

TEMEL ARAŐTIRMA TEKNİKLERİ-II



Prof. Dr. A. Eser ELÇİN

Dersin İçeriği

- 1 Hücre kültüründe temel kavram ve tanımlar, kültürdeki hücrelerin biyolojisi
- 2 Laboratuarda ve hücre kültürü laboratuvarında güvenli çalışma ilkeleri; Asepti ve sterilizasyonun ilkeleri ve uygulama yöntemleri
- 3 Hücre kültürü laboratuvarının, ilgili cihaz-ekipmanların ve diğer malzemelerin tanıtılması
- 4 Hücre kültüründe fiziksel, kimyasal ve biyolojik parametreler, kültür ortamının özellikleri, çoğalma kinetiği ve popülasyon katlanması; besiyerlerinin zellikleri
- 5 Hücre kültürü eşitleri ve özellikleri (primer kültür, hücre hatları, süspansiyon kültür, adhezif kültür, kanser hücreleri) ve Literatür alışması.
- 6 Hücre kültüründe temel işlemler: besiyeri hazırlama, hücre ekimi, besiyeri değiştirme, alt kültüre geçiş, hücre sayımı, pasajlama, kontaminasyon kontrolü, kültürün sürdürülmesi ve takip edilmesi
- 7 Hücre kültüründe temel işlemler: besiyeri hazırlama, hücre ekimi, besiyeri değiştirme, alt kültüre geçiş, hücre sayımı, pasajlama, kontaminasyon kontrolü, kültürün sürdürülmesi ve takip edilmesi.
- 8 Hücre kültüründe temel işlemler: besiyeri hazırlama, hücre ekimi, besiyeri değiştirme, alt kültüre geçiş, hücre sayımı, pasajlama, kontaminasyon kontrolü, kültürün sürdürülmesi ve takip edilmesi
- 9 Model canlı olarak Sıanın kemik iliğinden multipotent stromal hücrelerin izolasyonu, primer kültürü ve hücrelerin tanımlanması (-nesile farklılaştırma ve cfu-f deneyi)
- 10 Model canlı olarak Sıanın kemik iliğinden multipotent stromal hücrelerin izolasyonu, primer kültürü ve hücrelerin tanımlanması (-nesile farklılaştırma ve cfu-f deneyi)
- 11 Model canlı olarak Sıanın kemik iliğinden multipotent stromal hücrelerin izolasyonu, primer kültürü ve hücrelerin tanımlanması (-nesile farklılaştırma ve cfu-f deneyi)
- 12 Kriyoprezervasyonun ilkeleri; Hücre dondurma, çözme ve tekrar kültüre alma; ve Literatür alışması
- 13 GMP laboratuvarında hücre kültürü, büyük-ölçekte üretim ve Literatür alışması
- 14 GMP laboratuvarında hücre kültürü, büyük-ölçekte üretim ve Literatür alışması

TEMEL ARAŐTIRMA TEKNİKLERİ



1. HAFTA:

HÜCRE BİYOLOJİSİ-HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültüründe temel kavram ve tanımlar, kültürdeki hücrelerin biyolojisi

Prof. Dr. Eser ELÇİN

Hücre Biyolojisi

- ❖ Hücre biyolojisi, hücre yapısı ve fonksiyonuyla ilgili çalışmaları kapsar ve *'Hücre yaşamın temel birimidir.'* kavramı etrafında şekillenir.
- ❖ Hücrenin üzerine yoğunlaşılması, hücrelerin oluşturduğu doku ve organizmalarla ilgili ayrıntılı bir bilgi edinmemizi sağlamaktadır.

Hücre Biyolojisinin Doğuşu-1

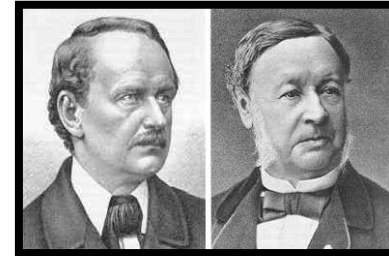
- ❖ **1665 Robert Hook**, ışık mikroskobunda şişe mantarını incelemiş ve etrafları çevrili ve içleri boş olan yapılara "**hücre: cellula**" ismini vermiştir.



- ❖ **1670 Antony van Leeuwenhoek**, bakteriyi ilk keşfeden kişidir ve kendi oluşturduğu mikroskobu ile ilk kez mikroskopik canlıları incelemiştir.

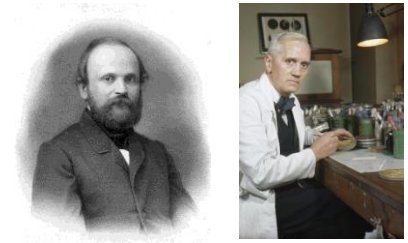


- ❖ **1838 Matthias Schleiden ve Theodor Schwann**, hücre teorisini ileri sürerek çağdaş hücre biyolojisine geçişi sağladı.

