

TEMEL ARAŐTIRMA TEKNİKLERİ

II

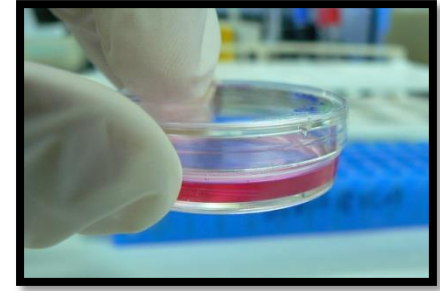


5. HAFTA

Hücre kültürü çeşitleri, özellikleri ve Literatür çalışması

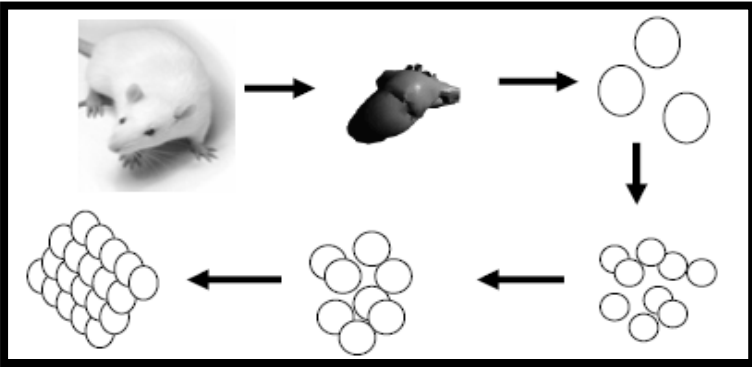
Prof. Dr. Eser ELÇİN

Doku Kültür Tipleri



Primer

Bölünme oranlarında herhangi bir değişiklik olmadan normal hücreler kültüre edilir.



Devam eden

Sınırlı

Tek hücre tipi, büyüme faktörleriyle zenginleştirilirler.

Sınırsız

Dönüşüm ile tümör hücrelerine bölünebilirler, hücre soyu olarak adlandırılırlar.

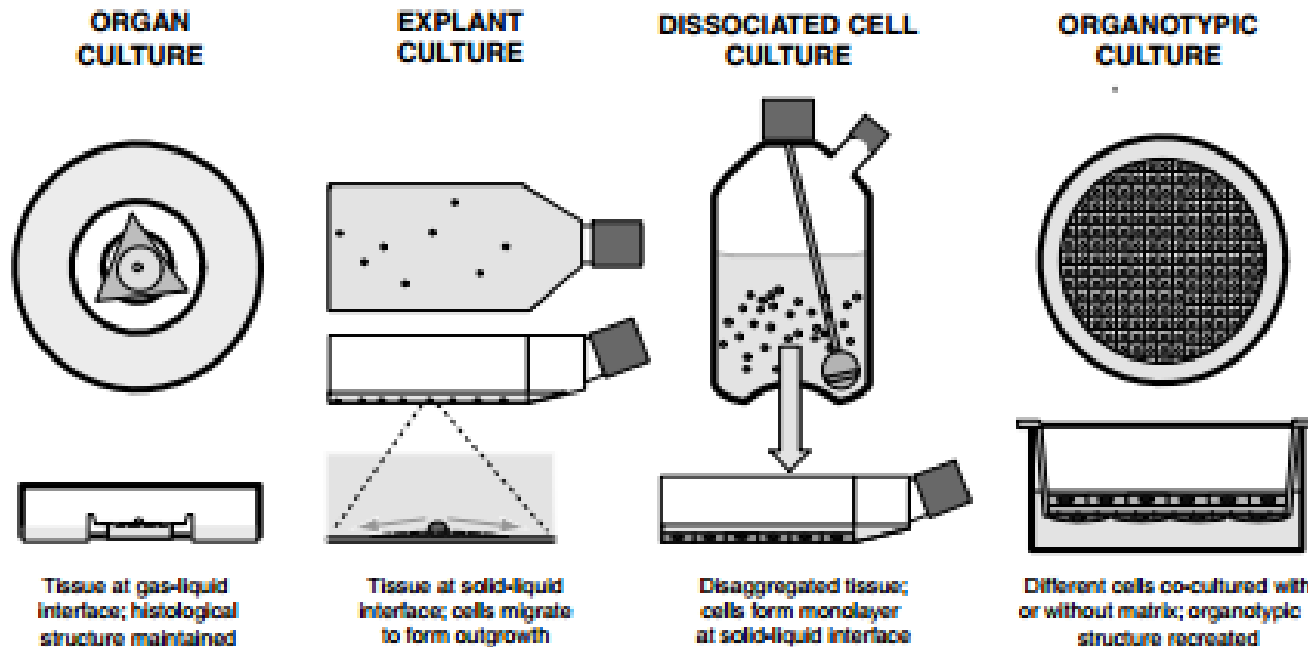


Figure 1.1. Types of culture. Different modes of culture are represented from left to right. First, an organ culture on a filter disk on a triangular stainless steel grid over a well of medium, seen in section in the lower diagram. Second, explant cultures in a flask, with section below and with an enlarged detail in section in the lowest diagram, showing the explant and radial outgrowth under the arrows. Third, a stirred vessel with an enzymatic disaggregation generating a cell suspension seeded as a monolayer in the lower diagram. Fourth, a filter well showing an array of cells, seen in section in the lower diagram, combined with matrix and stromal cells. [From Freshney, 2005.]

Birincil Kültür

Donör dokudan hücreler izole edildiğinde, çok farklı yollarla sürdürülebilirler. Hücreler dokudan izole edilip uygun koşullarda çoğaltıldıktan sonra tüm mevcut substratı işgal edene kadar ki kültür **primer kültürdür**. Bu evreden sonra hücreler, taze besiyerli yeni bir kapta alt kültüre alınmalıdır.

