

VİRUS ARAŞTIRMALARINDA HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN ÖNEMİ

Dr. Salih YILMAZ (*)

Hiçbir metod; virusların hücre kültürlerinde üretilmesi kadar viral araştırmaları olumlu yönde etkilememiştir. İnsan ve hayvan hücrelerinin laboratuvarlarda canlı olarak muhafazasına ve bilhassa bunların tüp ve şişelerde organizma içinde olduğu gibi üremelerinin ve yeni hücre topluluklarının meydana getirmelerinin sağlanmasından sonra, her türlü virusun canlı organizma dışında üretilmesi ve virusların üreme safhalarının gözlenebilmesi imkânı elde edilmiş oldu. Bununla birlikte; virus üretiminde Embryonlu tavuk yumurtası kültürünün sağlamış olduğu tüm kolaylıkların hücre kültüründe de mevcut olduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır. Diğer taraftan ne deney hayvanlarında ve ne de embryolu tavuk yumurtası kültüründe sun'i olarak çoğaltılmasında muvaffak olunamayan virusların hücre kültürlerinde çoğaltılması imkânı elde edilmiştir.

Son senelerde hücre yetiştirme sahasında çok büyük gelişmeler sağlanmış bulunmaktadır. Taze dokulardan elde edilen hücre kültürlerine geniş spektrumlu antibiyotiklerin ilavesiyle hücrelerin direkt olarak cam yüzeylerde üretilme şansını çok arttırmıştır. Bu gelişmelere paralel olarak virus çalışmalarının sürekliliğini sağlamak amacıyla permanent (Celline) hücre suşlarının elde edilmesine gayret sarfedilmiştir. Bugün virolojik araştırmaların yapılmakta olduğu ülkelerde «HELA» hücre suşu çok yaygın bir tarzda kullanılmaktadır. Bu hücre suşu servix kanserinden ayrılmıştır. Bugün bakteriyel besi yerleri gibi ticari olarak temin edilebilecek birçok sayıda «Permanent» hücre suşları bulunmaktadır. Monoleyer

(*) Enstitü Teşhis Bölüm Başkanı

hücre kültürlerinde virus kolay üremekte ve istenilen miktarda virus ürünü elde edilebilmektedir. Meselâ;

Permanent hücre suşlarından olan «Chang» suşu insan böbreği ve embryonal çocuk konjunktival dokusundan menşeyini almaktadır.

Harrison ve Carrel (1907); adlarındaki araştırmacıların doku kültürünün hazırlanmasındaki temel metodları yayınlamaları üzerine hücre kültürünün virus üretimindeki değeri çok daha iyi anlaşılmuştur. Ne yazık ki araştırmacılar çok uzun bir süre geliştirilmiş olan bu tekniği çalışmalarını içine alıp faydalanmamışlardır. Bununla değişik birçok nedeni bulunmaktaydı. Genel olarak bu nedenleri üç grupta toplayabiliriz.

1 — İlk zamanlarda doku kültürlerini bakteriyel kontaminasyonlardan korumak çok zordu. Geniş spektrumlu birçok antibiyotiklerin keşfi ve pratiğe aktarılması ile hücre kültürlerinin kontaminasyonu önlediği gibi hazırlanan bu tür kültürlerin çok uzun bir süre muhafazalarında sağlanmış oldu. Bilhassa balgam, göz akıntısı ve dışkı gibi bakterilerce çok bulaşık oldukları bilinen marazi maddelerden doku kültüründe virus izolasyonunda antibiyotiklerin ne derece de bir önem taşıdıkları tartışma kabul etmez bir gerçektir. Antibiyotiklerin keşfinden önce bu tür marazi maddelerden doku kültüründe virus izole etmek imkânsızdı, çünkü kültürdeki hücreler daha virus üremeye fırsat bulamadan marazi maddelerdeki bakteriler tarafından tahrip ve dejenere edilmekteydi. Ancak antibiyotiklerin keşfinden sonra doku kültürlerinde virus izolasyonu mümkün olabilmıştır.

2 — Doku kültürünün araştırma ve rutin muayenelerde kullanılmasını geciktiren sebeplerden ikincisi de; bu alanda çalışmakta olan bilim adamlarının virus üretiminde deney hayvanları ile embryonlu tavuk yumurtası kültürlerinden memnun oluşları ve bu kültürlerde üretmedikleri viruslar içinde muayene edilen marazi maddelerde viral bir etken yok diye araştırma ve çalışmalarını durdurmalarından kaynaklanmaktaydı.

3 — Doku kültürünün geliştirilmesini müteakip geçen uzun yıllar boyunca; Hücre kültürlerinde üreyen veya üretilen virusların varlığını güvenceli olarak gösteren belirgin bir metodun veya işaretin bulunmamasını; virus izolasyonunda doku kültürünün

gecikmeli olarak kullanılmasına üçüncü bir neden diye takdim etmektedirler. Çünkü ilk zamanlarda doku kültüründe virusun üremiş olduğunu kanıtlayabilmek için, doku kültürü sıvısı duyarlı bir deney hayvanına inoküle ediliyor ve deney hayvanından alınacak sonuca göre virusun hücre kültüründe üreyip üremediğine karar veriliyordu. Bu tür bir çalışma yönteminin hiçbir şekilde deney hayvanlarına üstün olduğu pek tabii ki iddia edilemezdi.

Doku kültürleri üzerindeki bilimsel çalışmalardan günden güne yeni gelişmeler elde edilmekte ve bu gelişmelerden virusların izolasyonları ve üreyen virusların hücreler üzerinde yapmış olduğu değişiklikler detaylı olarak bilim adamlarınca incelenmeye başlandı.

İlk zamanlarda doku kültürlerinde virusun ürediğine dair işaret olarak enfekte hücrelerde oluşan «Einschlusskörperchen» lerin gözükmesi geçerli olmaktadır. Bu metod güvenceli değildi, çünkü sözü edilen cisimcikler ancak birkaç virus için kullanılabilirdi, diğer bir deyimle oluşmaktaydı. İkinci dünya savaşı anında hücrelerde oluşan diğer patolojik değişikliklere dikkat çekilmeye başlandı. Virusun çoğalmasıyla birlikte hücrelerde bir dejenerasyonun meydana geldiği ve odaklar halinde eridikleri müşahade edildi. Bu bulguların önemi tanınınca çok sayıdaki enfekte doku kültürlerindeki hücrelerin parçalanmasının virus spesifitesi ile çok sıkı bir ilişkisinin bulunduğu anlaşıldı. Bunun sonunda da doku kültürlerindeki virus üremesine işaret sayılan ve teşhis için çok büyük değer taşıyan ve Cytopathogenen Effekt (CPE) diye adlandırılan bulgu ele geçirilmiş oldu. Son yıllarda geliştirilmiş bulunan Monolayer kültürler gerek menşeyini aldıkları hücre türleri ve gerekse virusa bağımlılıkları yönünden meydana gelen «CPE» olayları detaylı olarak tetkik edilmiştir. Bu araştırmalar sonunda doku kültürlerinde üreyen virus aktivitesi, güvenceli bir teşhis ve üremiş olan virus aktivitesi, güvenceli bir teşhis ve üremiş olan virus miktarının ölçülmesine yarayacak olan bir sıra karakteristik hücre değişikliklerini içeren Skala elde edilmiştir.

Viruslar; hücre kültürlerinde CPE yanında proliferatif bir etkiyede sahiptirler. Bunun dışında bazı viruslarda hücre kültürlerinde herhangi bir değişikliğe sebebiyet vermeden üreyebilirler.

