

Hücre Kültürlerine Genel Bakış

Harika Eylül ESMER DURUEL^{1*}, Nazlı Sevim ÇAĞAN², Serra IŞIK³, Figen Esin KAYHAN⁴

*Sorumlu yazar: harikaeylul@gmail.com

¹ Kahramanmaraş İstiklal Üniversitesi, Elbistan Meslek Yüksekokulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı, KAHRAMANMARAŞ

Orcid No: 0000-0002-0792-2062 / harikaeylul@gmail.com

² Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Programı, İSTANBUL

Orcid No: 0000-0002-4397-517X / nazlicagan@gmail.com

³ Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Programı, İSTANBUL

Orcid No: 0000-0002-8298-2612 / isikserraa@gmail.com

⁴ Marmara Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İSTANBUL

Orcid No: 0000-0001-7754-1356 / fekayhan@marmara.edu.tr

Öz: Hücre kültürü yöntemi, biyoteknolojik bağlamda geliştirilen bir yöntem olup hücrelerin laboratuvar şartlarında ve özel koşullar altında, doğal ortamlarının dışında yetiştirilmelerini ifade eder. İlk olarak yetişkin kurbağa sinir liflerinin, lenf sıvıları içerisinde büyütülmesi ile hayatımıza girmiştir. Geçmişten günümüze çalışılmakta olan hücre hatlarının gereksinimlerinin birbirlerinden farklı oldukları belirlenmiştir. Bu farklılıklar göz önünde bulundurularak doku, vasat ve ortam koşulları değiştirilmiş ve günümüzde kullanımı devam etmekte olan farklı hücre hatları ile kültür yöntemleri bulunmuştur. Günümüzde farmasötik, tıbbi ve biyolojik araştırmalarda çeşitli hücre hatları kullanılmaktadır. Bu hücre hatları, hücre biyolojisi ile doku morfolojisinin anlaşılması ve bu sayede doku mühendisliğinin geliştirilmesi için kullanılmaktadır. Genel olarak iki boyutlu hücre kültürü modeli kullanılıyor olsa da son zamanlarda üç boyutlu hücre kültürü modelleri de tercih edilmektedir. Besiyerleri farklı ihtiyaçlara yönelik hizmet etseler de genel olarak ortak bazı bileşenlerin hücre kültürü ortamları için son derece önemli olduğu bilinmektedir. Bu ortak bileşenler incelendiğinde özellikle karbonhidrat kaynakları ve serum ilk sıralarda yer almaktadır. Bunun en temel nedeni karbonhidratların temel enerji kaynaklarını oluşturması ve serumun ise gerekli büyüme faktörlerinin yanı sıra farklı hormon ve bileşenler içermesidir. Hücre kültürü uygulamalarında vasat kimyasal bileşenleri kadar hücrelerin bulunduğu ortamın çevresel faktörleri de hücre büyümesi ve devamlılığı açısından önemlidir. Ayrıca hücre kültürü yöntemlerinde hijyen konusuna hassasiyet gösterilmelidir. Çünkü kültür ortamı, kimyasal bileşenler ve çevresel faktörler birlikte ele alındığında aseptik koşullarda çalışılmaz ise kontaminasyon riski ortaya çıkmaktadır. Bu derlemede hücre kültürü yöntem ve uygulamalarına genel bir bakış açısı sunulacaktır.

Anahtar Kelimeler: Hücre kültürü, hücre vasatı, kontaminasyon, hücre hattı, büyüme faktörleri

Overview of Cell Cultures

Abstract: Cell culture method is a method developed in a biotechnological context and refers to the cultivation of cells outside of their natural environment under laboratory conditions and special conditions. It first came into our lives with the enlargement of adult frog nerve fibers in lymph fluids. Studies have shown that the needs of cell lines are different from each other. Considering these differences, tissue, media and environment conditions have been changed and different cell lines and culture methods that are in use today have been found. Various cell lines are currently used in pharmaceutical, medical and biological research. Cell culture studies are carried out to understand the biological structure and tissue morphology of the cell, thus improving tissue engineering. Although two-dimensional cell culture models are generally used, three-dimensional cell culture models are also preferred recently. Although the media serve for different needs, it has been found that some common components are extremely important for cell culture media in general. When these common components are examined, especially carbohydrate sources and serum are in the first place. Since carbohydrates are the main energy sources and serum contains different hormones and components as well as necessary growth factors, it is added to the medium. In cell culture practices, the environmental factors of the environment where

the cells are located and the chemical components of the environment are important for cell growth and continuity. In addition, cell culture methods should be sensitive to hygiene. Because when the culture environment, chemical components and environmental factors are taken together, if the aseptic conditions are not studied, there is a risk of contamination. In this review, an overview of cell culture methods and applications will be presented.

