

# Hücre Kültürünün Temel Prensipleri ve Laboratuvarın Tanıtımı

H. Seda VATANSEVER

# Niçin Hücre Kültürü-Avantaj

---

- ▶ Kontrol edilebilir
- ▶ Tekrarlanabilir
- ▶ Karakterizasyonu kontrol edilebilir
- ▶ Ekonomik
- ▶ Çalışma programlanabilir



# Niçin Hücre Kültürü-Dezavantaj

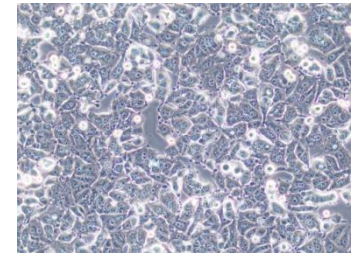
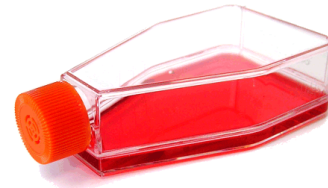
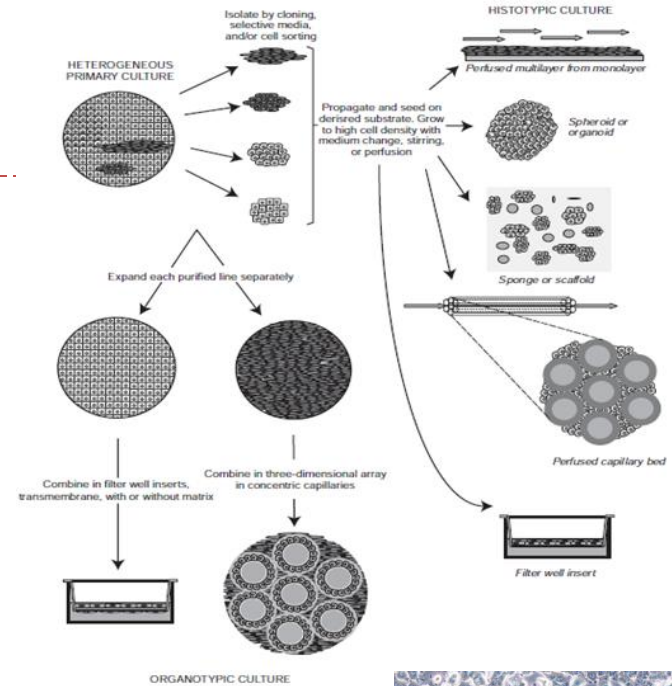
---

- ▶ Aseptik koşulların sağlanması
- ▶ Deneyimli olmak
- ▶ Kalite ve kantite
- ▶ Maliyet
- ▶ Hücrelerin karakterizasyonlarının değişmesi
- ▶ Kromozomal anomalilerin olması



# Hücre Kültürü

- ▶ **Histiyotipik kültürler**
  - ▶ Aynı hücre tipinden oluşmuş kültürler
- ▶ **Organotipik kültürler**
  - ▶ Farklı hücre tiplerinin bir arada yapıldığı kültürler
- ▶ **Monolayer kültürler**
  - ▶ Destek materyale ihtiyacı olan kültürler
- ▶ **Süspansiyon kültürler**
  - ▶ Destek materyaline ihtiyaç duymayan kültürler



# Laboratuvar Nasıl Olmalı

---

- ▶ Asepsiye dikkat edilmeli
- ▶ Steril alan
- ▶ Tozdan uzak olmalı
- ▶ Kalabalık olmamalı



# Laboratuvar Alanı

---

- ▶ Havalandırma
- ▶ İnsan sayısı
- ▶ Oda büyüklüğü
- ▶ Aseptik alan
- ▶ Çeker ocak
- ▶ İnkübasyon
- ▶ Hazırlık alanı
- ▶ Saklama

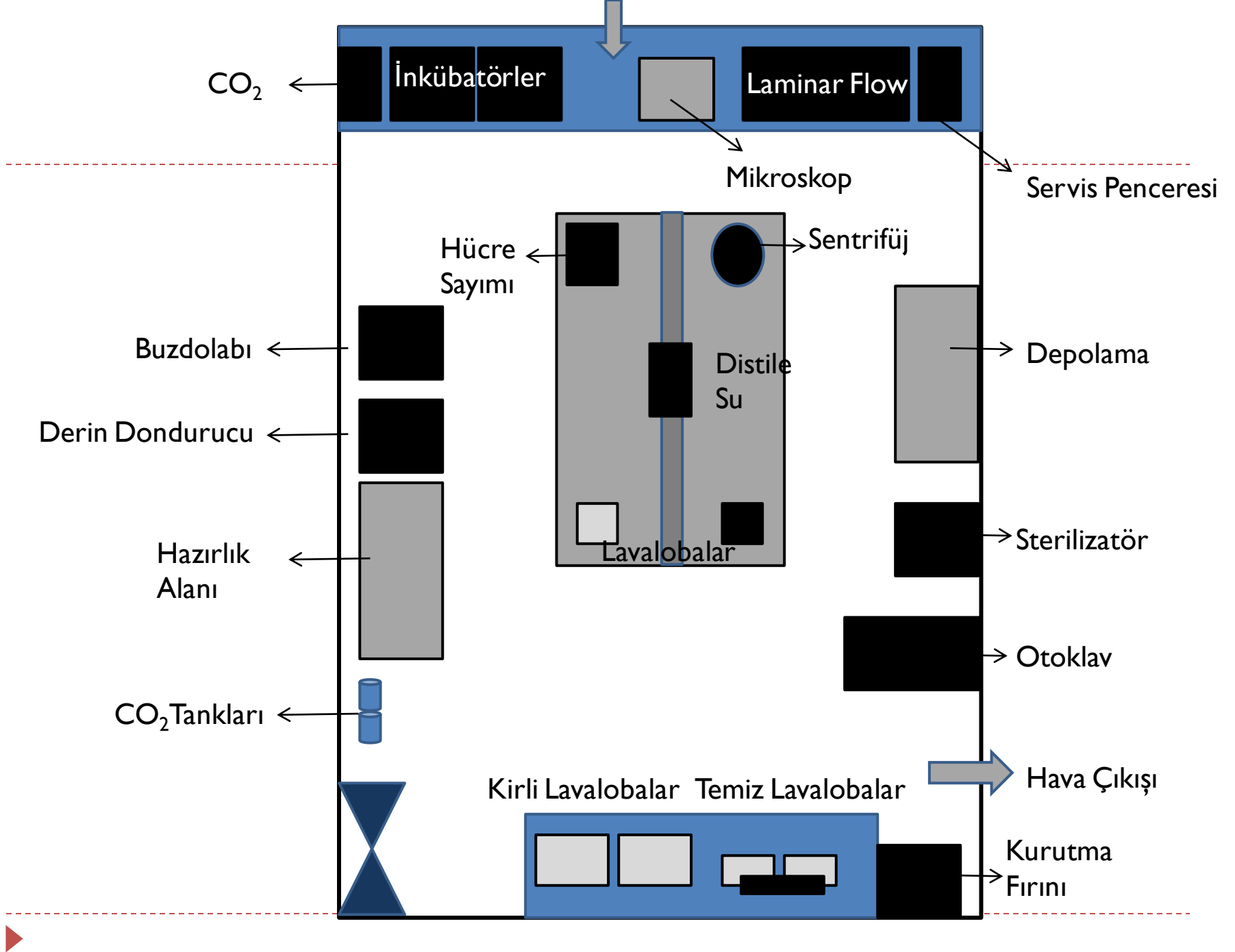


# Oda Büyüklüğü

4:2:1:1

- ▶ Kültürün esas yapıldığı alan
  - ▶ Biyogüvenlik kabini
  - ▶ Hücre sayım cihazları
  - ▶ Sentrifüj
  - ▶ İnkübatörler
  - ▶ Mikroskop
  - ▶ Kültür kapları
  - ▶ Kültür vasatları
- ▶ Hazırlık ve yıkama alanı
- ▶ Depo
- ▶ İnkübasyon