Bugün bütün dünyada virus araştırmalarında kullanılabilen esasta 3 tür doku kültürü bulunmaktadır.

Bunlardan ilk türü «Maitland - Kültür Tipidir.» Bu tip kültürler komplike olmayıp uzun seneler çok sayıda değişik virusların üretiminde kullanılmıştır. Bu kültürler basit olarak şu tarzda hazırlanmaktadır. 15-30 kadar küçük doku parçacıkları yassı bir tabaka halinde uygun bir besi yerine yatırılır. Vasat olarak inorganik tuzların karışımı kullanılır. Meselâ; Serum-fizyolojik, Tyrode eriyiği ve serum karışımı gibi. Bu kültür vasatında doku parçacıkları uzun süre canlı kalırlar ve az miktarda hücrelerinde ürettiği görülür, hücrelerde metabolizma olayları devam eder. Ekimi yapılan virus; üremesi için bu hücreleri kullanır.

İkinci tür kültürler «Plasma - Kültürleridir». Bu teknikte doğranmış olan doku parçacıkları Plazma tabakası içinde üretilir. Doku bu esnada üretme kaplarının duvarlarında plazma kuagülümü ile tesbit edilir. Plasma olarak en uygunu tavuk plasmasıdır. Tavuk plazması çok ince bir tabaka halinde parafinize edilmiş cam bardaklar içine tavukların karotisinden alınan kandan elde edilir. Alınan kan derhal kuagüle olur ve bunun üzerinde jel kıvamında sarı bir madde oluşur. Vasat olarak serum ve embryonal ekstrakt ilâve edilmiş olan serum-fizyolojik kullanılır. Plazma kültürleri gerçek doku kültürleri olarak kabul edilir. Vasat içerisine yatırılmış olan doku parçacıklarından zamanla yeni hücreler yetişir.

Üçüncü kültür türü ise bugün bütün dünyada kullanılmakta olan ve bundan öncekilere nazaran üstün ve pratik birçok yanı bulunan «Monolayer - Hücre» kültürleridir. Bu hücre kültür türü «Dulbecco» tripsinasyon tekniğine göre hazırlanmakta olup gerçek bir hücre kültürünü temsil eder. Çünkü bireysel hücreler uygun vasatlar içerisinde kültür kaplarının cam yüzeylerinde çok çabuk çoğalarak hücrelerden oluşan adacıkları ve bunlarda birbirleriyle birleşerek Monolayer hücre kültürlerini oluştururlar. Bu kültür için hücreler taze dokulardan devamlı tripsinasyon suretiyle ayrılır ve sonra uygun vasatlar içinde cam yüzeylerde üretilir. Tripsinasyon için 0.25 % Tripsin solüsyonu kullanılır. Bu işlem sonunda hücrelerarası maddeler sindirilerek dokulardaki hücreler serbest hale geçer. Bu esnada tripsin yüzdesi düşük olduğundan hücrelerde herhangi bir zarar oluşmaz. Diğer bir deyimle hücrelerin bölünme yetenekleri muhafaza edilir.

Tripsin solüsyonu içinde yüzen hücreler santrifüje edilir, birkaç defa PBS ile suspensiyonu yapılarak tekrar yıkanır, taki hü-

re sedimenti üstünde meydana gelen süpernetant berraklaşınca kadar santrifüj (Yıkama) işine devam olunur. Sonra uygun bir vasatta (1.0 ml. vasata 500.000 - 800.000 hücre isabet edecek şekilde) hücre sedimentinin suspensiyonu yapılır ve sonra cam kültür kaplarına tevzi edilerek etüve kaldırılır. Kısa bir süre sonra vasat içindeki hücreler cam kapların tabanında birikirler ve bölünmeye başlarlar. Hücreler çoğalarak adeta bir hasır manzarası alırlar. Hücreleri üretme vasatı olarak 5-10 % dana serumlu, 0.5 % Laktalbuminli dengeli tuz solusyonları (Earle-Hänks ve buna benzer) ve boya endikatörü (Fenol-kırmızısı) ile kontaminasyonu önlemek gayesiyle antibiyotikler ilâve edilir. 2-3 gün sonra kültürlerdeki vasatlar değiştirilir. Bu arada hücreler birhayli üremiş olurlar. Kültürlerin ekimi doğrudan doğruya vasata yapılır. Eğer virus üreyecek olursa hücre kültürleri çok çabuk olarak tahrip olur. Çok az sayıdaki viruslar hücre kültürlerinde değişik CPE yaparlar veya hücrelerde dejenerasyon meydana getirirler. Diğer bazıları da Dev hücrelerin oluşmasına sebebiyet verirler. Bu arada kültürlerde köpük teşkili ile Einschlusskörperchenlerin oluşumu söylenebilir.

Modern Monolayer doku kültürü ayrıca enfekte virus ünitesinin kantitatif tayininde çok uygun bir metottur. Çünkü viruslar infeksiyösitelerine göre varlıkları saptanır ve kantitatif olarak titre edilirler. Viruslar sulandırılarak doku kültürlerinde titreleri belirlenir. Eskiden virusların enfeksiyösiteleri yalnız deney hayvanlarında, daha sonraları embryonlu tavuk yumurtalarında bugün ise genel olarak dokukültürlerinde tesbit ve tayin edilmektedir.

Dulbecco bu hususta çok duyarlı bir metod geliştirmiştir. Araştırmacı bu maksatla hücreleri petri kutusunun tabanında üretmekte ve test'e tâbi tutulacak virusu doğrudan üremiş olan hücrelere ekmektedir. Virus partiküllerinin adsorpsiyonunu müteakip sıvı vasat dökülerek bunun yerine hücreler agarla bir tabaka halinde kaplanmaktadır. Böylece üreyen virus partikülleri lokal olarak kalmakta, yalnız komşu hücrelerde tahribat yapmaktadır. Böylece nekroz odakları oluşmaktadır. Vital boyalarla kültürler boyandığında virusların üredikleri sahalara çok belirgin hale gelmektedir. Genel olarak bu odaklara «Plaques» adı verilmektedir.

Mevcut dilüsyonda meydana gelen Plaques sayısı enfeksiyöz yeteneğe sahip virus partikül miktarını göstermektedir. Teşekkül eden bir Plaques'in yalnız tek bir virus partikülü tarafından mey-

dana getirildiği kanıtlanmıştır. Bu metodun diğer bir yararıda; hayvanlar için patojen olan bir virus türünde aynı özelliklere sahip olan diğer bir deyimle genetik yapıları aynı olan virus suşlarının elde edilmesine hizmet etmesidir. Bu husus aşuların hazırlanmasında çok büyük bir önem taşımaktadır.

Herşeyden önce hücre kültürleri viroloji dalında rutin teşhislerde, virusi salgın hastalıklarda, hastalıkların profilaxi ve mücadelesinde ve aşuların üretiminde kullanılmaktadır. Günden güne hücre kültürünün önemi; aşuların geliştirilmesinde, istihsalinde, denenmelerinde ve standardasyonunda artmaktadır. Bunun dışında hücre kültürü İnterferenz, virus-hücre sistem ilişkileri, virus genetiği, virusların çoğalması ve enfeksiyon mekanizmasının temel araştırmalarına imkân vermesi bakımından değeri tahmin edilemeyecek kadar büyüktür.

