

DOKU KÜLTÜRLERİYLE İLGİLİ GENEL KAVRAMLAR

Nadir Çıray*

Canan Akbay**

Biyolojik anlamda «kültür» terimi, hücrelerin, dokuların ve organların «in vitro», yirmidört saatten daha uzun süre korunmalarını, beslenmelerini ve büyümelerini içine almaktadır (9). Günümüzde kültürler, başlıca dört başlık altında toplanabilirler :

1 — Hücre kültürleri : Doğal orijinlerinde organize olmayan hücrelerin in vitro yaşatılma ve büyütülmeleridir.

2 — Doku kültürleri : Orijinal ve karakteristik doku mimarisinde bulunmayan doku parçalarının yaşatılmalarıdır.

3 — Organ kültürleri : Organ taslaklarının veya bir organın tamamı veya kısımlarının in vitro olarak yaşatılmaları ve büyütülmeleridir. Bu yapının orijinal mimarisi ve/veya fonksiyonunu koruyabilmesi veya diferansiasyonuna imkan olmalıdır.

4 — Subhücre kültürleri : Homojenize hücrelerin bir veya daha çok subhüresel komponentlerinin in vitro yaşatılmasıdır (3).

Doku kültürleri¹ konusunda en çok kullanılan terimleri tanımlamak gerekmektedir :

Eksplant : Normal çevresinden ayrılan ve büyümesi için suni bir ortama aktarılan dokuya denir.

¹: Eldeki derleme kültürlerin tanımlanmasına genel bir giriş yapma amacına yöneldiğinden, yukarıda bahsedilen kültür tiplerinin ayrı ayrı sözkonusu edilmesi yerine, bundan sonraki bölümlerde, «doku kültürleri» teriminden, hücre, doku ve organlar anlatılmak istenecektir.

* A. Ü. Tıp Fakültesi Hist. ve Emb. Bilim Dalı Araştırma Görevlisi

** A.Ü. Tıp Fakültesi Hist. ve Emb. Bilim Dalı Profesörü

Primer kültür : Bir organizmadan doğrudan alınan hücre, doku yada organın oluşturduğu kültürdür. Bir kültür, ilk defa pasaj işlemine uğrayana kadar primer kabul edilir, sonra «hücre dizisi» adını alır.

Pasaj : Bu terim «subkültür» kelimesiyle eşanımlıdır. Hücrelerin bir kültür damarından diğerine transplantasyonu anlamına gelir.

Hücre dizisi (cell line) : İlk pasaj işlemine uğramış primer eksplant'a denir. Bir hücre dizisinde, primer kültürde bulunan değişik jenerasyonlardan hücreler olabilir.

Monolayer : Bir substrat üzerinde, ona yapışarak büyüyen tek bir hücre tabakasıdır.

Süspansiyon kültürleri (suspension cultures) : Hücrelerin bir inert yüzeye yapışmadan çoğaldıkları kültür tipidir.

Hücre zinciri (cell strain) : Bir primer kültürden yada hücre dizisinden türeyip, spesifik özelliklere yada işaretleyicilere (marker) sahip olan hücrelerdir.

Popülasyon veya hücre yoğunluğu : Kültür damarının herbir birim alan yada hacmine düşen hücre sayısıdır.

KÜLTÜRLERİN KULLANILDIĞI ALANLAR :

Bir kültür işleminde kullanılacak materyal, çoğunlukla biyopsi ile olmak üzere, bu amaç için dondurularak saklanmış dokulardan da sağlanabilir. Kültür işlemi ile şu yapısal ve fonksiyonel veriler elde edilebilir : Çeşitli embryonal alanların potansiyelleri ve organ kalıntıları hakkında bilgi edinebilir; değişik hücre tiplerinin beslenme gereksinimleri ve «kimyasal olarak tanımlanabilen» ortamlarda bulunması gereken maddelerin yapıları (7); mitotik mekanizmalar; hücre hareketinin yapısı; hücreler üzerinde radyasyon, ısı, yerçekimi ve manyetizma gibi fiziksel kuvvetlerin etkileri (10); kültürlerin bazı hastalıkların teşhisinde kullanılmaları (5); dokuların greftleme için hazırlanması; kan ve kan hastalıklarının kökeninin saptanması (1); hücrelerin toksik maddelere reaksiyonları; bakteriyel enfeksiyonlara ve parazitlere hücrelerin cevaplarının saptanması; bağışıklığı sağla-