Keywords: Cell culture, cell medium, contamination, cell line, growth factors

1. Giriş

Hücre kültürü, hücrelerin doğal ortamlarının dışında kontrollü şartlar altında yetiştirilmeleridir. Ayrıca hücre kültürü sistemleri, canlı hayvan testlerine alternatif olarak büyük potansiyele sahiptir. Yetiştirilecek hücre tipine bağlı olarak, vasat gereksinimleri değişir. Hücrelerin doğru bir şekilde büyümesini sağlamak için hücre kültürü sırasında farklı parametreleri ve koşulları sürekli olarak kontrol etmek gerekmektedir. Bu koşullar hücrelerin canlı kalmasını ve büyümesini sağlayan aminoasitler, karbonhidratlar, mineral ve vitaminlerin yanı sıra hormon, karbondioksit, oksijen ve antibiyotik gereksinimleridir. Fizikokimyasal koşullar olarak ortamın pH ve sıcaklığı da kontrol gerektiren diğer şartlardır (States, 2019).

19. yüzyıldan sonra hücre kültürü teknikleri gelişmelerine devam ederek günümüze kadar ulaşmıştır. İlk olarak uygulanmış olan kurbağa sinir hücrelerinden itibaren, değişen hücre tipine spesifik olarak farklı hücre yaşam ortamları ve hücre kültürü yöntemleri geliştirilmiştir. Geçmişten günümüze kadar hücre hatlarının gereksinimleri doğrultusunda çeşitli hücre

kültürü yöntemleri ve hücre yaşama ortamları geliştirilmiştir (Jedrzejczak-Silicka, 2017).

2. Tarihte İlk Uygulama Yapılan Hücreler

Amerikalı embriyolog Harrison (1870–1959), yirminci yüzyılın başlarında hücre kültürü uygulamalarının ilk tekniklerini geliştirdi. 1907’de Harrison, yetişkin bir kurbağanın lenf bezlerinden elde edilmiş taze lenf sıvısında birkaç hafta boyunca kurbağanın sinir liflerinin belirgin büyümesini başarıyla gerçekleştirdi. Bu deney hayvan hücre kültürü uygulamalarının başlangıcı olarak kabul edildi ve daha sonra kan plazması çeşitli hayvan hücreleri için önemli bir kültür ortamı haline geldi (Harrison, 1907). Ayrıca Harrison’ın yöntemi, mikrobiyolojik teknikten uyarlanmasına ve bakteri çalışmaları için kullanılmasına rağmen (1880’lerde Robert Koch tarafından icat edildi ve ilk olarak şarbon basili büyümesi için kullanıldı), hayvan hücre kültürü uygulamalarında da başarıyla uygulanmıştır (Jedrzejczak-Silicka, 2017).

Carrel ve Burrows, tavuk plazmasının kullanıldığı hücre kültürü yöntemlerini uyguladı. Çünkü plazma elde etmek daha kolay bir uygulamadır, ayrıca hazırlama süreci daha güvenilirdir (Carrel ve Burrows, 1911). Ocak 1912'de Carrel, eksplante edilmiş embriyonik tavuk kalp dokularından oluşturulmuş ilk "hücre hattını" geliştirdiler (Carrel, 1912). Daha sonra da memeli hücrelerinin kontrollü laboratuvar koşullarında yetiştirilmesi sağlandı (Landecker, 2002). 1911'de Lewis ve Lewis, dengeli salin solüsyonlarına amino asitler, bulyon ve glikoz (veya maltoz) eklenmesiyle civciv embriyo hücresi yetiştiriciliğinin iyileştirilebileceğini bildirdiler (Lewis ve Lewis, 1911).

1940'ta ise Earle ve arkadaşları, ölümsüz fare fibroblastlarını (L hücreleri) başarılı bir şekilde oluşturmak için kanserojenleri kullanarak tek bir hücreden çoğalmanın mümkün olduğunu ispatladılar (Earle ve ark., 1943). 1951'de Gey, rahim ağzı kanseri olan bir hastanın dokusundan sonsuz çoğalan bir insan hücre hattı olan HeLa hücrelerini meydana getirdiler. Normal dokulardan oluşturulan hücre hatları sınırlı büyüme gösterirken, kanserli dokulardan elde edilen hücre hatlarının sonsuza kadar çoğalmayı başardığını keşfettiler (Gey, 1952).

Gelişmeler devam ettikçe iki boyutlu hücre modelleri yaygın olarak kullanılmaya başlandı. İki boyutlu hücre kültürü; flask

veya petri kapları kullanılarak yapılmaktadır. Hücreler buradaki yüzeye tek tabaka halinde tutunmuş durumdadır. Son zamanlarda bu yönteme ek olarak bazı çalışmalarda üç boyutlu kültür yöntemi de araştırmalarda yer almaktadır. Üç boyutlu hücre kültürü uygulamalarında, vericinin dokularından hücreler alınarak çok hücreli ve üç boyutlu yapılarda kültürlenir. Üç boyutlu hücre kültürü doku yapısını taklit elde etmek için oluşturulan uygun hücre-hücre ve hücre-çevre etkileşimlerin daha iyi gözlenebilir olmasına olanak sağlar (Kapałczyńska ve ark., 2018). Üç boyutlu hücre kültürü tekniklerinin gelişmesi ile doku mühendisliği alanında ilerlemeler kaydedilmiştir. Doku mühendisliği teknikleri genel olarak; otolog dokudan elde edilen hücrelerin amplifikasyonunu veya kök hücrelerin farklılaşmasını, hücrelerin geçici üç boyutlu tabakaya ekilmesini ve tasarlanmış dokular oluşturmak için yapı içindeki hücrelerin üç boyutlu kültürlenmesini içermektedir (Chung ve Burdick, 2008). Günümüzde hücre kültürünün kullanılacağı araştırmalar için ticari olarak farklı hücre hatlarının temini firmalar tarafından sağlanmaktadır.