Virolojide Hücre Kültürünün Değeri :

1. Virusların izolasyonu,
2. Isolatların üretimi,
3. Virus suşlarının adaptasyonu,
4. Virusların titrasyonu,
5. Çok fazla miktarda virusi materyali prodüksiyonu,
6. Neutralizasyon test,
7. Plaquestest,
8. Aşı istihsalı,
9. Enfeksiyon mekanizması, virus çoğalması, virus-hücre sistem ilişkileri, virus genetiği ve İnterferenz üzerinde temel araştırma yapma imkânını vermesi.

HÜCRE KÜLTÜRLERİ TÜRLERİ :

I. Yeni Metodlar :

- a) Tek kat - veya Monolayer Kültürler.

1. Primer kültürler (organlardan üretilmiştir, diploid)
 2. Diploid hücre suşları,
(Bunlar 2.-50. pasaja kadar sınırlı hayat süreleri olan diploid hücre suşlarıdır.)
 3. Zell-linien (Bunlar sınırsız pasaja tabi tutulabilen tri, tetra-, polyploid genellikle tümör teşkil eden hücrelerdir.)
- b) Suspensiyon kültürleri,
- c) Organ kültürleri.

II. Eski Metodlar :

- a) Harrison (1907) metoduna göre asılı damlada doku yetiştirilmesi,
- b) Carrel tekniğine göre (1923) kapalı sistemde plazma - kültürü,
- c) Maitland-Tekniğine göre (1928) suspense doku kültürü,
- d) Grey'in (1933) Rolling-tüp-plazma tekniği.

III. Uzun Ömürlü Doku :

- a) Frenkel - Tekniği.

Hücre Kültürlerini Hazırlama Şeması :

1. Embryonlar veya organların steril şartlarda alınması,
2. Bunların kapsül, zar ve yağlardan arındırılmaları,
3. Dokuların 1 mm³ büyüklüğünde küçük parçalara bölünmesi,
4. Doku parçacıklarının PBS içinde yıkanmaları ve ön tripsinisasyona tabi tutulmaları.

Tripsinisasyon genellikle % 0,25'lik tripsin eriyiği içinde (PBS-T) sıcakta (37°C), oda ısısında (20-22°C) veya soğukta (+4°C) yapılır. Bundan sonra filtrasyon, santrifüj ve yıkama, hücre sayı-

sının tesbiti ile kültür kaplarına ekim işlemi sürdürülür. Böylece primer kültürler elde edilmiş olur.

Birkaç Üretim Vasatının Terkibi :

- | | |
|---|--------|
| 1. Earle veya Hanks - Tuz Eriyiği | % 78.5 |
| Laktalbuminhydrolysat (% 5'lik) | % 10 |
| Dana serumu | % 10 |
| Phenolrot | % 1.5 |
| Penicillin (beher ml. vasat için 100 Ünite) | |
| Streptomycin (beher ml. vasat için 100 Gamma) | |
| Mykostatın (beher ml. vasat için 100 Gamma) | |
| 2. Laktalbumin-Yeast Ekstrakt Eriyiği | % 88.5 |
| Dana serumu | % 10 |
| Phenolrot | % 1.5 |
| Penicillin, Streptomycin, Mykostatın | |
| 3. TCM Parker 199 | |
| Laktalbuminhydrolysat (% 5'likten) | % 78.5 |
| Dana serumu | % 10 |
| Phenolrot | % 10 |
| Antibiotika | % 1.5 |
| 4. Eagle - Earle Vasatı | |
| Earle dengeli tuz eriyiği | % 86.2 |
| Eagle TC Vitaminleri 100 x | % 1 |
| Eagle TC Amino asitleri 100 x | % 1 |
| Eagle TC Glutamine | % 0.3 |
| Dana serumu | % 10 |
| Phenolrot | % 1.5 |
| Antibiotika | |
| 5. Earle veya Hanks - Tuz Eriyiği | |
| Laktalbuminhydrolysat (% 5'lik) | % 88.5 |
| Phenolrot | % 10 |
| Antibiotika | % 1.5 |

6. Steril Sığır Amnian Sıvısı

Phenolrot	% 98.5
Antibiotika	% 1.5

7. VM 2a - Vasatı

Deionize su	1.000 ml
Natriumchlorid	9.0 g
Potasyum Chlorid	0.42 g
Yeast-Extrakt	1.0 g
Laktalbuminhydrolysat	2.5 g
Kalsiyumglukonat	1.0 g
Glikoz	3.0 g
Natriumbikarbonat	2.0 g
Antibiotika (Penicillin, Strept. ve Mykostatın)	

8. TCM Parker 199

Laktalbuminhydrolysat (% 5'lik)	% 87.5
Dana serumu	% 10
Phenolrot	% 1
Antibiotika	% 1.5

Virus Enfeksiyonlarının Hücreler Üzerindeki Etkisi :

1. Herhangi bir değişiklik yapmazlar,
2. Dejeneratif değişiklik yaparlar,
3. Proliferatif değişiklikler meydana getirirler.

Viruslar tarafından hücrelerde meydana getirilen CPE (Cytopatogen effekt) türleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

1. Zytolyse,
2. Yuvarlaklaşma,
3. Granülatif dejenerasyon,
4. Şişme şeklinde dejenerasyon,
5. Dev hücreler teşkili,
6. Sinsisyen teşkili,

7. Hücreler içinde Vakuollerin oluşması,
8. Hücre içi cisimciklerinin oluşması,
9. Hücre çekirdeklerinde diğer değişiklikler;
 - a) Çekirdeğin büzülmesi (Piknoz),
 - b) Çekirdeğin şişmesi,
 - c) Çekirdek zarının fazla renk alması,
 - d) Çekirdek zarının şişmesi gibi.
10. Proliferasyon.

Monolayer Kültürlerde Plaque Tekniği :

Petri kutularında üretilmiş bulunan Monolayer kültürlerin sıvı vasatları dökülür, PBS ile steril şartlarda yıkanır, virus suspensiyonu kültürler üzerine yaydırılır ve 0.5-4 saat arasında değişen bir süre ile adsorpsiyona bırakılır. Virus suspensiyonu dökülür ve kültürler yeniden PBS ile itinalı bir surette yıkanır. Sonra kültürler üzerine özel Agar yaydırılarak bir tabaka halinde kapatılır. Bu şekilde kültürler 2-10 gün kadar + 37°C'de kuluçkaya bırakılır ve bu süre sonunda kültürler usulüne göre boyanarak meydana gelen «Plaque»'lar sayılır.

Plaque Tekniğinin Önemi ;

1. Hassas muayenelerde virus titrasyonunun yapılabilmesi,
2. Virusi marazi maddelerden virus'un izolasyonuna imkân vermesi,
3. Saf virus suşlarının elde edilmesine yaraması,
4. Çeşitli virus türlerinin tefriki teşhisinde çok faydalı oluşu,
5. Serolojik muayeneler için çok pratik olması,
6. Viral araştırma ve muayenelerde çok geniş imkânlara sahip olması gibi hususlar söylenebilir.

Hücre Kültürlerinden Aşı Üretimi

1. Canlı etkenlerden elde edilen aşılar;

a) Homolog etkenlerden

Tabii olarak mevcut avirulant suşlar (NDV-lentogen suşlar)

Sun'i olarak zayıflatılmış (attenüe) suşlar Paraenflüenza-3

b) Heterolog etkenlerden

Tabii mevcut suşlar (tavuk çiçeğine karşı güvercin çiçeği suşu)

Sun'i olarak zayıflatılmış (attenüe) suşlar. Kızamık virüsü distempere karşı.

2. İnaktif etkenlerden elde edilen Aşılar :

Kimyasal-fiziksel metodlarla inaktive edilmiş «Virulent» etkenlerden. Örnek; şap, tavuk vebası, domuz vebası, v.s. gibi.