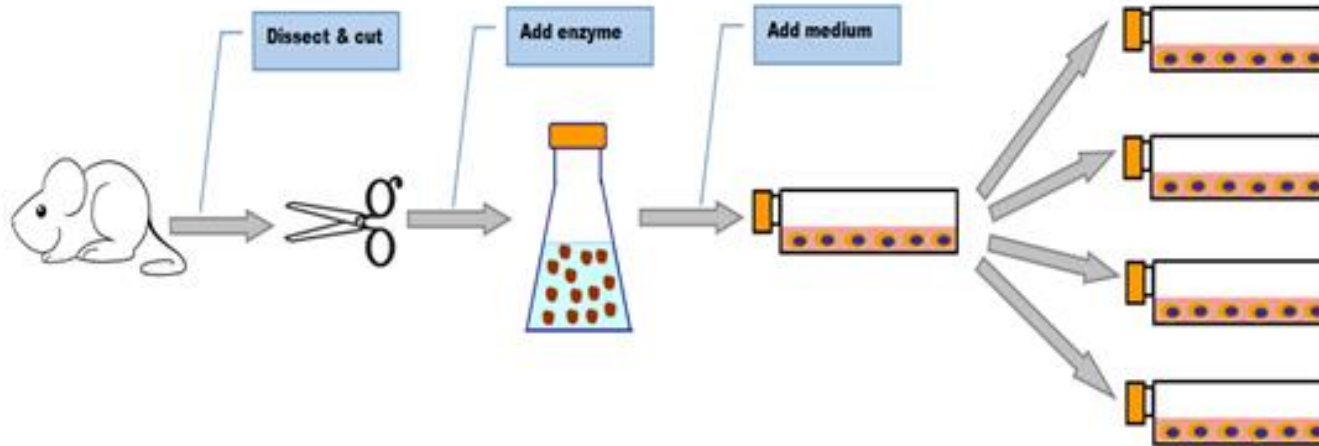


Fig1: the flow chart for primary cell culture

Birincil Kültür

Belirli yaşam süresine sahiptir.

Heterojen hücre popülasyonu içerir.

Birincil kültürün alt kültüre alınması hücre hatlarının oluşmasına sebep olur.

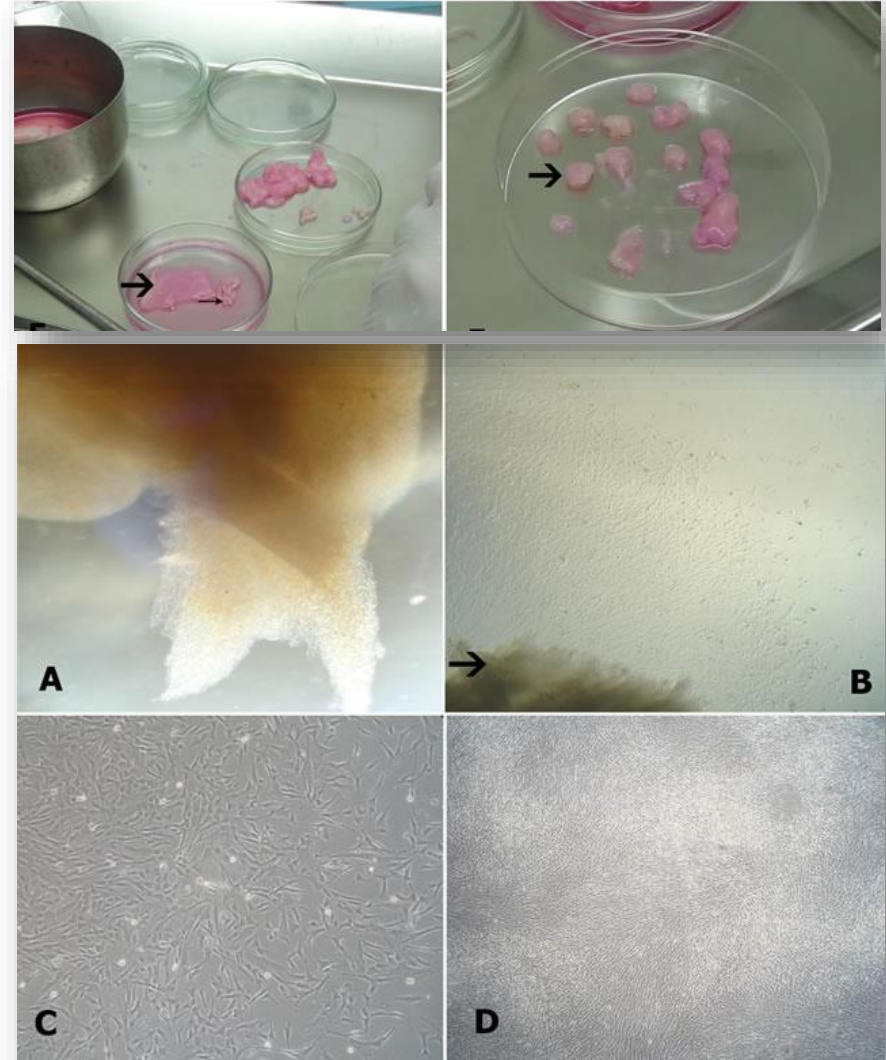
Hücre hatları sınırlı yaşam süresine sahiptir, yaşlanmadan önce pasajlanmaları gerekir.

Makrofaj ve nöron tipi hücreler in vitro blnmediklerinden dolayı birincil kültür olarak kullanılabilirler.

