

DOKU KÜLTÜRLERİ HAKKINDA

Prof. Dr. Muharrem KÖKSAL

Doku parçacıkları veya hücre suspansiyonunun artifisiyel vasatlarda üretilmesi, yani doku kültürü (explantation) bugünkü ilmi araştırma metodları arasında önemli bir mevki işgal etmektedir. Bu metod sayesinde hücre ve dokunun hayat esnasında haiz olduğu özellikler objektif olarak mütalâa edilebilmektedir.

Üç türlü doku kültürü metodu biliyoruz:

- I — Bilhassa doku kültürü,
- II — Hücre kültürü
- III — Organ kültürü.

Her üçünde de esas aşağı yukarı aynıdır. Doku parçacıklarının bir plazma pıhtısı üzerinde uygun olan gıda vasatları, oksijen kesafeti ve hararet şartları içinde in-vitro olarak hayatîyetini muhafaza ve idame imkânlarının bir araya getirilmesinden ibarettir.

Bir dokunun in-vitro olarak üreme kabiliyeti dediferansiyasyon derecesine, alındığı canlının cinsine, yaşına ve alışık olduğu gıda maddelerinin uygun bir hararet derecesinin mevcudiyetine tâbidir. Embriyoner hücrelerin üreme kabiliyeti olgun dokularınkinden daha fazladır. Az diferansiye hücreler diferansiye olanlardan daha kolay ve sür'atle çoğalırlar. Meselâ, tavuk embriyosu kalbinden hazırlanan bir eksplantta fibroblastlar sür'atle çoğalarak sahneye hâkim olurlar.

Gıda vasatlarının hazırlanması ve seçilmesi muvaffakiyetin başlıca âmillerindendir. Şimdiye kadar yapılan tecrübeler gıda vasatının, mümkün olduğu kadar, hücrenin alışık bulunduğu bir vasıfta olması lâzım geldiğini göstermiştir. Nitekim, tavuk embriyosu hücreleri için en uygun gıda vasatı yine tavuk plazma ve embriyosu ekstresidir.

Dokunun yaşıatılabilmesi için oksidation şartlarının da hazırlanması icap eder. Bilindiği gibi, canlı hücrelerin bulunduğu iç mil-yö devamlı bir değişme halindedir. Dolayım ve teneffüs fonksiyon-ları vasıtası ile sağlanan bu yenileme fa'aliyetine mukabil, eksplant'-ın bulunduğu milyöde ise, bilâkis gittikçe artan bir kirlenme ve es-kime vuku bulur. Bilhassa asılı damla metodunda doku dar bir hava boşluğuna haps edilmiştir. Bu sebeple, eksplantin kısa fasılalarla, 24-48 saatta bir, yeni bir vasata geçirilmesi gerekir.

I — Bilhassa doku kültürü :

Bu, üç ayrı metod halinde yapılmaktadır :

- a) Asılı damla metodu,
- b) Şişe (flask) metodu ve
- c) roller tüp metodu.

Asılı damla metodu :

En basit olan şekildir. Sitolojik araştırmalar için uygundur. can-lı hücrenin mikroskop ve bilhassa fazkontrast mikroskop ile tedki-kine imkân veren bir usuldür. Steril şartlar altında, küçük doku parçacıklarının lamel üzerindeki tavuk plazması pıhtısına ekilme-sinden ve asılı damla halinde 39 derecelik etüv içinde enkübasyo-nundan ibarettir. Tavuk plazması hücre için iyi bir gıda vasatı teş-kil etmekle beraber, ilâve edilmiş olan tavuk embriyo ekstresi mi-toz fa'aliyetini şiddetle hızlandırır. Diğer taraftan bu ekstre, plaz-manın pıhtılaşmasına da yardım eder.

Yapılan uzun araştırmalar doku ve hücrelerin in vitro olarak gelişebilmeleri için bir zemine istinad etmesi lâzım geldiğini öğret-miştir. Bu sebeple, eksplantasyonda pıhtının büyük bir önemi var-dır.