3. Hücre Kültürü Vasatı Tarihçesi

Fischer 1948 yılında yaptığı bir çalışmayla, diyaliz edilmiş seruma belirli aminoasitleri ekleyerek, hücrelerin metabolik olarak desteklenebildiği bir vasat

oluşturulabileceğini gösterdi (Fischer, 1948). 1955'te Eagle, Fischer'in yöntemini temel alarak, gerekli minimum miktarlarda düşük moleküler ağırlıklı bileşenleri inceledi ve ilk kısmen kimyasal olarak tanımlanmış vasat olan EMEM (Eagle's Modified Essential Medium)'i geliştirdi (Eagle, 1955). Eagle, geliştirdiği bu hücre vasatında karbonhidrat kaynağı olarak genellikle glikoz ve galaktoz (bazen maltoz veya fruktoz), amino asitler, vitaminler, yağ asitleri, lipidler ile çinko ve bakır gibi eser elementleri ve az miktarda serumun yanı sıra, hücre büyümesi için en verimli katkı maddeleri gibi besin karışımlarını kullandı. Eagle daha sonra 1955'te farklı hücrelerin amino asit gereksinimlerini inceleyerek minimum temel ortamı (MEM)'i geliştirdi. EMEM, serum içerse de, formülasyonu günümüzde yaygın olarak kullanılan birçok hücre kültürü vasatının temelini oluşturmaktadır (Eagle, 1955). Örneğin; Dulbecco ve Freeman'ın DMEM'i (Dulbecco ve Freeman, 1959), EMEM'e göre dört kat fazla aminoasit ve vitamin konsantrasyonu içeren Eagle ortamının değiştirilmiş bir versiyonudur (Henschler, 2018).

Ham, 1963'te F10 vasatını geliştirdi. Serum yerine iki tür serum protein fraksiyonu (albümin ve fetuin) kullandı. Serumsuz koşullar altında tek bir Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücresinin bir koloni oluşturmasını başarıyla sağladı.

Kimyasal olarak tanımlanmış bir Ham's F12 geliştirmek için Ham's F10'u değiştirdi. Biyolojik kökenli albümin ve fetuini, düşük moleküler ağırlıklı maddeler olan linoleik asit ve putrescine ile değiştirdi ve tamamen sentetik bir vasat olan Ham's F-12'yi geliştirdi (Ham, 1963). Ham's F12 vasatı, CHO hücrelerinin klonal büyümesini destekleyebilen tamamen sentetik, kimyasal olarak tanımlanmış ve serumsuz bir ortamın erken başarılı bir örneğiydi. Mather ve Sato daha sonra, Ham's F12'nin Dulbecco ortamıyla karıştırılarak ve ek olarak hormonlar, büyüme faktörleri ve transferrin ile takviye edilerek DMEM / F12 adlı yeni bir formülasyon oluşturarak iyileştirilebileceğini belirlediler (Mather ve Sato, 1977).

4. Hücre Kültürü Ortamı

Farmasötik, tıbbi ve biyoteknolojik araştırmalarda yaygın olarak uygulanan hücre kültürü çalışmalarının başarısında özellikle sıcaklık, pH değeri, oksijen ve karbondioksit seviyeleri ile glikoz konsantrasyonunun büyük etkisi bulunmaktadır (Price, 2017). Bir vasat tipik olarak tuz, besinler, antibiyotikler ve hücre metabolizmanın gerçekleşmesi için gerekli herhangi bir bileşene sahip pH dengeli bir sıvıdan oluşur. Ayrıca bir vasat, hücre bölünmesi için gerekli her türlü vitamin veya hormonları da içerir (Schwartz ve Ronnekleiv-Kelly, 2019). Kimyasal olarak tanımlanmış bir vasat;

karbonhidratları, aminoasitleri, büyüme faktörlerini, lipitleri, poliaminleri, eser elementleri ve vitaminleri içeren yaklaşık on ila yüz bileşenden oluşmaktadır (Wahrheit ve ark., 2014). Vasattaki glikoz ve glutamin, en temel enerji kaynaklarıdır. Glikoz; nükleositler ve bazı aminoasitler için karbon kaynağı olarak işlev görmektedir. Konsantre L-glutamin çözülmesi ve tek kullanımlık alikotlara konulmalı ve dondurucuda saklanmalıdır. Kültüre edilen hücreler için gerekli amino asitler L- formdaki arginin, izolösin, histidin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan, valin, izolösin, sistein, tirozin, lösin, ve glutamin'dir. Eagle tarafından tanımlanan esansiyel olmayan amino asitler, L formdaki alanin, glutamik asit, serin, asparagin, aspartik asit, prolin ve glisin'dir. Kimyasal olarak tanımlanmış bir ortam, protein veya peptit içermez, bu nedenle insülin için bir ikame (önemli bir büyüme faktörü) gereklidir (Price, 2017).