Birincil Kültür elde edebilmek için 2 temel metot bulunmaktadır:

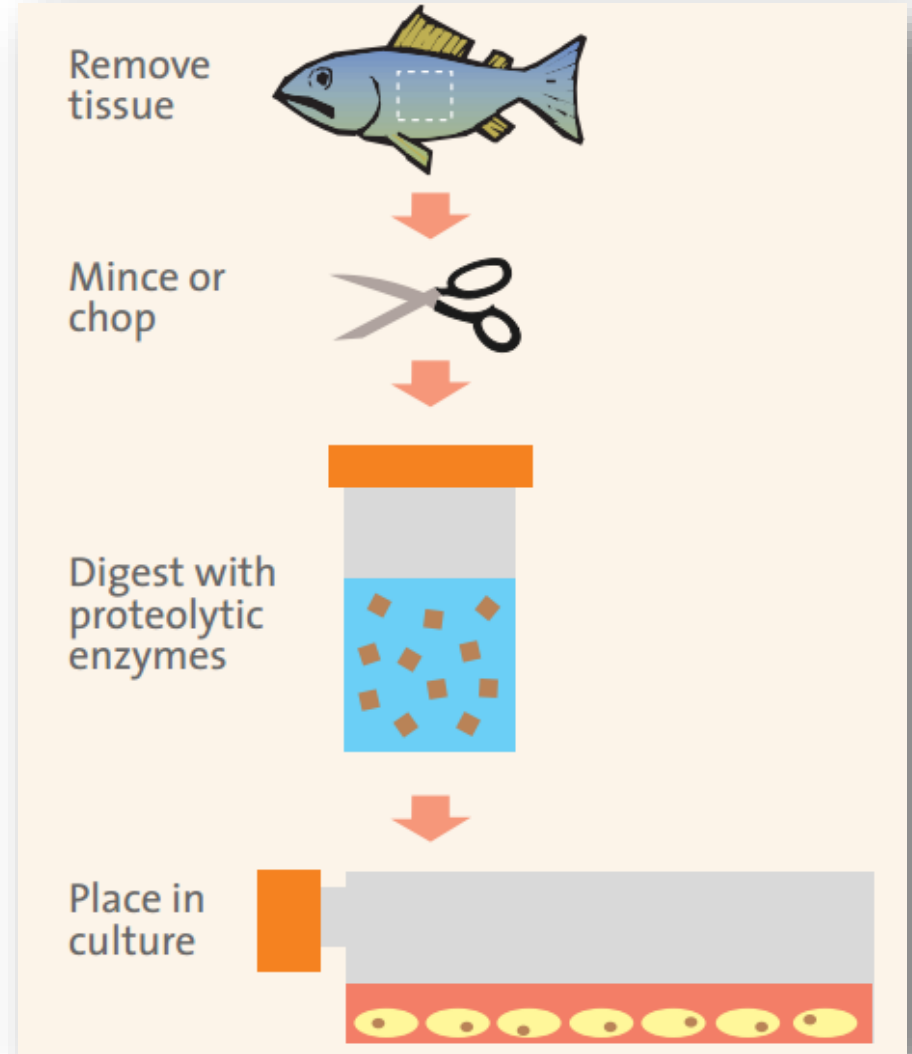
1. Explant Kültür:

- ✓ Dokudan izole edilen küçük parçalar cam ya da plastik kültür kaplarına ekilir ve besiyerinde kültüre edilir.
- ✓ Birkaç gün sonra hücreler doku explantından, bölünüp büyüyecekleri kültür kabının yüzeyine geçerler.



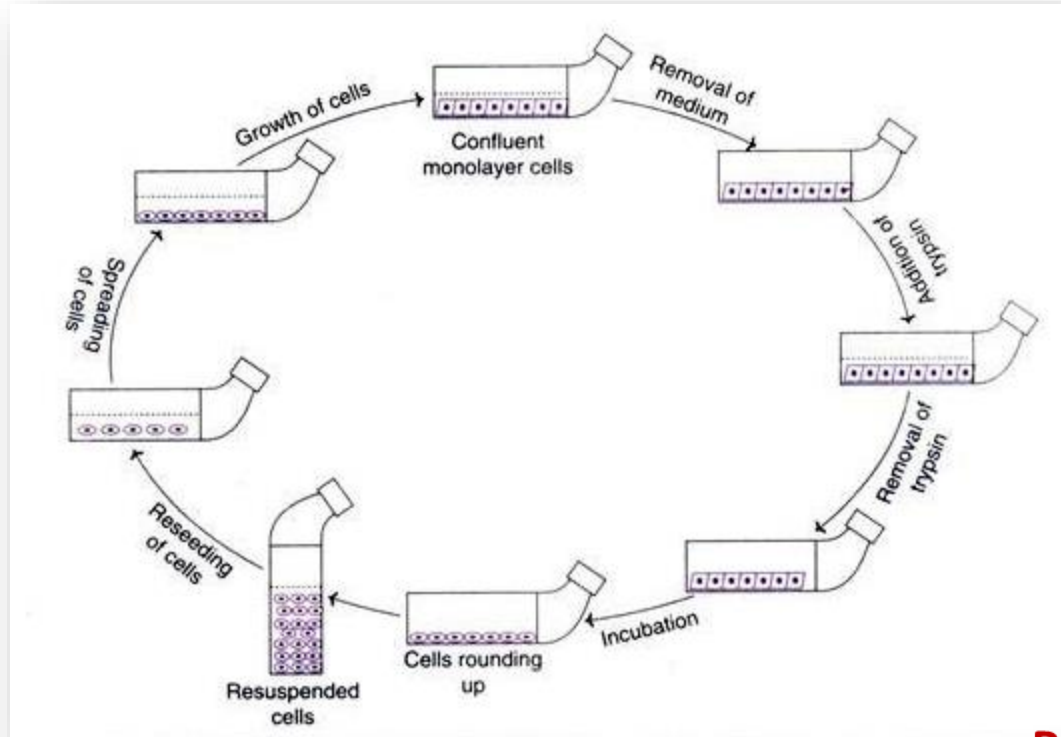
2. Enzimatik parçalama:

- ✓ Daha sık kullanılan yöntemdir.
- ✓ İşleme öncelikle toplu hadde bulunan hücreleri ayrıştırmak için doku parçasına tripsin ya da kollajenaz gibi proteolitik enzimler eklenerek başlanır.
- ✓ Bu olay tekli hücrelerden bir süspansiyon elde edilmesini sağlar. Daha sonra bu hücreler besiyeri içeren kültür kabına alınır.