yan bazı maddelerin kökenlerinin bulunması; hücrelerin karşılaştır-
malı biyokimyalarının çalışılması; hormonların ve diğer hücreysel
ürünlerin ince yapılarının ve davranışlarının açıklanması; antiseptik-
ler, antibiyotikler, narkotikler ve benzeri diğer medikal maddelerin
hücreler üzerindeki etkilerinin saptanması; virüs çoğalmasının kine-
tiğinin saptanması (4); virüs mutasyonlarının in vitro incelenmesi;
hücreysel transformasyonların detaylı kinetiğinin çalışılması; klonal
popülasyon hücrelerine kültür işleminin etkilerinin incelenmesi (8);
normal ve malign hücrelerarası benzerlik ve ayrıcalıkların incelen-
mesi; in vitro fertilizasyon (2)...

KÜLTÜR İÇİN GEREKLİ KOŞULLAR :

Laboratuar, kullanılacak araç - gereçler ve temizleme ve sterili-
zasyon koşullarını içermektedir.

Doku Kültür Laboratuvarı; Kültür üniteleri de denen güvenlik
kabini ile steril oda ve kültür işleminde kullanılacak kalıcı materya-
lin bulunduğu serbest sahaları-ki bunlara biyokimyasal, sitolojik ve
fotoğraf işlemlerinde kullanılanlar, yıkama ve sterilizasyon madde-
leri dahil değildir-kapsar. Kültür üniteleri, her çeşit konfigürasyon-
da-tüm oda ünitesinden, laboratuvarın belli bir kısmına yerleşebilen
ünitelere kadar-ticari olarak bulunur. Birçok hücre kültürü işlemleri
ise temiz, yoğun trafiğe maruz kalmayan yerdeki basit bir tezgah üze-
rinde gerçekleştirilebilir. Daha detaylı veya zararlı ajanların kulla-
nılacağı çalışmalarda ise bu koşullar yeterli olmayabilir. Güvenlik
kabini içindeki çalışma sahası ve bu sahadaki germisidal lamba, gaz,
vakum, ve elektrik donanımı gibi materyalin uygun olması gerekir. Çalı-
şma sahası paslanmaz çelik ya da formika olmalıdır, çünkü bu yü-
zeyler tozu minimal düzeyde toplar ve dezenfektanlar ile defalarca yı-
kanabilirler. Laboratuar, laminar hava akımı ile havalandırılmalıdır.
Bu amaçla «yüksek verimli partikül filtreleri» (high efficiency par-
ticle filters-HEPA) kullanılır. Bu sistemde oda içinde hava dönüşümü
tabandan tavana doğrudur, tavandan alınan hava filtreden geçtikten
sonra laminar hava akım kabinesinden dışarıya verilir. Bu şekilde çalı-
şan kişinin soluduğu hava ile çevre havası, ters akım nedeniyle oda
içerisine giremez. Laboratuarda, odalar kayan-kapılar ile donatılma-
lıdır, yerler, duvarlar ve tavanlar yıkanabilir olmalıdır. Yıkama günde

iki kez, (sabah-akşam) çapraz kontaminasyonu önleyecek şekilde olmalıdır. Özel hücre kültür prosesleri uygulanacağı zaman, kullanılacak malzemeler işleme başlamadan on-onbeş dakika önce, kültür ünitesine konmuş olmalıdır. Hernekadar bu aletlerin sterilizasyon ve dezenfeksiyonları önceden yapılmış ise de, getirecekleri partiküller böylece on-onbeş dakikalık süre içinde laminar hava akımı ile ortamdan temizlenir.

