelerin şişe yüzeyini kaplaması yaklaşık 96 saat sonra gerçekleşti.
26. Hücre kültürlerinin pasajı için şişelerin içindeki besiyeri alındı ve hücreler 4-5 cc PBS ile bir kez yıkandı.
27. Hücre tabakası üzerine 7-8 cc PBS içerisindeki Versen tripsin karışımı konularak 37°C'de 5-10 dakika bekletildi.
Daha sonra hem hücrelerin mekanik ayrışmasını kolaylaştırması hem de ortamdaki tripsini dilüe etmek amacıyla şişelere yaklaşık 10 cc PBS konularak yavaşça pipetaj yapıldı.
28. Hücre süspansiyonu +4°C'de 1000 devirde 5-10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve hücre çöküntüsünün üzerine bir miktar Hanks besiyeri konup hücre sayımı yapıldı ve kaydedildi. Daha sonra hücreler ml'de 100.000 olacak şekilde %10 dana serumlu hücre üretme besiyerinde 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

Hücre kültürü hergün kontrol edildi ve birinci pasaja ait hücrelerin de şişenin yüzeyini yaklaşık 96 saatte kapladığı gözlemlendi. Hücreler kaldırıldı ve toplandı. Daha sonra hücre sayımı yapıldı. Primer tavşan böbrek hücre kültürü 6. pasaja kadar devam ettirilebildi.

Çalışmamızda primer tavşan böbrek hücre kültürünün yapılması için kullandığımız hücre üretme besiyeri, tek tabaka hücre kültürünün gelişmesini takiben pasaj yapmadan önce 3 kültür şişesinden alınan besiyeri ile birinci ve ikinci pasaj sonunda eşit sayıdaki kültür şişelerinden alınan örnekler CO₂ basıncı, O₂ basıncı, Na⁺, K⁺, H⁺, pH değerleri yönünden AVL 995 ve AVL 988-3 aletlerinde analiz edildi. Pasaj öncesindeki, birinci ve ikinci pasaj sonrasındaki bütün örneklerdeki hücre canlılıkları ve hücre sayıları Thoma lamı yardımıyla tespit edildi. Hücrelerin kültürü sırasında mitoz safhalarını gözleyebilmek amacıyla hücrelerin

ilk inokülasyonundan sonraki 36. ve 96. saatlerde petri yüzeyine önceden konmuş olan ve üstünde üremiş hücreler bulunan lameller alınarak Giemsa ile boyandı ve fotoğrafları çekildi.

Hücre Sayımı

-Thoma lamının iki tarafında bulunan 2 adet büyük 16 karedeki hücreler sayılıp aritmetik ortalamaları alındı. Daha sonra şu formül yardımıyla istenilen dilüsyon yapıldı.

$$\text{Dilüsyon Miktarı} = \frac{\text{Başlangıçta dilüsyon için katılan miktar} \times \text{Ortalama sayılan Hücre} \times 10.000(\text{sabit})}{\text{ml'de istenen hücre sayısı}}$$

Örneğin ml'de 250.000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu elde etmek istiyoruz. Thoma lamında üstteki 16 karede sayılan hücre sayısı 90, alttaki 16 karede sayılan hücre sayısı 110 olsun ve başlangıçta hücre pelleti 10 ml üretim besiyeri ile dilüe edilmiş olsun. Buna göre;

$$\text{Ortalama Hücre Sayısı} = \frac{110 + 90}{2} = 100$$

$$\text{Dilüsyon Faktörü} = \frac{10 \times 100 \times 10.000}{250.000} = 40$$

Hücre pelleti üzerine toplam 40 ml' olacak şekilde besiyeri konulursa her ml'de 250.000 hücre olacaktır. Buna göre başlangıçta şişede bulunan 10 ml hücre süspansiyonuna 30 ml üretim besiyeri ilave edilmelidir.

Hücrelerin Krioprezervasyonu

Krioprezervasyon için iki haftalık tavşan böbreğinden hazırladığımız primer hücre kültürlerinden faydalandık. Krioprezervasyon işlemi için hem dokudan direk izole edilen hem de pasajı takiben elde edilen hücreler kullanıldı. Krioprezervasyondan önce ve sonra hücrelerin toplam sayısı ve canlı hücre sayısı %0.9'luk NaCl içinde hazırlanmış %0.5'lik Trypan Blue

boyası kullanılarak tespit edildi.

Doku kültürü şişesinde hücreler üreyip yüzeyi tamamen kapladıktan sonra üretme besiyeri alındı ve şişenin yüzeyini kaplayacak kadar PBS konup hücreler yıkandı, kültür şişesine 7-8 ml PBS içerisindeki Versen Tripsin karışımı ilave edildi. 37°C'de 5-10 dakika kadar inkübasyona bırakılarak şişe yüzeyine yapışmış olan hücrelerin şişeden ayrılması sağlandı ve hücrelerin üzerine 10 ml PBS konuldu. Hafif pipetaj yapılarak hücrelerin mekanik olarak da yüzeyden ayrılması sağlandı. Hücre süspansiyonu +4°C'de 800-1000 devirde 5-10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı atıldı ve hücre pelleti, Hanks ve fetal dana serumunun bire bir oranında karıştırıldığı solüsyonla süspansiyon edilip ml'de 1×10^6 hücre olacak şekilde 1 ml'lik volümler halinde plastik kriotüplere (Nunc) dağıtıldı. Bu karışıma krioprotektan madde olarak %10 oranında dimethyl sulfoxide (DMSO) konuldu.

Daha sonra hücrelerin krioprezervasyonu için aşağıdaki 5 farklı dondurma metodu uygulandı.

- 1. Metod:** Hücreler buzdolabında +4°C'de 2 saat tutulup direk olarak sıvı azota konuldu.
- 2. Metod:** Hücreler +4°C'de 30 dakika tutulup sonra kurubuzda yaklaşık dakikada 8°C soğutularak -20°C'ye getirildi ve sıvı azota konuldu.
- 3. Metod:** Hücreler +4°C'de 30 dakika, -20°C'de 30 dakika ve derin dondurucuda (Hetofrig CL 410) -50°C'de 30 dakika tutulup sıvı azota kaldırıldı.
- 4. Metod:** Hücreler +4°C'de 30 dakika, -20°C'de 30 dakika tutulduktan sonra sıvı azot ve alkol karışımında hazırlanan yaklaşık -30°C'lik ısıda 30 dakika bekletilip sıvı azot tankına kaldırıldı.
- 5. Metod:** Hücreler +4°C'de 30 dakika bekletildikten sonra styrofoam kutu içinde -20°C'de bir saat ve takiben -70°C'de 1 gece tutulduktan sonra kriotüpler styrofoam içinden alınıp sıvı azota kaldırıldı.

Sıvı azotta 40 gün süreyle saklanan hücreler 37°C'lik su banyosunda çözülüp canlılıkları ve hücre sayısı tespit edildi. Sonra kriotüpteki numune bir santrifüj tüpüne alınıp, üzerine 10 ml kadar Hanks besiyeri yavaş yavaş 1-2 dakika içinde konuldu. Pipetaj yapıldıktan sonra 5 dakika 800-1000 devirde santrifüj edildi. Üst kısım atıldıktan sonra dibeye çökmüş hücreler %20 dana serumlu Hanks besiyerine ml'de 100.000 olacak şekilde konuldu. Sonra

kültür tüpleri 37°C'ye kaldırıldı. Hücrelerin adezyonu ve gelişmeleri 24-72 saat süreyle takip edildi.