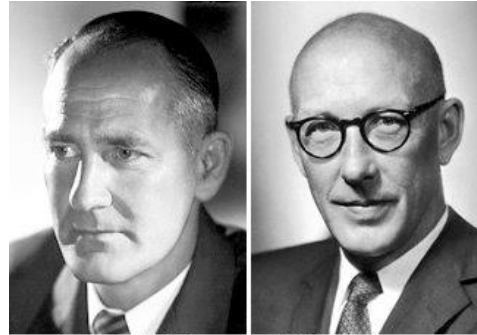


Hücre Biyolojisinin Doğuşu-2

- ❖ **1852'de Remak ve 1880'de Fleming** hücre bölünmesini incelemişlerdir.



- ❖ **1940'lar**, her gen kendi ürününü üretir (**Beadle ve Tatum, bir gen-bir enzim, Nobel 1948**) ve genetik materyal DNA'dır (**Avery ve Mc Carty, Griffiths, 1944**).



George Wells
Beadle
(1903 - 1989)

Edward Lawrie
Tatum
(1909 - 1975)

Hücre Biyolojisinin Doğuşu-3

❖ *1950'lerde Linus Pauling*



proteinlerin ve *James Watson ile*

Francis Crick



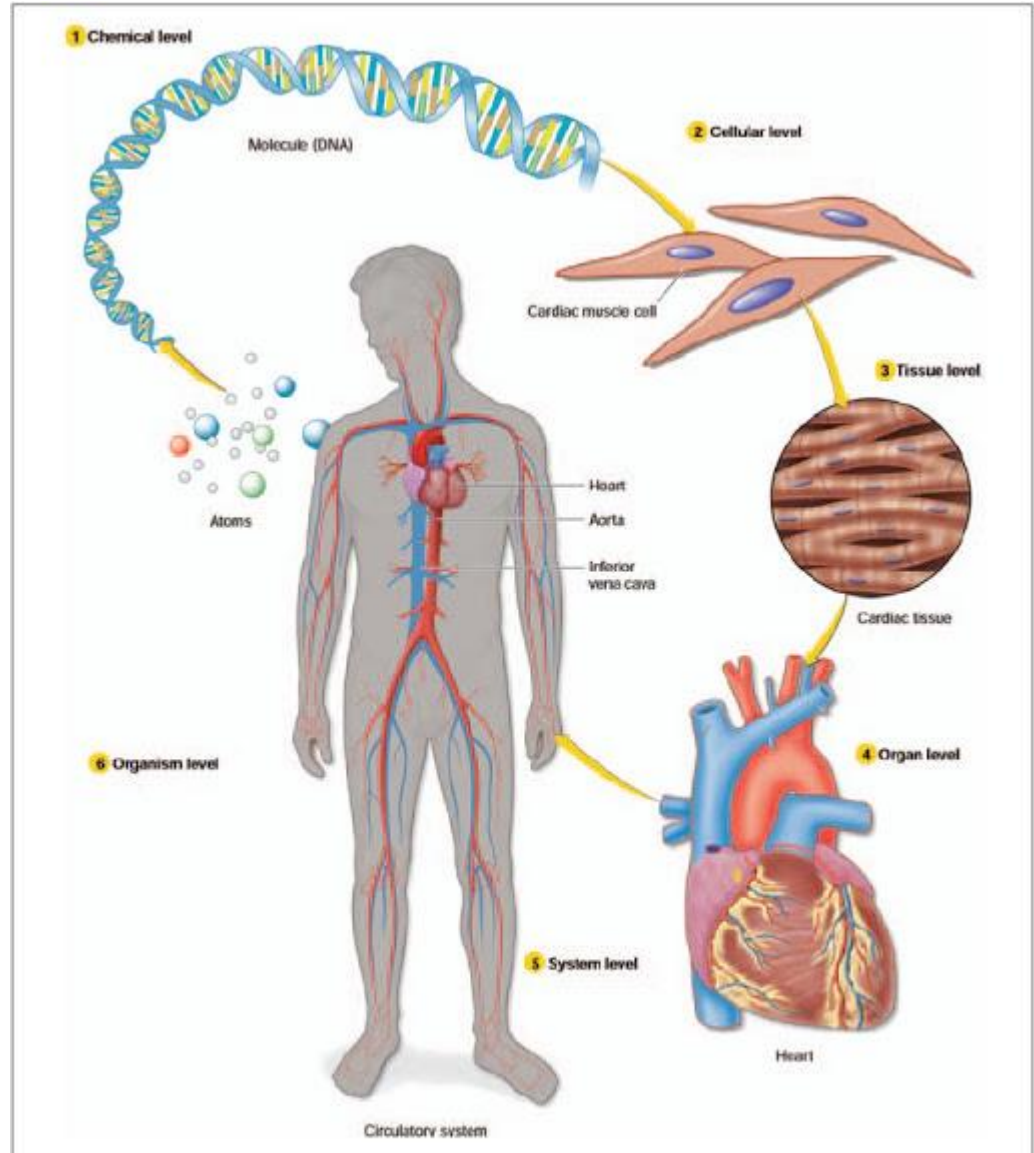
ise (Nobel 1962) DNA molekülünün üç boyutlu

yapısını tanımlamışlardır.