Kültür odalarında sabit 37°C'lik sıcaklık sağlanmalıdır. Kültür işleminde kullanılacak araç-gereçlerin depo edildiği oda, laboratuvar içinde olmalıdır. Temel doku kültürü operasyonlarında gerekli araç-gereçler, başlıca inkübatör, mikroskop, hücrelerin dinlenmelerini sağlayan materyal ve hücrelerin içinde büyüdüğü kültür damarları olarak sayılabilir. İnkübatör, ısıyı regüle eden basit tiplerden, ısı, nem ve CO₂ düzeylerini ayarlayabilen tiplere kadar herhangi birisi olabilir. Herhangi bir elektrik kesilmesinde devre kapanmamalıdır. Eğer kullanılacak doku kültürü ortamı, tamponlama için CO₂ dengesi gerektiriyorsa, o zaman CO₂ inkübatörü gerekir. İnkübatör eşit ısı dağılımı sağlamalıdır, bu amaçla horizontal hava akımlı olanlar hem ısı, hem de CO₂ açısından eşit dağılım sağlamaktadırlar. Mikroskop, kültürlerin morfolojik ve büyüme hızlarının günlük incelenmeleri için çok önemlidir. Bu mikroskop ters (inverted) ve faz-kontrast olmalıdır. Bunların dışında bir diseksiyon, bir de bileşik mikroskoba sahip olmak, araştırmacıya avantaj sağlar. Mikroskopla günlük kültür gözlemine önem vermeyen merkezler, kültürlerin yabancı hücrelerle istilasına maruz kalırlar. Bu kontaminasyona en sık HeLa hücre dizisi ile rastlanmakta; hızlı büyüme ve çoğalma yeteneğindeki bu hücreler, kültürde bir anda dominant hücre olmaktadır.

Bugün çoğu kültürler, sıvı nitrojenin verdiği imkanlarla yıllarca dondurulabilmektedir. Saklanabilmeleri için özel plastik kryotüplerde veya özel plastik torbalarda tutulur ve bu halde dondurulup, kriyojenik depolarda saklanırlar. Kültür damarlarından, polisitren plastik ve soda camından imal edilenler, ucuz ve atılabilir olup borosilikattan yapılanlar ısıya daha dayanıklı ancak atılabilir değildir. Bunların sterilizasyonlarını mükemmel yapma zorunluluğu, çoğu kültürçüyü ilk gruptan imal edilenleri kullanmaya yöneltmiştir. Çeşitli boyuttaki petri plakları, kültür flaskları, plastik tüpler ve çok kuyulu* (multiwell)

* : Terim yazarlar tarafından kullanılmıştır.

plaklar bunlara örnek sayılabilir. Kullanılacak sistem ve materyal, üretilecek hücrelerin (ya da dokunun) özelliklerine göre -ki bu özelliklerden ileride bahsedilecektir- kültürü yapan kişinin seçimine kalmıştır. Sonuç olarak 10^8 hücre/ml, hücre yoğunluğuna ulaşılabilir. Kullanılacak materyalin sterilizasyonu da çok önemlidir. Tecrübeler göstermiştir ki, ilk defa kullanılan cam malzemeye hücreler yapışmakta daha durgun kalmaktadır. Hatta Rappaport'un bu nedenle, kullanacağı cam materyali önceden hücre içermeyen media ile inkübe ettiği, bundan sonra kültür işleminde kullandığı bilinmektedir. Bu işlem, hücrelerin yeteri kadar hidrolize olup, yapışma için gerekli negatif yükün sağlanmasına neden olur (3).

Kültürde kullanılan cam malzemenin temizliği; ultrasonik veya diğer yollarla yapılır. Diğer yollar kapsamına alkaliler ile kaynatma, daha hafif alkali deterjanlar kullanma veya sıcakoksidedici asitler ile muamele girer. Yıkamadan sonraki son çalkalama mutlaka saf su ile yapılmalıdır. Temizlenmiş cam malzemelere asla elle dokunmamak gerekir, çünkü bu yüzeylerin derinin yağını almalarına neden olur. Bu amaçla lastik eldivenler giyilmelidir. Cam yüzeylerdeki en ufak bir polar olmayan kısım bile hücrelerin yapışmalarına ve dolayısıyla yayılma ve çoğalmalarına engel olabilir. Bu aşamadan sonra sterilizasyon safhasına gelinmiş olur. Kurutma masaları veya kurutma fırınları ile kurutulan cam materyal ya kağıt yada alimünyum folye ile kaplanmalı ve pipetlerin içi pamukla doldurulduktan sonra, temiz bir kapalı ortamda depo edilmelidir. Sterilizasyon işlemi ya kuru ısı ile fırında veya nemli ısı ile otoklavda yada herikisi ile birden yapılabilir. Bugün kullanım kolaylığı nedeniyle otoklavlar ile sterilizasyon tercih edilmektedir. Otoklavda da dikkat edilmesi gereken fazla buhar kullanılarak, ortamı yeniden kontamine etmemektir. Bu amaçla içerideki buharı filtre eden otoklavlar tercih edilmelidir.