# Pencere

---

- ▶ Tercih edilmez
- ▶ UV ışınının girmesi
- ▶ Sıcak hava girişi
- ▶ Hava akımı olması



# Temiz Oda

## ▶ Standart için

- ▶ Amerikan standartları, 209 denilen federal standart
- ▶ Alman standartları, DIN 1946/4, VDI 2167, 2080, 2083
- ▶ Avrupa standardı, ISO 14644

Federal Standard 209E Airborne Particulate Cleanliness Classes											
Class Name		Class Limits									
SI	English	0.1µm		0.2µm		0.3µm		0.5µm		5µm	
		Volume units	Volume units	Volume units	Volume units	Volume units	Volume units	Volume units	Volume units	Volume units	Volume units
		m <sup>3</sup>	ft <sup>3</sup>	m <sup>3</sup>	ft <sup>3</sup>	m <sup>3</sup>	ft <sup>3</sup>	m <sup>3</sup>	ft <sup>3</sup>	m <sup>3</sup>	ft <sup>3</sup>
M1		350	9.91	75.7	2.14	30.0	0.875	10.0	0.283	—	—
M1.5	1	1,240	35.0	265	7.50	906	3.00	35.3	1.00	—	—
M2		3,500	99.1	757	21.4	309	8.75	100	2.83	—	—
M2.5	10	12,400	350	2,650	75.0	1,060	30.0	35.3	10.0	—	—
M3		35,000	991	7,570	214	3,090	87.5	1,000	28.3	—	—
M3.5	100	—	—	26,500	750	10,600	300	3,530	100	—	—
M4		—	—	75,500	2,140	30,900	875	10,000	283	—	—
M4.5	1,000	—	—	—	—	—	—	35,300	1,000	247	7.06
M5		—	—	—	—	—	—	100,000	2,830	618	17.5
M5.5	10,000	—	—	—	—	—	—	353,000	10,000	2,470	70.0
M6		—	—	—	—	—	—	1,000,000	28,300	6,180	175
M6.5	100,000	—	—	—	—	—	—	3,530,000	100,000	24,700	700
M7		—	—	—	—	—	—	10,000,000	283,000	61,800	1,750

ISO/TC209 14644-1 Airborne Particulate Cleanliness Classes						
	Concentration Limits (particles/m <sup>3</sup> )					
	0.1µm	0.2µm	0.3µm	0.5µm	1µm	5µm
ISO Class 1	10	2				
ISO Class 2	100	24	10	4		
ISO Class 3	1,000	237	102	35	8	
ISO Class 4	10,000	2,370	1,020	352	83	
ISO Class 5	100,000	23,700	10,200	3,520	832	29
ISO Class 6	1,000,000	237,000	102,000	35,200	8,320	293
ISO Class 7				352,000	83,200	2,930
ISO Class 8				3,520,000	832,000	29,300
ISO Class 9				35,200,000	8,320,000	293,000



# Temiz Oda

---

- ▶ Belirli bir hacim içerisinde hangi tanecik büyüklüğünün ne kadar olduğu önemlidir.
- ▶ HEPA filtreler 0,3-0,5 mikron gözeneğe sahip olup, bazı büyük bakterileri tutabilecek filtreleme özelliğine sahiptir, ancak virüsleri ve küçük bakterileri tutamaz.



**HEPA Filtrenin İç Yapısı**



# Filtrasyon Spektrumu

## Mikrofiltrasyon

70  $\mu\text{m}$ /50  $\mu\text{m}$ /20  $\mu\text{m}$

**Görülebilir Partiküller**

8  $\mu\text{m}$ /5  $\mu\text{m}$ /3  $\mu\text{m}$

**Hücre**

1  $\mu\text{m}$ /0.8  $\mu\text{m}$ /0.65  $\mu\text{m}$

**Maya  
Küf**

0.45  $\mu\text{m}$ /0.2  $\mu\text{m}$

**Bakteriler**

**Mycoplasma**

0.1  $\mu\text{m}$

**Kolloid**

**Virüs**

300 KD

100 KD

**Protein**

30 KD

**Lipozom**

10 KD

**Pyrogen**

5 KD

**Peptid**

Ultrafiltrasyon

Ters Ozmoz

# Temiz Oda Kriterleri

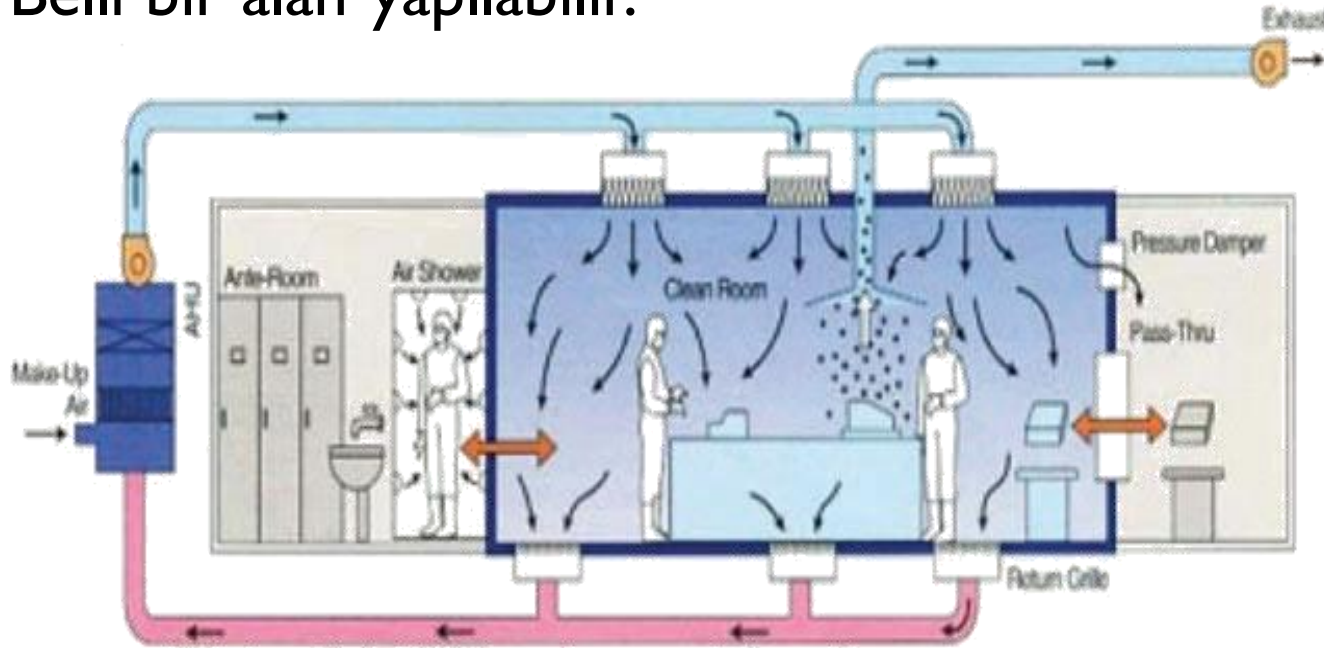
---

- ▶ Sıcaklık 20°C ile 24°C arasında ayarlanabilmeli
- ▶ Bağıl nem %50 - %60 arasında olmalı (özel şartlar belirtilmediği durumlarda)
- ▶ Laminar akışta HEPA filtre üzerindeki hava hızı 0,45m/s  $\pm$ %20 olmalı
- ▶ Oda içine %10-%15 fazla hava vererek pozitif basınç sağlanmalı
- ▶ Kapı, duvar ve tavanlarda sızdırmazlık sağlanmalı
- ▶ Sıcaklığın, nemin, akış hızlarının, toleranslarıyla birlikte belirli sınırlar içinde kalmalı
- ▶ Kapı ve duvar tabanlarının sızdırmaz olmalı



# Temiz Oda

- ▶ Hava akışı laminar, türbülanslı yada karışık şekilde olabilir.
- ▶ Türbülanslı akışta temiz ve kirli hava karışabilir.
- ▶ Pahalı odalar
- ▶ Belli bir alan yapılabilir.