❖ *1955 yılında Harry Eagle,* hayvan hücrelerinin büyümesini sağlayan *'Eagle's minimal essential medium'* besiyerini geliştirdi.

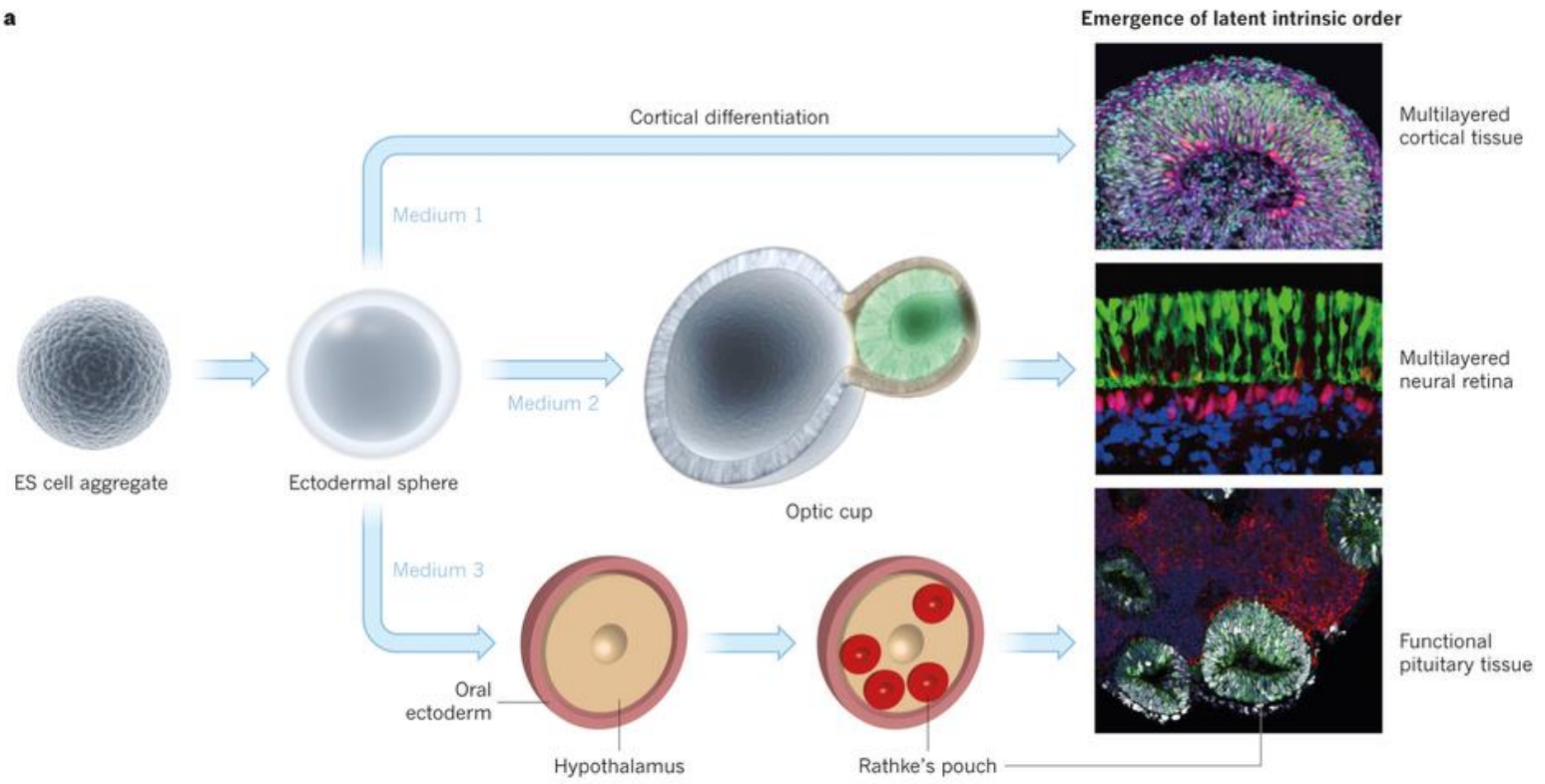


ORGANİZASYON:

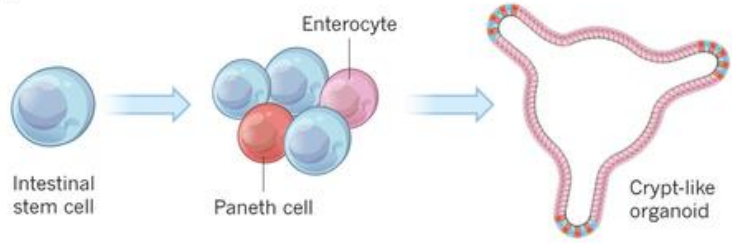


Cells in the human body organize themselves into increasingly complex structures and systems. (From Premkumar K. *The Massage Connection Anatomy and Physiology*. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004.)

