

# **TEMEL HÜCRE KÜLTÜRÜ KURSU EĞİTİM KİTAPCIĞI**

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

BETÜL ZİYA EREN GENOM VE KÖK HÜCRE ARAŞTIRMA MERKEZİ-

GENKÖK

## **İçindekiler**

- I. Hücre Kültürü
  - a. Hücre Kültürü Genel Bakış
  - b. Tarihçe
  - c. Kültür Hücrelerinin Biyolojisi
  - d. Laboratuvar Düzeni ve Ekipmanları
  - e. Hücre Kültür Mediumları- Fizikokimyasal Özellikleri
  - f. Hücre Kültür Laboratuvarlarında Aseptik Kontrol
  - g. Hücre Kültür Modelleri
- II. Protokoller
  - a. Hücre Pasajlaması
  - b. Hücre Sayılarının Hesaplanması
  - c. Hücrelerin Dondurulması
  - d. Hücrelerin Çözülmesi
  - e. Hücre Sayımı
  - f. Sitotoksosite

KAYNAKLAR

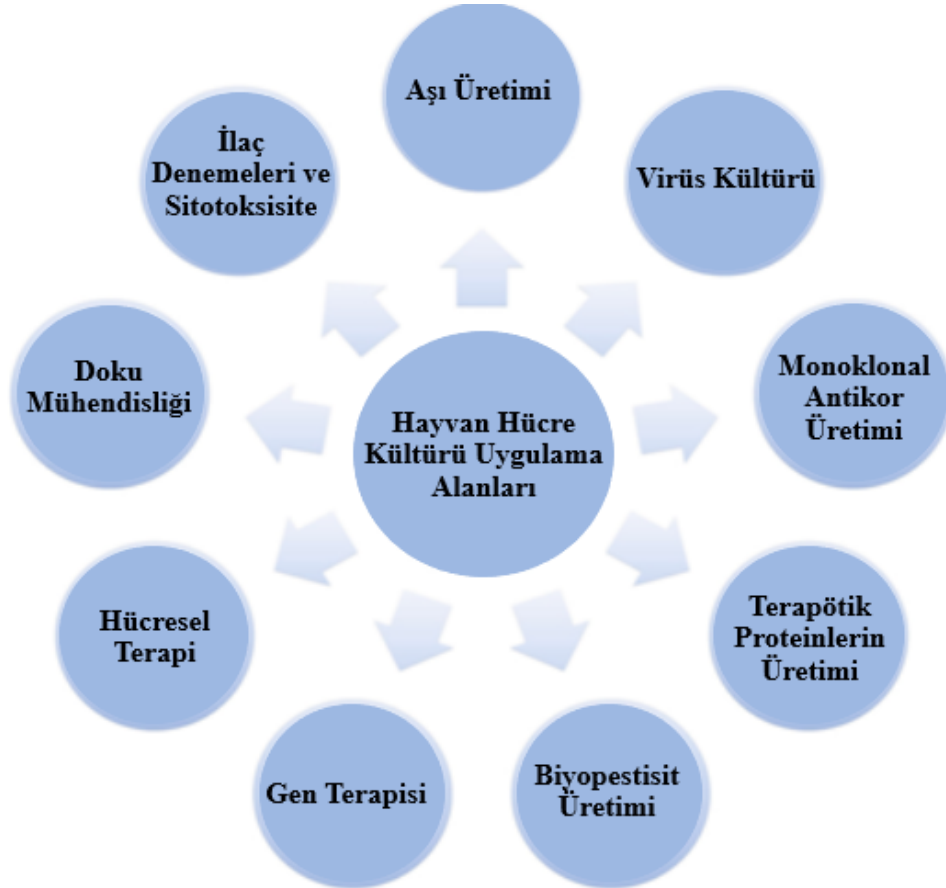
## I. Hücre Kültürü

### a. Hücre Kültürü Genel Bakış

“Hücre kültürü” terimi, orijinal bir dokudan, primer kültürden, hücre hattından enzimatik, mekanik veya kimyasal ayırma yöntemleri ile hücrelerin elde edilerek kültürünün yapılması anlamında kullanılır [1-7].

Hücre kültürlerinde, kültüre edilen hücreler elde edildikleri dokuların genel özelliklerini ve normal fonksiyonlarını gösterir. Bu nedenle dokunun *in vivo* bütünlüğü ve özellikleri hücre kültürlerinde *in vitro* olarak da gözlenebilir. Böylelikle gerek çeşitli hastalıkların tedavisine yönelik araştırmalar, gerekse ilaç etkinlik deneyleri gibi deneysel çalışmalar hücre kültürünün önemini ortaya koyar [2-7]. Hücre kültürü alanındaki ilerlemeler, hücre biyolojisi, genetik, tıp ve ilaç geliştirme gibi birçok alanda büyük etkiler yaratmıştır. Bugün hücre kültürü teknikleri, kanser araştırmaları, ilaç testleri, doku mühendisliği ve biyoteknoloji gibi birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır

Hücre kültürü üzerinde yapılabilecek çalışmalar Şekil 1.1’ deki gibi özetlenebilir.