Bu metodla hazırlanan kültürlerde hücrelerin bir kaç saat zar-fında çoğalmağa başladığı, tek sıra halinde, muhite doğru ilerlediği yani bir emigrasyonun vukua geldiği kolayca fark edilir. Her 48 saatta bir, başka bir vasata nakl edilmek suretiyle, eksplant uzun zaman hayatta tutulabilir. Carrell'in meşhur fibroblast kültürü 30 sene müddetle idame edilebilmiştir (3).

Şişe metodu :

Carrell tarafından özel olarak hazırlanmış olan şişelerde yapı-lır. Bu metod bilhassa hücre metabolizmasını etüd için çok uygun-

dur. Hem daha büyük ve müteaddit parçacıkların enkübasyonunu hem de eksplantın uzun zaman, tedirgin edilmeksizin, muayyen şartlar altında üretilmesini sağlar. Doku, bundan evvelkinde olduğu gibi, yine bir plazma pıhtısı üzerine istinad ettirilir, besleyici bir mayi tabakası ile kaplanır ve etüvde enkübasyona tâbi tutulur. Bu besleyici mayi muayyen zamanlarda değiştirilir. Parker'in ifade ettiği gibi, bu usul sayesinde doku ile besleyici mayi arasındaki mütakabil tesirler incelenebilir ve bu suretle hücrelerin metabolizma ve fonksiyonları hakkında fikir edinilir. Cameron'a göre, bu metod sayesinde hücrelerin sürülmantasyonuna mani olunmak suretiyle çoğalma tempoları yavaşlatılır ve neticede diferansiyasyonuna imkân verilmiş olur.

Roller tüp metodu :

Bundan evvelki metodun daha mütekâmil şeklidir. Plazma pıhtısına ekilmiş olan eksplantın, mütenaviben, besleyici mayi ve hava tabakası ile temasını sağ'ayan bir usuldür. Tüpün bir kenarında hazırlanan pıhtıya doku ekilir ve besleyici mayi ilâve edilir. Etüv içinde, özel tertibatla, saatta 6-8 def'a devir yapacak şekilde döndürülür. Bu suretle, doku bir saat zarfında 6-8 def'a nöbetleşe mayi ve hava tabakası ile temas etmiş olur.

Hücre kültürü

Bilhassa kan hücrelerini tedkik için kullanılan bu metod da hücre sedimenti kütleciklerinin besleyici bir mayi içine bırakılıp enkübasyonundan ibarettir. Bu maksatla, özel olarak hazırlanmış şişelerden istifade edilir (26).

Organ kültürü

İlk olarak Thomson tarafından tarif ve bilhassa Strangeways ve Fell tarafından tadil ve islâh edilen bu usule saat camı metodu da tabir edilir. Plazma koagülomunu ihtiva eden saat camına embriyo aksamının ekilmesi ve etüvde enkübasyonu esasına istinad eder. Dokuyu ihtiva eden saat camı, zemininde ıslak pamuk bulunan, bir petri kutusu içinde tutulur. Her 48 saatta bir, organ taslağı veya doku stereomikroskop altında tetkik edilir. Harice doğru olan gelişme sahaları kesilerek düzeltilir ve böylece organın muntazam bir şekil alması sağlanır (10).

Yukarda tarif ettiğimiz eksplantasyon metodları ile birçok enteresan araştırmalar yapılmıştır. Mitoz olayının safhaları, hücre

bölünmesine müessir olan veya bunu inhibe eden faktörler, patojen ajanlarının eksplant'daki hücreler içindeki proliferasyonu ve husule getirdikleri tahavvüller mütalâa edilmiştir. Bundan başka, fagositoz olayı, tümör hücrelerindeki mitoz anomalileri, embriyolojik tetkikler ve sair etüdler yapılmıştır. Bu yoldaki araştırmalara son senelerde daha büyük bir önem verilmektedir.