KÜLTÜR ORTAMI (MEDIA) :

Hücre ve dokuların media'ya alınmasından önce, dengeli tuz solüsyonları (BSS) kullanılır. BSS'in işlevleri, doku ve hücreleri yıkama ve sulandırma (dilue etme) ve bu sırada hücre tonüslerini koruma, tampon görevini yapma ve fizyolojik pH sınırını ve osmotik basıncı koruma, normal hücre metabolizması için gerekli olan su ve inorganik

iyon ihtiyacını gidermektir. BSS'ler piyasada steril solüsyonlar veya toz halinde mevcuttur (9). BSS seçiminde gözönüne alınması gereken noktalardan ilki, solüsyonun bikarbonat içerip içermeyeceğidir. Aşamalar atmosfer koşullarında yapılacaksa, bikarbonat tamponuna gerek yoktur, çünkü aksi halde CO₂'nin kaybı ile solüsyon çok alkali hale gelecektir. CO₂ içeren atmosfer koşullarında çalışılacaksa, erimiş CO₂'nin ortamı çok asitleştirmemesi için, bikarbonat tamponlu bir BSS kullanmak gerekecektir (3). Ortam pH'sının kontrolü açısından, BSS fenol kırmızısını visual indikatör olarak içerebilir. Seçimde gözönüne alınması gereken bir başka nokta, glukozun BSS'de olup olmayacağıdır. Dokunun ekstirpe edilmesi ile büyüme ortamına konması arasında geçen süre düşünülerek tercihin yapılması gerekir. Eğer süre uzunsa, BSS glukoz içermelidir. Divalan katyonlar olan kalsiyum ve magnezyumun, solüsyonda bulunup bulunmayacağı da gözönüne alınmalıdır. Bu katyonların intrasellüler matriksin stabilitesine yol açtığı ve bu nedenle de hücreler ile ortam arasındaki madde alışverişine ters etki ettiği ispatlanmıştır. Bugün kullanılmakta olan çoğu media, bahsedilen BSS'lere serum (at, dana, buzağı, insan; 2-20 %) ilavesiyle elde edilmiştir (1). Tip ve yapılarına bakmadan, neler eklendiği gözönüne alınmadan şu söylenebilir ki, media çeşitli besinlerin, hormonların veya büyüme faktörlerinin BSS'e eklenmiş halidir. Genel olarak BSS'ler, doku ayrılmalarının ara safhalarında ve hücrelerin büyüme media'sına konmadan önceki son çalkalanmasında kullanılmaktadırlar.

Doku kültürü çalışmalarını daha iyi anlayabilmek için, hücreler aşağıdaki kriterlere göre sınıflandırılırlar;

- a) Karyotip : Hücreler diploid mi ,anöploid mi?
- b) Çoğalma potansiyelleri : Hücrelerin sınırlı bir çoğalma potansiyelleri mi var, yoksa devamlı mı çoğalıyorlar?
- c) Çoğalmanın yoğunluğa bağlı inhibisyonu : Kültürler çok kalabalıklaşınca, hücreler sikluslarını G₁ veya G₂ fazında durduruyorlar mı, yoksa çoğalmaya devam edip, birbirlerini üzerinde kümeler yapıyorlar mı?

d) Demir atmaya bağımlılık* (anchorage dependence) : Hücreler çoğalmak için bir substrata yapışma ihtiyacı gösteriyorlar mı, yoksa süspanسیون kültürlerinde mi çoğalabiliyorlar?

e) Malignite : Hücreler malign mi, benign mi?

f) Diferansiyasyon : Hücreler kültürlerde, dokulardaki spesifik özelliklerini gösteriyorlar mı?