Şekil 1. Hücre kültürü uygulamaları [8]

## **b. Tarihçe**

Hücre kültürü, bilimsel araştırmalarda hücrelerin dış ortamda üretildiği ve çoğaltıldığı laboratuvar tekniklerine odaklanır. Hücre kültürü deneyleri bugün bütün dünyada yaygın bir şekilde yapılmaktadır. Hücrenin vücut dışında büyüebilmesini gerektiren tekniklerin gelişmesi ilk olarak 19. yüzyılın ortalarında başlamıştır. 1885 yılında Alman fizyolog Wilhelm Roux, embriyonal gelişim üzerine yaptığı çalışmalar sırasında, hücrelerin doku dışında da yaşayabileceğini keşfetmiştir. Bu çalışmada tavuk embriyoları tuzlu suda bekletilmiş ve birkaç gün boyunca canlılıklarını koruyabildiği gözlenmiştir. Daha sonra Loeb tarafından 1897 yılında yapılan bir çalışma ile kan yapan hücreler ve bağlayıcı dokular uzun süre yaşatılmıştır [9]. 1898 yılında ise Ljunggren, bir asit sıvısı içinde insanlara ait deri parçalarını haftalarca canlı olarak muhafaza edebilmiştir [10-3, 2,7]. Bu çalışmalardan sonra ise 1907 yılındaki başarısıyla adını “doku kültürünün babası” olarak kabul ettiren Ross Harrison’ un çalışması gelmektedir. Ross Harrison, kurbağa embriyosundan aldığı doku parçalarını kültüre etmiş ve sadece doku parçalarını değil sinir fibrillerini de yaşatmayı başarmıştır. Daha sonra 20. yüzyılın başlarında, Ross Harrison ve Alexis Carrel gibi bilim insanları hücre kültürü tekniklerini geliştirmiştir. Bu çalışmalardan sonra ise hücre kültürü çalışmalarını bugünkü haline getiren pek çok araştırma yapılmıştır [1-7].

## **c. Kültür Hücrelerinin Biyolojisi**

In vivo fizyolojik fonksiyonun bir modelini oluşturulacak şekilde tasarlanan hücre kültürü çalışmaları sıkça denetlenmektedir. Çoğu zaman hücreler doğru in vivo fenotipi ifade etmez çünkü hücrelerin mikro ortamı değişmiştir. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri azalır, çünkü hücreler heterojenlikten, in vivo olarak bulunan üç boyutlu mimariden ve birçok hormonal ve besinsel uyarandan yoksundur. Bu, uyarıların kültür ortamında temin edilmesi hücre kültüründe sağlıklı bir kültür ortamını destekler. Mikroçevrenin hücre kültürü üzerindeki etkisi beş yolla ifade edilir:

1. Hücrelerin üzerinde veya içinde büyüdüğu substratın doğası: plastik veya diğer sert matris üzerinde olduğu gibi katı, kollajen veya agar gibi bir jelde, yarı katı veya kültürü kabına yapışmayan hücreler için süspanse ortamdaki sıvı
2. Diğer hücrelerle temas derecesi
3. Mediumun fizikokimyasal ve fizyolojik yapısı
4. Gaz fazının oluşumu
5. İnkübasyon sıcaklığı

Bir yüzeye tutunarak çoğalan hücrelerin, çoğalabilmesi için dokudan ayrıldıktan veya ikinci kültürlerinin (subkültür) yapılmasından sonra bir yüzeye tutunması ve yayılması gereklidir. Hücreler polistirel (polystyrene) gibi plastik bir yüzeye veya güçlü bir asitle ve yüksek enerjili iyon radyasyonu ile işlenmiş bir plastik yüzeye ya da yine işlenmiş bir cam yüzeye tutunabilirler. Yüzey dışında hücrelerin tutunmasını etkileyen bir diğer faktör ise hücre adezyon molekülleridir. Hücre-hücre ve hücre-yüzey adezyonunda dört büyük transmembran proteininin rol oynadığı belirlenmiştir. Bu moleküller şu şekilde sıralanabilir:

1. Ca<sup>2+</sup> bağlı kaderinler
2. Ca<sup>2+</sup> bağlı olmayan hücre-hücre adezyon molekülleri (CAMs)
3. Fibronektin, entaktin, laminin ve kollajen gibi moleküllerle etkileşime giren integrinler
4. Transmembran proteoglikanları
5. Klaudinler ve okludenler [1-7].

#### **d. Laboratuvar Düzeni ve Ekipmanları**

Hücre kültürlerinin yapıldığı laboratuvarlar diğer deneylerin gerçekleştirildiği laboratuvarlara göre bazı değişiklikler gösterir. Bu laboratuvarlar için tercih edilen kültür yapılan ortamın, preparasyon alanlardan ayrı tutulmasıdır. Çalışmaların sağlıklı bir şekilde yürütülebilmesi için laboratuvarı kullanan kişi sayısı, laboratuvar alanı, hazırlık alanlarının yerleşimi, malzemelerin depolanması gibi özellikler oldukça önem taşır.