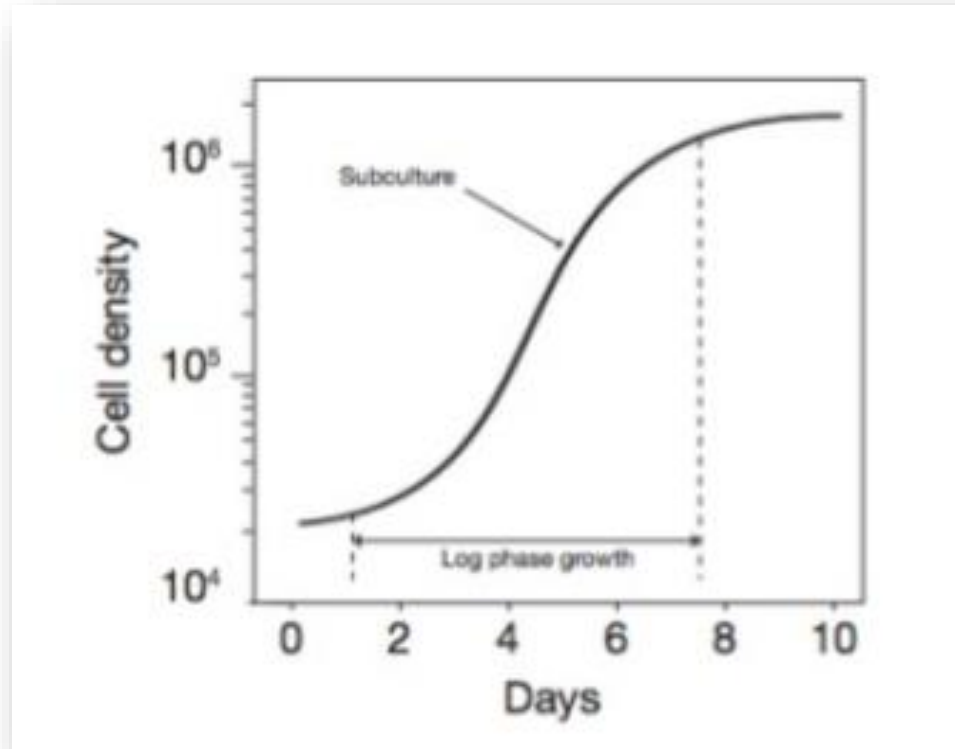
Alt Kültür

Alt kültüre alma (pasajlama), besiyerinin atılması ve hücrelerin eski kültürden yeni besiyerine alınmasıdır. Hücre hattının genişlemesine olanak sağlar. Kültürde hücrelerin büyümesi duraklama fazından ekimin yapıldığı logaritmik faza kadar geçen sürede devam eder.



Alt Kùltür

Yapışan kùltürde eęer hücreler bütün substratı işgel ettiyse ve büyüme için yer kalmadıysa, ya da hücreler süspansiyon kùltürde besiyerinin büyüme için sağlama kapasitesini aştıysa, hücre çoğalması hızlı bir şekilde düşer ve durur.



Süspansiyon Kültür

Süspansiyon kültüre uyum sağlayabilen hücreler için uygundur (Ör., hematopoetik). Doku kültürü amaçlı hazırlanmamış kültür kaplarında sürdürülebilir fakat yeterli gaz değişimi için sallama ve karıştırma gibi uyarılara ihtiyaç vardır. Pasajlama daha kolaydır, fakat büyümeyi takip edebilmek için günlük hücre sayımı ve canlılık ölçümü gereklidir.



Yapışan Kùltür

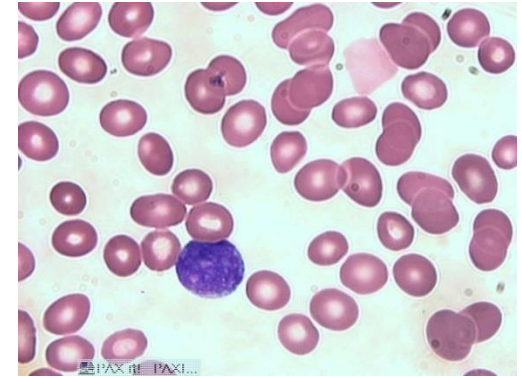
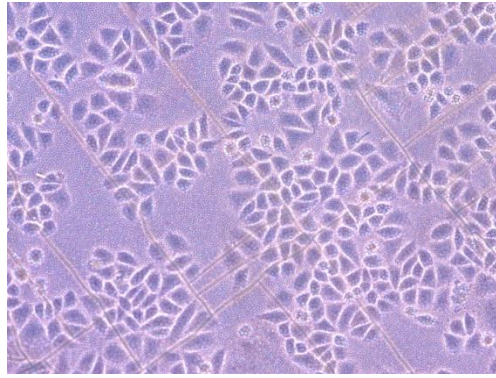
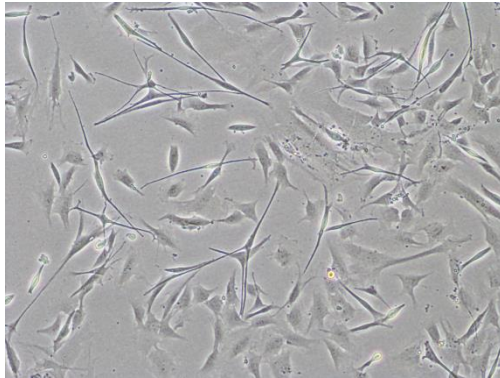
- Yapışan hücreler büyüme için bağlanacak yüzeye ihtiyaç duyar. Çoğu hücre tipi için uygundur. Omurgalılarından elde edilen hücrelerin çoğu desteğe bağımlıdır ve hücre adhezyonuna ve yayılmasına uygun bir substratın üzerinde kültüre edilmelidir.

Yapışan kültür	Süspansiyon kültür
Belirli sürelerde pasajlama yapılır.	Pasajlama daha kolaydır, büyümeyi uyarmak için kültür dilue edilebilir.
Hücrelerin görüntülenmesi daha kolaydır.	Hücrelerin görüntülenmesi daha zordur.
Hücreler enzimatik ya da mekanik yolla ayrıştırılır.	Enzimatik ya da mekanik ayrıştırmaya gerek yoktur.
Yuüzey alanı büyümeyi sınırlar.	Besiyerindeki hücre konsantrasyonu büyümeyi sınırlar.
Sitoloji amaçlı kullanılır.	Protein yığıını elde etmek için kullanılır.