Hücre Kültür Serilerinin Devamlı Pasaj Yöntemi :

- İyi gelişmiş hücre kültürlerinin üzerine PBS-T-Versen eriyiği her tarafı kaplayacak şekilde yaydırılır ve hücrelerin bulunduğu cam kaplardan ayrılncaya kadar + 37°C'lik etüvde tutulur, gereğinde kültür kapları hafifçe çalkalanabilir. (Bir litre PBS-T eriyiğine 30 ml. Versen solusyonu katılır.)
- Sonra çözülmüş olan hücreler 3-5 dakika 1200 g (2200 devir/dak.) veya 10 dakika 600 g (1500 devir/dak.) sivri cam godelerde santrifüje edilir.
- Santrifüjden sonra üstte biriken sıvı atılır ve dipteki hücreler üzerine 3-5 ml. kadar üretme vasatı ilâve edilerek bir suspanسیون yapılır. Bu hücre suspensiyonu geniş kanüllü bir şırınga ile (8-10 defa tekrarlamak suretiyle) çekip-bırakmak suretiyle hücrelerin birbirinden iyice ayrılıp serbest hale geçmeleri sağlanır.
- İyi bir suspensiyon haline getirilen hücreler uygun vasatlarla karıştırılarak (sık sık çalkalamak şartıyla, çünkü hücreler zamanla dibe çöker) üretme kaplarına tevzi edilir.

Hücre türüne göre çoğaltma oranı 1:2 ve 1:4 olarak hesaplanmalıdır.

Üretme vasatının pH derecesi 7.3 civarında olmalıdır.

Tavuk Embryosu Fibroblast Hücre Kültür Tekniği :

- Aletler** : Pensler, büyük, küçük, eğri ve düz makaslar, embryo ezicisi veya bir adet Rekord şırınga.
- Cam Malzemeler** : Büyük ve küçük petri kutuları, 200-500 ml. hacimli Erlenmeyerler, Santrifüj godeleri, 5 ml. ve 10 ml.'lik pipetler, kauçuk tıplar ve üretme kapları.
- Materyal** : 8-12 günlük kuluçkada bırakılmış tavuk yumurtası, önceden ısıtılmış PBS ve PBS-T, Earle-Eriyiği, % 5'lik Laktalbuminhydrolysat eriyiği, inaktive dana serumu, Phenolrot Antibiotika, Kristalviole eriyiği.

1. Kuluçkadan çıkarılan tavuk yumurtaları lamba ile kontrol edilerek canlıları ayrılır,
2. Hava boşluğu sınırı lamba altında işaretlenir,
3. İşaretli hava boşluğu sahası alkol veya tentüridiyotla dezenfekte edilerek eğri bir makas ve pens yardımı ile bu kısma isabet eden yumurta kabuğu kesilerek ayrılır,
4. Yumurta kabuğu zarının açılmasından sonra embryo eğri bir pens yardımı ile yumurta içinden çıkarılarak petri kutusu içine konur,
5. Kalp ve akciğerlerin dışında embryoların baş ve iç organları atıldıktan sonra embryolar iki defa PBS ile yıkanır. Sonra ya bir makas yardımı ile veya embryo ezicisi ile embryolar çok küçük parçalara ayrılır (doğranır),
6. Doku parçacıkları bir erlenmeyer içine doldurulduktan sonra iki veya üç defa PBS ile yıkanır, doku parçacıklarının dibeye çökmesinden sonra üstte toplanan sıvı kısım dikkatli olarak vakumla emdirilerek veya dökmek suretiyle atılır.
7. Doku parçacıkları üzerine 50-100 ml. PBS-T katılarak 37°C'de 5 dakika ön tripsinisasyona tabi tutulur ve üstte biriken sıvı kısım atılır.
8. Beher embryoya 10 ml. isabet edecek miktarda yeniden PBS-T doku parçacıkları üzerine konur ve 37°C'de 1 1/2 saat veya oda ısısında 2-3 saat magnetik karıştırıcı üzerinde tripsinize edilir.

9. Sonra hücre suspensiyonu 6 kat tülbentten süzülerek 5-8 dakika 200 g (800-1000 devir/dakk.)'de santrifüje edilir. Üstte biriken sıvı atılır ve yeniden sediment PBS ile suspensiyon haline getirilerek tekrar santrifüje edilir. (Bu iş üstte biriken sıvı kısım berraklaşınca kadar devam ettirilmelidir.)
10. Hücre sedimenti ya üretme vasatı veya PBS'ten 20 ml. içinde suspensiyon haline getirildikten sonra «Fuchs-Rosenthal» lamında hücre sayısı belirlenir.
11. Hücrelerin üreyebilmesi için beher ml. üretme vasatı için 500.000 - 1.000.000 hücrenin hesaplanması gerekmektedir. Buna göre hücre sedimenti üretme vasatı içinde suspensiyon haline getirilerek üretme kaplarına tevzi edilmelidir.
12. 24-48 saat sonra hücreler tam anlamıyla buldukları kültür kaplarını kaplamış olur. Bundan sonra kültür kaplarındaki üretme vasatları dökülerek bunun yerine muhafaza vasatı konur.

Örnek :

Üretme vasatı; % 78,5 Earle Eriyiği
% 10 Laktalbuminhydroolisat eriyiği
(% 5'lik)
% 10 Dana serumu
% 1.5 Phenol rot
Antibiotika

Muhafaza vasatı; Sığır amnioi mayii
% 1.5 Phenol rot
Antibiotika

veya

% 87 Earle solusyonu
% 10 Laktalbumin (% 5'likten)
% 1.5 dana serumu
% 1.5 Laktalbumin
ve Antibiotika

Hasılat : Ortalama olarak bir embryodan 40-60 ml. kadar hazır hücre suspensiyonu elde edilebilmektedir.

Büyük Memelilerin Böbreklerinden Hücre Elde Etme Tekniği :

Aletler : Çeşitli büyüklükte pensler, çeşitli büyüklükte eğri ve düz makaslar, 1-2 adet tatlı kaşığı, 1-2 bistüri, magnetik karıştırıcı ve taflonla kaplı magnetik kısa çubuk.

Cam Malzemeler : Büyük ve küçük petri kutuları, 1 adet erlenmeyer, 100-500 ml. hacimde santrifüj tüpleri, 510 ml.'lik pipetler, kültür kapları, steril tulbentle kaplı cam Becherler, kauçuk tıplar.

Materyal : Uygun hayvan türlerinin böbrekleri, önceden ısıtılmış PBS - PBS-T ve Earle solusyonları, Hanks, Med. 199 v.s., Dana serumu, % 5'lik Laktalbumin, Phenolrot, Antibiotika Kristallviolet solusyonları.

1. Taze kesilmiş hayvanların böbrekleri steril şartlarda alınarak kapsüllerini yaralamadan yağlarından ayıklanır,
2. Böbrek kapsülü bir bistüri ile kenarından boydan boya kesilir ve önce üst tarafındaki sıyrılır,
3. Alet değişiminden sonra kapsülü sıyrılmış olan böbrek yüzeyinden ince dilimler halinde kortikal kısım makasla alınır, dana böbreğinde ise her bir renkli aynı şekilde işleme tabi tutulur. Böbreğin diğer yüzeyinde aynı işleme tabi tutularak kortikal kısımlar ince dilimler halinde bir petri kutusu içinde toplanır.
4. Sonra bir makasla böbrek dilimcikleri çok küçük parçacıklara doğranır. Sonra bir kaşıkla doğranan böbrek parçacıkları bir erlenmeyer içine konur ve birçok defa PBS ile yıkanır. Üstte toplanan kanlı sıvı ve doku parçacıkları dikkatli olarak uzaklaştırılır.
5. Bundan sonra tahminen böbrek parçacıklarının iki katı kadar PBS-T erlenmeyere konarak oda derecesinde magnetik karıştırıcı üstünde 20-30 dakika ön tripsinisasyona bırakılır. Üstte biriken sıvı kısım atılır.
6. Yeniden böbrek parçacıklarının üzerine (her bir böbrek için ortalama 50-100 veya 150 ml. hesabıyla) önceden 37°C'de ısıtılmış olan PBS-T konur ve 3-4 saat süreyle oda derecesinde tripsi-

nize edilir. Domuz ve dana böbreklerinde tripsinisasyon 4°C'de bir gece soğukta da yapılabilir.