Laminar kabin, invert mikroskop, inkübatör, CO<sub>2</sub> inkübatörü, azot tankı, santrifüj ve flasklar hücre kültürü laboratuvarlarının en temel donanımlarıdır. Laminar kabinler kontrol edilebilir bir şekilde, çalışma alanında steril bir hava akımı olmasını sağlayarak çalışmalarda kontaminasyonun önlenmesi açısından büyük önem taşırlar. İvert mikroskoplar flaskın alt yüzeyine tutunmuş hücrelerin düzenli olarak gözlenebilmesi için çok önemlidir. Hücrelerin yaşayıp çoğalabilmeleri için gerekli atmosfer, nem ve sıcaklığın kontrolü CO<sub>2</sub> inkübatörleri ile sağlanır. Bir anlamda hücrelerin elde edildiği organizmayı *in vivo* koşullarını taklit eden CO<sub>2</sub> inkübatörlerinde hücreler genellikle, 37 °C sıcaklık, %5 CO<sub>2</sub> ve sabit nemli bir ortam ile kültüre edilirler. Azot tankları ise dondurulan hücrelerin bozulmadan saklanabileceği (kritik sıcaklık seviyesi -135 °C' altında) -196 °C' lik ortamı sağlamada hücre kültür laboratuvarlarının en önemli donanımlarından biridir. Hücrelerin dondurulmasında dimetilsülfoksit (DMSO) ve gliserol kullanımı, hücrelerin zarar görmeden dondurulmasına yardımcı olur. Kademeli olarak soğutma sağlayan özel dondurma kapları da yine hücrelerin zarar görmeden dondurulmasında etkilidir [7].

### e. Hücre Kültür Mediumları-Fizikokimyasal Özellikleri

**Hidrojen İyonu (pH):** Hücrelerin kültür ortamında yaşatılabilmesi için hidrojen iyonu konsantrasyonu oldukça önemlidir. Hücrelerin birçoğu pH 7.4' te iyi bir şekilde büyürler. Bununla beraber hücre hattına göre çeşitli pH değerlerinden de söz edilebilir. Mediumların birçoğunun içinde pH indikatörü olarak fenol kırmızısı bulunur. Medium rengi kırmızı iken pH 7.4 tür. Mediumun turuncuya dönüşmesi pH' ın 7.0, sarıya dönüşmesi ise pH' ın 6.5 civarlarında olduğunu gösterir. pH 7.6 gibi yüksek pH' a sahip mediumlarda ise mediumun rengi koyu kırmızı-pembe bir renk alır [1-7].

**Karbondiyoksit ve Bikarbonat:** Karbondiyoksit HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonlarıyla dengeyi kurmak için, gaz fazında iken medium içinde çözünür ve laktik asitin de artmasıyla mediumun pH'ı düşer. Çözünmüş CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve pH birbiriyle ilişkili olduğu için CO<sub>2</sub>' in direk etkisini kontrol etmek zordur. Ortamın pH'ının sabit kalabilmesi için CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tampon sistemleri kullanılır. Karbondiyoksitin H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> oluşturduğu denklem şu şekilde gösterilebilir:



Mediumlara bu dengeyi korumak için CO<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub> veya HEPES ilave edilir. Bikarbonat tamponlarıyla karşılaştırıldığında daha ucuz ve daha az toksik olduğundan son yıllarda tamponların en iyilerinden birisi olarak kabul edilen HEPES'in kullanımı oldukça yaygındır [1-7].

**Oksijen:** Diğer bir önemli bileşen ise gaz formundaki oksijendir. Oksijen oranının artması hücrelerde toksik etki oluşturmasının yanı sıra %95 oksijene ihtiyaç duyan hücreler olduğu gibi; %5'e kadar inen düşük oksijen seviyelerinde yaşayan insan mezenkimal kök hücreleri ve insan embriyonik akciğer fibroblastları gibi hücreler de mevcuttur [1-7].

**Osmolarite:** Birçok hücre osmotik basınca oldukça dayanıklıdır. İnsan plasması yaklaşık olarak 290 mOsm/kg'dır. Osmolaritedeki ± 10 mOsm/kg'lık bir değişim tolere edilebilir. Mediumun hazırlanmasında osmolarite oldukça önemlidir ve ölçümü için osmometre kullanılır [1-7].

**Sıcaklık:** Hücre kültürleri için sıcaklık hücrelerin elde edildiği organizmanın sıcaklığına bağlıdır. Bu yüzden sıcakkanlı hayvanlardan elde edilen hücrelerde optimum sıcaklık 37 °C'dir. Memeli hücrelerinin kültürlerinde hücreler 4 °C' de birkaç gün yaşayabilir ve kademeli olarak soğutulduklarında -196 °C'de dondurulabilirler. Kuşlar gibi daha yüksek sıcaklığa sahip

hayvanların hücreleri 38,5 °C'de canlılıklarını sürdürürler. Soğukkanlı hayvanların kültüre edilen hücreleri ise 15 -26 °C'de yaşayabilirler [1-7].