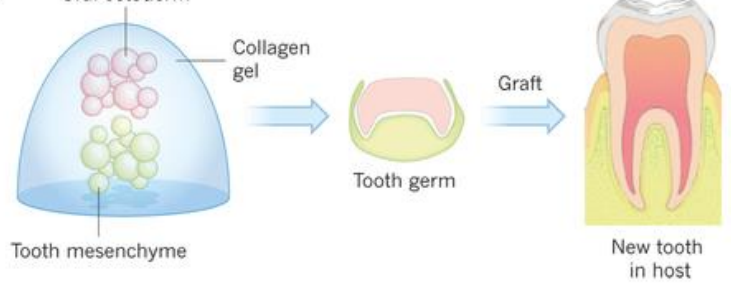
a



b



c

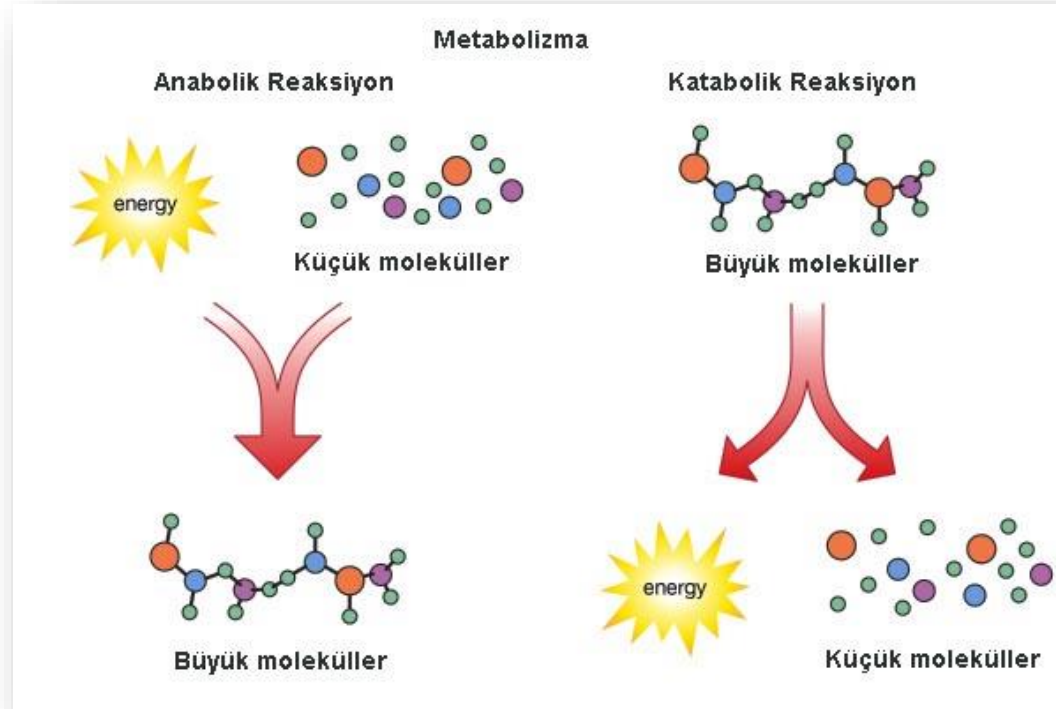


Hücreler genetik programa sahiptir: Organizmalar genlerinin kodladığı bilgiye göre oluşurlar. Bu büyük miktardaki bilgi çekirdek içinde yer alan kromozomlar üzerinde paketlenmiştir.

Hücreler kendini çoğaltma yeteneğine sahiptir: Bir ana hücreden iki yeni yavru hücre oluşmadan önce genetik materyal iki katına çıkar ve her bir yeni yavru hücre ana hücre ile aynı genetik materyali taşır.

Hücreler Enerjiyi Kazanır ve Kullanır: Işığın enerjisi fotosentetik hücrelerin membranlarında bulunan ışık absorblayan pigmentler tarafından tutulur. Işık enerjisi fotosentez ile kimyasal enerjiye dönüştürülür ve nişasta ve sukroz gibi karbonhidratlarda enerji şeklinde depolanır. Glukozun parçalanmasıyla oluşan enerji ATP'de depolanır. Hücre makromolekülleri, organelleri parçalayarak ve yeniden oluşturarak çok fazla miktarda enerji harcar. Böylece hücre devamlılığını sağlar değişen koşullara kolaylıkla uyum sağlar.

Hücreler çok çeşitli kimyasal reaksiyonu başarıyla gerçekleştirirler: Hücrelerdeki kimyasal reaksiyonlar enzimler tarafından katalizlenmektedir. Biz, enzimler tarafından katalizlenen bütün reaksiyonları metabolizma adı altında toplayabiliriz. **Metabolizma**, oldukça koordine ve maksatlı ilerleyen bir hücre faaliyetidir; bu faaliyette pek çok enzim sistemi görev almaktadır.