7. Sonra hücre-Tripsin suspensiyonu steril 3-6 kat tulbentten süzülür, elde edilen filtrat 5-10 dakika 800-1000 devirde santrifüj edilir, üstteki sıvı kısım atılır, yeniden PBS ile bir suspensiyon yapılır ve tekrar santrifüje edilir.

Yıkama işine üst tarafta toplanan sıvı kısım berraklaşımaya kadar devam edilir. (Ortalama 3-4 kez)

8. Hücre sedimenti 20 ml. üretme vasatı içinde suspensiyon haline getirilerek hücre sayısı tesbit edilir.
9. Beher ml. üretme vasatı içindeki konsantrasyon bazı hücre türlerine göre şöyledir.

<u>Böbrek türü :</u>	<u>Beher ml. üretme vasatı için gerekli hücre adedi :</u>
Dana böbreği	200.000 — 330.000
Domuz böbreği	400.000 — 600.000
At böbreği	800.000 — 1.000.000
Köpek böbreği	200.000 — 300.000
Maymun böbreği	300.000 — 400.000
Koyun böbreği	800.000 — 1.000.000
Ada tavşanı böbreği	400.000 — 600.000
Kedi böbreği	300.000 — 400.000

Bu tabloya göre suspensiyondaki hücre sayısı hücre üretme vasatı ile arzu edilen konsantrasyona ayarlanarak kültür kaplarına tevzi edilir.

10. Hücre kültürlerinin monoleyer hale gelebilmeleri için hücre türlerine göre şu sürelerle ihtiyaç vardır.

Dana böbreği	5 - 7 gün (bir defa vasat değişimi)
Domuz böbreği	4 - 7 » (» » » »)
At böbreği	7 » (» » » »)
Köpek böbreği	4 - 10 » (» » » »)
Maymun böbreği	6 - 8 » (» » » »)
Koyun böbreği	7 - 10 » (1-2 » » »)
A. Tavşanı böbreği	7 - 10 » (1-2 » » »)
Kedi böbreği	7 » (1 » » »)

İnsan Amnion Hücre Üretim Tekniği :

Aletler : Pensler, makaslar, magnetik karıştırıcı ve taf-
lonlu magnetik çubuk.

Cam Malzemeler : Plasenta için büyük cam bir kap, büyük ve
küçük petri kutuları, 500 ml. hacminde bir er-
lenmeyer, santrifüj tüpleri, 5-10 ml.'lik pipet-
ler, kültür üretme kapları, kauçuk tıpalı.

Materyal : İnsan plasentası, önceden ısıtılmış PBS, PBS-T
ve Hanks solusyonu, % 5'lik Laktalbumin,
Eagle vitaminleri, Eagle amino asitleri 100x;
Eagle glutamini, dana veya insan serumu,
Phenolrot, Antibiotika ve Kristallviole solus-
yonu.

1. Doğumdan hemen sonra plasenta içinde antibiotikli PBS bulu-
nan steril cam bir kaba alınır. İşlemeye başlanıncaya kadar oda
ısısında tutulur ve mümkünse taze olarak işlenir.
2. Amnion zarı steril bir eldivenle plasentadan ve koryondan ay-
rılır, Amnion zarı üzerindeki kan ve sümüksel kısım başka bir
petri kutusu içinde PBS ile yıkanır. Antibiotikli PBS en az 2-3
defa değiştirilmelidir.
3. Amnion zarı 2 ilâ 4 parçaya kesilir ve bir erlenmeyer içine ko-
narak üzerine 100-200 ml. PBS-T ilave edilir. 10-15 dakika
37°C'de ön tripsinisasyon yapılır.
4. Bu süre sonunda sıvı kısım atılır ve yeniden ısıtılmış PBS-T
katılarak 2-4 saat süre ile 32-37°C'de tripsinize edilir. Burada
magnetik karıştırıcıya ihtiyaç yoktur, yalnız arada sırada erlen-
meyer hafifçe çalkalanmalıdır. (20-30 dakikada bir defa).
5. Tripsinisasyon süresinin sonunda Amnion zarı PBS-T içinde 4-5
dakika kuvvetle çalkalanarak hücrelerin zardan ayrılmaları sağ-
lanmalıdır. (Lehmann-Grube 1962) Bu çalkalama işine zar üz-
rinden hiçbir hücre ayrılmayınca kadar devam edilir. Her se-
ferinde yeni solusyon konmalıdır.
6. Hücre suspensiyonu 6 kat tülbentten süzülür ve elde edilen filt-
rat 10 dakika 200-250 g. (ortalama 700-800 d/dak.) santifüje
edilir, üstteki sıvı atılır. Yıkama işi 2-3 defa tekrarlanabilir.
7. Hücre sedimenti 20 ml. üretme vasatı içinde suspensiyon hali-
ne getirilir ve hücre sayısı mikroskopta tayin edilir.

hücre sedimenti iyice karıştırılır ve yıkama işi üstte biriken sıvı kısmı berraklaşınca kadar devam eder.

8. Hücre sedimenti 20 ml. üretim vasatı içinde suspense edilir ve hücre sayısı tesbit edilir.
9. Beher ml. üretim vasatı için; fare böbreklerinde 500.000, Hamster böbreklerinde ise 300.000 - 500.000 adet hücre isabet edecek tarzda bir suspensiyon hazırlanmalıdır.
10. Arzu edilen konsantrasyona göre hazırlanan üretim vasatı - hücre suspensiyonu kültür kaplarına tevzi edilir. Burada dikkat edilmesi gereken bir husus ise fare hücrelerinin pH- derecesine çok hassas oluşlarıdır. Vasat kültür kaplarında gaz verilmeyi müteakip sarı, pipet içinde iken portakal renginde olmalıdır.
11. Fare hücre kültürlerinin 2 gün sonra vasatları değiştirilir ve ekimden 3 gün sonra monoleyer hale gelirler.

Üretim Vasatı :

- a) Fare böbreği % 91.5 Earle solusyonu
% 4 Dana serumu
% 3 Laktalbumin (% 5'lik)
% 1.5 Phenolrot
Antibiotika
- b) Hamster böbreği % 78.5 Earle solusyonu
% 10 Dana serumu
% 10 Laktalbumin (% 5'lik)
% 1.5 Phenolrot
Antibiotika

Muhafaza Vasatı :

Fare böbreğinde üretim vasatının aynı veya üretim vasatına % 2 oranında civciv serumu katılması,

Hamster böbreğinde; Sığır amnion sıvısı
% 1.5 Phenolrot ve
Antibiotika.

Ortalama olarak 20-30 fare böbreğinden 200-300 ml. hücre suspensiyonu elde edilmektedir.

Buna mukabil 20 hamster böbreğinde ise 200-400 ml. hücre suspensiyonu elde edilebilir.