Araştırmada Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar

Tripsin Solüsyonu (%1)

Tripsin (Difco)	10 g
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	2.37 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Dekstroz	1.0 g
Deiyonize su	1000 ml

Kimyasal maddeler deiyonize suda eritildi ve membran filtresi yöntemiyle sterilize edilerek +4°C'de saklandı.

Fosfat Buffer Solüsyonu

(Ca⁺² ve Mg⁺² süz Dekstrozu)

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	2.37 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Dekstroz	1 g
Fenol Red	0.02 g
Deiyonize su	1000 ml

Kimyasal maddeler deiyonize suda iyice eritildikten sonra membran filtresi yöntemiyle sterilize edilerek +4°C'de saklandı.

Hanks Besiyeri

NaCl	8.0 g
KCl	0.4 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1.85 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	0.12 g
KH ₂ PO ₄	0.06 g
NaHCO ₃	0.35 g
D-Glukoz	1.0 g
Laktalbumin hidrolizat	5.0 g
Fenol Kırmızısı	0.02 g
Deiyonize su	1000 ml

Kimyasal maddeler deiyonize suda eritildi ve membran filtrasyon yöntemiyle sterilize edilerek +4°C'de saklandı.

Versen ve Tripsinli Fosfat Buffer

(Ca⁺² ve Mg⁺²'suz)

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	2.37 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Titriplex III (Versen)	1.0 g
Tripsin	1.25 g
Deiyonize su	1000 ml

Kimyasal maddeler deiyonize suda eritildikten sonra, membran filtresi yöntemiyle sterilize edildi ve sterilit kontrolü yapıp +4°C'ye kaldırıldı.

Bütün solüsyonların sterilizasyonu için kullanılan filtrasyon metodunda solüsyonlar önce kalın nitroselüloz membran filtresi (50 K Sartorius) sonra delik çapı 0.45 µm ve son olarak

da delik çapı 0.22 µm olan membran filtreleri kullanılarak filtre edildi. Sonra filtre edilen solüsyonlardan tüplere 5'er ml alınarak 37°C 1 gece bekletildi. Ertesi gün kanlı agar, Endo agar, ilaçlı sabouraud besiyeri ve thioglycolate besiyerlerine ekim yapılarak kontaminasyon kontrolleri yapıldı.

Tripsinizasyon Solüsyonu

Primer hücre yapımında gerekli olan %0.25'lik tripsin solüsyonu için, %1'lik stok tripsin solüsyondan 1 kısım alınıp üzerine 3 kısım PBS ilave edilerek hazırlandı.

Kanlı Agar:

Adi jeloz 1000 ml

Defibrine kan 70 ml

Adi jeloz otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilip 45-50°C'ye soğutuldu. Steril defibrine insan kanı ilave edilip steril petri kutularına döküldü.

Endo Agar

Adi jeloz 1000 ml

Na₂SO₃ (%10) 24 ml

Laktoz (%20) 40 ml

Bazik fuksin (%10) 4 ml

Adi jeloz otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilip 45-50°C'ye soğutuldu. Diğer maddeler katılıp steril petrilere döküldü.

Sabouraud Dekstroz Agar (SDA):

Adi jeloz 1000 ml

Dekstroz 40 g

Yeast ekstrakt 3 g

Penicillin(200.000 Ü/ml) 1 ml

Adi jeloz otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. pH 5.5'e ayarlanıp 45-50°C'ye soğutulduğunda diğer maddeler ilave edilip steril petrilere döküldü.

Thioglycolate'lı Besiyeri

Aerob, fakültatif anaerob ve anaerob bakterilerin üremesi için kullanılır.

NaCl	2.5 g
Bacto Dekstroz (C ₆ H ₁₂ O ₆ H ₂ O)	5.5 g
Maya özeti	5.0 g
Kasiton	15 g
Sodium thiyoglycolate	0.5 g
L.cystine	0,5 g
%1'lik resasurin	1 ml
Agar toz	0.75g
Distile su	1000 ml

L. cystine küçük bir kaba konularak üzerine %40'luk NaOH'tan damla damla eklenip alttan ısıtılarak eritildi. Eridikten sonra tartılan maddelerin üzerine ilave edildi. Üzerine 1000 ml distile su konularak Koch kazanında eritildi. pH 7.5-7.7'ye ayarlandı. Pitman tüplerine paylaştırıldı (Tüpün 3/4'üne kadar dolduruldu). Ağızları pamukla kapatıldı. Otoklavda 121°C'de 20 dakikada steril edildi. Otoklavdan çıkarılınca derhal soğuk su dolu bir kaba konuldu (üstte kırmızı bir çizgi kalmalıdır. Alt kırmızı bölge vasatın 1/3'ünden fazla ise vasat kullanılmaz). 37°C'lik etüvde iki gün bırakılarak kontrolü yapıldı.

Antimikrobiyal Solüsyon

Kullanılan antimikrobik solüsyonlar steril edilmiş deiyonize suyla bu maddelerin toz formlarından hazırlandı.

Penicillin G	100 U/ml
Streptomycin	100 mg/ml
Gentamycin	50 mg/ml
Amphotericin B	0.5 mg/ml

Hazırlanan bu antimikrobiyal solüsyonlar küçük hacimlere bölünerek -20°C'ye kaldırıldı. Penicillin-streptomycin kombine halde hazırlandı. Gentamycin ve Amphotericin B solüsyonları ayrı ayrı hazırlandı ve -20°C'ye kaldırıldı.

Dana Serumunun Elde Edilmesi

Hücrelerin kültivasyonu sırasında üremeyi stimüle edici özelliğinden dolayı kullanılan dana serumu Adana Mezbahasında kesilen sağlıklı ve genç danalardan sağlandı.

Mezbahada danaların kesimi sırasında büyük mezürlere alınan kan laboratuvara getirilerek, serumun kan hücrelerinden ayrılması için +4°C'de 1 gece bekletildi. Ayrılan serum buradan alınarak 2000-3000 devirde santrifüj edilip eritrositlerinden arındırıldı. Serum 56°C'de 30 dakika tutularak inaktive edildi ve filtrasyon yöntemiyle steril edildikten sonra kontamine olup olmadığı kontrol edildi ve uygun antibiyotik solüsyonları katılarak küçük şişelere taksim edilip derin dondurucuya (-80°) kaldırıldı.

Trypan Blue Boyama Metodu

Gerek primer kültür sonunda, gerekse hücre pasajları esnasında canlılık tespiti maksadıyla kullanılan bir metoddur. Hazırlanışı;

Trypan Blue	1 g
NaCl	0.9 g

Deiyonize suyla 100 ml'ye tamamlanır. Bir kısım boya ile bir kısım hücre süspansiyonu karıştırılır ve 37°C'de 5 dakika tutularak ölü hücrelerin boyayı tam ve net bir şekilde alması sağlanır.

Hücrelerin Giemsa ile Boyanması

Kültürde hücrelerin mitoz safhalarını izleyebilmek amacıyla kültür kapları içine bırakılan lameller 36. ve 96. saatlerde çıkarılarak 3 dakika metanol ile tespit edilip giemsa ile boyandı.

Giemsa

Stok Solüsyon

Giemsa (hazır toz)	0.5 g
Metil Alkol (asetonsuz)	33 ml

Karıştırılır ve oda ısısında saklanır.