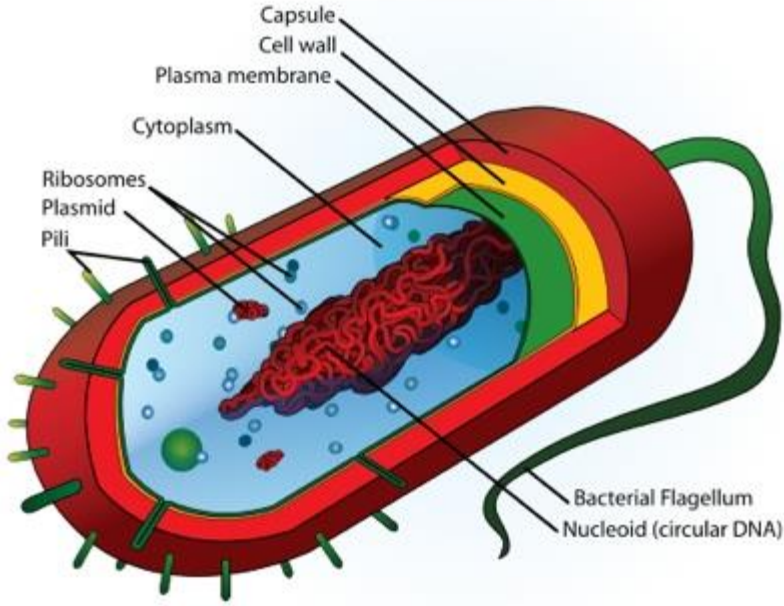


Hücreler temelde 2 büyük sınıfa ayrılır:

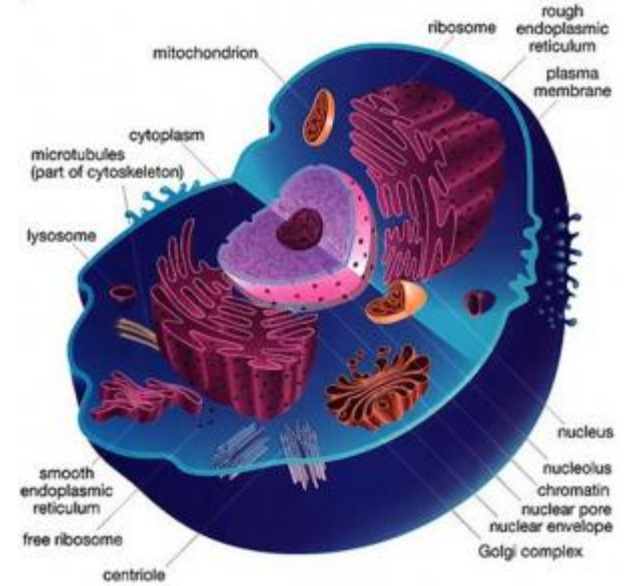
Prokaryot ve Ökaryot hücrelerin karşılaştırılması

Karakter	Prokaryot hücre	Ökaryot hücre
Boyut	Küçük	Büyük
Hücre membranı	Hücre duvarı	Plazma membranı
Organeller	Yok	Belli organeller var (Mitokondri, çekirdek, lizozom)
Çekirdek	Yok	Var
Enerji metabolizması	Mitokondri yok, enerji metabolizmasını sağlayan enzimler membrana bağlı.	Enerji metabolizmasını sağlayan enzimler mitokondride bulunuyor.
Hücre bölünmesi	Bölünme	Mitoz
DNA içeriği	1×10^6 to 5×10^6	1.5×10^7 to 5×10^9
Sitoplazma	Organeller ve hücre iskeleti yok	Organeller ve hücre iskeleti var

Prokaryot hücre (Bailey, 2015)



Ökaryot hücre (Anonymous, 2013)



Hücre Kültürü-1

❖ Hücre kültürü, prokaryot, ökaryot ve bitki hücrelerinin doğal ortamları dışında kontrollü koşullar altında büyütüldüğü işlemdir. Fakat pratikte genellikle kültür için hayvan hücreleri tercih edilmektedir.

❖ *İlk kez 1885 yılında Roux* embriyonik civciv hücrelerini hücre kültüründe devam ettirebilmiştir.



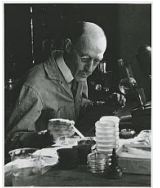
❖ *1897: Loeb*, serumda kandan ve bağ dokudan izole edilen hücrelerin canlılığını göstermiştir.

❖ *1903: Jolly*, in vitro ortamda semender lökositlerindeki hücre bölünmesini gözlemlemiştir.



❖ Hücre kültürü *ilk kez 1907 yılında Ross Harrison* tarafından başarıyla gerçekleştirilmiştir.

❖ *1910: Burrows*, tavuk embriyo hücrelerinin uzun süreli kültürünü başarıyla gerçekleştirmiştir.



Hücre Kültürü-2

- ❖ **1911: Lewis** deniz suyu, serum, embriyo ekstraktı, tuz içeren ilk sıvı besiyerini hazırlamıştır.
- ❖ **1913: Carrel** hücrelerin uzun süre kültüre edilebileceği aseptik teknikler geliştirmiştir.
- ❖ **1916: Rous ve Jones** yapışık hücreleri yüzeyden kaldırabilmek için proteolitik bir enzim olan tripsini tanıtmıştır.
- ❖ **1923: Carrel ve Baker** ilk kez 'T-flask' adı verilen hücre kültür kabını geliştirmiş ve hücrelerin kültürdeki mikroskobik gelişimini incelemiştir.
- ❖ **1927: Carrel ve Rivera** 'Vaccinia' adı verilen ilk aşığı geliştirmişlerdir.
- ❖ **1933: Gey** silindir tüp teknolojisini geliştirmiştir.