Dana böbreğinden: 400-800 ml, Domuz böbreğinden: 400-700 ml., At böbreğinden: 600-800 ml., Köpek böbreğinden: 400-500 ml., Maymun böbreğinden: 1000-1500 ml., Koyun böbreğinden: 400-500 ml., Kedi böbreğinden: 100 ml., Tavşan böbreğinden: 50-100 ml.

Hamster ve fare böbreklerinden hücre elde etme tekniği :

- Aletler** : Küçük ve büyük pensler, makaslar, bistüriler, spatül, magnetik karıştırıcı ve taflonlu çubuk.
- Cam Malzemeler** : Küçük petri kutuları, 100-200 ml.'lik erlenmeyer, santrifüj tüpleri, 5-10 ml.'lik pipetler, kültür kapları ve kauçuk tıplar.
- Materyal** : 14-16 günlük fareler ve genç hamsterler, önceden ısıtılmış PBS, PBS-T ve Earle solusyonu, % 5'lik Laktalbumin, dana serumu, Phenolrot ve antibiotika.

1. Hamster veya fareler; başları makasla kesilmek suretiyle öldürülür. Hayvanların kanlarının tamamen akması için sırt üstü yatırılırlar.
2. Kullanılmamış makas ve pensler yardımı ile steril olarak böbrekler alınarak petri kutusu içine toplanır.
3. Böbreklerin kapsülleri ve hilüsleri uzaklaştırıldıktan sonra yeni bir petri kutusu içine konur ve makasla çok küçük parçalara doğranır. (Ortalama 1 mm² büyüklüğünde.)
4. Doğranan böbrek parçacıkları bir erlenmeyere aktarılır ve 2-3 defa PBS ile yıkanır. Doku parçacıklarının dibeye çökmesinden sonra üstte toplanan bulanık sıvı kısım atılır.
5. Sonra böbrek parçaları üzerine PBS-T katılır (ortalama 30-60 ml.) ve tripsiniasyon oda derecesinde fraksiyoner olarak (10'ar dakika) yapılır. Hamster böbreklerinde bu iş ara verilmeksizin yine oda ısısında 2-3 saat sürdürülerek tamamlanır.
6. Her tripsiniasyon süresi sonunda elde edilen hücre suspensiyonu 4-6 kat tullebentten süzülerek işlemin sonu alınıncaya kadar 4°C buzdolabında bekletilir.
7. Sonra tripsin-hücre karışımı 5-8 dakika 150-200 g (600-800 d/dak) de santrifüje edilir, üstteki sıvı atılır ve yeniden PBS ile

Domuz böbreği d.	T.C. 199	% 88
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Dana serumu	% 2
	Antibiotika	
veya		
	VM2a - vasatı	% 98.5
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Antibiotika	
At böbreği	Earle solusyonu	% 88.5
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Phenolrot	% 1.5
	Antibiotika	
veya		
	Sığır amnion sıvısı	%
	Phenolrot	% 1.5
	Antibiotika	
Köpek böbreği	Earle veya Hanks s.	% 88
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Dana serumu	% 2
	Phenolrot	% 1.5
	Antibiotika	
Maymun böbreği	T.C. 199 ve Antibiotika	
	veya	
	Hanks solusyonu	% 90
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Phenolrot	
	Antibiotika	
veya		
	Sığır amnion sıvısı, phenolrot ve Ant	
Tavşan ve kedi böbrekleri	Üretim vasatlarının aynı olup yalnız dana serumu oranı % 1-2 olarak ayarlanmalıdır.	

Değişik hayvan türlerine ait tek bir böbrekten elde edilen hücre suspensiyon miktarı ortalama olarak şöyledir :

Koyun Böbreği	Earle solusyonu	% 78.5
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Dana serumu	% 10-20
	Phenolrot	% 1.5
	Antibiotika	
Tavşan Böbreği	Hanks veya Earle solusyonu	% 78.5
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Dana serumu	% 10
	Phenolrot	% 1.5
	Antibiotika	
Kedi Böbreği	Earle solusyonu	% 73.5
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Dana serumu	% 15
	Antibiotika	
	veya	
	T.C. 199	% 75
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Dana serumu	% 10
	Phenolrot	—
	Antibiotika	

Muhafaza Edici Koruyucu Vasatları :

Dana böbreği	Earle solusyonu	% 88.5
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Phenolrot	% 1.5
	Antibiotika ve gereğinde	
	% 2 dana serumu,	
Domuz böbreği	Sığır Ammion sıvısı	
	Phenolrot ve Antibiotika	
	veya	
	Earle solusyonu	% 87.5
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Dana serumu	% 1
	Phenolrot	% 1.5
	Antibiotika	
	veya	

Üretim Vasatları :

Dana Böbreği	Earle solusyonu	% 78.5
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Dana serumu	% 10
	Phenolrot	% 1.5
	Antibiotika	

Domuz Böbreği	Earle solusyonu	% 78.5
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Dana serumu	% 10
	Phenolrot	% 1.5
	Antibiotika	

veya

T.C. 199	% 90
Dana serumu	% 10
Antibiotika	

At Böbreği	Earle solusyonu	% 68.5
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Dana serumu	% 20
	Phenolrot	% 1.5
	Antibiotika	

Köpek Böbreği	Earle solusyonu	% 78.5
	% 5'lik Laktalbumin	% 10
	Dana serumu	% 10
	Phenolrot	% 1.5
	Antibiotika	

Maymun Böbreği	T.C. 199	% 97
	Dana serumu	% 3
	Phenolrot	% 1.5
	Antibiotika	

veya

Hanks solusyonu	% 83.5
% 5'lik Laktalbumin	% 10
Dana serumu	% 5
Phenolrot	% 1.5
Antibiotika	

8. Hücrelerin iyi üreyebilmesi için; üretme vasatı içindeki hücre konsantrasyonu beher ml. vasat içinde en az 300.000 - 350.000 adet olmalıdır. Bu tarzda hazırlanan hücre suspensiyonu kültür kaplarına tevzi edilir.
9. Ekimden 6-7 gün sonra hücreler buldukları kültür kaplarında çok iyi üreyerek tabanı kaplarlar, bundan sonra üretme vasatı atılarak yerine muhafaza vasatı konur.

Üretim Vasatı :

- % 67-77 Hanks-solusyonu,
- % 10 Laktalbumin (% 5'lik)
- % 1020 İnsan serumu,
- % 0.9 Eagle amino asidi,
- % 0.9 Eagle vitamini,
- % 0.9 Eagle Glutamini, Phenolrot ve antibiotik

veya

- % 67.5 Hanks-solusyonu,
- % 10 Laktalbumin (% 5'lik)
- % 2.5 Embryonal ekstraktı,
- % 20 İnsan serumu, phenolrot ve antibiotik,

Muhafaza Vasatı :

- % 86 Hanks-solusyonu,
- % 10 Laktalbumin (% 5'lik)
- % 2 Tavuk embryosu ekstraktı,
- % 2 Dana serumu, % 1.5 phenolrot, antibiotik,

veya

- % 80 Hanks-solusyonu,
- % 5 Laktalbumin (% 5'lik)
- % 5 Bacto yeast ekstrakt ve yeastolat ((% 1'lik),
- % 10 Dana serumu,
- % 1.5 Phenolrot ve antibiotik

Plasentanın büyüklüğüne göre herbirinden 500-1500 ml. hazır hücre suspensiyonu elde edilir.