Bu kriterleri gözönüne alarak hücreler, tam olarak normal hücrelerden (fully normal cell) klasik kalıcı hücre dizisine (classical permanent cell line) kadar geniş bir spektrum gösterirler. «Tam olarak normal hücre» diploiddir, sonlu bir hayatı vardır, demir atmaya bağımlıdır, yoğunluğa bağlı olarak çoğalması inhibe olur ve malign değildir. «Klasik kalıcı hücre dizisi» ise anöplöiddir, sonsuz çoğalma yeteneği gösterir, demir atmaya bağımlı değildir, yoğunlukla çoğalması inhibe olmaz ve maligndir. Ancak her hücre bu sabit sınıflandırmaya uymayabilir. Ör. : Kondrositler ve bazı kanla ilgili hücreler, normal kabul edilmelerine rağmen, demir atmaya bağımlı değildirler, keratinositler ise yoğunluğa bağlı çoğalma inhibisyonu göstermezler. Bazı kalıcı hücre dizileri ise (ör : 3T3) anöplöid ve sonsuz çoğalma yetenekleri olmasına rağmen, demir atmaya bağımlıdır, yoğunlukla çoğalmaları inhibe olur ve çoğu testlerle malign değildirler. Bu tip hücrelerin özellikleri, onkojenik virüsler kullanılarak transforme edilebilir. Bu nedenle bunlara transforme edilirlerse, «transforme kalıcı hücre dizileri», transforme edilmemişlerse de «nontransforme kalıcı diziler» denir. İdeal olarak «normal» terimi, sadece hücrelerin yukarıda sayılan tüm özelliklere uyduğu hallerde kullanılır. «Nontransforme» terimi ise, normal hücrelerden bahsedilen kriterlerin bir yada ikisine uymayan hücrelere uygulandığı gibi, kalıcı hücre dizilerinden, transformasyon kriterlerinden bir yada birkaçını göstermeyenlerine de uygulanmaktadır.

Bu sınıflandırmanın önemi, hücrelerin buldukları sınıfa göre, değişik büyüme maddelerine ihtiyaç göstermeleri, yani değişik media'da yaşatılma gereksinimleridir. Ör : tam olarak transforme edilmiş bir kalıcı hücre dizisi, «kimyasal olarak tanımlanmış media»da yaşatılabilinen tek hücre dizisidir. Buna karşın, normal hücreler ve

* : Terim yazarlar tarafından kullanılmıştır.

nontransforme diziler, günümüzde hala tam olarak içeriği açıklanamayan serum, serum proteinleri yada diğer birçok biyolojik materyalin bulunduğu media'da yaşatılabilmektedir. Media, hücrelerin büyüme gereksinimlerinin karşılanabilmesi için şu ana başlıkları içeriyor olmalıdır;

1 — Tüm gerekli besin maddelerini içermelidir. Bunlar enerji metabolizması için gerekli substratlar, vitaminler, eser elementler, iyonlar vb.dir.

2 — Fizyolojik parametreler; ısı, pH, osmolalite, redoks potansiyelleri kabul edilebilir sınırlarda olmalıdır.

3 — Kültür sistemleri toksik ve inhibitör etkili maddeler içermemelidir, bunlara gerekli komponentlerin aşırı miktarları da dahildir.

4 — Kültür sisteminin içerikleri arasında bir denge olmalıdır.

5 — Serum, bazı sistemlerde gereklidir. Bu konu detaylı olarak tartışılacaktır.

Şu nokta unutulmamalıdır ki, hücreler bu sayılan kriterlerden, «hepsinin birden» yerine getirildiği durumlarda çoğalırlar. Yakın zamana kadar, hayvan hücrelerinin in vitro kullanılan media içeriği, hemen tamamının organizmadan elde edildiği maddelerdi. Bunlar, kan plazması, serum, diğer vücut sıvıları ve eksudaları ile doku ve organların ekstratlarıdır. Doku kültürlerinin amaçlarından biri hücrelerin büyüme ve yaşatılmaları için ihtiyaçları olan besin maddelerinin saptanması ve ortamdaki bazı maddelerin hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesi olduğundan, bu tip media içerikleri, doğal besinlerin karmaşıklığı nedeniyle, bu amaca uygun sayılmazlar. Bu içerikler besin maddeleri olduğu kadar, diğer bazı partiküller de olabilir. Bu amaca uyan, yani içeriklerinin tam olarak bilindiği ve hücrelerin büyüme ve yaşatılabilmelerine bu içeriklerin etkileşimlerinin ve hücreler üzerinde ne değişiklikler yaptığının açıklanabildiği maddeleri içeren media'ya «kimyasal olarak tanımlanabilen media» (chemically defined media) denir. Kimyasal olarak tanımlanabilen media, aşırı bir hücre çoğalmasının gerekli olmadığı durumlarda yada böyle bir çoğalmaya ihtiyaç duyuluyorsa, protein eklenmek suretiyle kullanılır.