Kültürdeki Hücrelerin Morfolojisi

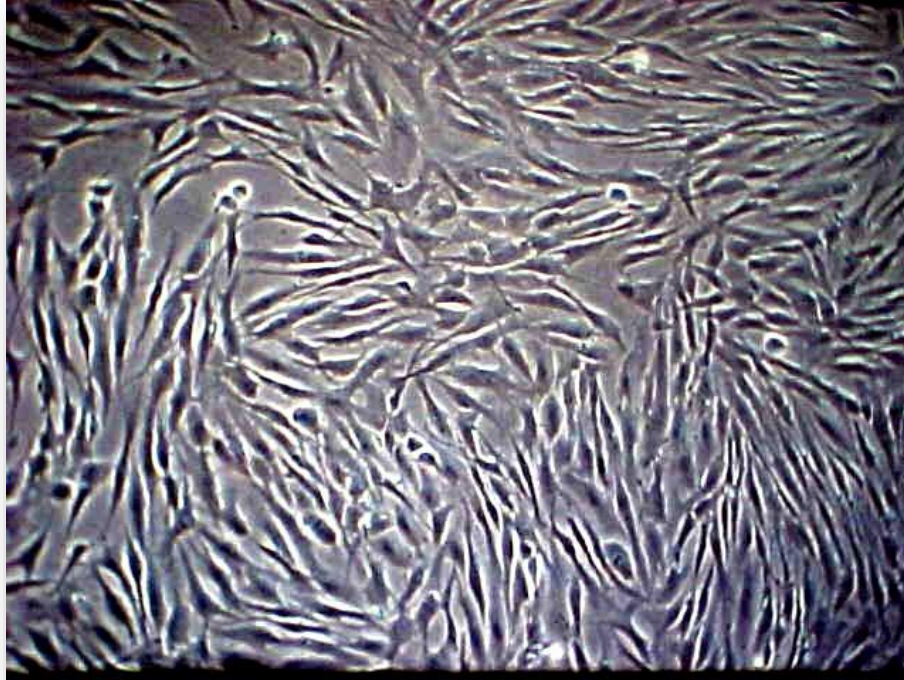
Kültürdeki hücreleri, şekillerine ve görünüşlerine göre 3 temel kategoriye ayırmak mümkündür.

1. **Fibroblastik Hücreler**
2. **Epitelyal-benzeri Hücreler**
3. **Lenfoblast-benzeri Hücreler**



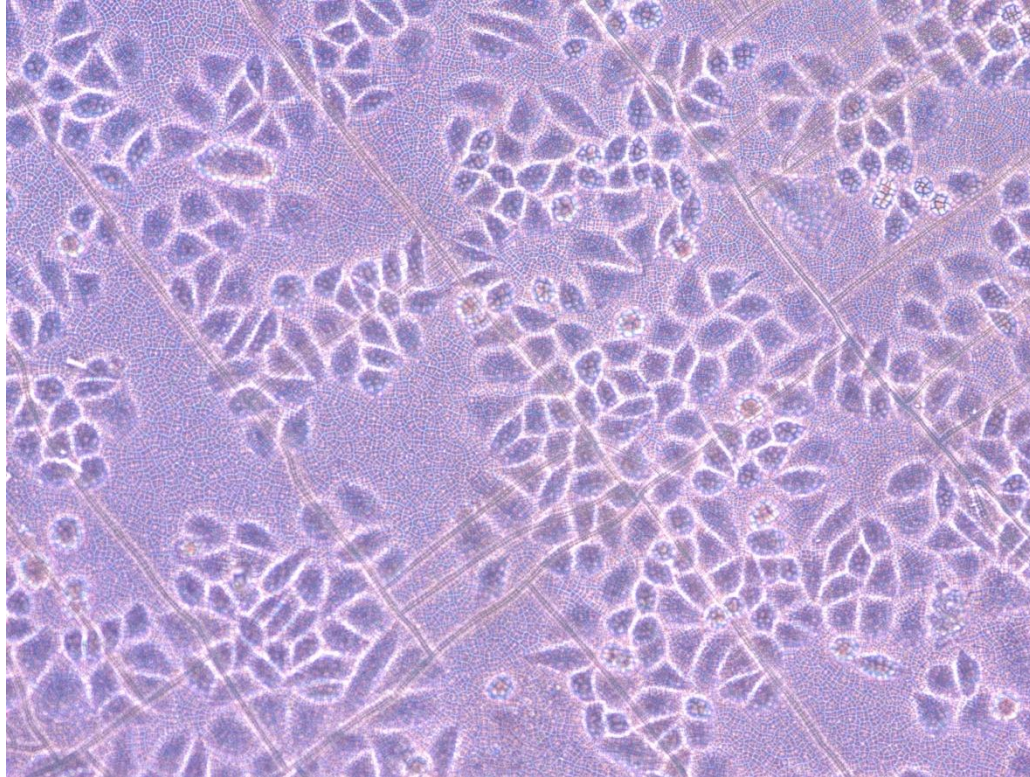
Fibroblastik Hücreler

Çift kutuplu veya çok kutuplu, uzamış şekilli ve bir substrata tutunarak büyüyen hücrelerdir.