**Vizkozite:** Vizkozite hücre kültürlerinde, hücrelerin çalkalanması veya hücrelerin tripsinizasyon sonrası ayrılmasında önemli bir rol oynar. Mediumlardaki vizkozite daha çok serum ile sağlanır [1-7].

### **PBS (Fosfatla Tamponlanmış Tuz Solüsyonu)**

İnorganik tuzlardan oluşan PBS, sodyum bikarbonat veya glukoz içerebilir. Genellikle tripsinizasyon öncesinde mediumun tripsin aktivitesini düşürmesini engellemek için hücreleri yıkamada kullanılır. İzotonik bir solüsyon olduğundan hücrelere zarar vermez.

### **Medium ve İçerikleri**

Kültüre edilen hücreler besin ihtiyaçlarını mediumdan sağlarlar. Mediumlar hücre hatları için çeşitlilik gösterdiğinden mediumlara eklenen destekleyici içerikler de değişiklik gösterir. Bu yüzden mediumlar basal mediumlar ve tamamlanmış mediumlar olarak ikiye ayrılırlar. Bazal mediumlarda hücrelerin yaşaması için gerekli bütünleyici içerikler olmadığından tek başına hücrelerin yaşatılabilmesi için uygun değildirler. Tamamlanmış mediumlar ise hücre hattına göre değişen gerekli bütünleyici içerikleri ile hücrelerin yaşatılmasına yardımcı olurlar. Bütünleyici içerikler şu şekilde sıralanabilir:

**Aminoasitler:** Aminoasit konsantrasyonu hücrelerin yaşaması ve büyümesinde önemlidir. Hücre tipine göre değişse de genel olarak kullanılan zorunlu amino asitler sistein, arjinin, glutamin ve tirozindir. Hücre için en çok kullanılan amino asit ise glutamindir. Ancak glutaminin yarılanma ömrü kısadır ve ürettiği amonyak sebebiyle toksik bir etkiye neden olabilir. Çeşitli firmalarca glutamin yerine kullanılacak daha stabil bir yapıya sahip olan bileşikler de vardır [1-7].

**Vitaminler:** B grubu vitaminler, folik asit, inositol, biotin, nicotinamid, A, D, E, K vitaminleri ve kolin gibi çeşitli mediumlarda bulunan çeşitli vitaminler hücre canlılığının devamı için önemlidir [1-7].

**Tuzlar:** Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> tuzları mediumun osmolaritesine katkıda bulunan tuzlardır. Özellikle Ca<sup>+</sup> sinyal iletiminde rol alıp, hücrelerin büyümesi ve çoğalmasında etkili olduğu için oldukça önemli bir tuzdur. Birçok medium orijinal olarak kendi tuz konsantrasyonuna sahiptir [1-7].

**Glukoz:** Enerji kaynağı olarak kullanılan glukoz, birçok mediumda kendiliğinden bulunur. Glikolizle laktata dönüşen pirüvat oluşumunu metabolize edebilir, sitrik asit döngüsüne katılarak CO<sub>2</sub> ve su okside edebilir [1-7].

**Organik Bileşenler:** Hücre mediumunda bulunan diğer bileşenler ise protein, peptit, nükleosit, piruvat ve lipitlerdir. İçeriği indirgenmiş serumlarda bu organik bileşenler hücre devamlılığı açısından önem taşır [1-7].

**Hormonlar ve Büyüme Faktörleri:** Hormonlar ve büyüme faktörleri her medium için gerekli değildir, daha çok serum içermeyen mediumlarda kullanılır.

**Antibiyotikler:** Hücre kültürlerinde aseptik koşullar oldukça önemlidir. Kullanılan malzemeler ile ortamın sterilitesi ve çalışanların temizliği hücrelerin sağlıklı bir şekilde yaşamaları için elzemdir. Bu nedenle mediumların içerisine mikroorganizmaların üremesini engellemek için çeşitli antibiyotikler eklenir. Hücre kültür laboratuvarlarında en çok görülen kontaminasyon sebebi bakterilerin özellikle de mikoplazmaların yol açtığı kontaminasyonlardır. Bunlar için de genelde streptomisin, penisilin ve gentamisin gibi antibiyotikler kullanılır. [7]

**Serum:** Büyüme faktörleri içeren serumlar, hücre bölünmesinin indüklenmesini ve antitripsin özelliği ile de hücrelerin adezyonunu sağlarlar. Aynı zamanda birçok hormonun, lipidin ve mineralin kaynağıdır. Mediumlarda daha çok büyükbaş hayvanlardan elde edilen serumların kullanılmasının yanı sıra atlardan ve nadiren insanlardan elde edilen serumlar da kullanılabilir. Ancak kullanılmadan önce bu serumların HIV ve Hepatit B gibi virüsler açısından kontrol edilmiş olması gereklidir. Ayrıca bazı serumlar yine kullanımdan önce ısı ile inaktive edilerek mikoplazmalara karşı önlem alınmalıdır. Serumsuz olarak kullanılan mediumlar da vardır [7].