Ortam pH'ı genellikle çalışma sırasında değişebilir; Na_2CO_3 ve CO_2 ile nötre yakın bir aralıkta kontrol edilebilir (Sung ve ark., 2004). İyi bir hücre kültürü performansı elde etmek için doğru pH kontrolü şarttır. 4- (2-Hidroksietil)-1-piperazinetsülfonik asit (HEPES), vasat ortamlarında, 7.2–7.4 pH aralığında üstün bir tamponlama kapasitesi gösteren kimyasal bir tampondur (Media ve Properties, 2010). HEPES kullanımı sırasında kontrollü bir gaz atmosferine gerek duyulmamaktadır.

Bikarbonat sisteminin aksine daha pahalı olup, flüoresan ışığın vasatta neden olduğu fototoksik etkilerine duyarlılığını arttırmaktadır (Shipman, 1969).

4.1. Osmolarite ve Dengeli Tuz Çözeltisi

1882'de Ringer, dengeli bir tuz çözeltisi olan Ringer solüsyonunu geliştirdi. Bu solüsyon vücut sıvılarına yakın bir bileşimdi ve kurbağa kalplerinin diseksiyonundan sonra başarılı bir şekilde atmasını sağladı (Ringer, 1882). Bu dengeli tuz solüsyonu, modern kültür ortamının temeli olarak kabul edilir. Dengeli tuz çözeltisinde bulunan potasyum (K^+), sodyum (Na^+), magnezyum (Mg^{++}) ve kalsiyum (Ca^{++}) gibi katyonlara ek olarak, çinko, selenyum, demir ve bakırın belirli konsantrasyonlarda kullanılmasının hücre gelişimi için önemli olduğu gösterilmiştir (Wang, 2006). Ancak bu katyonların ve diğer geçiş metallere yüksek konsantrasyonları hücreler için toksik etki göstermektedir. Dengeli tuz çözeltisi, bir çözeltideki ana katyonları, anyonları ve ayrıca pH'ı istenen fizyolojik aralığında tutan tamponları içerir (Singh ve ark., 2021). Fizyolojik çözeltilerdeki dört ana katyon Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} ve K^+ 'dur. Na^+ ve K^+ katyonları, başlangıç ozmolaritesinin belirlenmesinde ve ozmotik dengenin korunmasında anahtar rol oynar. Ca^{++} ve Mg^{++} katyonları, hücrelerin birbirine ve bir substrata bağlanması için ve enzimatik

reaksiyonlarda ko-faktörler olarak önemlidir (Price, 2017).

4.2. Vitaminler

Vitaminler, spesifik hücre içi işlevler için gerekli olan bir grup organik bileşiktir. Bu bileşikler hücrede, enzim kofaktörleri, antioksidanlar veya hormonlar olarak hareket edebilmektedir. *In vivo* olarak sentezlenemediklerinden, hücrel ihtiyaçların karşılanması amacıyla dışarıdan alınmaları gerekmektedir (Schnellbaecher ve ark., 2019). Başlıca A, D, E ve K olmak üzere vitaminler, albumine bağlanarak taşınmaktadır (Combs, 2012). EMEM vitaminleri, ko-enzimlerin bileşenleri olan B grubu vitaminleri ile lipid sentezinde substrat görevindeki kolin ve inositolden oluşmaktadır. Askorbik asit veya C vitamini, hücre büyümesi için optimal pH ve sıcaklıktaki çözelti içinde çok kararsızdır (Schnellbaecher ve ark., 2019).

4.3. Lipitler

Lipitler; bir enerji kaynağı olarak, hücrelerde sinyal iletiminde, madde taşınmasında ve biyosentezinde ek olarak membranların yapısında yer aldığı için önemlidir. Serumdaki albümin; serbest yağ asitleri ve lipoproteinler için bir taşıyıcı görevi görmektedir. Pek çok hücre tipi, yağ asitleri, fosfolipidler veya kolesterol eklenmeden, serumsuz ortamda kültürde büyütülebilirken, bazıları için kesin bir ihtiyaç veya büyüme veriminde önemli bir artış gösterir (Price, 2017).