# Temiz Odanın Kontrolü

---

- ▶ Sıcaklık
- ▶ Bağıl nem (% RH)
- ▶ Saatteki hava değişim sayısı
- ▶ Hava hızı (laminar air flow)
- ▶ Canlı ve cansız parçacık sayısı
- ▶ Ses ve gürültü
- ▶ Basınç farkları



# Havalandırma

---

- ▶ Çalışma alanında pozitif basınç
  - ▶ Eğer **insan** örneği kullanılıyor ise örnek etrafında negatif basınç olması gereklidir.
- ▶ Biyogüvenlik Kabinleri

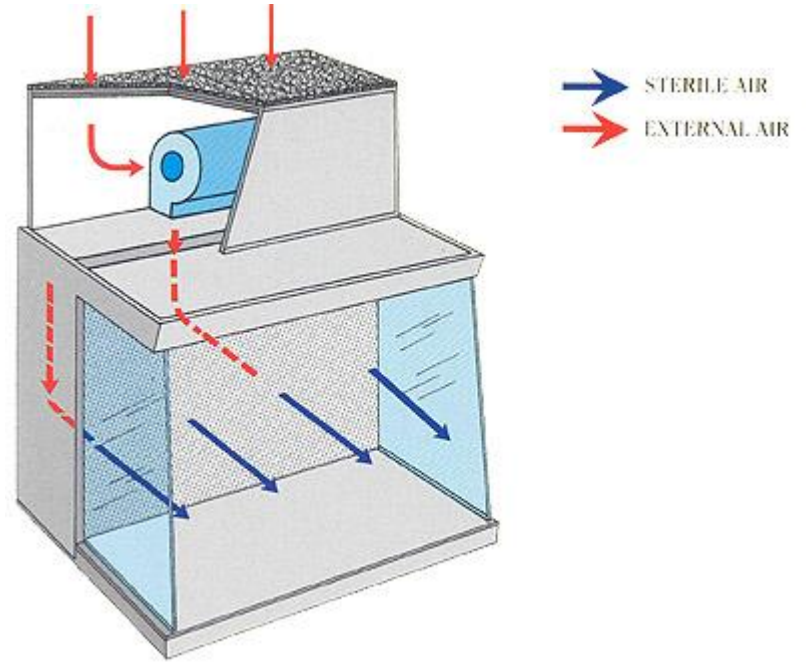




# MASA ÜSTÜ HAVA AKIŞ KABİNİ

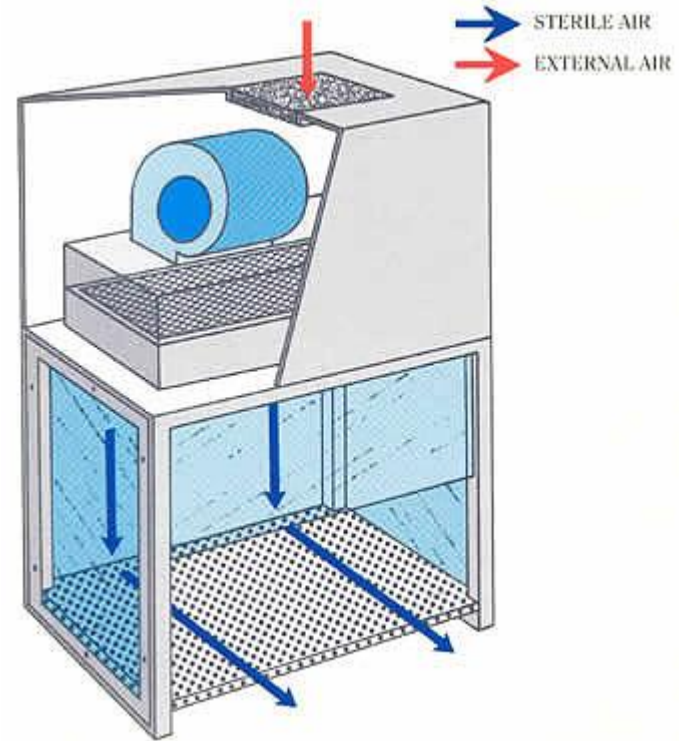
---

## ► Horizontal Laminar Hava Akış Kabinleri



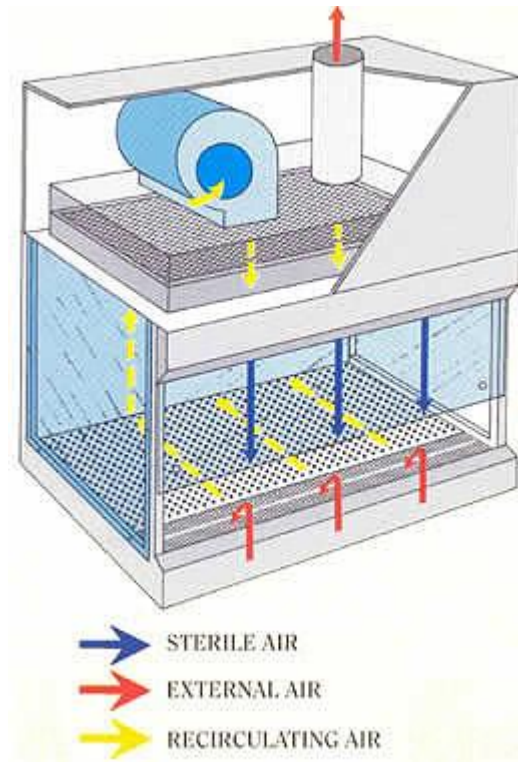
# DİKEY HAVA AKIŞ KABİNİ

- ▶ Mikrobiyoloji, Hücre Kültürü, Steril İşlemler



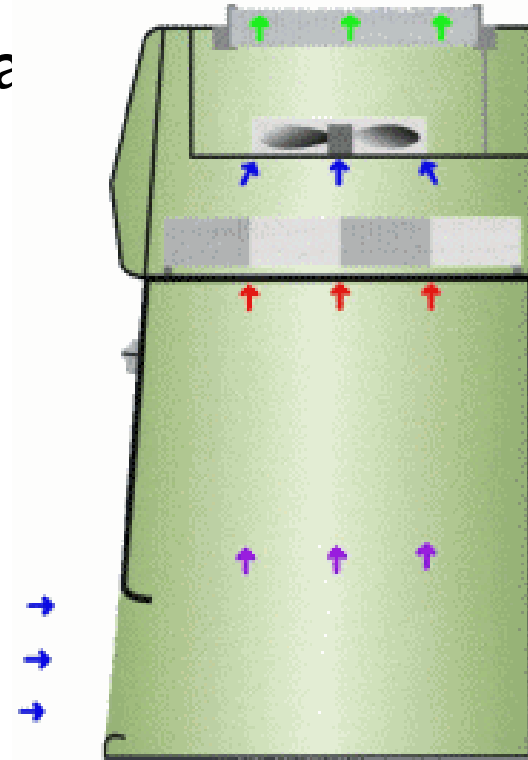
# DIKEY HAVA AKIŞ KABİNİ

- ▶ HEPA Filtreli
- ▶ Hücre Kültürü, zararsız biyolojik materyal



# Klas I

- ▶ Paslanmaz çelikten yapılmıştır
- ▶ Hava akımı içeride olup çalışma alanını geçip filtre ile bina havalandırılmasına veya dışarıya atılır.
- ▶ Havanın tekrar sirkülasyonu yoktur.
- ▶ İçerisinde bulunan filtre 1-5 mikron büyüklüğündeki partikülleri uzaklaştırabilir.
- ▶ Çalışanı koruyuculuğu zayıftır.