#### **f. Hücre Kültür Laboratuvarlarında Aseptik Kontrol**

Hücre kültürlerinin kontaminasyonu hücrelerin fizyolojisini ve metabolizmasını bozarak, eğer kontaminasyon geniş çapta olursa bütün laboratuvar çalışmalarının etkileneceği hücre kültür çalışmalarının en kritik dezavantajıdır.

Hücre kültürlerinde, genel olarak bakteri, mantar ve mikoplazma kontaminasyonu sık görülmektedir. Bakteri ve mantar kontaminasyonları araştırmacılar tarafından hızlıca fark edilip test yapılırsa da mikoplazma kontaminasyonu genel olarak PCR testleriyle belirlenmektedir [11].

#### **g. Hücre Kültür Modelleri**

Bir doku veya organdan alınan hücreler, işlenmiş özel yüzeylere sahip ortamlarda belirli mediumlarda ve gereken besin miktarıyla tam olarak doku veya organ özelliği göstermeseler dahi yaşayarak çoğalabilirler. Hücrelerin ilk subkültürden önce, hücre hattı oluşturmadığı ve elde edildiği dokudan izole edildikten sonraki kültürlerine primer hücre kültürü denir. Primer hücre kültürleri yapabilmek için hücreler ait oldukları dokulardan eksplant yöntemiyle, mekanik ayrıştırmayla veya kollejenaz gibi enzimlerin kullanılmasıyla izole edilebilirler. İzole edilmiş hücreler dokudaki gibi genetik özelliklerini korurlar. Primer hücre kültürleri, kullanılan dokuyu oluşturan hücrelerin varlığıyla heterojen bir yapılanma gösterirler. Bu yapılanmadan kaynaklanan tek tip hücrenin elde edilmesi zor olması ve kontaminasyona daha açık bir işlem geçirmesi sebebiyle primer hücre kültürlerinin dezavantajları vardır.

Primer hücre kültürlerini oluşturan hücreler, mitoz bölünmeyle çoğalarak ve seçici bir mediumun kullanılması ile subkültüre edilerek daha homojen bir hale gelirler. Kanser ve kök hücrelerin aksine diğer hücre tipleri telomeraz aktivitesinden yoksun olup senesense uğradıkları için ancak 20-100 kere subkültürleri yapılabilir. Bazı virüslerin kullanılmasıyla ise hücreler ölümsüz (immortal) hale getirilerek sonsuz sayıda subkültürlerinin yapılabilmesine olanak sağlanır [1-7]. Bu şekilde indüklenerek veya doğal olarak telomeraz aktivitesine sahip olduğu için sonsuz bölünme yeteneğine sahip hücrelerin kültürleri ise devamlı hücre kültürü olarak adlandırılır.

## **h. Hücre Sayımı**

Thoma sayım lamı veya Thoma lamı, hücre sayımı yapmak için kullanılan bir laboratuvar ekipmanıdır. Thoma Lamı; camdan, özel olarak hazırlanmış, üzerinde mikroskopik olarak görülen enine ve boyuna çizgilerin sınırladığı alanlar bulunan bir lamdır. Thoma lamına yandan bakıldığında üzerine kapatılan lamel ile lam arasında boşluk görülür, bu boşluk 1/10 mm'dir. Lam üzerinde her biri 1 mm<sup>2</sup> olan 2 sayım alanı vardır. En büyük karenin alanı 1 mm<sup>2</sup> 'dir. Bu alan enine ve boyuna üçlü çizgilerle 4 x 4 = 16 alana bölünmüştür. Bu 16 karenin her birine büyük kare denir ve bu 16 karenin her birinin kenar uzunluğu 1/5 mm'dir (üçlü çizgilerin kapladığı alan nedeniyle – 1/20 mm). Büyük kareler tekli çizgiler ile tekrar 16 eşit kareye ayrılır, her bir karenin kenar uzunluğu da 1/5 x 1/4 = 1/20 mm'dir. Karelerin kenar uzunlukları üçlü çizgilerden dışarıda bulunanlar ile hesaplanır [12].

Thoma lamı genellikle sitolojide ve hematolojide hücre sayımı yapmak için kullanılır. Örneğin, kan sayımında veya hücre kültürlerinde hücre sayımı yapmak için Thoma lamından faydalanılır. Thoma lamı ile hücre sayımı yapmak için ışık mikroskobu kullanılır. Lamaların üzerine önceden



belirlenmiş bir alan içine örnek konur ve mikroskop altında hücreler sayılır. Bu sayım prosedürü genellikle özel bir sayım odaklaması kullanılarak yapılır.

Thoma lamı sayesinde hücrelerin yoğunluğu, sayısı ve morfolojik özellikleri belirlenerek spesifik bir alanda kaç hücre olduğu hesaplanabilir. Bu sayım sonuçları daha sonra hücre kültürlerinin optimize edilmesi, tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesi veya kan sayımı gibi birçok uygulamada kullanılabilir.