Solüsyon A (pH 7.2)

Solüsyon 1:

NaH₂PO₄ 0.067 M

NaCl 9.5 g

1 lt distile suya tamamlanır.

Solüsyon 2:

NaH₂PO₄ 0.067 M

NaCl 9.2 g

1 lt distile suya tamamlanır.

72 ml solüsyon 1 ile 28 ml solüsyon 2 karıştırılır ve üzerine 900 ml distile su eklenir.

Giemsa Boyama Solüsyonu

Stok solüsyon 1 kısım

Solüsyona A(pH: 7.2) 50 kısım

karıştırılır, oda ısısında saklanır.

4. BULGULAR

Primer tavşan böbrek hücre kültürünün gelişmesiyle ilgili faktörleri araştırmak amacıyla yaptığımız bu çalışmada, hücre üretme besiyeri olarak kullandığımız dana serumlu Hanks besiyeri, pasaj öncesi kültür örneklerinden alınan besiyeri, birinci ve ikinci pasajların kültürlerine ait besiyeri örneklerindeki CO₂, O₂, Na⁺, K⁺, H⁺, pH değerlerinin yanısıra ml'deki hücre sayısı ve hücre canlılığı değerlendirildi.

Primer hücre kültürünün yapımında, başlangıçta kullandığımız %20 dana serumlu Hanks besiyerinde ve pasaj öncesi ilk kültüre ait besiyerindeki CO₂ değerleri sırasıyla 12.5 mmHg, 17.9±0.4 mmHg, O₂ 180.4 mmHg, 155.6±0.6 mmHg Na⁺ 146.3 mmol/L 148.3±0.1 mmol/l, K⁺ 5.32 mmol/L 5.31±0.1 mmol/L olarak bulundu. H⁺ iyonu 97 mmol/L 152.8±1, pH değeri ise 7.2 ve 6.83±0.04 olarak tespit edildi. Hücre sayısı başlangıçta ml'de 100.000 olacak şekilde ayarlandı. Pasaj öncesi ortalama değeri 316.666.6±8891 idi. Hücrelerin canlılığı başlangıçta %92, pasaj öncesi %94 olarak tespit edildi (Tablo-1).

Tablo I. Pasaj öncesi tavşan böbrek hücre kültürünün gelişmesiyle ilgili faktörler

	%20 dana serumlu Hanks besiyeri	1.Hücre Kültürü	2.Hücre Kültürü	3.Hücre Kültürü	Pasaj Öncesi Ortalama
Na ⁺ mmol/l	146.3	148.3	148	148.6	148.3±0.1
K ⁺ mmol/l	5.32	5.31	5.30	5.32	5.31±0.10
CO ₂ mmHg	12.5	18.5	17.0	18.2	17.9±0.4
O ₂ mmHg	180.4	155	157	154.9	155.6±0.6
H ⁺ mmol/L	97	152	155	151.5	152.8±1.0
pH	7.27	6.91	6.82	6.77	6.83±0.04
Hücre Sayısı/ml	100.000	320.000	300.000	330.000	316666.6±8819
Hücre Canlılığı (%)	92	96	95	93	94.6±0.8

Primer tavşan böbrek hücre kültürünün birinci pasajında kullanılan %10 dana serumlu Hanks besiyerinde ve birinci pasajın sonunda alınan besiyerinde hücrelerin üreme ve gelişmelerinde önemli rol oynayan kriterler sırasıyla, CO₂ 4.4 mmHg 18.6±0.3 mmHg, O₂ 186.7 mmHg 163.3±1.6 mmHg, Na⁺ 147.5 mmol/L 151±1.1 mmol/L, K⁺ 5.64 mmol/L 5.61±0 olarak bulundu. H⁺ iyonu 176.5 mmol/L 197.4±3.4 mmol/L, pH değeri ise 7.31 ve 6.89±0.05 idi. Hücre sayısı başlangıçta ml'de 100.000 olacak şekilde süspansiyon edildi. Birinci pasajda ortalama değeri 440.000±17320 olarak belirlendi. Hücrelerin canlılığı başlangıçta %93, birinci pasajda %96 idi (Tablo-II).

Tablo II. 1. pasajda ait primer tavşan böbrek hücre kültürünün gelişmesi ile ilgili faktörler.

	%10 dana serumlu Hanks besiyeri	1.Hücre Kültürü	2.Hücre Kültürü	3.Hücre Kültürü	1.Pasajda Ortalama
Na ⁺ mmol/l	147.5	151	149	153	151.0±1.1
K ⁺ mmol/l	5.64	5.61	5.63	5.59	5.61±0
O ₂ mmHg	186.7	160	165	164.9	163.3±1.6
CO ₂ mmHg	4.4	19	19	18	18.6±0.3
H ⁺ mmol/L	176.5	191	202.9	198.3	197.4±3.4
pH	7.31	6.92	6.98	6.78	6.89±0.05
Hücre Sayısı/ml	100.000	440.000	410.000	470.000	440000.0±17320
Hücre Canlılığı (%)	93	95	94	94	95.6±0.3

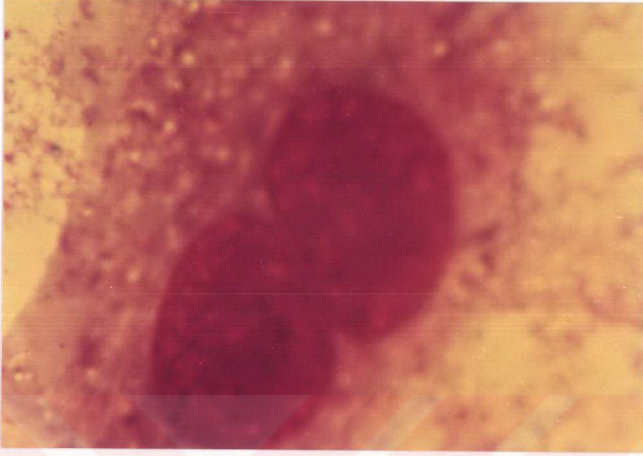
Aynı kriterler 2. pasajın sonunda alınan besiyerleri ve %10 dana serumlu Hanks besiyerinde tespit edildi. Bu değerlerin sırasıyla, CO₂ O mmHg 9.66±0.2 mmHg, O₂ 159.5 mmHg 155.2±0.6 mmHg, Na⁺ 144.4 mmol/L 146±1.1 mmol/L, K⁺ 5.59 mmol/L 5.47±0 mmol/L olduğu görüldü. H⁺ iyonu 60 mmol/L 168.5±0, pH değeri ise 7.29 ve 6.87±0.05 idi. Başlangıçta hücre sayısı ml'de 100.000 olacak şekilde süspanse edildi. 2. pasajda ortalama hücre sayısının 540.000±23094 olduğu tespit edildi. Hücrelerin canlılığı başlangıçta %92, 2. pasajda %93 olarak bulundu (Tablo- III).

Tablo III. 2. pasaja ait tavşan böbrek hücre kültürünün gelişmesiyle ilgili faktörler.