Doku kültürleri ile tetkik edilen başlıca konular şunlardır :

Hücre bölünmesi

Bilhassa asılı damla metodu ile hazırlanan preparatların fazkontrast mikroskopi ve sinematografi ile tedkiki sayesinde mitozun bütün safhaları teferruatı ile etüd edilebilmiştir. Normal ve malign hücrelerde vukua gelen mitoz değişiklikleri mükemmelen incelenmiştir. Bilhassa ultraviyole ile mikrofotografi sayesinde hücrelerin nükleik asit muhtevası üzerinde önemli araştırmalar yapılmıştır (19, 34). Mitoz esnasında hücrede vukua gelen şimik tahavvüller histoşimik araştırmalara zemin teşkil etmiştir. (17). Diğer taraftan hücre bölünmesini inhibe eden maddelerin tesir tarzı araştırılmış, meselâ, folik asit antagonisti olan aminopterin maddesinin eksplant'a ilâvesi halinde anafaz ve metafaz safhasında bulunan hücrelerin azaldığı yani harap oldukları sonucuna varılmıştır (Jacobson, 16). Bundan başka, colchicine, fluoride, cyanide, urethane gibi maddelerin de aynı tesirde bulunduğu gösterilmiştir (15). Holden yaptığı bir incelemede, kortizonla muamele edilen fibroblastların çoğalma kabiliyetinin azaldığını görmüştür (14).

Eksplantasyonda, kültür şartlarında husule getirilen değişikliklerin hücreler üzerine olan tesirleri de mütalâa edilmiştir. Ludford fibroblast kültürleri üzerine likid parafin ilâve ettiği zaman, periferdeki hücrelerin yassılaştığını, birleşerek dev hücreleri husule getirdiklerini müşahade etmiştir. Bundan başka, aynı tesirler altında protoplazmanın iştirak etmediği bir nüve bölünmesi neticesinde dev hücrelerin teşekkül edebileceği sonucuna da varılmıştır (21). Dev hücresi teşekkülünde patojen amillerin de rol oynadığı malûmdur. Rottino, normal ve sistem hastalığı gösteren lenf ganglyonlarından hazırladığı kültürlerde Hodgkin hastalıklı dokulardan daha bol sayıda dev hücrelerinin teşekkül ettiğini görmüştür (30). Tüberküloz granülasyon dokusunda teşekkül eden dev hücrelerinin husulünde de Koch basillerinin âmîl olduğu malûmdur. Brieger ve arkadaşları 24 saat önce intravenöz olarak Tb. basili enjekte edilmiş bir tay-

şanın dalağından elde ettikleri kültürlerde basilin makrofajda ürediğini ve zamanla dev hücrelerinin de husule geldiğini görmüşlerdir (2).

Mikroorganizmaların doku kültürlerinde tedkiki :

Mikroplar muvacehesinde hücrenin durumu, bunların hücreye giriş ve çoğalışı da mütalâa edilmiştir. Bilhassa Tb. basili üzerinde enteresan müşahedeler vardır. Fell ve Brieger tavuk embryosu akciğerinden elde ettikleri hücre kültürlerine değişik virülansda kuş tipi Tb basillerini inoküle etmişler ve ilk 2-3 hafta zarfında dokunun enfeksiyona mukavemet ettiğini ve basillerin yalnız makrofajlarda bulunduğunu görmüşlerdir. Bir müddet sonra, basillerin tedricen çoğaldığını, makrofajların harabiyetinden sonra, serbest kalan basillerin ekstra sellüler olarak tekessüre devam ettiğini, subkültürlere devam edildikçe basil adedinin artmasına mukabil makrofajların azaldığını ve nihayet başlangıçta intakt kalan fibroblastların da basil ihtiva ettiğini ve bu hücrelerde bakterilerin alabildiğine çoğalarak protoplazmayı tamamiyle doldurduğunu ve en sonunda patlamasına sebep olduğunu müşahade etmişlerdir (6). Aynı araştırmacılar diğer bir tecrübeye, tavşan dalağında hazırladıkları eksplantı Bovine tip basil ile inoküle ettikleri zaman aşağı yukarı aynı neticeyi almışlar ve 14 üncü günde dokunun artık üreyemez bir hale geldiğini müşahade etmişlerdir (7). Suter'in yapmış olduğu araştırma daha enteresandır. Muaf kılınmış tecrübe hayvanı hücrelerinin Tb. basiline karşı daha mukavim olduğunu göstermişlerdir. Normal ve B. C. G. ile aşılınmış tecrübe hayvanlarından elde ettiği monosit kültürlerini aynı virülansda Tb. basili ile inoküle ettiği zaman bakterinin birincilerde daha kolay, ikincilerde ise daha güç ve mahdut sayıda ürediğini müşahade etmiştir. Bu mukavemetin bizzat hücreye ait bulunduğu immün hayvan serumunun kültürlerle ilâvesi halinde neticenin değişmemesi ile anlaşılmıştır. (32).