## Klas II

---

- ▶ Negatif ve pozitif basınçların oluşturulduğu laminar hava akımlı havalandırma sistemi, eksoz, radyal fan, Hepa filtre, aydınlatma sistemi ve UV lambası içerir.
  - ▶ Hepa filtreler sayesinde 0.12/0.30 mikronluk partikülleri tutabilme özelliğine sahip olmalıdır.
  - ▶ Kullanılan alanlar
    - ▶ Onkoloji
    - ▶ Mikrobiyoloji
    - ▶ Biyoteknoloji
    - ▶ Moleküler genetik
    - ▶ Viroloji
    - ▶ DNA analiz laboratuvarları için uygun tiptir.
- 



## Klas II

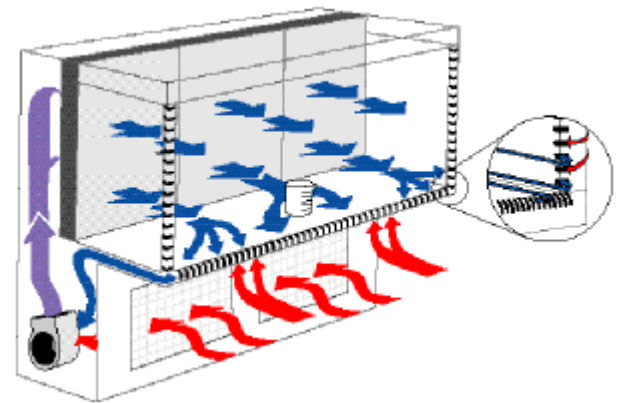
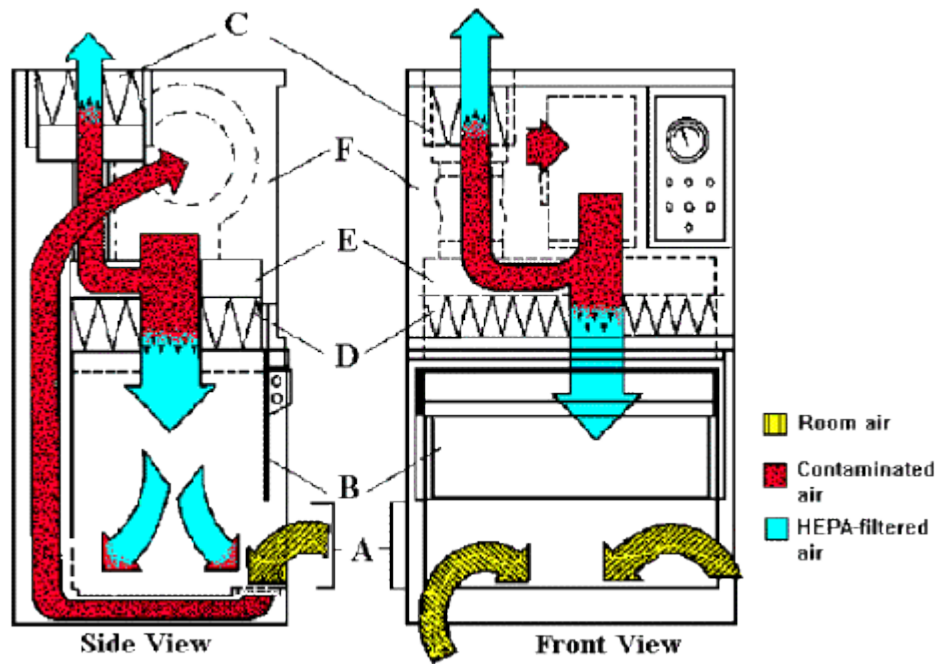
---

- ▶ Ulusal Sağlık Koruma kuruluşunun standartlarına uygun olarak tip A ve B olmak üzere iki tipi vardır.
- ▶ Klas tip II-A
  - ▶ Hava ön açıklıktan içeri girer ve dikey hava akımı ile ön hava alıcı ızgaraya geçer.
  - ▶ Hava yukarıda HEPA filtresi ile temizlenir.
  - ▶ Temizlenen hava aşağıya iner, çalışma yüzeyinde ikiye ayrılarak yarısı ön hava alıcı ızgaralara, diğer yarısı besleyici hava çıkarıcı ızgaralara girerek infeksiyöz partiküllerin ön açıklıktaki koruyucu hava perdesi ve atımdaki HEPA filtreleri yardımı ile laboratuvar ortamına kaçış engellenmiş olur.



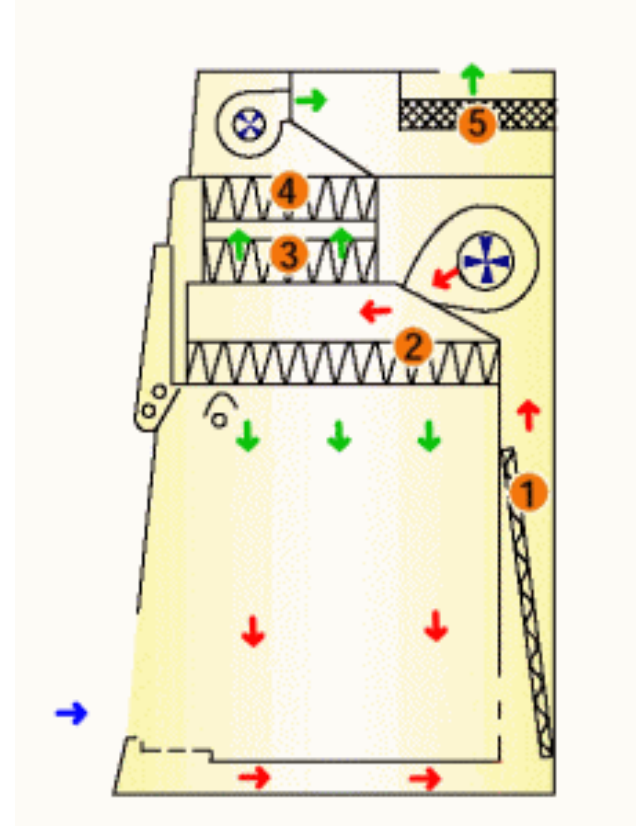
# CLASS II-B1

# CLASS II A-B3



# Klas II-B

- ▶ Her bir kabinde, laboratuvardan giren hava, Tip B1 hariç, öndeki hava alıcı ızgaradan geçerken HEPA filtreleri çalışma sahasının altına yerleştirilmiştir.
- ▶ Hava, üfleyici fanı, hava akım plakası ve üst plakayı dolaşmadan önce HEPA filtresinden geçer ve 30% tekrar sirkülasyona girerken 70% dış atılış filtresine gönderilir.
- ▶ Üfleyici motor, havalandırma ve havalandırma içindeki plakalar canlı partiküller içermez.
- ▶ “Yüzey hızı” tip A kabinlerinde 75 fpm iken tip B de 100 fpm dir.