### **i. GIEMSA boyama**

Giemsa boyama, Giemsa boyasının tüm hücrelerin kromatin ve nükleer membranını boyama, bazı hücresel bileşenlerin tematokromazisi ve hücre tipine bağlı farklı sitoplazmik boyama kalitesi nedeniyle hematoloji, sitoloji ve histolojide hücrelerdeki çeşitli yapıları ve hücre tiplerini belirlemek için kullanılan bir boya yöntemidir. Giemsa boyaması, hücrelerin yapısını ve morfolojisini belirginleştirmek için yaygın olarak kullanılır.

Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, hücre hasarı veya stres durumlarında gerçekleşebilir. Apoptotik hücreler genellikle karakteristik morfolojik değişikliklere sahiptirler, bu nedenle apoptoz saptamak için hücrelerin boyanması sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir.

Giemsa boyaması ile apoptotik hücreler boyanabilir ve karakteristik özellikleri belirlenebilir. Bu hücreler, küçük, pürüzlü bir çekirdeğe, kromatinin kondenzasyonuna ve sitoplazmik parçalanmaya sahip olabilir. Bu özellikler nedeniyle Giemsa boyaması apoptotik hücreleri tanımak için kullanılan bir yöntemdir ve sıklıkla kullanılır. Apoptoz ile ilişkili morfolojik değişikliklerin belirlenmesindeki etkili yönü ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi ve apoptozun araştırılmasında önemli bir araçtır [13].

### **j.3 Boyutlu (3D) Hücre Kültürü**

3D hücre kültürü, hücrelerin 3 boyutlu bir ortamda büyütülmesini sağlayan bir tekniktir. Bu yöntem, hücrelerin daha doğal bir mikroçevrede büyümesini sağlayarak hücre-hücre etkileşimlerini ve doku benzeri yapıların oluşumunu destekler. 3D hücre kültürü, hücre davranışını daha iyi anlamak, ilaç keşfi ve hastalık modellemesi gibi birçok araştırma alanında kullanılmaktadır.

3D hücre kültürü genellikle sıvı içeren bir matris üzerinde hücrelerin büyütülmesini içerir. Bu matris, jel şeklinde olabilir ve hücrelerin büyümesi ve etkileşimleri için uygun bir ortam sağlar.

3D hücre kültürü yapmak için genellikle aşağıdaki adımlar izlenir:

1. Hücre Seçimi ve Yalıtımı: İlgili hücre tipi seçilir ve uygun Şekilde yalıtılır.
2. 3D Matris Hazırlığı: Hücrelerin büyümesi için kullanılacak matris oluŐturulur. Bu matris genellikle jel formunda olabilir ve hücrelerin içine yerleştirilir.
3. Hücrelerin Eklenmesi: Hücreler, hazırlanan 3D matrisin içine eklenir.
4. Kültür ve İnkübasyon: Hücreler, uygun 3D kültür koŐullarında inkübe edilir ve büyümesi izlenir.
5. Analiz ve Değerlendirme: GeliŐen 3D hücre kültürü, istenilen süre boyunca büyütülür ve daha sonra analiz edilerek sonuçlar değerlendirilir.

Bu adımlar, temel olarak 3D hücre kültürü tekniklerini yerine getirmek için izlenen genel prosedürleri açıklamaktadır. Her araştırma laboratuvarı veya çalışma alanı, kendi spesifik gereksinimlerine göre 3D hücre kültürü protokollerini uyarlayabilir ve optimize edebilir. Bu nedenle, detaylı bir 3D hücre kültürü protokolüne eriŐmek için ilgili literatüre veya kaynaklara baŐvurmanız önerilir [14].

## II. BÖLÜM: PROTOKOLLER

### a. Hücre Pasajlaması

1. Hücreler pasajlanabilmeleri için hücre petrilerinin yüzeyini %80-90 oranında kaplamış olmalıdır. Böyle petrilere 'konfluent petrilere' denir.
2. Konfluent petrilerin üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır.
3. Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkanır,
4. PBS aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler inkübatörde tripsinle 5 dakika inkübe edilir.
  - 100 mm petri için 2 ml tripsin
  - 6 mm petri için 2 ml tripsin
  - 35 mm petri için 0,5 ml tripsin uygulanır.

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

5. Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edilir.
  - 100 mm petri için 2 ml tripsin 4 ml besiyeri
  - 6mm petri için 1 ml tripsin 2 ml besiyeri
  - 35 mm petri için 0,5 ml tripsin 1 ml besiyeri uygulanır.
6. Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilir ve bir falkon tüpe aktarılır. Tüpe 2-3 ml daha medyum ilave edilir.
7. Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (1000-1500 rpm/300-400xg 5 dakika), süpernatant uzaklaştırılır.
8. Petrilere ekimler yapılır.