Koyun, Keçi, Kuzu, Dana ve Yavru Domuz Testis Hücre

Kültürü Elde Etme Tekniği :

Aletler : Küçük pensler, küçük sivri uçlu makaslar, bir tatlı kaşığı, bir magnetik karıştırıcı ve taflonlu çubuk.

Cam malzemeler : Çeşitli büyüklükte petri kutuları, bir erlenmeyer, (1/2 lt.) santrifüj tüpleri, 5-10 ml.'lik pipetler, kültür üretme kapları, tulbentli beherglaslar ve kauçuk tıplar.

Materyal : 3-8 haftalık hayvanlardan taze olarak kapsülleriyle birlikte alınmış testisler, önceden ısıtılmış PBS, PBS-T, ve Earle solusyonu, Laktalbumin % 5'lik, dana serumu, phenolrot, anti-biotik, kristalviole solusyonu.

1. Testisler daima kapsülleriyle birlikte ve kapsüller yaralanmadan alınmalıdır.
2. Steril şartlarda testis kapsülü (tunika vaginalis) ve Epididimis testisten ayrılır, testis ayrı bir petri kutusuna konur.
3. Kullanılmamış kesicilerle testis ortadan ikiye bölünür ve bir kaşık yardımı ile testisin paranziması iç zardan kazınmak suretiyle alınır (tunika albugina) ve çok küçük parçalara doğranır.
4. Elde edilen lapa kıvamındaki madde birkaç defa PBS ile bir erlenmeyer içinde yıkanır. Üstte biriken kanlı sıvı kısım dikkatlice atılır.
5. Ön tripsinisasyon için doku parçacıkları üzerine 50-100 ml. PBS-T katılarak 5-10 dakika magnetik karıştırıcı üzerinde çevrilir. Sonra üstteki sıvı atılarak yeniden PBS-T konur ve oda derecesinde 1-3 saat veya etüvde (37°C) yine magnetik karıştırıcı üstünde fraksiyoner olarak tripsinize edilir. Her bir testis için 15 ml. PBS-T hesaplanmalıdır.

6. Sonra Tripsin-hücre suspensiyonu 6 kat tulbentten süzülerek 5-8 dakika 200 g (7-800 d/dak.) de çevrilir ve bu yıkama işi birkaç defa tekrarlanır. (PBS ile)
7. Hücre sedimenti 20 ml. üretme vasatı içinde suspense edilerek hücre sayısı saptanır.
8. Hücre üretimi için hücre türlerine göre beher ml. vasat içindeki hücre konsantrasyonu şu şekilde hesaplanmalıdır.

Yavru domuz testisi	100.000 — 300.000 hücre
Dana testisi	200.000 »
Keçi testisi	400.000 »
Koyun testisi	400.000 »

9. Kültürlerin monoleyer hale gelebilmeleri için hücre türlerine göre değişik zamanlara ihtiyaç vardır.

Yavru domuz testisinde	6-7 gün (1 kez vasat değişimi)
Dana tesisinde	6 gün (1 kez vasat değişimi)
Teke ve koç testisinde	6-10 gün (1-2 kez vasat değişimi)

Üretim Vasatı :

% 78.5	Earle solusyonu veya Hanks s.
% 10-20	Dana serumu,
% 10	Laktalbumin % 5'lik,
% 1.5	Phenolrot ve antibiotik.

Muhafaza Vasatı :

Yavru domuz testis hücre kültürü için;	
Sığır amnion sıvısı	
% 1.5	Phenolrot ve antibiotik.

veya

% 86.5	Earle solusyonu,
% 10	Laktalbumin % 5'lik,
% 2	Dana serumu,
% 1.5	Phenolrot ve antibiotik.

Dana testis hücre kültürü :

% 88	Earle solusyonu
% 10	Laktalbumin % 5'lik,
% 2	Phenolrot.

Teke ve koç testis hücre kültüründe :

% 2	Dana serumlu üretme vasatı veya
% 1.5	Phenolrot, antibiyotikli sığır amnion SIVISI.

Ortalama olarak bir yavru domuz testisinden; 200-300 ml., bir dana testisinden 300 ml. ve beher teke ve koç testisinden ise 100-150 ml. hazır hücre suspensiyonu elde edilebilir.

İnvitro Olarak Hücrelerin Hibridizasyonu, İdentifikasyonu, Klonizasyonu ve Konserve Edilmesi.

1. Hücre-Konserve, Depolanması ve Nakliyatı :

Permanent (Zell-Linien) hücrelerin devamlı sub kültürlerinin yapılması bunların laboratuvarlarda başka hücrelerle, bakteriler, virus ve mikoplazmalarla kontamine olmaları tehlikesini birlikte getirmektedir. Bunun dışında hücrelerin belli subkültürlerinin daima hazır bulunması gerektiğinden devamlı pasajları viruslara karşı olan duyarlılıklarının kaybolmasına sebep olurlar. Bu bakımdan hücrelerin konserve edilerek depolanması gereklidir.

Kısa sürelerle hücre kültürlerinin + 25°C ile + 4°C'de depolanması (muhafazası) mümkündür. Bu ısılarda hücrelerin 2-3 gün muhafazası anında hücrelerde bir büzüşme olur ve hücrelerde herhangi bir değişiklik olmadan dinlenme safhasına geçerler. Hücrelerdeki metabolizma + 4°C'de çok yavaş seyreder. Sağlıklı hücre kültürlerinin büyük bir bölümü böylece 4-8 hafta korunabilirler.

Hücrelerin muhafaza sürelerinin uzamasında depolanmış hücrelerde hiçbir şekilde vasat değişimi yapılmaz. Eğer kültürler kullanılacaksa bunlar 37°C'de kuluçkaya bırakılır. Bu meyanla hücrelerdeki ilk vasat değişimi en erken 2 gün sonra yapılmalıdır. Bu şekilde işleme tabi tutulan hücre kültürleri kendi metabolizma faaliyetlerini çok çabuk normalize ederler ve herhangi bir kısıtlamaya tabi tutulmadan kullanılabilirler.

Primer hücre kültürleri + 4°C'de saklanmamalıdır. Bunlar en iyisi oda derecesinde muhafaza edilmelidir.

Uzun süre muhafaza edilmesi gerekli hücre kültürleri konserve edici maddelerle işleme tabi tutulduktan sonra derin dondurucularda saklanmalıdır. Hücrelerde dondurma anındaki tahribatı önlemek için hücre süspansiyonlarına gliserin veya Dimethylsulfoxid (DMSO)'in değişik konsantrasyonlar ilavesi gereklidir. Konserve maddelerinin hücre kültürlerine katılmasından sonra derin dondurulması anında gliserin ve DMSO hücrelerin içinde bulunan suların kristalleşmesi hızını 0°C ile -46°C arasında değiştirir veya tamamen önler. Çünkü gerek gliserin ve gerekse DMSO hücrelerdeki suyu penetrasyon suretiyle bağlar. DMSO gliserinden daha çabuk hücre içine girdiğinden dondurmada daha uygun görülmektedir. Bu bakımdan konserve edici maddelerin hücre içine girmelerini sağlamak için +4°C'de 4-6 saat buzdolabında tutulmaları gereklidir. Konserve edici maddelerin hücre içine giriş süratleri hücre türüne göre değişiktir. Gliserin ve DMSO hücre vasatına % 5-10 oranında konulur. DMSO ile dondurulan hücreler yeniden eritildiklerinde gliserinle muamele edilenlere nazaran daha çabuk geliştikleri tesbit edilmiş. Yapılan çalışmalar hücre süspansiyonlarının yavaş yavaş dondurulmaları çabuk dondurulmalarına nazaran daha koruyucu bir etkiye sahiptir. Bu bakımdan dondurma hızı dakikada 1°C olmalı ve -25°C'ye kadar inildikten sonra istenilen ısıda dondurulmalıdır. HeLa- ve L- hücreleri tedrici olarak dondurulduklarında beş yıl süre ile canlılıklarını korudukları buna mukabil çok çabuk olarak (3-5 dakika) dondurulmaları halinde ise canlılıklarını ancak 3-12 ay muhafaza edebildikleri tesbit edilmiştir.