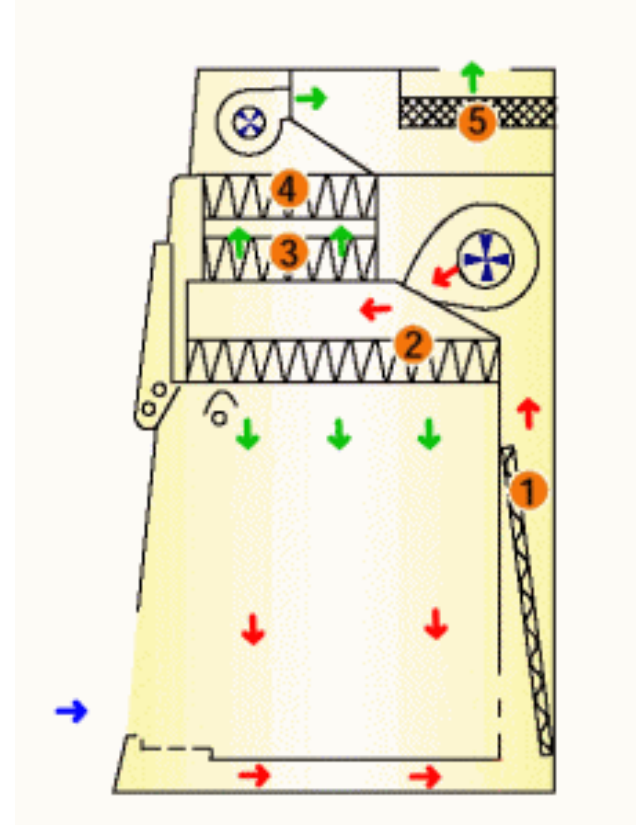


Fpm: Feet Per Minute



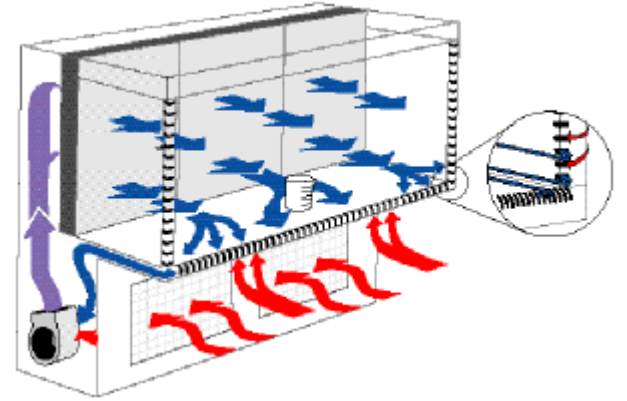
# Klas II-B2

- ▶ Tip B2 kabini tam bir dış atılım kabinidir.
- ▶ Hava, kabinin üstünden girer
- ▶ ve çalışma sahasındaki HEPA flitresine girmeden önce bir ön filtreden geçer.
- ▶ Filtre edilmiş hava kabin boyunca bir geçiş yapıp dış atım HEPA flitresinden atılır.
- ▶ Tekrar sirkülasyonun olmadığından bu sistem toksik kimyasallar ve radyonükleotidlerle işlenmiş biyolojik ajanlar için kullanılabilir.



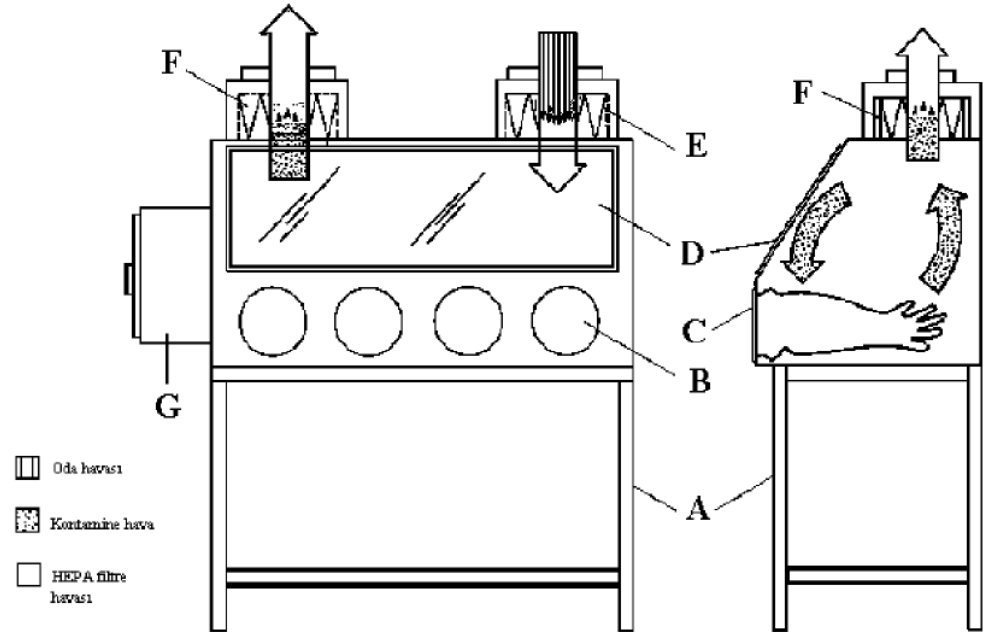
## Klas II-B3

- ▶ Tip B3 kabini aslında bir tip A kabinidir.
- ▶ Aşağıya doğru tekrar sirküle olan havanın hızı yaklaşık olarak 75 fpm'si olmasına rağmen hava HEPA filtresinden bir kanala atılır.
- ▶ Yüzey hızı 75' ten 100 fpm'ye yükseltilmiştir.
- ▶ Tip B3 kabini atılan havanın uzaklaştırılması için ayrı bir dış üfleyici gerektirmektedir.



# Klas Tip III

- ▶ Önü kapalı, paslanmaz çelikten yapılmış, kendinden havalandırmalı kabinler olup negatif basınç altında çalışarak laboratuvar ortamında bulaşıcı materyallere karşı kesin koruyucudur.
- ▶ Kol uzunluğunda eldivenler içerir ve hava HEPA filtrelerinden girip seri şekilde yerleşmiş 2 HEPA filtresinden veya tek HEPA filtresinin bir dış bağlantısı ile dışarı atılır.



# İnkübatörler

---

- ▶ İhtiyaca göre
- ▶ CO<sub>2</sub> ihtiyacı
- ▶ Nemli ortam



# Inverted Mikroskop

---



# CO<sub>2</sub> Tankları

---

- ▶ İnkübatörlere CO<sub>2</sub> sağlanması için tanklar ulaşılabilir yerde, olabilirse hücre kültürü odasının dışında olmalıdır. Tanklar üzerindeki basınç ve içeriğin miktarı hergün kontrol edilmesi gerekmektedir.



# Santrifüjler

- ▶ Hücre kültürü sırasında hücre açımı, pasajlanması vb. işlemler sırasında kültür vasatının atılması ve hücrelerin pelet şeklinde eldesi için 15 ml ve 50 ml'lik santrifüj tüpleri için santrifüj gereklidir.



# Santrifüj

---

- ▶ Kapaklar sıkıca kapatılmalı
- ▶ Dengeli şekilde konmalı
- ▶ Fazla doldurulmamalı
- ▶ Kapağı kapandığından emin olunmalı
- ▶ Maksimum dönme hızından fazla çalıştırılmamalı
- ▶ Santrifüj yapılırken başından ayrılmamalı
- ▶ Tamamen durmadan açılmamalı
- ▶ Enfekte örneklerde santrifüjden sonra 10 dk beklenmelidir.



Soğutmalı Santrifüj





# Hücre depolama kapları

## Elektrikli

- ▶ -86°C' ye kadar soğutan derin donduruculardır.
- ▶ En önemli dezavantajları, hücrelerin sağlıklı saklanma sürelerinin maksimum 5 yıl olması ve elektriğe bağımlı olmalarıdır.