### Kullanılan çözeltiler

1. **Hücre Kültür Medyumu:** DMEM/RPMI/aMEM vb., %10 FBS ve %1 Antibiyotik, %1 L-Gutamin (50 ml için; 44 ml DMEM, 5ml FBS, 500 µl L-Glutamin ve 500 µl antibiyotik)
2. **DPBS:** Ticari solüsyon
3. **Tripsin / EDTA solüsyonu (%0,05) EDTA %0,02:** Ticari Solüsyon

## **b. Hücre Sayılarının Hesaplanması**

1 ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ependorf tüpe konur ve üzerine 10 µl tripan blue boyası konarak karıştırılır. Bu karışım thoma lamına konur, thoma lamındaki hücreler sayılır, bulunan sayı sulandırma miktarı ve x10.000 sayısı ile çapılır. Sonuç olarak 1 ml medyumda kaç hücre olduğu bulunur. Ekim yapılacak sayı belirlenip hücrelerin petriye ekimleri yapılır.

Genelde 60 mm'lik konfluent bir kültür kabı 2 tane 100 mm'lik kültür medyumlu kültür kabına geçirilebilir (subkültüre edilebilir). 100 mm hücre kabı 1/5 oranında 100 mm'lik başka kaba geçirilebilir. 60 mm hücre kabı 1/5 oranında 60 mm'lik başka bir kaba geçirilebilir.

- 100 mm'lik kültür petrisine 5x10<sup>6</sup>
- 60 mm'lik kültür petrisine 2x10<sup>6</sup>
- 35 mm'lik kültür petrisine 1x10<sup>6</sup>
- 24 kuyuluk kültür kabının her kuyusana 125 bin hücre transfer edilmelidir.
- Bunun için kültür kabı sayılır ve 500.000 hücre/ml olacak şekilde dilue edilir.
- 100 mm'lik kültür petrisine 10 ml hücre süspansiyonu
- 60 mm'lik kültür petrisine 4 ml hücre süspansiyonu + 1 ml medyum
- 35 mm'lik kültür petrisine 2 ml hücre süspansiyonu + 1 ml medyum
- 24 kuyuluğun her kuyusuna: 250 µl hücre süspansiyonu + 250 µl medyum.

## **c. Hücrelerin Dondurulması**

1. Petri üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır.
2. Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkanır,
3. PBS aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler inkübatörde tripsinle 5 dakika inkübe edilir.
4. Tripsin, hacminin en az iki kat serumlu besiyeriyle inhibe edilir.
5. Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilir ve bir falkon tüpe aktarılır. Üzerine 2-3 ml daha medyum ilave edilir.
6. Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (1000-1500 rpm 5 dakika), süpernatant uzaklaştırılır.
7. Pelet 1 ml besiyerinde sulandırılarak sayılır.
8. Dondurma tüpleri içerisine 1:1 oranında dondurma medyumunu ve hücre çözeltisi konur
9. Tüpler dondurma kabına yerleştirilir ve kap – 80 derin dondurucuya konur. 24 saat sonra dondurma tüpleri sıvı nitrojen takına transfer edilir.

#### **d. Hücrelerin Çözülmesi**

1. -196°C'den alınan kriyovial 37 °C'lik su banyosunda hızlı şekilde eritilir
2. Kriyovialin içindeki hücre süspansiyonu 6 ml besiyeri içeren falkon tüpe yavaşça aktarılır. Hücreler DMSO içerisinde oldukları için manüplasyonlar nazik olmalıdır.
3. Tüp 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılır ve pelete 1 ml medyum uygulanır. Hücreler 1 ml içinde iyice çözüldükten sonra üzerlerine 4 ml besiyeri eklenir. 5 ml'lik hücre süspansiyonu 60 mm'lik medyumlu kültür kabına aktarılır.
4. Ertesi gün medyum değiştirilir (2. Gün). Kültür kabı her gün invert mikroskop ile kontrol edilip hücreler konfluent oldukları gün tripsinlenerek pasajlanabilir.

#### **Kullanılan Çözeltiler**

1. **Hücre Kültür Medyumu:** DMEM/RPMI/aMEM vb., %10 FBS ve %1 Antibiyotik, %1 L-Gutamin (50 ml için; 44 ml DMEM, 5ml FBS, 500 µl L-Glutamin ve 500 µl antibiyotik)
2. **dPBS:** Ticari solüsyon
3. **Trypsin / EDTA solüsyonu (%0,05) EDTA %0,02:** Ticari Solüsyon
4. **Dondurma Medyumu:** %90 Hücre besiyeri ve %10 DMSO [15].