4.4. Serum

Serum, gerekli hormonları, taşıma proteinlerini, büyüme faktörlerini, ayrışma faktörlerini, bağlanma faktörlerini ve proteaz inhibitörlerini sağlayarak hücre büyümesini destekler. Bununla birlikte, hücre kültüründe serumun sürekli kullanımı da birçok dezavantaja sahiptir. Bu dezavantajlar, bakteriler, mikoplazma, virüsler, endotoksinler ve prionlar gibi çok çeşitli kirletici maddelerdir (Yao ve Asayama, 2017). Potansiyel mikrobiyal kontaminantları inaktive etmek için işlenmiş serum önerilmektedir (Nims ve Harbell, 2017).

Hücre kültüründe en yaygın olarak kullanılan serum türü fetal sığır serumudur (FBS). Serumlar daha seyrek olarak at, domuz gibi diğer hayvan türlerinden de elde edilebilir. Mevcut çeşitli sığır ve sığır dışı serum kategorilerinden, hücre kültürü ortamı için en yaygın olarak kullanılanı FBS olmuştur (Verma ve ark., 2020). Bunun nedenleri ise şunlardır:

- FBS, özellikle hücre büyümesini destekleyen yüksek düzeyde maddeler içermektedir.
- FBS, yenidoğan veya yetişkin sığır serumları ile karşılaştırıldığında daha düşük seviyelerde immünoglobulin içerir.
- FBS, yenidoğan veya yetişkin sığır serumuna göre daha düşük miktarlarda tamamlayıcı içerir (Piletz ve ark., 2018).

Serumlar ışıktan korunmalı ve dondurulmuş olarak saklanmalıdır. Çok sayıda dondurma ve çözündürme işlemine tabi tutulmamalıdır. Serumu saklamak için önerilen sıcaklık aralıkları -5 ile -20 arasında değişir (Arora, 2021). Her kullanım için serum alikotları hazırlanmalıdır ve bunları uygun şekilde saklamak gerekmektedir. Hücre kültürü vasatındaki serumun ana işlevleri aşağıdakilerdir:

- Hormonlar, mineraller, eser elementler ve lipitleri taşıyan proteinleri nakletmek,
- Bağlanma ve yayılma faktörleri (yani hücre dışı matrisin bileşenleri) olarak,
- pH'ı korumak veya proteazları inhibe etmek için, stabilize ve detoksifiye edici faktörlerle direkt olarak etki gösterilebilir. Proteazlar ve toksik moleküller için spesifik olmayan faktörlerle de indirekt etki gösterilebilir (Nims ve Harbell, 2017).

4.5. Serumsuz Vasat

Birçok hücre hattı, serumsuz vasat kullanılarak özel olarak tasarlanmış ortamda büyütülebilir (Verma ve ark., 2020). Bu hücre hattına özgü ortam, deneylerin güvenilirliğini değiştirebilecek ve enfeksiyonlara yol açabilecek kalite ile ilgili sorunları ortadan kaldırabilir. Serumlar, virüslerin bilinen taşıyıcılarıdır ve bulaşıcı materyallerin girme potansiyeli hakkında bilgi sahibi olunmalıdır (Schwartz ve Ronnekleiv-Kelly, 2019). Tipik olarak

serumsuz ortam, hidrolizatlar, aminoasitler, vitaminler ve inorganik tuzlar dahil olmak üzere bir dizi hücre büyüme faktöründen oluşur ve tanımlanmamış karakterle ilişkili risklerin en aza indirilmesine ve serum içeren ortama kirletici maddelerin potansiyel girişine izin verir (Krattenmacher ve ark., 2018). Serumsuz ortam aynı zamanda, kompleks kirleticiler içeren serum albümin (kandan saflaştırılmış), hormonlar, taşıyıcı proteinler ve bağlanma faktörleri gibi tanımlanmamış hayvandan türetilmiş ürünler de içerebilir (McGillicuddy ve ark., 2018).

EMEM, MEM ve DMEM; kanser hücrelerine yalnızca sürekli çoğalmaları için gerekli olan besinleri sağlamak üzere tasarlanmıştır. Spinner-MEM (S-MEM), DMEM'de bulunan amino asitlerin daha düşük konsantrasyonlarına ve ek proteinojenik (örneğin, alanin, glutamat) ve proteinojenik olmayan amino asitlere (örneğin ornitin, sitrülün) sahiptir, ancak yine de insan plazmasında normalde bulunan birçok polar metabolitten yoksundur (Ackermann ve Tardito, 2019). S-MEM, kalsiyum tuzu içermez ve kalsiyum seviyeleri farklı konsantrasyonlarda ayarlanabilmektedir (Price, 2017).

Sık kullanılan diğer bir hücre kültürü ortamı olan F12, azaltılmış serum takviyesi altında CHO hücrelerinin klonal büyümesi için optimize edilmiştir (Bryant ve ark., 2019). Geliştirilecek kimyasal olarak tanımlanmış ilk serumsuz hücre kültürü

ortamı, DMEM ve Ham's F12 ortamının 1:1 (v/v) karışımı olan vasattır (van der Valk ve ark., 2010). DMEM'deki aminoasitlerin dengesi ve F12 ortamı tarafından sağlanan eser elementler hücrelerin serumsuz kültürlenmesine izin verir. Bu ortamlarda hücrelerin büyümesi için serum takviyesi gerekli değildir. Aminoasitler, proteinlerin temel yapı taşlarıdır ve hücre iskeleti, enzimlerin protein bileşeni, reseptörler ve sinyal molekülleri dahil olmak üzere hücrenin tüm proteinli materyalini mantıksal olarak oluştururlar (Salazar ve ark., 2016). Sonuç olarak, ortam genellikle insan sıvılarında normal olarak bulunan metabolitlerden yoksundur, ancak glikoz, glutamin veya piruvat gibi moleküller genellikle süperfizyolojik konsantrasyonlarda bulunur (Ackermann ve Tardito, 2019).