## Elektriksiz



Sıvı Azot Tankları  
En önemli riskleri kontaminasyon



# Kriyotüpler

---



External Thread  
Cryogenic Vial



Internal Thread  
Cryogenic Vial



External Thread  
Cryogenic Vial



# Diğer Malzemeler

---

- ▶ Buzdolabı,  $-20^{\circ}\text{C}$  ve  $-80^{\circ}\text{C}$  Dondurucular



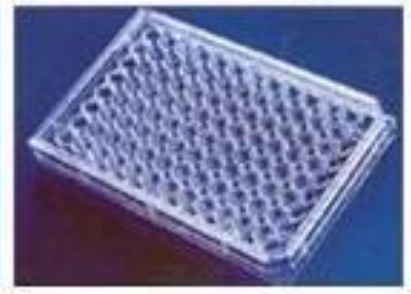
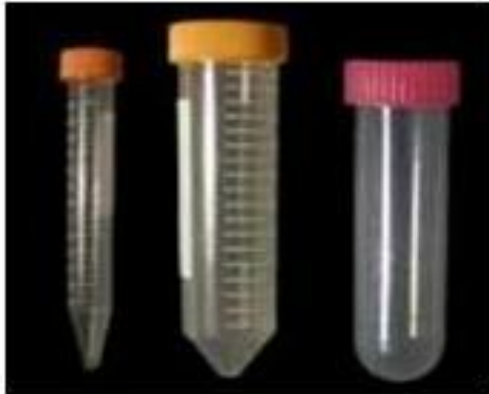
- ▶ Pipet Tabancası



- ▶ Sıcak Su Banyosu



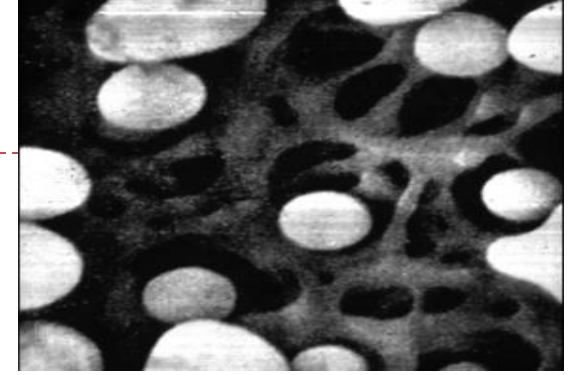
# Diğer Malzemeler



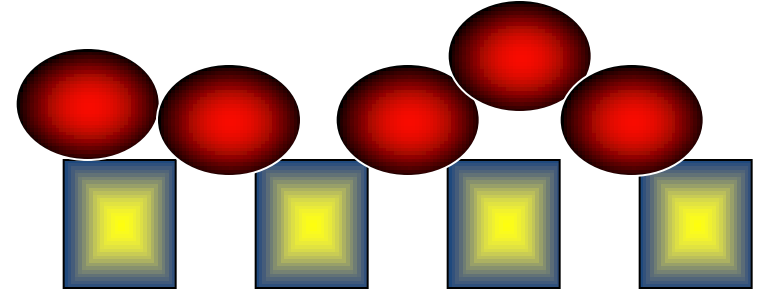
# Filtreler

---

## Membran Filtre



- ▶ Belirlenmiş büyüklükte gözenek çaplarına sahip olan filtrelerdir.
- ▶ Gözenek çapından büyük partikül ve mikroorganizmaları hiçbir koşulda geçirmeyen **mutlak** (absolute) filtrelerdir.
- ▶ En önemli özelliği ise test edilebilmeleridir.
- ▶ Gözenek büyüklükleri 0.1 mikron'dan başlayarak 10 mikrona kadardır.



# Filtreler

---

## Membran Filtrelerin Kullanım Alanları

- ▶ Sıvıların bakterilerden arındırılmasında
- ▶ Sıvıların pürifikasyonunda
- ▶ Steril hava filtrasyonunda



# Filtreler

---

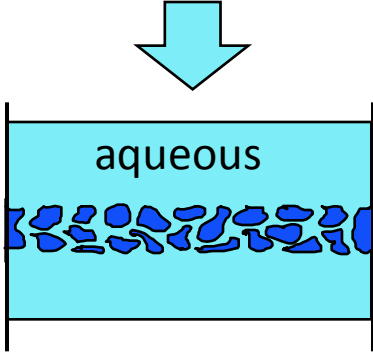
## Membran Filtrelerin Yapıları

- 1. Hidrofilik (Su ile geçimli)**  
Su bazlı sıvıların filtrasyonunda kullanılır.
- 2. Hidrofobik (Su ile geçimsiz)**  
Hava ve gazların filtrasyonunda kullanılır. Su ile temas ettiklerinde ıslanmazlar.



# Filtreler

## Hidrofilik/Hidrofobik

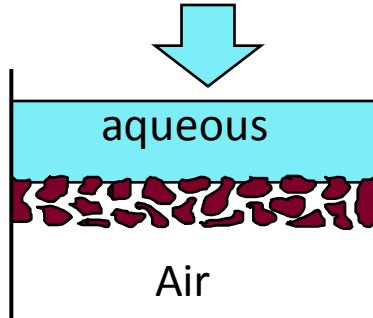


Hidrofilik:



Anında su ile ıslanabilen.

Sıvıların filtrasyonunda kullanılırlar.



Hidrofobik :



Su ile hiçbir zaman ıslanmayan.

Hava ve gazların filtrasyonunda kullanılırlar.

Ancak alkol ile ıslatılarak agresif solüsyonların filtrasyonunda da kullanılabilirler.



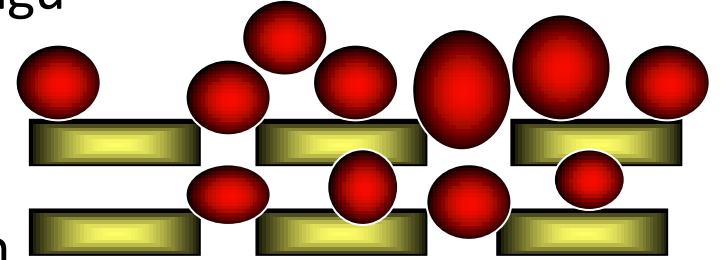


# Filtreler

---

## Derinlik (Depth) Filtreleri

- ▶ Süzme işlemi, membran filtrelerde olduğu gibi filtrenin yüzeyinde değil, filtrenin derinliklerinde oluşur.
- ▶ Filtre gözenek yerine lif katmanlarından oluşur,
- ▶ Gözenek büyüklüğü yerine tutma oranı ile ifade edilirler.
- ▶ **Partikül filtrasyonu ve** membran filitrelerin çabuk tıkanmasını önlemek için **prefiltre** olarak kullanılırlar.
- ▶ **Polipropilen, Glass fiber ve selüloz gibi** materyallerden oluşurlar.