Yukarda zikredilen araştırmalar aktif fagositoz olayının bilhassa histyosit ve monositlere has olduğunu göstermiştir. Bunu teyid eden diğer bir çalışmadan da bahsedelim : Mühlethaler fibroblast ve histyosit ihtiva eden doku kültürlerine tripan mavisi ilâve etmiş ve yalnız histyositlerin vital olarak boyandığını görmüştür (24).

Virusların doku kültürlerinde tedkiki :

Bu alanda yapılan araştırmalarda virusların hücreye giriş ve çoğalışı mütalâa edilmiştir. Diğer taraftan, hücrede husule gelen de-

ğişiklikler de araştırılmıştır. Franklin (12), Thicke ve mesai arkadaşları (33) insan embriyosu ve maymun testisi dokusundan hazırladıkları kültürlerle poliomyelitis virusu emplace etmişler ve virusun hücre içinde çoğaldığını görmüşlerdir. Bu araştırmada bir kısım hücrelerde aşikâr bir bazofilinin husule geldiği bir kısım hücrelerde de tam bir harabiyetin vuku bulunduğu müşahade edilmiştir. Çiçek virusunun üreme şartlarını araştıran Crawford ve Sanders bazı hücrelerde Feulgen pozitif enklüzyon cisimlerinin husule geldiğini görmüşlerdir (5). Diğer enteresan bir araştırmada, Pollar ve Bussel faredeki sarkom dokusundan ürettikleri ve eksplantlara çeşitli viruslar implante etmişler ve Louis-encephalitis virusunun önemli bir hücre harabiyetine sebep olduğunu göstermişlerdir (27).

Protozoer ve patojen mantarların in vitro olarak tedkiki :

Mühlthfordt tavuk embriyosundan hazırladığı fibroblast kültürünü toxoplasma Gondii ile enfekte etmiş ve parazitin hücre içinde çoğaldığını müşahade etmiştir (25). Bu araştırmada pek fazla parazit ihtiva etmeyen hücrelerde mitoz olayının devam ettiği, yeni teşekül eden hücrelerde de parazit bulunduğu görülmüştür.

Randall ve Hackeny dissemine histoplazmosisli iki çocukdan dalak kültürü yapmışlar ve mantarın hücre içindeki çoğalışını mütalâa etmişlerdir. Burada da hücrelerin bölünmek suretiyle parazit ihtiva eden yeni hücreler meydana getirdiği görülmüştür (28).

Tümörlerin doku kültürlerinde tedkiki :

Tümör dokusundan elde edilen kültürlerde malign hücrelerin özellikleri araştırılmış ve bilhassa mitoz anomalileri, kromozom adet ve cesametleri arasında büyük farkların mevcudiyeti, mitotik aberasyonlar v.s. mütalâa edilmiştir. Bundan başka, histolojik preparatda olduğu gibi, malign hücrelerin daha büyük, daha bazofil, nükleik asit ve mitokondriden daha zengin bulundukları müşahade edilmiştir (20). Bichol faredeki lösemik infiltrasyon sahalarından kültürler elde etmiş ve hücrelerin hiç bir diferansiyasyon temayülü göstermediğini tesbit etmiştir (1). Bu müşahade de lösemnin tümöral bir processus olduğunu teyid eder.