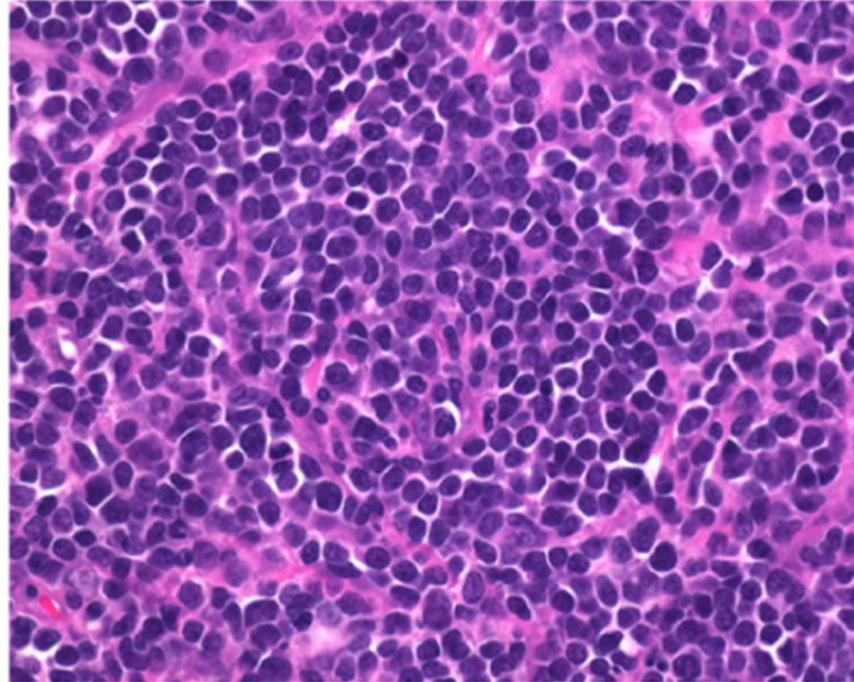
Epitelyal-benzeri Hücreseler

Çokgen ve düzenli şekilleri olan, bir substrata ayırık olarak tutunan hücrelerdir.



Lenfoblast-benzeri Hücresler

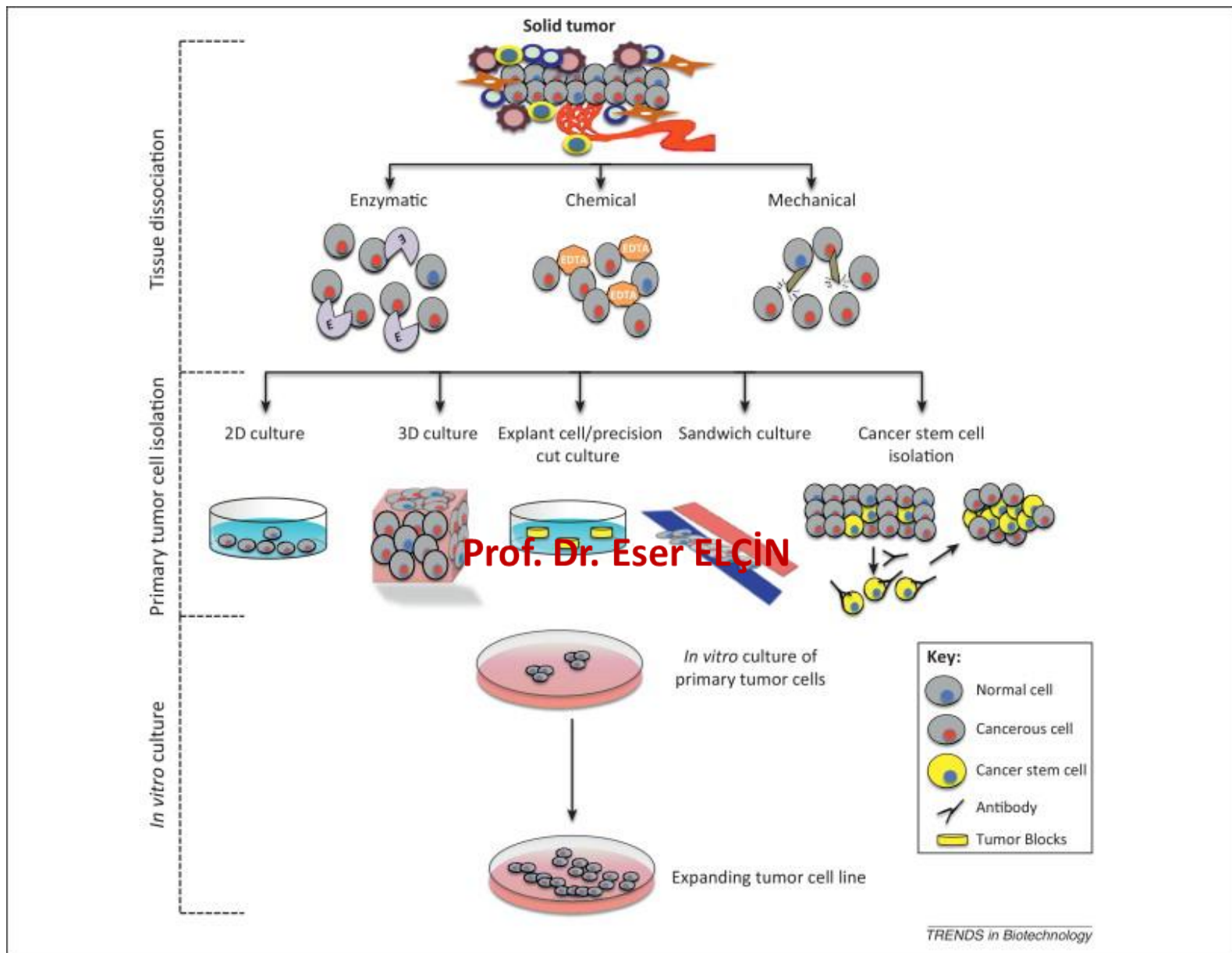
Küre Şekilli, çođunlukla süspansiyon iđerisine, bit yüzeye tutunmadan büyüyen hücrelerdir.