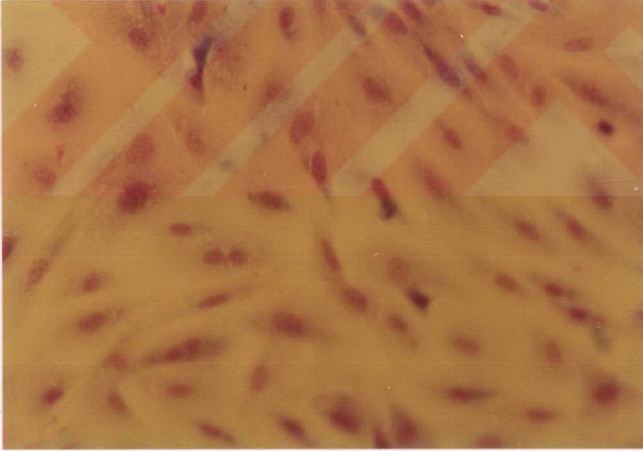
	%10 Dana serumlu Hanks besiyeri	1.Hücre Kültürü	2.Hücre Kültürü	3.Hücre Kültürü	2. Pasajda Ortalama Değer
Na ⁺ mmol/l	144.4	146	144	148	146.0±1.1
K ⁺ mmol/l	5.59	5.49	5.48	5.46	5.47±0
O ₂ mmHg	159.5	156	154	155.8	155.2±0.6
CO ₂ mmHg	0	9.2	9.8	10	9.66±0.26
H ⁺ mmol/L	60	167.1	168.3	170.1	168.50±0.08
pH	7.29	6.95	6.90	6.78	6.87±0.05
Hücre Sayısı/ml	100.000	500.000	580.000	540.000	540.000±23094
Hücre Canlılığı (%)	92	91	95	93	93±1.54

Primer tavşan böbrek hücre kültüründe hücrelerin gelişmesini izleyebilmek amacıyla hücre kültürü şişesinin içine bırakılan lameller hücrelerin inokülasyonundan sonra 36. ve 96. saatlerde alınarak Giemsa ile boyandı.

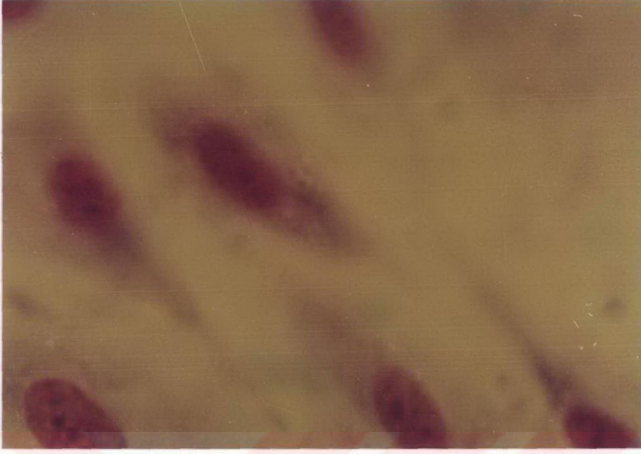
Boyamadan sonra yapılan incelemede 36. saatte alınan örnekte hücrelerin telofaz safhasında olduğu (şekil-1) 96. saatte ise monolayer halde ürediği görüldü. (şekil-2 ve şekil-3).



Şekil-1. Primer tavşan böbrek hücre kültüründe 36.saatte tespit edilmiş telofaz safhası (x1000)



Şekil-2. Monolayer tarzda üremiş primer tavşan böbrek hücre kültürü (x100).



Şekil-3. Monolayer tarzda üremiş primer tavşan böbrek hücre kültürü (x400).

Hücrelerin krioprezervasyonu için 5 farklı dondurma metodu uygulandı. Krioprezervasyon sonrası hücrelerin ortalama canlılık oranlarını tespit etmek amacıyla her metod 4 ile 7 kez tekrarlandı. Krioprezervasyon sonrası değerlendirmelere göre 1.metodda hücrelerin canlılık oranı %9.04 (Tablo-IV), 2.metodda %24.6 (Tablo-V), 3. metodda %42.5 (Tablo-VI), 4.metodda %67 (Tablo-VII) ve 5.metodda % 84 ± 1.22 olarak tespit edildi. (Tablo-VIII)

Tablo-IV. Birinci metod sonrası hücrelerin canlılık oranları

Dondurma Metodu	Dondurma Öncesi		Dondurma Sonrası	
	Hücre sayısı/ml	Canlılık oranı (%)	Canlılık oranı (%)	Ortalama Canlılık Oranı (%)
+4°C'de 2 saat ↓ Sıvı azotta 40 gün	1.000.000	96	6	9.04±1.38
	1.000.000	96	10.6	
	1.000.000	96	7.5	
	1.000.000	96	12.06	

Tablo-V. İkinci metod sonrası hücrelerin canlılık oranları

Dondurma Metodu	Dondurma Öncesi		Dondurma Sonrası	
	Hücre sayısı/ml	Canlılık oranı (%)	Canlılık oranı (%)	Ortalama Canlılık Oranı (%)
+4°C'de 30 dk. ↓ 8 ^b C/dk soğutarak -20°C ↓ Sıvı azotta 40 gün	1.000.000	94	28	24.6±2.22
	1.000.000	94	30	
	1.000.000	94	25	
	1.000.000	94	17.14	
	1.000.000	94	23	

Tablo-VI. Üçüncü metod sonrası hücrelerin canlılık oranları

Dondurma Metodu	Dondurma Öncesi		Dondurma Sonrası	
	Hücre sayısı/ml	Canlılık oranı (%)	Canlılık oranı (%)	Ortalama Canlılık Oranı (%)
+4°C'de 30 dk. ↓	1.000.000	94	42	42.5±1.6
-20°C'de 30 dk. ↓	1.000.000	94	40	
-50°C'de 30 dk. ↓	1.000.000	94	50	
Sıvı azotta 40 gün	1.000.000	94	41	
	1.000.000	94	39	
	1.000.000	94	43	

Tablo-VII. Dördüncü metod sonrası hücrelerin canlılık oranları

Dondurma Metodu	Dondurma Öncesi		Dondurma Sonrası	
	Hücre sayısı/ml	Canlılık oranı (%)	Canlılık oranı (%)	Ortalama Canlılık Oranı (%)
+4°C'de 30 dk. ↓	1.000.000	95	60	67±2.45
-20°C'de 30 dk. ↓	1.000.000	95	75	
-30°C'de 30 dk. (Alkol+sıvı azot) ↓	1.000.000	95	64	
Sıvı azotta 40 gün	1.000.000	95	68	
	1.000.000	95	58	
	1.000.000	95	72	
	1.000.000	95	72	

TABLO-VIII. Beşinci metod sonrası hücrelerin canlılık oranları

Dondurma Metodu	Dondurma Öncesi		Dondurma Sonrası	
	Hücre sayısı/ml	Canlılık oranı (%)	Canlılık oranı (%)	Ortalama Canlılık Oranı (%)
+4°C'de 30 dk. ↓	1.000.000	94	83	84±1.22
-20°C'de styrfoam kutu içinde 1 saat ↓	1.000.000	94	87	
-70°C'de styrfoam kutu içinde 1 gece ↓	1.000.000	94	84	
Sıvı azotta 40gün	1.000.000	94	86	
	1.000.000	94	80	