Günümüzde hala «tanımlanmış» ideal bir media yoktur, birçok kontaminantların bu gibi media'ya karışabilmesi, bu terimi kullanırken, otörleri düşündürmektedir. Bahsedilen anlamda kimyasal olarak tanımlanmış media'daki, günümüzde yapılan diferansiye tümör serileri çalışmaları hakkında çok az yayın vardır. Bunun gibi süspansiyon kültürleri için kullanılanların çoğu serum desteğine ihtiyaç duymakta olduğundan pek geniş kullanım alanı bulamamıştır. Bugün kullanılmakta olan kimyasal olarak tanımlanmış media'lar;

1 — Dengeli tuz solüsyonlarına glüköz ve antibiyotiklerin, enzimatik hidrolazların, maya ekstrelerinin, peptonların, kan-serum fraksiyonlarının ve diğer materyallerin eklenmesiyle elde edilen media (1,7).

2 — Kimyasal olarak tanımlanabilen media'ya bir yada birkaç çeşit proteinlerin eklenmesiyle elde edilen media.

3 — Bazıları da geleneksel kan plazması, embryo doku ekstreleri ve dengeli tuz solüsyonlarının üçlü karışımlarını içeren mediayı kullanmaktadırlar (2).

Plazmanın günümüzde hala kullanılma nedenlerinden bir tanesi, hücrel çoğalma için gerekli olan peptid hormonları veya hormon benzeri büyüme faktörleri ve diğer proteinleri sağlamasıdır. Moleküller rekombinant DNA tekniği ile yapıları açıklanan bu peptid büyüme faktörleri (epidermal büyüme faktörü, eritropoetin, interlökin -3,-6, fibroblast büyüme faktörü vb.) günümüzde ticari olarak da elde edilmeye başlanmış ve doku kültürlerinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar, bunların karakterlerini ve saflaştırılmalarını da içermektedir. Normal diploid hücrelerin kimyasal tanımlanabilen media'daki, bu gibi purifiye makromoleküler faktörlerin nanogram/ml düzeylerde eklenmesi ile yaşatılabilmesi artık mümkündür. Media'da bu sayılan ihtiyaçlardan başka, ısı, pH, CO₂ ve O₂, nemlilik vb fiziksel gereksinimler de vardır.

«Klonal hücre», ayrı özellikleri taşıyan tek bir ata hücreden oluşmuş, yani klonal büyüme sonrası gelişmiş bir klona ait hücrelerdir. «Klonlama» terimi, sadece bir tek hücrenin torunlarından, yeni bir kültürün yaratılmasını anlatmak için kullanılmalıdır. Tek bir hücreden klonilerin oluşturulmasını da içeren tüm diğer deneyler «klonal büyü-

me» olarak adlandırılır. Klonlama ve klonal büyümeyi de içeren tüm deneyler, ya bir sıvı medium'un altındaki solid substrata yapışmış yada yumuşak agar gibi yarısolid media'da süspansiyona uğratılmış hücrelerle yapılır. Bir substrata yapışmış hücrelerden oluşmuş yoğun kültürlerle sıklıkla «monolayer kültürler» denir. Monolayer kültürlerdeki hücre tarlası, sadece hücrelerin üzerinde büyüdüğü yüzeyden ibarettir. Süspansiyon kültürleri, hücrelerin bir substrata yapışmadığı kültür damarının sürekli çalkalanması yada karıştırılmasının sağlandığı sistemlerle yapılır. Bu sistemlerin büyüklükleri çok değişik boyutlardadır. Süspansiyon kültürlerinin avantajları, monolayerlara oranla çok daha fazla hücre içerebilmeleri ve hücrelerin monolayer'larda olduğu gibi harmanlanmak için enzimlere ihtiyaç göstermemeleridir. Bazı spesifik hücre tipleri ise, yapışmamak için karıştırılma ve çalkalama gibi tekniklere ihtiyaç duymazlar. Hücre popülasyon yoğunluğu ve yapışma yada süspansiyonda büyüme, hücrelerin büyüme ihtiyaçlarına etki eden en önemli faktörlerdir. Ayrıca süspansiyon kültürlerinde, kültür süresi içinde mediumu değiştirme ve ekleme olanağı vardır.