Kanser Hücre Kültürü

Kanser hücre kültürünün ilk yapıtaşları

Tarih	Olay	Buluş Sahibi
1885	İlk doku (tavuk) in vitro ortamda bir süre sürdürülmüştür.	Wilhem Roux
1898	İlk insan dokusu (deri) in vitro ortamda sürdürülmüştür.	Ljunggren
1903	İlk doku (semender lökosit) 1 ay sürdürülmüştür.	Jolly
1907	İlk fonksiyonel deney (kurbağa sinir lifi büyümesi)	Ross Harrison
1911	Canlılık ve büyüme için gerekli olan besiyerinin içeriği	Warren Lewis
1922	İlk epitel hücre kültürü	Albert Ebeling
1943	İlk kemirgen hücre hattı	Wilton Earle, George Gey
1951	İlk devam eden insan kanser hücre hattı	George Gey
1961	Normal hücreler kültürde sınırlı bir yaşam süresine sahiptir.	Hayflick/Moorhead
1965	Serumsuz besiyerinin ilk tanımı	Ham

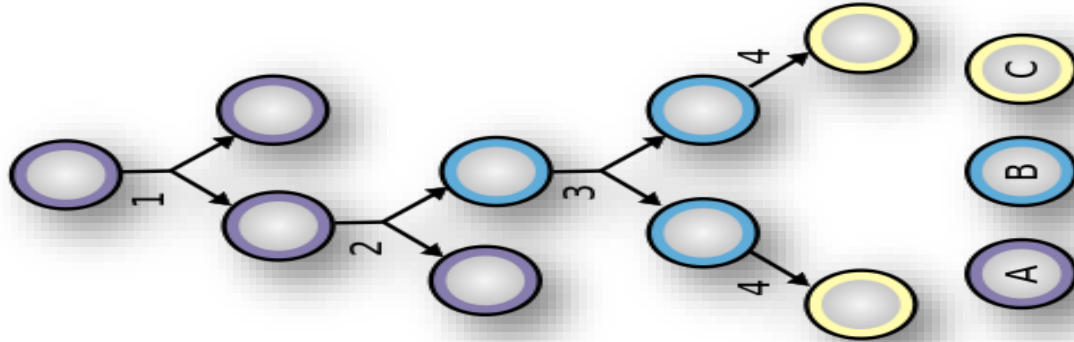


Schematic representation of the process of primary tumor cell line establishment. Primary neoplastic mass is dissociated either by enzymatic, chemical, or mechanical method according to tissue origin. Tumor cells are enriched from single cell suspensions by 2D, 3D, explant, precision-cut, sandwich, or cancer stem cell isolation method. These cells are cultured with medium by adding suitable tissue-specific supplements.

Hücre Hattı

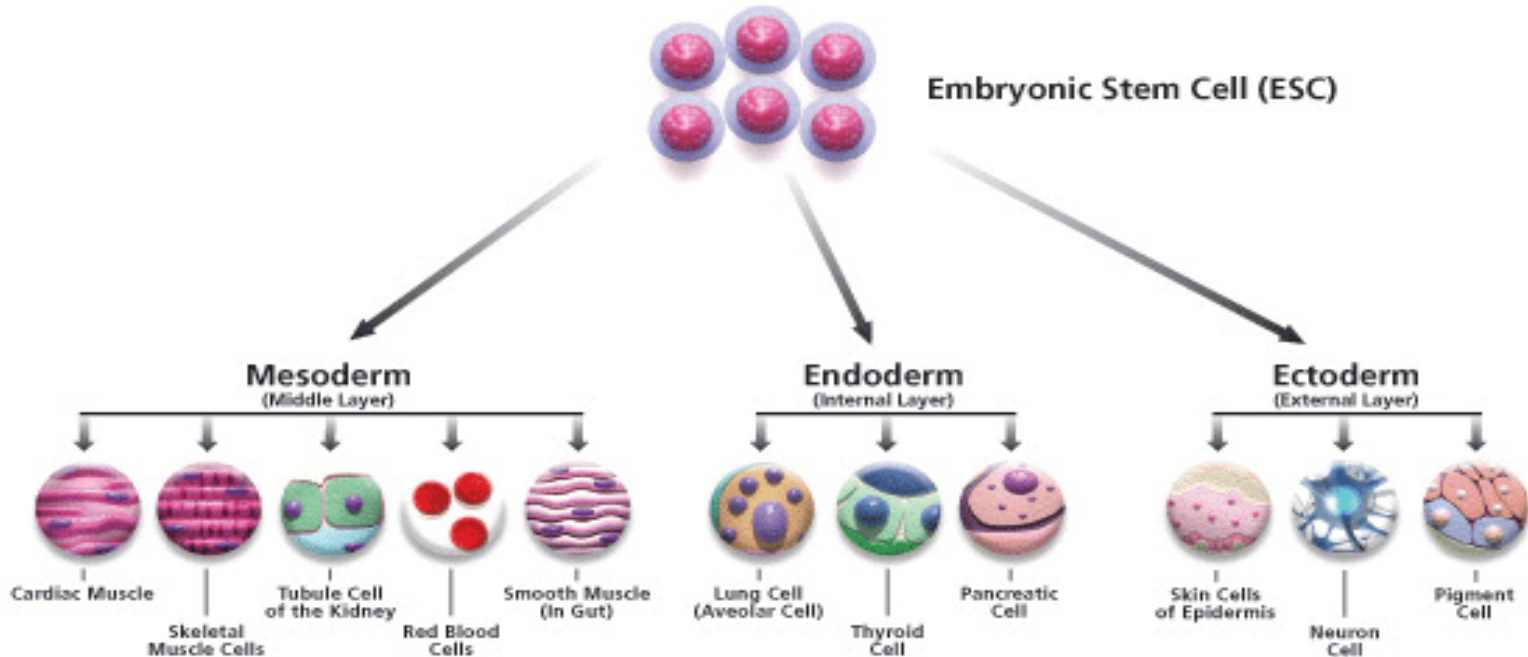
İlk alt kültürün ardından primer kültür, **hücre hattı** veya **subklon** olarak adlandırılır.

Primer kültürden gelişen hücre hatları sınırlı bir yaşam süresine sahiptir ve pasaj edildikçe, yüksek büyüme hızı gösteren hücreler üstün gelirler ve popülasyonda genotipik ve fenotipik tekdüzelik ortaya çıkmaya başlar.



Hücre Soyu

Hücre hattından bir hücre popülasyonu pozitif olarak seçilip klonlama veya diğer metotlarla kültüre edildiğinde, bu hücre hattı **hücre soyu** haline gelmeye başlar.