Krioprezervasyon sonrası hücrelerin kültürünü yaptığımızda 1. ve 2. metodlara göre dondurulan hücreler kültürde gelişmedi. Üçüncü metoda göre dondurulan hücreler 24 saat içinde adezyon gösterdi ve hücrelerin şişenin yüzeyini %20-30 oranında kapladığı gözlemlendi. Dördüncü ve beşinci metodlara göre dondurulan hücreler 24 saat içinde adezyon gösterdi. Dördüncü metoda göre yapılan kültürlerde hücrelerin şişenin yüzeyini yaklaşık %50 oranında, 5. metoda göre yapılanlarda ise %70-80 oranında kapladığı görüldü.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hücre kültürü çalışmalarının tıp ve diğer birçok bilim alanında uygulanmaya konmasıyla çok büyük aşamalar sağlanmıştır. Hücre kültürlerinin virusların izolasyonu ve identifikasyonu, viral antijenlerin elde edilmesi, viral aşuların hazırlanması, monoklonal antikörlerin üretilmesi gibi virolojik çalışmalarda kullanılmasının yanında kanserli dokuların kültürlerinin yapılması ve hastalığın tanısı, karsinogenez mekanizmalarının araştırılması ve antikanserojen ilaçların etkilerinin incelenmesi, radyasyonun hücreler üzerine etkisi, ilaçların aktivitelerinin ve toksik etkilerinin çalışılması, kromozomal anomalilerin tespiti ve in vitro fertilizasyon gibi çeşitli alanlarda kullanılması bu tekniğin önemini açıkça göstermektedir. Hücre kültürü yardımıyla farklı birçok dokulardan üretilen hücrelerin morfolojileri, fizyolojik aktiviteleri ve metabolizmaları incelenebilmiş ve yeni bilgiler elde edilmiştir (13,15,23).

Hücre kültürleri genel olarak primer hücre kültürü, diploid hücre kültürü ve devamlı hücre kültürü olmak üzere üç tipe ayrılır. Primer hücre kültürü bir dokudan veya organdan hazırlanan ilk hücre kültürü olup, virusların üretilmeleri için en duyarlı sistemdir. Primer hücre kültürü epitel, fibroblast veya karışık hücrelerden oluşur. Primer kültüre örnek olarak tavşan böbrek hücre kültürü ve insan embriyonu böbrek hücre kültürü verilebilir. Diploid hücre kültürü primer hücre kültüründen sonra gelişebilen en fazla 50-100 kadar pasajı yapılabilen daha çok fibroblastların hakim olduğu hücre kültürüdür. Diploid hücre kültürleri arasında diploid insan fibroblast akciğer hücre kültürü olan WI-38 ve MRC-5 sayılabilir. Devamlı hücre kültürleri ise ya diploid hücre kültürlerinin transformasyonu sonucu gelişen veya kanser dokularından yapılan epitelyal hücrelerin baskın olduğu hücre kültürleridir. Devamlı hücre kültürlerinin (HEp-2, HeLa gibi) avantajı sonsuz pasajının yapılabilmesidir (2,37,57,61).

Hücre kültürünün in vivo şartlara benzer bir ortamda yapılması halinde hücre üremesi en iyi şekilde sağlanır. Hücre üretme besiyerinde hücrenin yapı elemanlarının sentezi için ve enerji kaynağı olarak karbonhidratlar, amino asitler, vitaminler, serum proteinleri, tuzlar, hidrojen iyonu, oksijen ve karbondioksit gibi gazlar mutlaka bulunmalıdır. Besiyerinde serum bulunmaması halinde hücreler fonksiyonlarını yalnızca birkaç gün devam ettirebilirler. Diğer taraftan besiyerinde aminoasitlerin bulunmaması durumunda hücreler 24 saat kadar, karbonhidratın bulunmaması halinde ise ancak birkaç saat yaşayabilirler (7,8,15,23).

Çalışmamızda primer tavşan böbrek hücre kültürünün yapımında hücre üretme

Çalışmamızda primer tavşan böbrek hücre kültürünün yapımında hücre üretme besiyerine başlangıçta %20 dana serumu, sonraki pasajlarda ise %10 dana serumu ilave ettik. Başlangıçta ml'ye 100.000 olarak hesapladığımız hücre sayısı ilk 4 gün sonunda yaklaşık 317.000/ml, birinci pasajın sonunda yaklaşık 440.000/ml ve ikinci pasajın sonunda 540.000/ml'ye ulaştı. Bu veriler hücrelerin üredikleri ortama gittikçe artan bir adaptasyon gösterdiklerini ispatlamıştır. Hücre kültürlerinin 4. ve 5. pasajları gibi ileri pasajları sırasında hücrelerin gelişmelerinin yavaşladığı durumlarda, serum konsantrasyonunu %20 oranına çıkarmamız verimli olmuştur.

Hücre fonksiyonlarının kontrolünde önemli rol oynayan faktörlerden biri hücrelerde membran potansiyelini regüle eden Na^+/K^+ pompasıdır. Bütün hücrelerde membranın iki tarafı arasında elektrik potansiyeli mevcuttur. Vücutta ekstraselüler sıvıda fazla miktarda Na^+ (142 mmol/l) ve az miktarda K^+ (4 mmol/l) bulunur. İntraselüler sıvıda ise Na^+ daha az iken K^+ 'un miktarı daha fazladır (11,25,28,40,51).

Sodyum iyonu suyun hücrenin içine ve dışına hareketini regüle eder. Genellikle besiyerlerine ve solüsyonlara klor (Cl^-) anyonuyla birlikte katılır. Hücre membranında oluşan osmotik basınç NaCl konsantrasyonu ile ilgilidir (17,27,36,54). İzotonik bir solüsyon kullanılırsa hücrelerin hacimleri in vivo şartlardakinden farklı değildir. Kültür hücreleri için kullanılan izotonik solüsyonda %0.9 oranında NaCl (155 mM) bulunmalıdır. Hücrelerin üretilmesi için kullanılan %20 dana serumlu Hanks besiyerinde Na^+ ve K^+ miktarı sırasıyla 146.3 mmol/L, 5.32 mmol/l iken pasaj öncesi alınan örneklerde Na^+ miktarı ortalama 148 mmol/l'ye yükselirken K^+ miktarı 5.31 mmol/l'ye düşmüştür. Yine birinci pasajda kullanılan %10 dana serumlu Hanks besiyerindeki Na^+ miktarı 147.5 mmol/l'den, pasaj sonunda (4.gün) alınan örneklerde ortalama 151 mmol/l'ye yükselmiş, K^+ miktarı ise sırasıyla 5.64 mmol/l'den 5.61 mmol/l'ye düşmüştür. İkinci pasajda da benzer bulgular elde edilmiştir (Tablo-III). Bu bulgular hücrelerin üremesi sırasında Na^+ 'un hücrelerden salınması sonucu hücre dışı ortamda Na^+ konsantrasyonunun arttığını ve K^+ 'un hücre içine transportu sonucu besiyerinde K^+ konsantrasyonunun azaldığını göstermektedir. Pasaj öncesi Na^+ 'a ait 148 mmol/l'lik ortalama değer ile diğer pasajlara ait 151 ve 146 mmol/l'lik ortalama değerler in vivo hücre dışı ortamdaki 142 mmol/l'lik Na^+ konsantrasyonuna oldukça yakındır. Yine pasaj öncesi 1.pasaj ve 2.pasaja ait sırasıyla 5.31, 5.61 ve 5.47 mmol/l olan K^+ değerleri in vivo hücre dışı

ortamdaki 4 mmol/l'ye yakındır. Bu sonuçlar primer tavşan böbrek hücre kültürü için kullandığımız dana serumlu Hanks besiyerinde Na^+/K^+ pompasının normal olarak çalıştığını yansıtmaktadır.