4.6. İnsülin

Vogelaar ve Erlichman 1933 yılında, önceki çalışmaların aksine insülin ve tiroksin hormonunun etkinliğini kanıtladı. İki araştırmacı, Ringer solüsyonu, insülin ve tiroksin ile birlikte glikoz, sistein, hemin, pepton ve kan plazmasının bulunduğu vasatta 3 aydan daha uzun süre insan fibroblast hücrelerini çoğaltmayı başardı. İnsülin ve insülin analogları serumsuz vasatta kullanılan en yaygın büyüme faktörleri arasındadır. Bununla birlikte, hücre çoğalması üzerindeki etkilerinin hemen hemen her zaman serumun

etkisinden daha düşük olduğu bulunmuştur (Vogelaar ve Erlichman, 1933).

4.7. Antibiyotik

In vitro çalışmalar sırasında oluşabilecek kontaminasyonu önlemek amacıyla vasat ortamını antibiyotikler ile desteklemek önemlidir. American Type Culture Collection (ATCC) tarafından yayınlanan standart hücre kültürü protokolünde önerilen penisilin (100U/mL) ve streptomisin (100µg/mL) (% 1 v/v) kombinasyonu, en sık kullanılan antibiyotik takviyelerindedir (Hassan ve Ahmad, 2020). Buna ek olarak gentamisin ve yaygın antifungal aktivitesi sebebiyle amfotersin B de kültür ortamında sıklıkla önlem olarak kullanılmaktadır (Ryu ve ark., 2017). Ancak kültür ortamına eklenen antibiyotiklerin, sitotoksositeye sebep olabileceği ve hücrelerin biyolojik özelliğini değiştirebileceği öne sürüldüğünden dikkatli kullanılmaları gerekmektedir (Hassan ve Ahmad, 2020).

5. Hücre Kültürü Uygulaması İçin Gerekli Çevresel Faktörler

Hücre kültürü deneylerinin optimum performansı ve stabilitesi için hücre kültürü koşulları standardize edilmelidir. Bunun için hücre yoğunluğuna göre hücre ortamının periyodik bir şekilde değiştirilmesi gerekmektedir. Uygulama zamanında sapma olması durumunda optimal pH'dan uzaklaşma görülür. pH değişimi hücre döngüsünü, hücre büyümesini ve

farklılaşmasını etkileyen ve aynı zamanda DNA hasarına ve genomik kararsızlığa neden olan bir durum ortaya koyar. Vasat ortamının pH'ı, gaz fazındaki CO₂ konsantrasyonu ile kültür ortamındaki sodyum bikarbonat (NaHCO₃) konsantrasyonu arasındaki denge ile korunur. Doğal tamponlama sistemine sahip vasat ortamları genellikle %5-10 CO₂ desteğiyle, bir CO₂ inkübatöründe muhafaza edilir. Ortam pH'ının kontrolü için kullanılan bu sistem pratik, ekonomik ve toksik olmaması sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir (Rothblat, 2012).

Tamponlar asitliği kontrol etmek için kültür ortamına dahil edilse de değişen pH rutin olarak izlenemez. Bileşenler bozulduğunda, bu bir vasat stabilitesi sorunu haline gelir. Fenol kırmızısı boyası, araştırmacıların ortam asiditesini ölçmesine olanak sağlamak için ortama dahil edilir. Bu tür bir değerlendirme “doğrudan gözle izleme” yoluyla yapılabilir. Daha hassas bir ölçüm için ise bir plaka okuyucu ile absorbans değeri hesaplanarak yapılabilmektedir (Michl ve ark., 2019).

6. Kontaminasyon ve Korunma Yolları

Tanımlanamayan kaynaklardan gelen yabancı maddeler bir kültür ortamını kontamine edebilir ve deney sonuçlarını etkileyebilir. Tipik olarak bu kirleticiler arasında virüsler, bakteriler, mantarlar, mikoplazma ve endotoksinler bulunur.

Bununla birlikte sudan, kullanılan plastik veya diğer malzemelerden bulaşabilen başka kirletici maddeler de vardır (Yao ve Asayama, 2017).

Kontaminasyonlardan kurtulmak için; kontamine materyalin atılması, ekipmanın ve reaktiflerin sterilizasyonu veya değiştirilmesi gibi yollar izlenerek hızlı bir şekilde hareket edilmelidir. Sterilizasyon için kullanılan mikro filtrelerden bazı toksik maddelerin ayrıştırıldığı da bilinmektedir (Fenandes ve ark., 2020).