#### **e. Hücre sayımı**

##### **Kullanılacak Malzemeler**

1. **Mikroskop:** Deneyde 10-40'luk büyütme kullanılır.
2. **Sayma Lamı (Thoma veya Neubauer)**

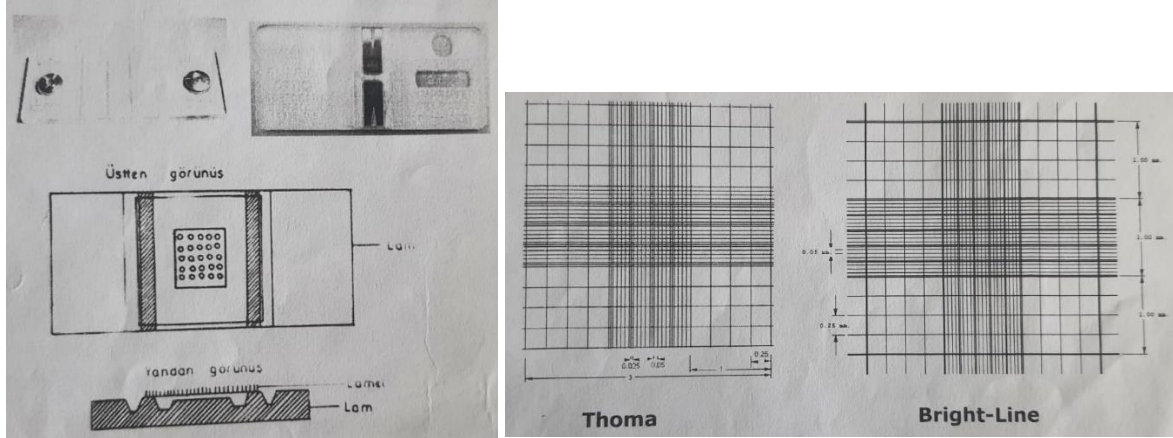
##### **Hücre Sayısı Normal veya Az ise:**

1. 1 mm<sup>2</sup> alandaki tüm hücreler sayılır (10x büyütme)
2. Ardından 1mm<sup>2</sup> sayma alanı üzerinde bulunan hacim hesaplanır. (Hacim = En x Boy x Yükseklik – 1 x 1 x 1/10 = 1/10 mm<sup>2</sup>)
3. 1 mm<sup>2</sup> alandaki hacim hesaplandıktan sonra basit orantı ile 1 mm<sup>3</sup> sıvıdaki hücre sayısı hesaplanabilir.
4. Bulunan değer, 1 mm<sup>3</sup> sıvıdaki hücre sayısını ifade etmektedir.

##### **Hücre Sayısı Fazla İse:**

Thoma Lamındaki her bir karenin kenar uzunluğunun 1/5 mm olması nedeni ile 1 mm hesaplaması için:

1. Değerlendirme yapılan karelerdeki hücre sayısı/ Değerlendirme yapılan karelerin toplam sayısı = 0.04 mm<sup>2</sup> ‘deki hücre sayısını verir.
2. Bulunan değer x 25 = 1 mm<sup>2</sup> ‘deki hücre sayısıdır.
3. Bulunan değer x 10 = 1 mm<sup>3</sup> ‘deki hücre sayısıdır [12].



## KAYNAKLAR

1. Freshney, R., I., 2010, Culture of Animal Cells, 6th Ed., Wiley-Blackwell, 676 s.
2. Ersöz, M., 2007, İnsan Meme Kanseri (MCF 7) ve Fare Fibroblast (L-929) Hücre Kültürlerinde Poliakrilik Asidin Toksisitesinin İncelenmesi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 139 s.
3. Alberts B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Watson, J., D., 1994, The Cell Cycle, 1053-1114, In: Molecular Biology of The Cell, Garland Publishing Inc, USA
4. Lewin, B., 2004, Cell Cycle and Growth Regulation, 849-894, In: Genes III, Pearson Prentice Hall, USA,.
5. Pecorino, L., Molecular biology of cancer, Oxford University Press, 2005
6. Karaca, T., D., 2008, İnsan meme kanseri hücre kültüründe *Nerium oleander* bitkisinden elde edilen ekstraktların antikanserojen etkisinin incelenmesi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 111 s.
7. Dabanlı, D., 2012, *Echinops orientalis* Trautv. Bitkisinden Elde Edilen Ekstraktların Antimikrobiyal ve Antikanserojen Etkisinin İncelenmesi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
8. Chandra, V., Tiwari, A., Pant, K.K., Bhatt, R. (2022). Animal Cell Culture: Basics and Applications. In: Verma, P. (eds) Industrial Microbiology and Biotechnology. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-5214-1\\_24](https://doi.org/10.1007/978-981-16-5214-1_24)
9. Garret, M., D., 2001, Cell cycle control and cancer, Current Science, 81: 5
10. Langdon, S., P., 2004, Basic Principles of Cancer Cell Culture, Cancer Cell Culture, Humana Press, 3-17
11. Coté R. J. 2001, Aseptic technique for cell culture. Current protocols in cell biology, Chapter 1. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0103s00>
12. Ural, A. U. Hücre Kültür Laboratuvarında Uyulması Gereken Kurallar, 12-13
13. Barcia, J. J. 2007, The Giemsa Stain: Its History and Applications, International Journal of Surgical Pathology, 292-296
14. 5 Steps to Creating 3D Cell Culture Models. Erişim adresi <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-culture/organoids-spheroids-3d-cell-culture/5-steps-creating-3d-cell-models.html>
15. Gürtürk S., 1977, Viroloji, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 64-73