Hücrelerin üremesi sırasında hücrelerdeki kimyasal reaksiyonlar için gerekli olan başlıca maddelerden biri de oksijendir. Oksijen hem aerobik glikoliz yoluyla enerji sağlanmasında rol oynar hem de Krebs siklusunu sonucu açığa çıkan bazı ürünlerin hücre yapılarının sentezinde kullanılması için gereklidir (28). Kültürler O_2 ihtiyacı yönünden önemli farklılık gösterir. Hücre kültürlerinin çoğunda atmosferik veya düşük O_2 basınçları tercih edilirken bazı organ kültürleri, özellikle geç dönemdeki embriyo, yeni doğan veya yetişkin, kültürleri gaz fazında %95'ten fazla O_2 'e ihtiyaç gösterirler. Bu durum organ kültürlerinin morfolojik yapısından kaynaklanır. O_2 'nin hücrelere diffüzyonu güç olduğundan fazla O_2 'e ihtiyaç vardır. Kültür besiyerinin derinliği O_2 'nin hücrelere diffüzyonunu etkileyeceğinden besiyerinin derinliğinin 0.2-0.5 ml/cm² olması tavsiye edilir (23).

Karbondioksit, hücrelerde oksidatif reaksiyonların son ürünlerinden biri olup hücre dışına atılır. Eğer oluşan CO_2 hücrelerde birikirse, hücrelerde enerji veren reaksiyonların hepsi kısa sürede durur (28). Karbondioksitin hücre kültüründe ortamın pH'nı kontrol etmede önemli rolü vardır ve CO_2 'siz yaşayabilen kültür yoktur. Besiyerindeki çözünmüş CO_2 'in bir kısmı hücrelerden açığa çıkar, bir kısmı da atmosferik CO_2 'in besiyerine geçmesiyle sağlanır (23,39). Hücrelerden açığa çıkan CO_2 gazı kültür besiyerinde iyi çözünür. Küçük bir kısmı (%1'den daha az) su ile kimyasal reaksiyona girerek karbonik asidi (H_2CO_3) oluşturur. Bu bileşik de H^+ ve HCO_3^- iyonlarına ayrılır. HCO_3^- iyonunun besiyerindeki mevcut katyonlarla birleşme eğilimi yüksektir. Mesela Na^+ ile birleşerek NaHCO_3 oluşturur ve besiyerinde H^+ iyonu konsantrasyonunu yükseltir ve pH'yı düşürerek ortamı asitleştirir. Bundan dolayı besiyerinde CO_2 basıncının artmasına bağlı olarak asidite yavaş yavaş artar (15,26). Besiyerinde NaHCO_3 miktarının Earle's dengeli tuz solüsyonundaki gibi (23 mM) yüksek olduğu şartlarda kültür şişesi kapağı gevşek bırakılarak %5 CO_2 'li ortamda inkübe edilir (15,39). Bizim hücre üretme besiyeri olarak seçtiğimiz Hanks besiyerinde NaHCO_3 (4 mM) olup kültür şişelerinin kapakları sıkıca kapatılıp normal atmosferde inkübe edilmiştir. Primer kültür yapımında kullandığımız besiyeri ve pasaj öncesi kültürden alınan besiyeri örneğinde O_2 ve CO_2 basınçlarını analiz ettiğimizde sırasıyla O_2 180 mmHg'den ortalama 155.6 mmHg'ye düşmüş, CO_2 12.5

mmHg'den 17.9 mmHg yselmiştir. Yine 1. ve 2. pasajlarda da besiyerlerinde benzer şekilde O₂ değerleri azalmış, CO₂ değerleri ise artmıştır (Tablo-II ve III). Bu sonuçlar hücre fonksiyonlarının normal seyrettiğini göstermektedir. Besiyerinde CO₂ ve bikarbonat buffer tampon sistemi dışında pH'yı etkileyen faktörler kültür şişesindeki besiyerinin üstünde kalan boş hacim ve glukoz konsantrasyonudur. Glukoz glukolitik enzimlerin etkisiyle prvik asite dönüşür, sonra laktik asite indirgenir ve asitten meydana gelen hidrojen iyonu konsantrasyonu artar (55). Yine pH'nın kontrolünde önemli olan, besiyerinin üstünde kalan şişenin hacmi, kapalı sistemlerde besiyeri miktarından 10 kat daha fazla olmalıdır. Bu hacim uygun miktarda oksijen ihtiyacını da sağlar (15,39). Çalışmamızda da 150 ml'lik kültür şişelerine bu hacmin %10'u kadar besiyeri koyarak hücre kültürünü yaptık.

Çalışmamızda pH değerlerini dikkate aldığımızda kullandığımız besiyerinde pH değeri 7.27 iken pasajdan önce 6.83'e düşmüş, benzer şekilde 1. pasajın başlangıcında Hanks besiyerinin pH'sı 7.31 iken, 1.pasajın sonunda 6.89'e düşmüştür. İkinci pasajın sonunda da kültür besiyerinin pH'sının hücrelerin gelişmesiyle ilgili olarak düştüğü tespit edilmiştir (Tablo-III).

Primer ve devamlı hücre kültürlerinin krioprezervasyonunun yapılması için çeşitli metodlar uygulanmaktadır. Bu metodlardan en pratik ve uygun olanları programlı dondurma cihazları kullanılarak yapılan krioprezervasyon teknikleridir. Ancak, bu tür cihazlar pahalı olduğu gibi zor bulunduğundan kullanımı sınırlıdır (15,47).

Araştırmamızda primer tavşan böbrek hücrelerinin çeşitli dondurma metodları ile krioprezervasyonunu optimize etmeye çalıştık. Bu amaçla 5 metoddan oluşan denemeler yaptık. Hücreleri dondurmak için bire bir(1:1) oranında karıştırılmış Hanks besiyeri ve fetal bovin serumdan oluşan %10 DMSO'li dondurma solüsyonu kullandık.

Çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuçlarda hücrelerin en düşük canlılık oranı direk dondurma metodu olarak adlandırdığımız 1. metoddan elde edildi. Bu metoddan canlılık oranı %9.04 iken, en yüksek canlılık oranı 5. metoddan (hücrelerin +4°C'de 30 dakika, -20°C'de styrofoam kutu içinde 1 saat, -70°C styrofoam kutu içinde 1 gece tutulması ve sıvı azota konulması) %84 olarak tespit edildi.

Uyguladığımız metodlardan 1. metod olan direk dondurma metodunun başarılı olmadığı görüldü. İkinci metoddan diğer metodlara göre daha düşük (%24.6) canlılık oranının