6.1. Aseptik Teknik

Steril kültürlerin kontaminasyonunu önlemek için hijyen ve temizlik kurallarına uymak şarttır. Kök hücreler gibi klinik olarak kullanılacak hücrelerin İyi Üretim Uygulamaları (İÜU) gerekliliklerine uygun bir şekilde üretilmesi gerekmektedir (Aydoğdu ve ark., 2020).

6.2. Kabin Kullanımı

Biyogüvenlik kabini kesinlikle kullanılmalıdır. Kullanımdan önce ve sonra dezenfektan veya %70 etanol ile temizlenmelidir. Düzenli olarak derinlemesine temizliği yapılmalı ve servis kontrolleri düzenli yapılmalıdır. Kabindeki eşyaların sayısı minimumda tutularak, kabin içinde ve dışında fazladan hava akışı oluşturabilecek hareketlerden kaçınarak, varsa laboratuvarındaki pencereler ile havalandırma sistemlerini kapalı tutarak hava yolu kontaminasyonunun önlenmesi sağlanmalıdır (Bouam ve ark., 2021).

6.3. Hücre Kültürü Vasatı

Vasat doğrudan şişeden dökülmemelidir. Steril ambalajlardaki tek kullanımlık serolojik pipetler vasatı aktarmak için kullanılmalıdır. Şişe kapakları uzun süre açık tutulmamalıdır (Adeniye ve Lua 2020). Kapak açık tutulacaksa, kapak aşağı bakacak şekilde çalışma yüzeyine konulmalıdır. Vasatlar kullanılmadan önce kontaminasyon riski olmaması için 0.1-0.2 µm boyutundaki özel filtre sistemlerinden geçirilerek kullanılmalıdır (Fenandes ve ark., 2020).

6.4. Kullanılan ekipman

Kabine yerleştirilen tüm öğeleri temizlemek için uygun dezenfektan veya %70 etanol kullanılmalıdır. Otoklavlama, reaktifleri ve ekipmanı gerektiği gibi sterilize etmek için kullanılabilir (WHO, 2020). Ticari olarak satın alınan ürünlerde sterilizasyon uyarılarına dikkat edilmelidir.

6.5. Hücre hatlarının çalışılması

İdeal olarak, farklı hücre hatları ayrı kabinlerde ve inkübatörlerde çalışılmalıdır. Böyle bir imkân yok ise, çapraz kontaminasyonun önüne geçmek için kabinde bir seferde yalnızca bir hücre hattı çalışılmalı ve diğer hücre hattına geçmeden önce kapsamlı dezenfeksiyon uygulamaları yapılmalıdır (Abatenh ve ark., 2018). Çalışma sırasında herhangi bir dökülme olması durumunda derhal uygun bir dezenfektanla müdahale edilmelidir.

6.6. Çalışanlar

Çalışma süresince eldivenler sık sık değiştirilmelidir (kirlenirlerse bu zorunludur). Eldiven değişimi yapılmayan sürelerde de %70'lik etanol ile düzenli olarak silinmelidir. Hücre kültürü yapılırken kişisel koruyucu giysiler giyilmeli, çalışmanın öncesinde ve sonrasında eller iyice yıkanmalıdır (Donaldson ve Bishop, 2015).

7. Sonuçlar

Hücre kültürü sistemleri, canlı hayvan testlerine alternatif olarak büyük potansiyele sahiptir. Yetiştirilecek hücre tipine bağlı olarak, vasat gereksinimleri değişir. Hücrelerin doğru bir şekilde büyümesini sağlamak için hücre kültürü sırasında farklı parametreleri ve koşulları sürekli olarak kontrol etmek gerekmektedir. 1907'de Harrison, yetişkin bir kurbağanın lenf bezlerinden elde edilmiş taze lenf sıvısında birkaç hafta boyunca kurbağanın sinir liflerinin belirgin büyümesini başarıyla gerçekleştirdi. Daha sonra da memeli hücrelerinin kontrollü laboratuvar koşullarında yetiştirilmesi sağlandı. Fischer 1948 yılında yaptığı bir çalışmayla, diyaliz edilmiş seruma belirli aminoasitleri ekleyerek, hücrelerin metabolik olarak desteklenebildiği bir vasat oluşturulabileceğini gösterdi.