# Çeşitli Membran Filtre Türleri

## 1. Şırınga Ucu Filtre



---

## 2. Disk Filtration

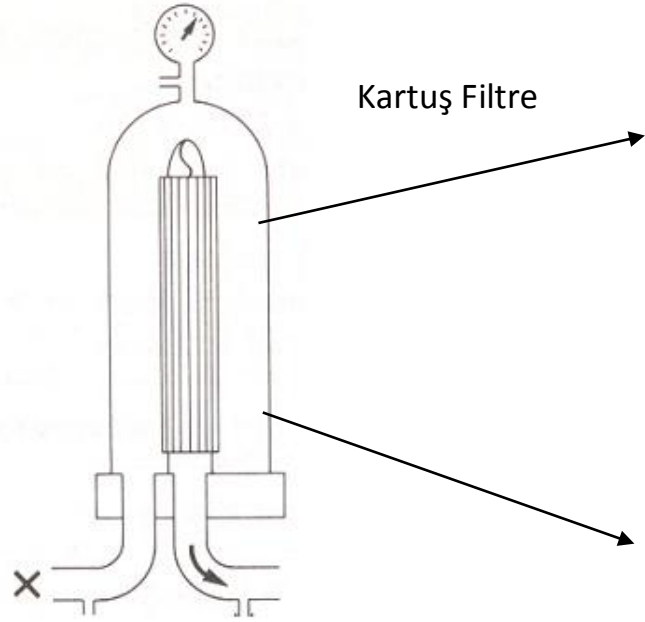


---

### 3. Kapsül Filtre



## 4. Kartuş Filtre



Paslanmaz Çelik Filtre Yuvası



---

## 5. Lentiküler filtre

### Maxicaps

#### Capsules



0.1 – 1.0 litres

Capsule

25cm<sup>2</sup>



1 - 100 liter

5", 10" et 20"

0.11m<sup>2</sup> to 0.33m<sup>2</sup>

#### Sheets & Modules



> 100 liter

- 12" Module (1,8m<sup>2</sup>)

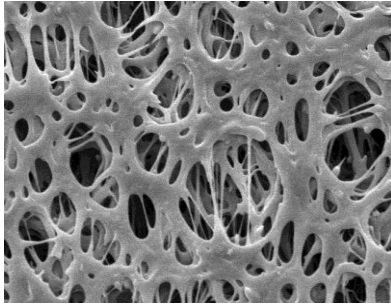
- 16" Module (3,6m<sup>2</sup>)

**Retention rates: 0,1 to 8µm**

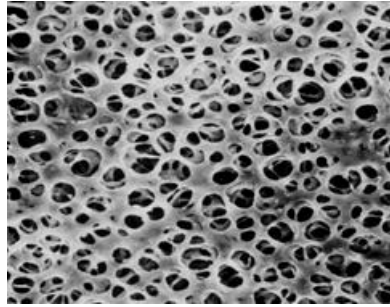
---



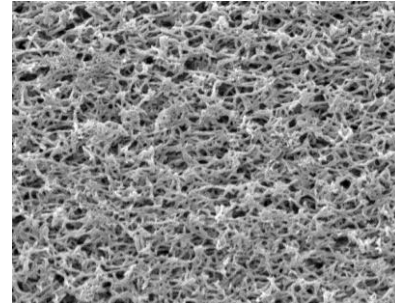
## Membran Filtre ve Derinlik Filtre Çeşitleri



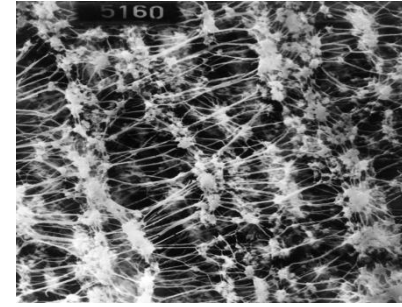
PESU Membran Filtre



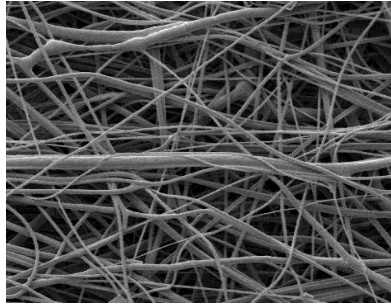
CA Membran Filtre



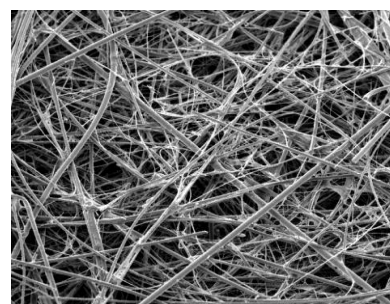
Nylon Membran Filtre



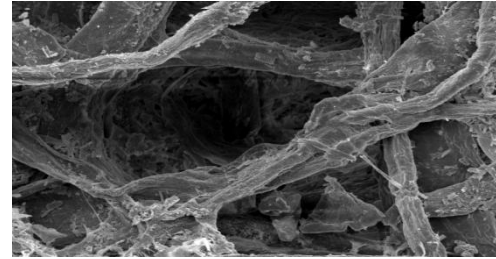
PTFE Membran Filtre



Melt Blown Önfiltre



Microflies Önfiltre



Derinlik Filtresi Katmanları

Derinlik Filtresi

Derinlik Filtresi



---

## Çeşitli Ultra Filtre Tipleri

### 1. Ultrafiltrasyon amaçlı disposable ürünler (0,5-20 ml)





---

## 2. Ultrafiltrasyon amaçlı Disposable ürünler (70-250 ml)



# Filtreler

---

## Filtrasyonu Etkileyen Parametreler

- ▶ Sıcaklık
- ▶ Toplam Kapasite (debi)
- ▶ Akış Hızı
- ▶ Tutma Hızı
- ▶ Sıvı viskozitesi
- ▶ Partikül Yükü
- ▶ Partikül Çeşiti
- ▶ Basınç
- ▶ Kimyasal Uyumluluk
- ▶ Sıvı Kompozisyonu
- ▶ pH
- ▶ Membran Yapısı
- ▶ Mikrobiyal Yük
- ▶ İyon Yükü



# Biyogüvenlik

---

- ▶ Laboratuarda yiyecek ve içecek olmamalıdır
- ▶ Yeme ve içme olmamalıdır.
- ▶ Giyilen laboratuvar önlüğü ayrı olmalıdır ve sadece hücre kültürü laboratuvarında giyilmelidir.
- ▶ Diğer laboratuarda kullanılan önlükler ile hücre kültürü laboratuvarına girilmemelidir.
- ▶ Laboratuvara girilmeden önce galoş giyilmelidir.



# Biyogüvenlik

---

- ▶ Açılan malzemeler ve stoklanan malzemeler mutlaka etiketlenmelidir (açılma tarihi, açan kişi vb.)
- ▶ Çalışılan hücre kültürünün özelliğine dikkat edilmelidir.
  - ▶ Hayvan, insan, enfekte vb.
- ▶ Uygulanan yöntemlerin özelliği bilinmelidir.
  - ▶ Transfeksiyon, ilaç uygulanması, vb.



# Kayıt Tutma

---

- ▶ Günlük yapılan tüm işler
- ▶ Hazırlanan vasatlar
- ▶ Kullanılan malzemeler
- ▶ Karşılaşılan problemler
- ▶ Stoklanan hücreler
- ▶ Açılan hücreler
- ▶ Kişiyeye özel
- ▶ Laboratuvara özel
- ▶ Bölüme özel
- ▶ Arşivleme



# Deney Düzenlenmesi

---

- ▶ Hücre kültüründe yapılan çalışmalar 3 kez tekrarlanmalıdır.
- ▶ Hücre büyüme eğrisi çıkartılmalıdır (bilinmiyor ise)
- ▶ Kültür vasatı için kullanılan malzemeler aynı katalog ve aynı partide üretilmiş olmalıdır.
- ▶ Uygun kontroller olmalıdır.