Alexis Carrel

Hücre Kültür Teknolojisindeki Önemli Gelişmeler

İlk gelişme kontaminasyona sebep olan kirliliklerin büyümesini engelleyen antibiyotiklerin kullanımınıdır.

İkincisi, tripsin kullanılarak tabana yapışan hücrelerin kaldırılarak başka bir kültür kabına alınmasıdır.

Üçüncüsü ise kültür besiyeri olarak tanımlanan kimyasalın kullanımınıdır.

Peki Hücre Kültürü Ne Amaçla Kullanılır?

Model Sistemlerde

- Temel hücre biyolojisi, ilaçların hücre üzerindeki etkieri

Toksisite testlerinde

- Yeni ilaçların etkileri

Kanser araştırmalarında

- Çeşitli kimyasalların, virüs ve radyasyonun normal hücre kültürlerinin kanser hücreğine dönüşümü üzerine etkiler

Peki Hücre Kültürü Ne Amaçla Kullanılır?

Viroloji

- Aşı üretimi için virüs kültürü yapılması

Genetik Mühendisliği

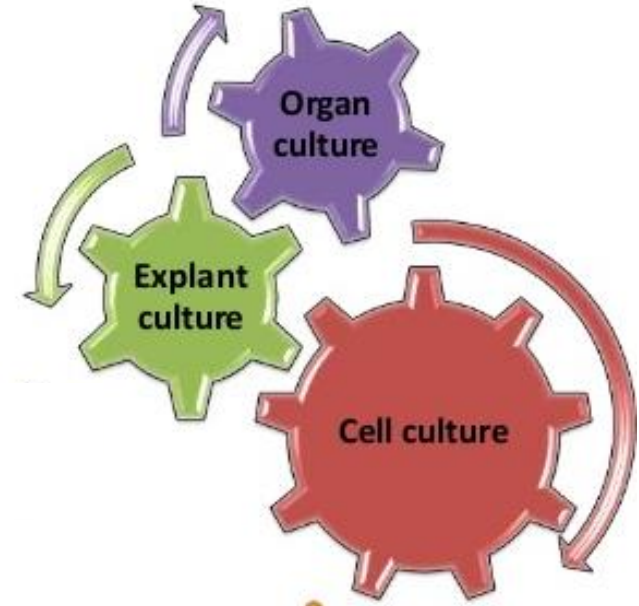
- Ticari proteinlerin üretimi

Gen terapisi

- Fonksiyonel gene sahip olan hücrelerin, olmayanların yerine geçmesi

Doku Kùltürü-1

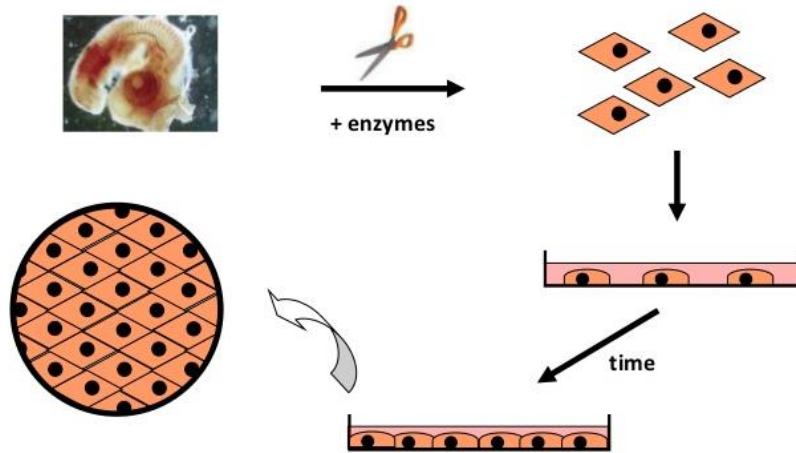
*Organ, doku ve hücrelerin belirtilen sıcaklıkta inkübatör ve hücre besinleri içeren besiyeri ve büyüme faktörleri kullanılarak in vitro kùltivasyonu **doku kùltürü** olarak tanımlanır.*