alınmasının sebebini soğutma hızının ($8^{\circ}\text{C}/\text{dk}$) yüksek olmasına ve diğer metodlarda hücrelerin sıvı azota konulmadan önce farklı ısılarda bir süre bekletilmesine (Tablo-VI, VII ve VIII) karşılık bu methodda hücrelerin bir ara basamak olan -20°C 'de bekletilmeden hemen sıvı azota konulmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Üçüncü ve 4. methodlarda ise önceki her iki methoddan daha fazla canlı hücre elde edilmesinin hücrelerin -20°C 'de 30 dakika tutulmasından kaynaklanabileceğini düşündük. Dördüncü methodda (%67), 3. methoddan (42.5) daha yüksek canlılık oranının elde edilmesinin sebebi 3. methodda hücrelerin -20°C 'den -50°C 'ye getirilmesine karşılık 4. methodda hücrelerin -20°C 'den sonra alkol ve sıvı azot karışımındaki yaklaşık -30°C 'lik ısıya kaldırılması olabilir. Dördüncü methoddaki -20°C ve -30°C arasındaki ısı farkının 3. methoddaki -20°C ve -50°C arasındaki ısı farkına göre düşük olmasının hücrelere zarar verebilecek faktörlerin (buz kristalleri, vs.) oluşmasını önleyebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, krioprezervasyon sonrası hücrelerin kültürü yapıldığında 4. methodla dondurulan hücrelerin 24 saat içinde adezyon göstermesi ve şişe yüzeyini yaklaşık % 50 oranında kaplamasına karşılık, 1. ve 2. methoda göre dondurulan hücrelerin kültüründe gelişme gözlenmemesi, 3. methodda ise hücrelerin adezyon göstermesi, ancak şişenin yüzeyini %20-30 oranında kaplaması hücrelerin krioprezervasyonu için 4. methodun daha uygun olduğunu göstermektedir. Ancak kriotüplerin styrofoam bir kutu içine yerleştirilerek -70°C 'de en az 6 saat bekletildiğinde dakikada yaklaşık -1°C soğuma hızı sağladığı ileri sürülen yavaş dondurma işleminin (23,35,50) benzeri olarak uyguladığımız 5. methodda hücrelerin canlılık oranını hem diğer methodlara göre %84'lük bir rakamla en yüksek orana ulaştığını, hem de hücrelerin 24 saat içinde yine diğerlerine göre daha yüksek (%70-80) oranda şişe yüzeyini kapladığını tespit etmemiz bu methodun hücrelerin krioprezervasyonu için en uygun method olduğunu göstermiştir.

sıvı azota konulmadan önce farklı ısılarda bir süre bekletilmesine (Tablo-VI, VII ve VIII) karşılık bu methodda hücrelerin bir ara basamak olan -20°C 'de bekletilmeden hemen sıvı azota konulmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Üçüncü ve 4. methodlarda ise önceki her iki methoddan daha fazla canlı hücre elde edilmesinin hücrelerin -20°C 'de 30 dakika tutulmasından kaynaklanabileceğini düşündük. Dördüncü methodda (%67), 3. methoddan (42.5) daha yüksek canlılık oranının elde edilmesinin sebebi 3. methodda hücrelerin -20°C 'den -50°C 'ye getirilmesine karşılık 4. methodda hücrelerin -20°C 'den sonra alkol ve sıvı azot karışımındaki yaklaşık -30°C 'lik ısıya kaldırılması olabilir. Dördüncü methoddaki -20°C ve -30°C arasındaki ısı farkının 3. methoddaki -20°C ve -50°C arasındaki ısı farkına göre düşük olmasının hücrelere zarar verebilecek faktörlerin (buz kristalleri, vs.) oluşmasını önleyebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, krioprezervasyon sonrası hücrelerin kültürü yapıldığında 4. methodla dondurulan hücrelerin 24 saat içinde adezyon göstermesi ve şişe yüzeyini yaklaşık % 50 oranında kaplamasına karşılık, 1. ve 2. methoda göre dondurulan hücrelerin kültüründe gelişme gözlenmemesi, 3. methodda ise hücrelerin adezyon göstermesi, ancak şişenin yüzeyini %20-30 oranında kaplaması hücrelerin krioprezervasyonu için 4. methodun daha uygun olduğunu göstermektedir. Ancak kriotüplerin styrofoam bir kutu içine yerleştirilerek -70°C 'de en az 6 saat bekletildiğinde dakikada yaklaşık -1°C soğuma hızı sağladığı ileri sürülen yavaş dondurma işleminin (23,35,50) benzeri olarak uyguladığımız 5. methodda hücrelerin canlılık oranını hem diğer methodlara göre %84'lük bir rakamla en yüksek orana ulaştığını, hem de hücrelerin 24 saat içinde yine diğerlerine göre daha yüksek (%70-80) oranda şişe yüzeyini kapladığını tespit etmemiz bu methodun hücrelerin krioprezervasyonu için en uygun method olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada laboratuvarımızda virolojik araştırmalarda kullanılmak üzere yaptığımız primer tavşan böbrek hücre kültürünün devam ettirilmesi için %10 dana serumlu Hanks besiyerinin uygun olduğu ve hücrelerin krioprezervasyonu için en iyi methodun hücrelerin Hanks besiyeri ve fetal dana serumundan oluşan (1:1) %10 DMSO'lu dondurma solüsyonunda sırasıyla $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika, styrofoam kutu içinde -20°C 'de 1 saat ve -70°C 'de 1 gece tutulmasından sonra sıvı azotta 40 gün bekletilen method olduğu tespit edildi. Bu methodla yapılan krioprezervasyon sonunda hücrelerin %84 oranında canlılıklarını muhafaza ettikleri görüldü.

6.KAYNAKLAR

1. Adams RLP: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Cell Culture for Biochemists. Netherlands, 1980, p:84-95.
2. Akan E: Özel ve Genel Viroloji. 3. Baskı, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 1994, s:75-82.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: Molecular Biology of The Cell. Garland Publishing Inc, USA, 1994, p:156-62.
4. Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH: Modes of Interaction of Cryoprotectants with Membrane Phospholipids During Freezing. *Cryobiology* 1987; 24:324-31.
5. Anchordoguy TJ, Cecchini CA, Crowe JH, Crowe LM: Insights into The Cryoprotective Mechanism of Dimethyl Sulfoxide for Phospholipid Bilayer. *Cryobiology* 1991; 28:467-73.
6. Armstrong D: Contamination in Tissue Culture. Academic Press, New York, 1973, p:51-63.
7. Baker FJ, Breach MR: Medical Microbiology Techniques. First Published, Great Britain, 1980, p:259-62, 324-29.
8. Balows A, Hausler JR, William J, Kenneth L, Herrmann Henry D, Isenberg H, Shadomy J: Manuel Clinical Microbiology, Fifth Edition, USA, 1991, p:137-39.
9. Bank H: Visualization of Freezing Damage. II. Structural Alterations During Warming. *Cryobiology* 1973; 10:157-70.
10. Berquist LM: Microbiology for The Hospital Environment. USA, 1981, p:216-222.

11. Borle AB, Loveday J: Effects of Temperature, Potassium and Calcium on The Electrical Potential Difference in HeLa Cells. **Cancer Res** 1968; 28:2401-405.
12. Boyd RF, Hoerly BG: Basic Medical Microbiology. 2nd Ed, USA, 1981, p:49-57.
13. Boyd RF: Basic Medical Microbiology. 5th Ed., Little Brow and Company, USA, 1995, p:397-400.
14. Bryant G, Wolge J: Interfacial Forces in Cryobiology and Anhydrobiology. **Cryo Lett** 1992; 13:23-36.
15. Doyle A, Griffiths JB, Newell DG: Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures. John Wiley and Sons Ltd, England, 1995, p:3A:1.1-3C:1.1, 4C:1.1-4D:1.1
16. Epstein CJ, Epstein WL, Betlach M, Abbo Halbasch G: Detection of Mycoplasma Contamination in Cultured Human Fibroblasts- Comparison of Biochemical and Microbiological Techniques. **Exp Cell Res** 1973; 79:343-49.
17. Eveloff JL, Warnock DG: Activation of ion Transport Systems During Cell Volume Regulation. **Am J Physiol** 1987; 252:F1-F10.
18. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT: Vitrification as an Approach to Cryopreservation. **Cryobiology** 1984;21:407-26.
19. Fahy GM: The Relevance of Cryoprotectant Toxicity to Cryobiology. **Cryobiology** 1986; 23:1-13.
20. Farrugia A, Shea N, Knowles S, Holdsworth R, Piouronowski H, Portbury D, Romeo A: Cryopreservation of Red Blood Cells: Effect of Freezing on Red Cell and Residual Lymphocyte Immunogenicity. **J Clin Pathol** 1993, 46:742-45.