Bazı araştırmacılar domuz böbreği permanent hücre kültürlerini (IB-RS-2) aniden -80°C'de dondurduklarını ve sonra bunları sıvı azot gazı (-190°C) koyduklarını ve bu hücrelerin 5,5 yıl sonra canlılıklarında herhangi bir değişiklik olmadığını tesbit etmişlerdir.

Dondurulan hücreler -70°C ile -190°C'de muhafaza edilir. Üst sınır -70°C'dir. Fakat kısa süreli dondurmalarda -50°C ile -60°C'de hücreler çok çabuk tahrip olur. Buna mukabil -70°C'de hücre kültürlerinde herhangi bir kayıp olmadan 12 ay süre ile hücreler muhafaza edilebilir. Daha uzun süreli depolanmalarda ise hücrelerde tahribat meydana gelir. Çünkü enzimatik olaylar -120°C den -125°C'ye kadar seyretmektedir. Fakat -125°C'nin altında hücreler süresiz olarak dondurularak muhafaza edilebilir.

—190°C'de sıvı azot gazı içinde hücrelerin muhafazası için özel cam ampullere ihtiyaç vardır. Çünkü bu tür ampuller ısı oynamalarına karşı dayanıklıdır.

Hücrelerin içinde bulunduğu vasata konserve edici maddelerin dışında % 10-20 oranda dana serumu katılması halinde hücrelerin dondurulmasından iyi sonuç alınmıştır. Protein katılmamış tuz solüsyonlarında ve sentetik vasatlarda hücrelerin üreme oranı düşüktür. Bazı araştırmacılar vasatlara % 10 dana serumu, % 0,5 Laktalbuminhidrolizat ve ortalama % 10 oranında konserve edici madde (DMSO veya gliserin) katılmasını tavsiye etmektedirler.

Dondurulacak hücre kültürlerinde hücre konsantrasyonunun 1-4 milyon hücre/ml. olarak tesbiti hücrelerin yeniden üreme şansını yükseltmektedir.

Eritilen hücrelerin dondurmadan çok çabuk çıkarılarak eritilmesi gereklidir. Böylece hücre içindeki kristalleşmeler önlenmiş olur. Kristalizasyon ozmotik basınçta değişiklik yaparak hücrelerin tahribine sebep olur. Bu bakımdan hücrelerin bulunduğu ampuller dondurucudan alınır alınmaz (+37°C'lik) benmari konur ve hafif çalkalama ile sıvı eritilir (1,5 dakika). Sonra hücre süspansiyonu kültür vasatında sulandırılarak ekim yapılır, hücrelerin yapışmasından sonra (ortalama 4-8 saat) vasat değiştirilir ve böylece konserve edici madde hücre kültürlerinden uzaklaştırılmış olur. Virus laboratuvarlarında çabuk metod permanent hücre kültürleri için daha uygun bulunmaktadır.

Hücrelerin derin dondurucularda konserve edilmesi tekniği :

Materyal : 1,2 ml., - 1,5 ml. steril ampuller, sanrifüj tüpleri, 10 ml.'lik enjektörler ve iğneleri, hücre sayımına özel lamlar, PBS, kültür vasatı, steril Dimethylsulfoxid (DMSO), (açık otoklav 30 dakika sterilize edilmiş olmalıdır.), % 0,1'lik trypan mavisi. Hücre sayımı yapıldıktan sonra üretme vasatına % 10 DMSO katılır ve $1-2 \times 10^6$ hücre/ml.'ye ayarlanır.

Sonra hücre süspansiyonundan şırınga ile ampullere 0,8 - 1 ml. konduktan sonra ampuller alevde kapatılır. Ampullerin iyice kapalı olup olmadıkları kontrol edilir. Dondurulan ampuller 4-6 saat +4°C'de buzdolabında tutulur sonra —80°C'de dondurulur. 2-3 gün sonra ampuller bir kap içinde sıvı azot gazı içinde depolanır.

Hücreler eritileceği zaman 1 veya 2 ampul alınır içinde + 37°C lik su bulunan bir kabı bırakılır ve hafifçe çalkalanırlar. Hücre süspansiyonu tamamen eridiğinde ampulün boynu alkolle dezenfekte edildikten sonra kesilir ve hücre süspansiyonu steril bir şırınga ile alınarak 3-5 ml. üretim vasatı içinde süspanse edilir ve kültür kaplarına ekilir. 4-6 saat sonra kültür vasatı değiştirilerek konserve edici maddeler uzaklaştırılmış olur.

Yukarıdaki bu teknik permanent hücre kültürlerinin muhafazası için çok uygun bir methoddur. Primer hücre kültürlerinin konservesi veya tripsinize edilmiş hücrelerin muhafazası için bu materyaller yavaş yavaş dondurulmalıdır.

Hücre kültürlerinin nakli : Bu zamanda hücre kültürleri çok uzak mesafelerde bulunan bir laboratuvarından diğer laboratuvara hava yolu ile 2-3 gün içerisinde rahatlıkla ulaştırılmaktadır. Yalnız bu transport anında minimal şartların yerine getirilmesi gereklidir. Hücrelerin naklinde en büyük güçlük ekstrem etkenlerin örneğin çok sıcak veya soğuk ısıların varlığını dikkate almak gereklidir. Bu bakımdan ısıyı geçirmeyen izole kaplar kullanılmalıdır.

Hücreler süspansiyon halinde veya monolayer kültürler halinde sevk edilebilir. Süspansiyonlarda beher milimetre kültür vasatında 1×10^6 hücre bulunmalıdır. Buna mukabil monolayer kültürlerin sekinde ise kültür şişeleri vasatla tamamen ağzına kadar doldurularak steril şartlarda kapatılmalıdır. Böylece hücrelerin çalkalanma suretiyle kültür kaplarından kopmaları önlenmiş olur.

KAYNAKLAR

- 1 — A. MAYR - P.A. BACHMANN - B.BIBRACK - G.WITMANN (1974) : Virologische Arbeitsmethoden Band I.
- 2 — CNSTANCE A.C. ROSS - ELEANOR J. BELL - E.J.STOTT (1966) : Diagnostic Methods in Clinical Virology.
- 3 — G.HENNEGERG - H.KÖHLER (1961) : Praktikum der Virusdiagnostik.
- 4 — DUNNEBACKE, TH. ve E.M.ZITCER (1957) : Preparation and cultivation of primary human amnion cells/Cancer Res. 17.1043.
- 5 — LEHMANN - GRUBE, F. (1962) : Prep. of cells cultures from human amniotic membranes/Arch. ges. Virusforsch. 11, 258.
- 6 — HENIGST, W. (1963) : Vorteilhafte Anwendung primärer menschlicher Amnionzellkulturen bei virologischen Routine-untersuchungen. Z. Hyg. 149, 218.
- 7 — MAY, G. ve H. SHU (1964) : Zur Technik der Amniontripsinierung Zbl. Bakt. I. Orig. 192, 295.
- 8 — WILHELM KLÖNE (1953) : Laboratoriumsdiagnose Menschlicher Virus-Und Rickettsieninfektionen.