Prof. Dr. Eser ELÇİN

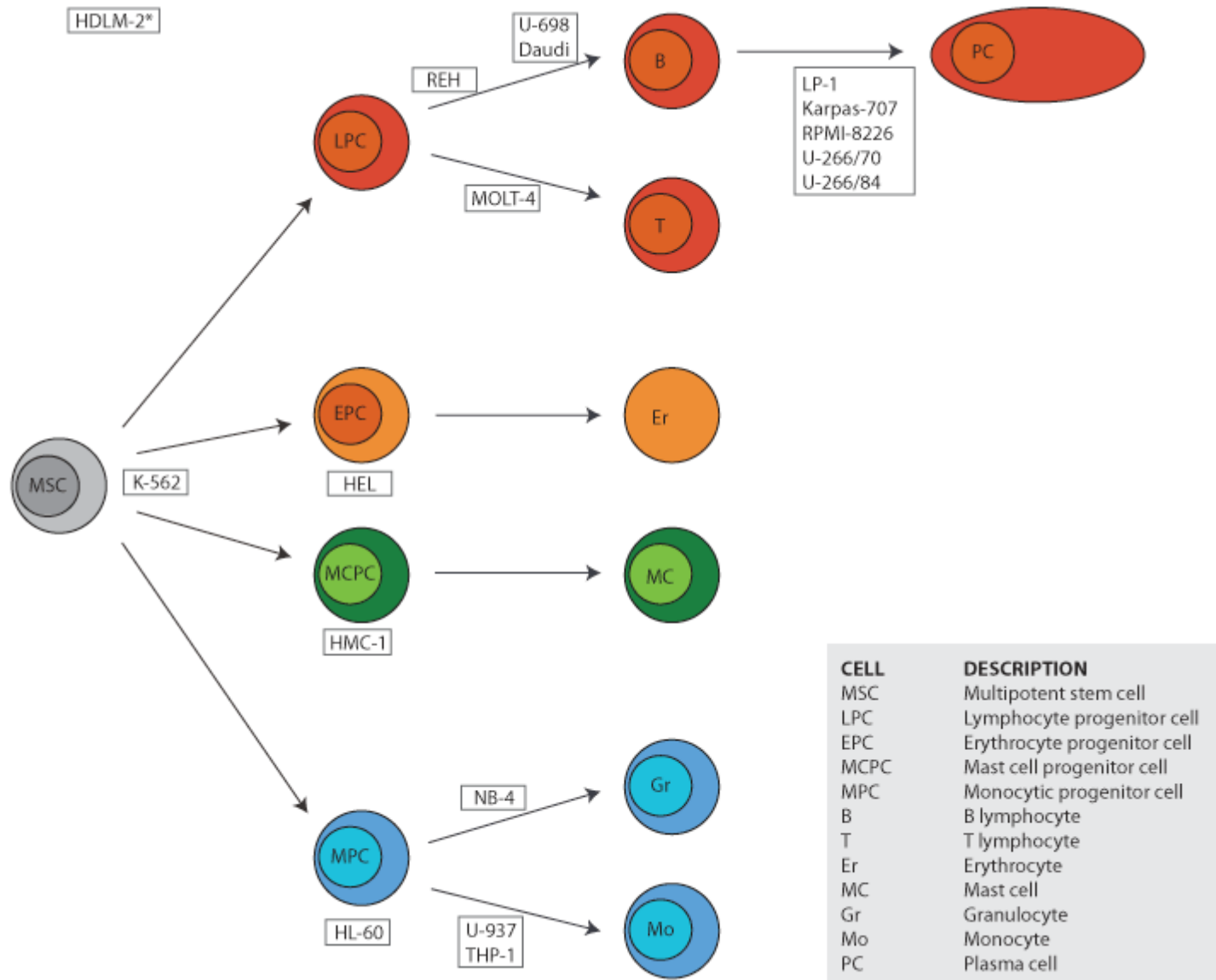
Primer (Birincil) Kültür

- ✓ Hücrelerin bir organizmadan cerrahi ya da enzimatik olarak çıkarılıp uygun kültür ortamına alınması ve o ortamda kültüre edilmesi primer kültür olarak adlandırılır.
- ✓ Primer hücreler sınırlı yaşam süresine sahiptir.
- ✓ Primer kültürler çok heterojen bir hücre popülasyonuna sahiptir.



Alt-Kültür/Primer (Birincil) Kültürün Pasajlanmas-Hücre Hatt

- ✓ İlk alt kültürün ardından primer kültür, **hücre hatt** veya **subklon** olarak adlandırılır.
- ✓ Primer kültürden gelişen hücre hatları limitli bir yaşam süresine sahiptir ve pasaj edildikçe, yüksek büyüme hızı gösteren hücreler üstün gelirler ve popülasyonda genotipik ve fenotipik tekdüzelik ortaya çıkmaya balar.



* Information regarding the relation of HDLM-2 (Hodgkin lymphoma) to B-cell development is inconclusive.