Diğer taraftan, tümör hücrelerinin zamanla tip değiştirebileceği fikrini telkin eden araştırmalar da yapılmıştır. Sanford ve mesai arkadaşları fare hepatomu ve melanomundan elde edip uzun zaman ürettikleri eksplantları tekrar aynı cins hayvana inoküle ettikleri

zaman melanom veya hepatom yerine sarkomların meydana geldiğini görmüşlerdir (31).

Tümör hücrelerinin fagositoz hassasına malik olduğu da malûmdur. Bu hal kültürlerde çok iyi müşahede edilebilir. Koller ve Weymouth fare sarkomu kültürlerini fazkontrast sinematografi ile tedkik ettikleri zaman eksplantta bulunan lökositlerin tümör hücrelerine yaklaştığını ve bilâhare protolapzmaları içine dahil olduğunu göstermişlerdir (18)✓

Organ kültürleri ve embriyolojiye tatbiki :

Bilhassa embriyo aksamının saat camı metodu ile eksplantasyonu önemli embriyolojik araştırmalara yol açmış bulunmaktadır (10). Bu hususta bir çok misaller vardır. Bilhassa enteresan olanlardan bir kaçını zikrederim :

Gaillarda seks hormonlarının jenital organ dokularına olan tesirlerini mütalâa etmiştir. Bu araştırmacı tenâsülî matürasyona vasıl olmamış genç farelerin uterus dokusunu saat camı metodu ile ürettiği zaman dokunun bir müddet sonra bozulduğunu, fakat eksplantta östrojen ilâve ettiği takdirde bilâkis geliştiğini ve bilhassa adale tabakasının inkişaf ettiğini görmüştür (13).

Yüksek dozda A vitamininin hücre üzerine olan tesirini mütalâa eden Fell ve Mellanby tavuk embryosundan elde ettikleri ektoderm hücrelerinin yüksek konsentrasyonda A vitamini muvacehesinde keratinizasyon hassasını kaybettilerini, buna mukabil glandüler bir metaplazi arz ettiklerini müşahade etmişlerdir (9). Aynı araştırmacılar tavuk embriyosu bacak kemiği taslağını aynı metodla kültive etmişler ve bol miktarda A vitamini ihtiva eden vasatlar kullandıkları zaman gelişmenin durduğunu görmüşlerdir (8).

Metazoerlerde aynı cins hücrelerin birbirleri ile birleşerek doku birlikleri yapmağa mütemayil oldukları malûmdur. Moscona ve Moscona tarafından yapılan bir araştırma ve müşahade hücrelerin bu hassasını vazihan meydana çıkarmıştır. Araştırmacılar 4 günlük tavuk embriyosundan elde ettikleri mesonephron dokusundan özel bir usul ile hücre süspanzyonu hazırlamışlar ve bunu kültive ettikleri zaman bir kısım hücrelerin bir araya gelerek tubuliler meydana getirdiğini müşahade etmişlerdir. Daha enteresan olarak, adale ve kıkırdak dokusundan hazırladıkları hücre süspanzyonlarını karıştırmışlar ve bu mahlûtu ürettikleri zaman kıkırdak hücrelerinin or-

tada toplanıp bir kırkırdak dokusu husule getirdiğini tesbite muvafak olmuşlardır (23). Chen fare sternum kemiğinin embriyolojik gelişmesini saat camında tedkik etmiş, bu kemiğin başlangıçta sağlı sollu iki taslak halinde olduğunu ve bilâhare bunların birleştiğini tesbit etmiştir (4).

Hücre diferansiyasyonu üzerinde yapılan araştırmalar da entresandır. Moscona ve Moscona 6 günlük tavuk embriyosu hipofizini eksplante etmişler ve hücrelerin normal bir diferansiyasyon arz ettiğini, 6 günlük bir üremeden sonra bazofil ve asidofil hücrelerin meydana çıktığını görmüşlerdir (22). Robertis ve Sotelo tavuk embriyosundan ürettikleri sinir hücreleri üzerinde elektron mikroskopik araştırmalar yapmışlar ve nörofibrillerin husul tarzını mütalâa etmişlerdir (29).