21. Finegold SM, Baron EJ: Diagnostic Microbiology. 7th Ed. The C V Mosby Company, USA, 1986, p:643-46.
22. Freshney RI: Animal Cell Culture. 1st Ed, England, 1986, p:13-33, 71-8.
23. Freshney RI: Culture of Animal Cells. 2nd Ed, Alan R. Liss, Inc, USA, 1987, P:15-47, 57-84, 107-26.
24. Garay RP: Inhibition of The Na/K Cotransport System by cAMP and Intracellular Ca⁺² in Human Red Cells. **Biochim Biophys Acta** 1982; 688:786-92.
25. Geck P, Heinz E: The Na-K=2Cl Cotransport System. **J Membr Biol** 1985; 91:97-105.
26. Good NE, Winget GD, Winter W, Conndly TN, Singh RMM: Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. **Biochemistry** 1966; 5:467-77.
27. Grinstein S, Woodside M, Sardet C, Pouyssegur J, Rotin D: Activation of The Na⁺/H⁺ Antiporter During Cell Volume Regulation. **J Biol Chem** 1992; 267:23823-28.
28. Guyton AC: Textbook of Medical Physiology. Seventh Edition. W B Saunders Company, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1986, p:3-7, 133-49.
29. Gürtürk S: Viroloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1977, p:64-73.
30. Harris DT, Schumacher MJ, Rychi S, Booth A, Acevedo A, Rubinstein P, Bard J, Boyse EA: Collection, Separation and Cryopreservation of Umbilical Cord Blood for Use in Transplantation. **Bone Marrow Transplantation** 1994; 13:135- 43.
31. Heaton A, Miripol J, Aster R: Use of Adsol Preservation Solution for Prolonged Storage of Low Viscosity AS-1 Red Blood Cells. **Br J Haematol** 1984; 57:467-78.
32. Hodges GM, Livingston D, Franks LM: The Localization of Trypsin in Cultured Mammalian Cells. **J Cell Sci** 1973; 12:887-902.

33. Hoffmann EK, Simonsen LO: Membrane Mechanisms in Volume and pH Regulation in Vertebrate Cells. *Physiol Rev* 1989; 69:315-82.
34. Hsiung GD: Diagnostic Virology. Yale University Press, USA, 1973, p:147-53.
35. Isenberg HD: Clinical Microbiology Procedures Handbook American Society for Microbiology, USA, 1992, p:8.19. 1-8.20.12.
36. Klein JD, Perry PB, O'Neil WC: Regulation by Cell Volume of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ Cotransport in Vascular Endothelial Cells: Role of Protein Phosphorylation. *J Membr Biol* 1993; 132:243-52.
37. Koneman WE, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC: Diagnostic Microbiology. 4th Ed, J.B. Lippincot Company, 1992, p:1010-16.
38. Kuchler RJ: Biochemical Methods in Cell Culture and Virology. Dowden, Hutchinson and Ross. Inc., USA, 1977, p:45-68.
39. Lenette EH, Schmidt NJ: Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 5th Ed, American Public Health Association, USA, 1979, p:70-93.
40. Lewis SA, Donaldson P: Ion Channels and Cell Volume Regulation: Chaos in an Organized System. *News Physiol Sci* 1990; 5:112-19.
41. Lovelock JE, Bishop MWH: Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulfoxide. *Nature(Lond)* 1959; 183:1394-95.
42. Mazur P: Criobiology: The Freezing of Biological Systems. *Science* 1970;168(3934): 939-49.
43. Mazur P: The Role of Intracellular Freezing in The Death of Cells Cooled at Supraoptimal Rates. *Cryobiology* 1977; 14:251-72.

44. Mazur P: Freezing of living cells: Mechanisms and Implication. **Am J Physiol** 1984; C247:125-42.
45. McGann LE, Farrant J: Survival of Tissue Culture Cells Frozen by a Two-step Procedure to -196°C . II. Warming Rate and Concentration of DMSO. **Cryobiology** 1976; 13:269-73.
46. McGann LE: Differing Actions of Penetrating and Nonpenetrating Cryoprotective Agents. **Cryobiology** 1978; 15:382-90.
47. McGann LE: Optimal Temperature Ranges for Control of Coding Rate. **Cryobiology** 1979; 16:211-16.
48. McGann LE, Stevenson M, Muldrew K, Schachar N: Kinetics of Osmotic Water Movement in Chondrocytes Isolated from Articular Cartilage and Applications to Cryopreservation. **J Orthop Res** 1988; 6:109-15.
49. Muldrew K, Hurtig M, Novak K, Schachar N, McGann LE: Localization of Freezing Injury in Articular Cartilage. **Cryobiology** 1994; 31:31-8.
50. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolen RH: Manual of Clinical Microbiology. 6th Ed, ASM Press Washington D.C, USA, 1995, p158-64.
51. Owen NA, Prastein ML: Na/K/Cl Cotransport in Cultured Human Fibroblasts. **J Biol Chem** 1992; 199:199-210.
52. Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR: Microbiology. McGraw-Hill Inc, USA, 1993, p:167-70.
53. Pincet F, Perez E, Wollfe J: Do Trehalose and Dimethyl Sulfoxide Affect Intermembrane Force?. **Cryobiology** 1994;31:531-39.

54. Roat NJH, Hartog A, Vanos CH, Bindels JM: Regulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransport Activity in Rabbit Proximal Tubule in Primary Culture. The American Physiology Society 1994, p:F63-69.
55. Roos A, Boron WF: Intracellular pH. **Physiol Rev** 1981; 61:296- 434.
56. Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD: Effect of Cell Concentration on Bone Marrow and Peripheral Blood Stem Cell Cryopreservation. **Blood** 1994; 83:2731-36.
57. Ryan KJ: Medical Microbiology. Third Edition. Printice-Hall International Inc, USA, 1994, p:231-32.
58. Sandskar B, Magalhaes B: Cryopreservation of Zoophthora radicans (Zygomycetes Entomophorales) in Liquid Nitrogen. **Cryobiology** 1994; 31:206-13.
59. Shalaby MA: Diagnostic Virology. Cairo University Faculty of Medicine, Cairo, 1991, p:33-6.
60. Storey KB, Mommsen TP: Effects of Temperature and Freezing on Hepatocytes Isolated From a Freeze-tolerant Frog. The American Physiological Society, 1994; p:R1477-82.
61. Ustaçelebi Ş: Genetic Virology. Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd Şti, 1991, p:37-75.
62. Valeri GR: Simplification of the Methods for Adding and Removing Glycerol during Freezing-preservation of Human Red Blood Cells with The High or Low Glycerol Methods: Biochemical modification prior to freezing. **Transfusion** 1975; 15:195-215.
63. Wolfe J, Yan Z, Pope J: Hydration Forces and Membrane Stresses: Cryobiological Implication and A New Technique for Measurement. **Biophys Chem** 1994; 49:51-8.

7. ÖZGEÇMİŞ

01.01.1972 tarihinde Ceyhan'da doğdum. İlkokulu 1983 yılında Ceyhan'a bağlı Eskikent Köyünde, ortaokulu 1986 yılında Yenikent Köyünde tamamladım. 1989 yılında Ceyhan Lisesi'nden, 1993 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 1995 yılından itibaren Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü kadrosunda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

Nizami DURAN