Sonlu & Sürekli Hücre Hattı

Normal hücreler, proliferasyon yeteneklerini kaybetmeden önce genellikle limitli sayıda çoğalma gösterirler. Bu genetik olarak, **senesens** olarak tanımlanır. Bu hücreler, sonlu hücreler olarak bilinir.

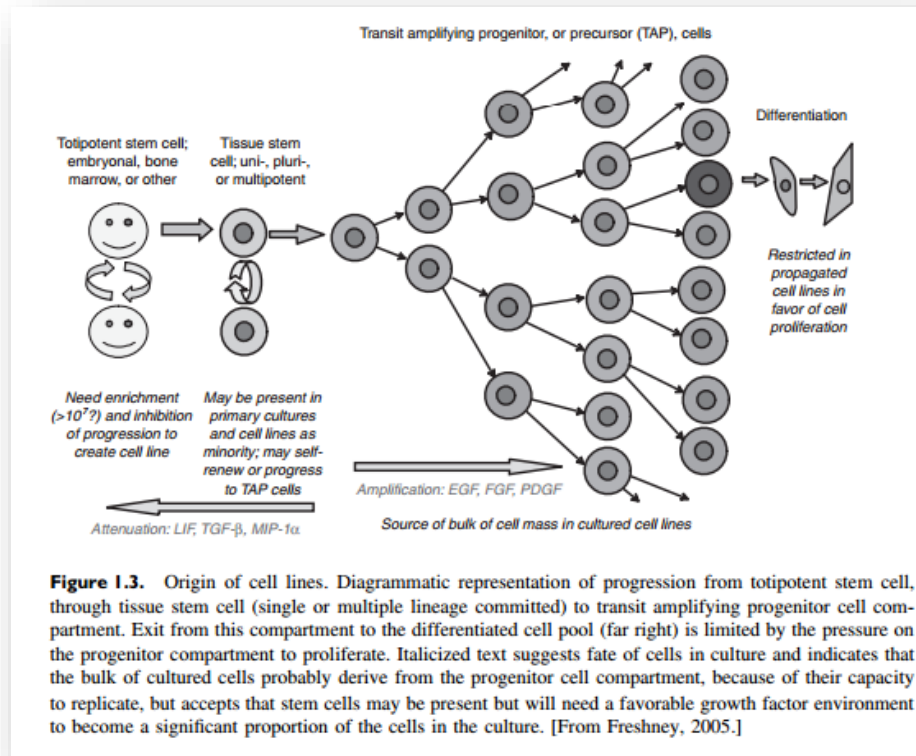
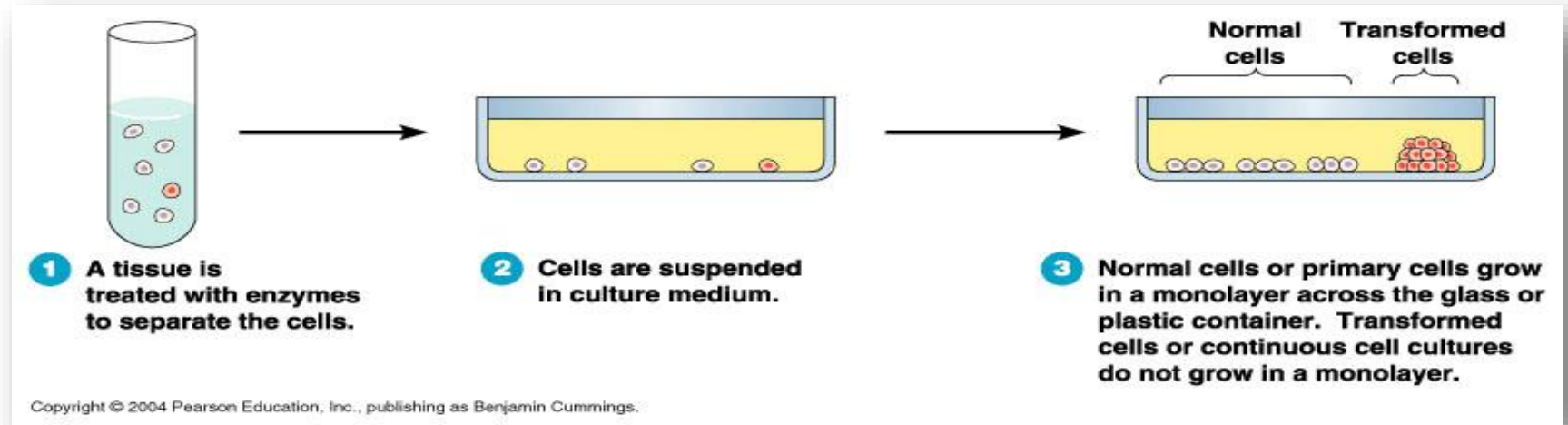


Figure 1.3. Origin of cell lines. Diagrammatic representation of progression from totipotent stem cell, through tissue stem cell (single or multiple lineage committed) to transit amplifying progenitor cell compartment. Exit from this compartment to the differentiated cell pool (far right) is limited by the pressure on the progenitor compartment to proliferate. Italicized text suggests fate of cells in culture and indicates that the bulk of cultured cells probably derive from the progenitor cell compartment, because of their capacity to replicate, but accepts that stem cells may be present but will need a favorable growth factor environment to become a significant proportion of the cells in the culture. [From Freshney, 2005.]

Sonlu & Sürekli Hücre Hattı

Bununla beraber, **transformasyon** adı verilen spontan, kimyasal ya da viral olarak gerçekleşen bir işlem ile bazı hücre hatları ölümsüz (immortal) hale getirilebilir. Sonlu bir hücre hattı, transformasyon ile sınırsız bölünme yeteneği kazandığında **sürekli hücre hattı** haline gelir.



Sürekli Hücre Hattı

İnsan hücre hattı

- ✓ MCF-7 Akciğer kanseri
- ✓ HL60 Lenfoma
- ✓ HEK-293 İnsan embriyonik soy
- ✓ Hela Henrietta eksikliği

Birincil hücre hattı

- ✓ Vero Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücreleri

✓ CHO Fare için

✓ Sf9 ve Sf21 Böcek hücrelerinden