Bir kaç misal ile önemini tebarüz ettirdiğimiz doku kültürü metodlarının memleketimizde de tatbiki temenni olunur.

Enstitümüzde bu maksadı temin edecek küçük bir lâboratuvarın kurulmuş olduğunu arz ederiz.

L İ T E R A T Ü R

- 1 — Bichol J., Acta Path. Scand., 41, 410, 1952.
- 2 — Brieger E. M., Fell H. B. ve Smith B. R. J. Hygiene, 49, 189, 1951.
- 3 — Cameron G. Tissue Culture Technique, ikinci baskı, Academic. Press Inc. New York, 1950.
- 4 — Chen J. M., J. Anat., 86, 373, 1952.
- 5 — Crawford G. N. C. ve Sanders F. K. Quart. J. Microsc. Sci. 93, 119, 1952.
- 6 — Fell H. B. ve Brieger E. M., J. Hygiene, 45, 359, 1947.
- 7 — Fell H. B. ve Brieger E. M. J. Hygiene 49, 181, 1951.
- 8 — Fell H. B. ve Mellanby E., J. Physiol. 116, 320, 1952.
- 9 — Fell H. B. ve Mellanby E., J. Physiol. 119, 470, 1953.
- 10 — Fell H. B., Science Progress, No. 162, April, 1953.
- 11 — Francis Stillwell E., Anat. Rec., 114, 9, 1952.
- 12 — Franklin A. E., Duncan D., Wood W. ve Rhodes A. J. Canad. J. Med. Sci. 41, 64, 1953.

- 13 — Gaillard P. J. Actual. Scientif. et Indust, 923, Causal and chemical Embryology III (Fell tarafından zikredilmiştir, 10),).
- 14 — Holdan M., Am. J. Path. 27, 748, 1951.
- 15 — Hughes A. F. W. Quart. J. Microsc. Sci. 91, Part 3, September 1950.
- 16 — Jacobson W., J. Path. Bact., 64, 245, 1952.
- 17 — Jacobson W. ve Webb m., Endeavour, 11, No. 44, October, 1952.
- 18 — Koller P. C. ve Waymouth C., J. Roy. Microsc. Soc., 72, 173, 1953.
- 19 — Ludford R. J., Smiles J. ve Webb F. V., J. Roy. Microsc. Soc., 68, 1, 1948.
- 20 — Ludford R. J. (Geoffrey H. Bourne'un Cytology and Cell Physiology adlı kitabından 373-418 sahifelerine ait ayrı baskı).
- 21 — Ludford R. J., Brit. J. Cancer, 6, 431, 1952.
- 22 — Moscona H. ve Moscona A., J. Anat. 68, 278, 1952.
- 23 — Moscona A. ve Moscona H., J. Anat. 86, 287, 1952.
- 24 — Mühlethaler J. P., Acta Anat. (Basel), 15, 156, 1952.
- 25 — Mühlthardt H. Z., Tropfenmed. u. Parasitol., 4, 53, 1952.
- 26 — Parker R. C., Methods of Tissue Culture, Paul B. Hoeber New York 1938.
- 27 — Pollard M. ve Bussel R. H., proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 80, 574, 1952.
- 28 — Randall C. C. ve Hackeny A. L., Am. J. Path., 29, 861, 1953. /
- 29 — Robertis E. D. ve Sotelo J. R., Exp. Cell Res. 3, 433, 1952.
- 30 — Rottino A., Arch. Path., 47, 328, 1949.
- 31 — Sanford K. K., Likely G. D., Evans V. J., Mackey C. J. ve Earle W. R. J. Nat. Canc. Inst., 12, 1057, 1952.
- 32 — Suter E., J. Exp. Med., 97, 235, 1953.
- 33 — Thicke J. C., Duncan D., Wood W., Franklin A. E. ve Rhodes A. J., Canad. J. Med. Sci., 30, 231, 1952.
- 34 — Walker P. M. B. ve ates H. B., Proc. Roy. Soc., 140, 274, 1952.