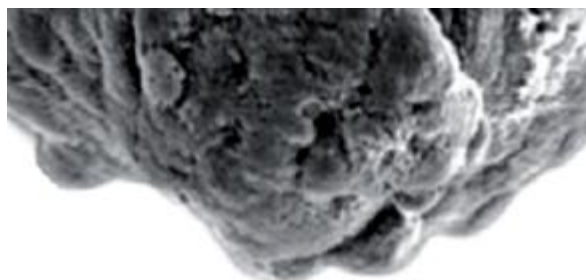
TECHNOLOGY FEATURE

A BETTER BREW

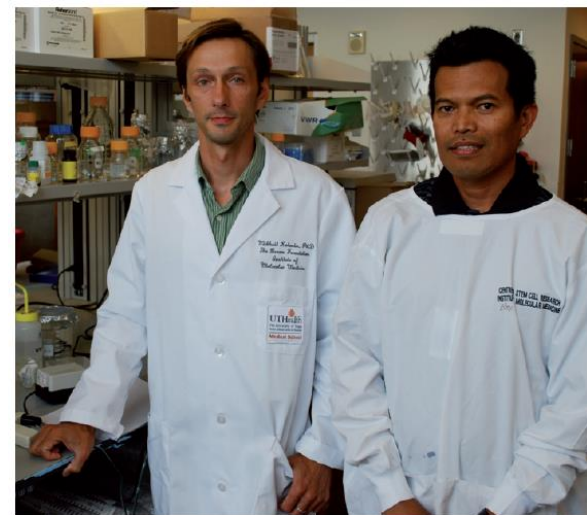
Advances in cell culture media mean that scientists increasingly know what has gone into the mix, and cells are enjoying a more natural environment — even in the lab.



Glauco Souza has made microtissues with *in vivo*-like morphology and protein production.

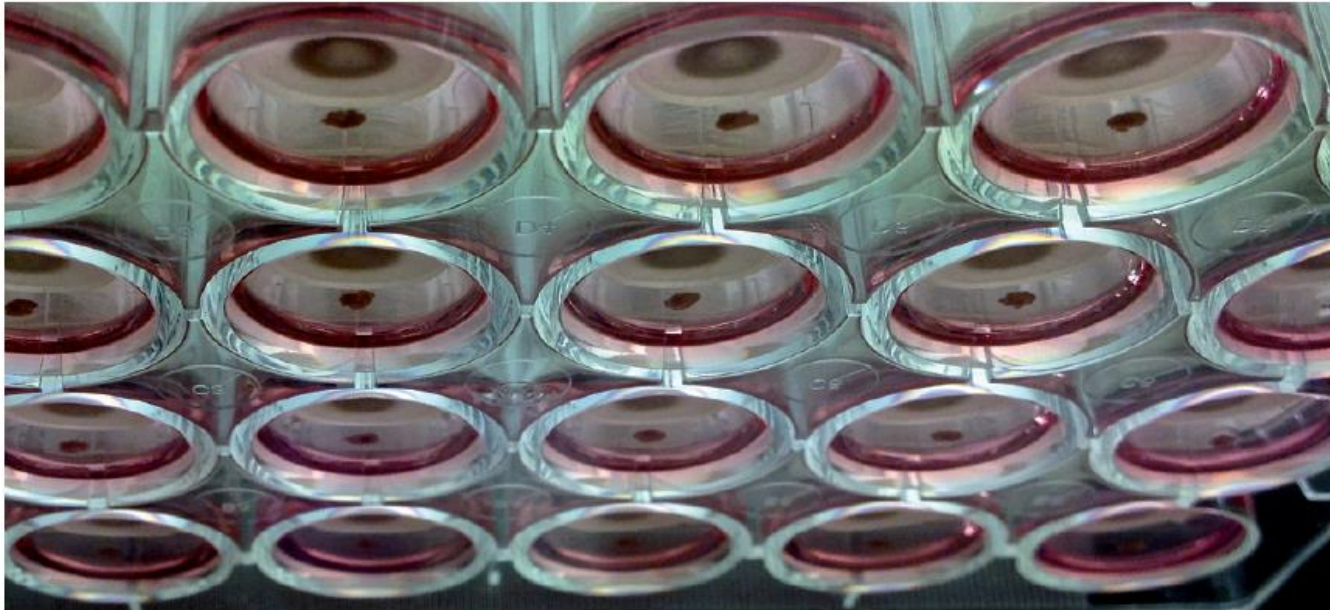


An artistically enhanced scanning electron micrograph of a liver-cancer-cell spheroid.

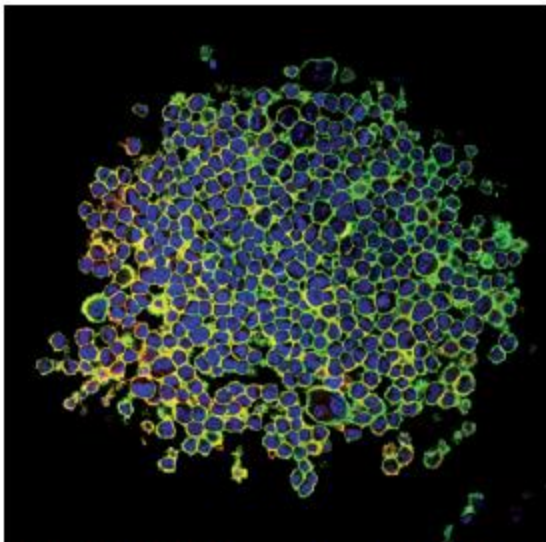


Mikhail Kolonin (left) and Alexes Daquinag at the University of Texas study adipose tissue and stem cells.

n3D BIOSCIENCES



Technology by n3D Biosciences brings cells together in a dish using magnetic nanoparticles to levitate them in a magnetic field.



Microtissues such as these colorectal-cancer cells can be grown in spheres without scaffolds.

THERMO FISHER SCIENTIFIC



Stem cells are often kept in liquid nitrogen at -196°C , but the recovery rate is low.