Çoğu hücre tipleri, belli bir popülasyonda çoğalmalarını durdurur yada yavaşlatırlar. Buna «yoğunluğa bağlı inhibisyon» denir. Bu özellik nontransforme hücrelerde malign transformasyona gitmişlere göre daha belirgindir. Yoğunluğa bağlı inhibisyonun mekanizması henüz tam olarak açıklanamamakla birlikte, hücre teması, lokal yada genel olarak besin maddeleri veya makromoleküler büyüme faktörlerinin azalmaları, hücre kökenli inhibitörlerin artması gibi nedenler sayılabilir. Hücre popülasyon yoğunluğu besin maddelerinin azalması ve artıkların çoğalması gibi problemleri beraberinde getirir. Klonal büyümede bu önemli bir sorun olmasa da, kalabalık monolayer ve süspansiyon kültürleri için önemlidir. Bu tip kültürlerde glükoz ve aminoasitler gibi besin maddelerinin düzeylerinin ölçümü, yada asitler gibi bazı hücre artıklarının miktarlarının saptanması, büyümenin daha fazla inhibe edilmeden gerekli önlemlerin alınabilmesini mümkün kılar. Bunlardan da daha basit bir test, taze media eklenmesidir. Hücrelerin kültür damarlarına yapışmaları, media'da düşük kalsiyum seviyesi bulundurarak sağlanabilir. Süspansiyon kültürleri kal-

siyumdan fakir, monolayer'lar ise zengin kùltùrlerdir. Divalan katyonlar, hücre yapışmalarını arttırlar. Yapışmanın olduğu kùltùrlerde görùlen bir özellik, hücrelerin geniş bir yüzeye «yatmalarına» bağlı olarak besin alımında daha verimli olmalıdır.

Memeli hücrelerinin in vitro olarak çeşitli fazlarının çalışılmasında bakteri, maya ve mantar kontaminasyonları çok zararlıdır. Bu nedenle media içerikleri arasında antibiyotik ve antimikotikler yer alır. Pratikte en çok kullanılanlar penisilin G, dihidrostreptomisin, gentamisin, tylosin ve Amphotericin B'dir.

ÖZET

Bu derlemede amaç doku kùltùrlerine, kullanılan terimler, araç ve gereçler, laboratuvar ile, media'nın açıklanması yoluyla genel bir giriş yapmak olmuştur. Doku kùltürü tekniklerinin ve bunlarda kullanılması gereken media'nın seçiminde gözönüne alınması gereken faktörler, ikinci bir çalışmada sunulacaktır.

SUMMARY

An Introduction to Tissue Cultures

In this paper, we tried to make an introduction to tissue cultures by explaining the terminology, materials and methods, laboratory and media. Information about techniques and the selection factors considered while choosing the media will be given on a second paper.

KAYNAKLAR

1. Colleoni M : Further investigations on serum ultrafiltrate as medium for tissue preparation in vitro. *Dev Biol Stand* 1985; 60 : 35-43.
2. Gianaroji L. : The successful use of human amniotic fluid for mouse embryo culture and human in vitro fertilization, embryo culture and transfer, *Fertil Steril* 1986 Nov; 46 (5) : 907-13.
3. Jacoby-Pastan : *Methods in Enzymology*, Vol LVIII Cell Culture, Academic Press, 1979, 1-233.

4. Jayme D : Culture media for propogation of mammalian cells, viruses and other biologicals, Adv Biotechnol Processes 1985; 5 : 1-30.
5. Laerum O.D. : Cell and tissue culture of the nervous system : Recent developments and current applications, Acta Neurol Scand, 1985 : 72 : 529-49.
6. Landmark Article., JAMA 1911; 57 : 1611, Rejuvenation of culture of tissues, by Alexis Carrel. Najafi H, JAMA 1983, 26 (250) : 1085-9.
7. Mc Leod A : Use of plasma protein fractions as serum substitutes for in vitro cell culture, Dev Biol Stand 1985; 60 : 55-61.
8. Parker : Methods of Tissue Culture, Hoeber, 1961, 1-222.
9. Sigma Kataloğu, 1989 : 1491-96.
10. Vertebrate cell culture I, Adv Biochem Eng Biotechnol 1987; 34 : 1-166.