# Dikkatle...

---

- ▶ Tasarruf
  - ▶ Zaman
  - ▶ Malzeme
  - ▶ Kaynak
- ▶ Biyolojik atıkların uygun atılması
- ▶ Radyolojik atıkların uygun atılması
- ▶ Cihazların kullanım kılavuzunun okunması
- ▶ Aletlerin kullanımın öğrenilmesi
- ▶ Bilinmiyor ise SORULMASI
- ▶ Laboratuvardan çıkmadan önce tüm aletler kontrol edilmesi gerekmektedir



# Dikkatle...

---

- ▶ Ellerde kesik var ise, band yapıştırılmalı
- ▶ Laboratuvarda ani hareket yapılmamalı
- ▶ Kültür yere döküldüğünde üzerine dezenfektan (%10 hipoklorit) dökülerek 15-30 dk beklenmeli, daha sonra temizlenmeli
- ▶ Sorumluya haber verilmeli





# Besi Yeri ve İçeriği

# Besi Yeri İçeriği

---

- ▶ Hücre kültürü ortamında canlılığın devam ettirilmesi ve büyüme için gerekli koşullar geliştirilmiş özel inkübatörler ve kullanılan besi yeri bileşimi aracılığı ile sağlanmaktadır. Gerekli bu koşullar iki ana başlık altında toplanabilir:
- ▶ **1- Fizyolojik Parametreler**
  - ▶ - Sıcaklık
  - ▶ - pH
  - ▶ - Bikarbonat ve Karbondioksit konsantrasyonu
  - ▶ - Nem
  - ▶ - Iřıktan korunma
- ▶ **2- Besi Yeri İçeriği**



# Besi Yeri İçeriği

---

- ▶ Besi yeri kültür ortamlarının en önemli bileşeni konumunda olup, hücrelere besin, büyüme faktörleri, hormonlar gibi büyümeyi uyaran ajanların sağlanmasının yanı sıra kültür ortamının pH'ını ve ozmotik basıncının regülasyonunu da sağlar.
- ▶ Üç ana grup besi yeri vardır. Bunlar:
  - ▶ - **Bazal Besi Yeri (Basal Media),**
  - ▶ - **Düşük Serum İçerikli Besi Yeri (Reduced-Serum Media),**
  - ▶ - **Serumsuz Besi Yeri (Serum-Free Media) dir.**



# Bazal Besi Yeri

---

- ▶ Bazal besi yeri içeriğinde amino asitleri, vitaminleri, inorganik tuzları, karbon kaynağı olarak glukozu içeren ve genellikle hacimsel olarak %10 oranında serum ile desteklenen besi yerleridir.
- ▶ Hücre kültürlerinde olması gereken temel aminoasit karışımı (MEM) Eagle tarafından 1955'de tanımlanmıştır.
- ▶ Dulbecco tarafından modifiye edilen MEM solüsyonu (DMEM) somatik hücre kültürlerinde en sık kullanılan besi yeri bileşenidir.



# Serum

---

- ▶ Bazal besi yeri içerisinde yer alarak:
  - ▶ Büyüme ve adezyon faktörlerinin, hormonların, lipidlerin ve minerallerin ana kaynağıdır,
  - ▶ Hücre membran geçirgenliğini de kontrol eder ve lipidlerin, enzimlerin, mikrogıdaların ve eser elementlerin hücre içerisine taşınmasında taşıyıcı rol üstlenir,
  - ▶ Toksinleri bağlayarak tamponlayan bileşenleri içerir,
  - ▶ Tripsin ve proteaz gibi enzimleri nötrleme yetisine sahiptir,
  - ▶ Hücre-hücre ve hücre-ortam etkileşimlerini yönlendirir.



# Serum

---

- ▶ Doku ve hücre kültürlerinde en çok hayvan orijinli serumlar kullanılır.
- ▶ Yapısında
  - ▶ **Proteinler**
    - ▶ albümin,
    - ▶ globülin (Ig),
    - ▶ fibrinojen,
    - ▶  $\alpha$ -2 makro globülin (tripsin inhibe edici faktör),
    - ▶ fötin,
    - ▶ transferin
  - ▶ **Büyüme Faktörleri**
    - ▶ Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF),
    - ▶ Epidermal büyüme faktörü (EGF),
    - ▶ İnsulin benzeri büyüme faktörü (ILF)],
    - ▶ Hormonlar, nutrient ve metabolitler, mineraller,
    - ▶ Çeşitli inhibitörler (hücrelerin büyümesini engelleyen bakteriyel toksinler, kontaminantlar) bulunur.



---

## ▶ **DÜŞÜK SERUM İÇERİKLİ BESİ YERİ**

- ▶ Düşük serum içerikli besi yeri, bazal besi yeri formülasyonlarındaki serum içeriğinin azaltılarak yerine besin ve hayvan kaynaklı faktörlerin ilave edildiği bileşimlerdir. Böylelikle serum kaynaklı bazı istenmeyen etkiler en aza indirgenmeye çalışılmaktadır.

## ▶ **SERUMSUZ BESİ YERİ**

- ▶ Serumsuz besi yeri, bazal besi yeri içerisindeki tüm serum içeriğinin yerini uygun besin ve hormonal faktörlerden oluşan bir formülasyonun aldığı bileşimlerdir. Bu tür besi yerlerinin en önemli avantajı besi yeri formülünü uygun büyüme faktörleri vb. ile istenilen hücre tipi için seçici olarak ayarlayabilme imkanıdır. Dolayısı ile her hücre tipine özel besi yeri üretimi söz konusu olabilmektedir.



## Serumsuz besi yeri kullanımının avantaj ve dezavantajları

<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
-İçerik yönünden tam tanımlanmıştır	-Hücre tipine özel formülasyon gerektirir
-Performans tutarlılığı ve sürekliliği vardır	-Kullanılan içeriklerin saflığının yüksek olması gerekir
-Pürifikasyonu ve kullanımı kolaydır	-Hücre büyümesi genellikle daha yavaştır
-Hücre fonksiyonlarının tam analizine izin verir	
-Üretkenliği artırır	
-Fizyolojik cevabın kontrolünü kolaylaştırır	
-HücreSEL uyaranların analizini kolaylaştırır	





# Kültive edilmiş hücrelerin sentezleyemediği esansiyel nutrientler

---

- İnorganik iyonlar
- Aminoasitler
- Vitaminler
- Enerji kaynakları



# Antibiyotikler

---

penisilin	100 IU/ml
streptomisin	50 µg/ml
amfoterisin B	25 µg/ml
nistatin	25 µg/ml
gentamisin	50 µg/ml



# Enerji kaynakları

---

D-glukoz.....5-20 mM

L-glutamin.....0.7-5 mM

Fazla miktarda glukoz kullanıldığında:

glukoz → (*glükolizis*) → laktat → pH(↓)

→ üremenin inhibisyonu



# Karbonhidratlar

---

Besi ortamında enerji kaynağı şekerlerden sağlanır ve en sıklıkla bu amaç için glukoz ve galaktoz kullanılır.

Hücrenin gereksinimine göre maltoz ve fruktoz ilaveleride yapılabilir.

Farklı bir karbonhidrat kullanımı.

glutamin.....0.7-5.0 mM

fruktoz.....2.0-20.0mM

galaktoz.....2.0-20.0mM



# Tampon sistemleri

---

- ▶ Hücre içi hemostazın sağlanması açısından kültür ortamlarına tampon sistemleri ilavesi gerekebilmektedir.
- ▶ HEPES ve/veya bikarbonat-CO<sub>2</sub> tampon sistemleri en sık kullanılanlardır.
- ▶ Bununla beraber tampon sağlayıcıların pH aralığının kontrolü açısından kültür ortamlarına fenol kırmızısı gibi pH indikatörleri ilavesi gerekir.
- ▶ Bazı kültür sistemlerinde fenol kırmızısının toksik etkileri olabileceğide göz önünde bulundurulmalıdır.



# Vitaminler

---

- ▶ Besi ortamına ilave edilen serum ile vitamin desteği sağlanmış olmasına rağmen bazı hücrelerin ekstradan vitamin ihtiyacı olabileceğide unutulmamalıdır.
- ▶ Vitaminler bilindiği üzere hücre içi birçok olayın kofaktörün öncülü olarak görev yaparlar ve özellikle en sıklıkla B grubu vitaminlerin varlığı hücre büyümesi ve proliferasyonu açısından önemlidir.
- ▶ Biotin, folik asit, nikotinamid, piridoksin
- ▶ Riboflavin, tiamin, kolin, inositol



# pH indikatörleri

---

FENOL RED:

3-55  $\mu\text{M}$

Bazı hücrelere ve serumsuz sistemlere toksik.