Bu derlemede, günümüzde birçok alanda kullanılmakta olan hücre kültürü yöntemlerinin tarihsel gelişiminden, hücre

kültürü ortamlarının temel ihtiyaçlarından, yapılacak vasat geliştirme çalışmalarına hücre kültürü alanındaki gelişmelere ek öncülük edecektir. Çalışmamız hücre olarak kültür ortamında meydana gelecek kontaminasyon risklerinden ve araştırmacılara genel bir bakış açısı bu risklerden korunma yollardan kazandıracaktır. bahsedilmiştir. Bu çalışma daha sonra

Kaynaklar

- Abatenh E, Gizaw B, Tsegaye Z (2018). Contamination in a microbiological laboratory. *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)* 6(4): 7–13.
- Ackermann T, Tardito S (2019). Cell culture medium formulation and its implications in cancer metabolism. *Trends in Cancer* 5(6): 329–332.
- Adeniyi AA, Lua LHL (2020). Protein expression in the Baculovirus-Insect cell expression system. In: *Gerrard J., Domigan L. (eds) Protein Nanotechnology. Methods in Molecular Biology*, vol 2073, 17-37. Humana, New York, NY.
- Arora M (2021). Cell culture media: A review. *Materials and Methods* 3: 1–29.
- Aydoğdu N, Öztel ON, Karaöz E (2020). Isolation, culture, cryopreservation, and preparation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a final cellular product under good manufacturing practices-compliant conditions. In: *Turksen K. (eds) Stem Cells and Good Manufacturing Practices. Methods in Molecular Biology* 2286: 73-84 . Humana, New York, NY.
- Bouam A, Vincent JJ, Drancourt M, Raoult D, Levy PY (2020). Preventing contamination of PCR-based multiplex assays including the use of a dedicated biosafety cabinet. *Letters in Applied Microbiology* 72(1): 98–103.
- Bryant KL, Stalneck CA, Zeitouni D, Klomp JE, Peng S, Tikunov AP, Gunda V, Pierobon M, Waters AM, George SD, Tomar G, Papke B, Hobbs GA, Yan L, Hayes TK, Diehl JN, Goode GD, Chaika NV, Wang Y, Der CJ (2019). Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer. *Nature Medicine* 25(4): 628–640.
- Carrel A (1912). On the permanent life of tissues outside of the organism. *The Journal of Experimental Medicine* 15(5): 516–528.
- Carrel A, Burrows MT (1911). Cultivation of tissues in vitro and its technique. *The Journal of Experimental Medicine* 13(3): 387–396.
- Chung C, Burdick JA (2008). Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60(2): 243–262.
- Combs GF (2012). How to use this book. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381980-2.00032-3>
- Donaldson CD, Bishop KN (2015). Cell culture. *British Journal of Hospital Medicine* 76(1): 2–5.

- Dulbecco R, Freeman G (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8(3): 396–397.
- Eagle H (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science (New York, N.Y.)* 122(3168): 501–514.
- Earle WR, Schilling EL, Stark TH, Straus NP, Brown MF, Shelton E (1943). The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *Journal of the National Cancer Institute* 4(2): 165–212.
- Fernandes F, Silkina A, Fuentes-Grünewald C, Wood EE, Ndovela WVLS, Oatley-Radcliffe DL, Lovitt RW, Llewellyn CA (2020). Valorising nutrient-rich digestate: Dilution, settlement and membrane filtration processing for optimisation as a waste-based media for microalgal cultivation. *Waste Management* 118: 197–208.
- Fischer A (1948). Amino-acid metabolism of tissue cells in vitro. *Nature* 161(4104): 1008.
- Gey GO (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12: 264–265.
- Ham RG (1963). An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Experimental Cell Research* 29(3): 515–526.
- Harrison RG (1907). Observations on the living developing nerve fiber. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 4(1): 140–143.
- Hassan SN, Ahmad F (2020). The relevance of antibiotic supplements in mammalian cell cultures: Towards a paradigm shift. *Gulhane Medical Journal* 62(4): 224–230.
- Henschler R (2018). Cell Culture Media. In: Kasper C., Charwat V., Lavrentieva A. (eds) *Cell Culture Technology. Learning Materials in Biosciences.* Springer, Cham. 49–59.
- Jedrzejczak-Silicka M (2017). History of cell culture. *New Insights into Cell Culture Technology* 1–42.
- Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science* 14(4): 910–919.
- Krattenmacher F, Heermann T, Calvet A, Krawczyk B, Noll T (2018). Effect of manufacturing temperature and storage duration on stability of chemically defined media measured with LC-MS/MS: Impact of manufacturing and storage on CDM components measured with LC-MS/MS. *Journal of Chemical Technology ve Biotechnology* 94.
- Landecker H (2002). New times for biology: nerve cultures and the advent of cellular life in vitro. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 33: 667–694.
- Lewis MR, Lewis W (1911). The cultivation of tissues from chick embryos in solutions of NaCl, CaCl₂, KCl and NaHCO₃. *The Anatomical Record* 5(6): 277–293.
- Mather J, Sato G (1977). Hormones and growth factors in cell cultures: problems and perspectives. *Cell, Tissue, and Organ Cultures in Neurobiology* 619–630.
- Media DOF, Properties P (2010). Chapter 8: Defined Media and Supplements. 8: 99–114.
- McGillicuddy N, Floris P, Albrecht S, Bones J (2018). Examining the sources of variability in cell culture media used for biopharmaceutical production. *Biotechnology Letters* 40(1): 5–21.

- Michl J, Park KC, Swietach P (2019). Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. *Communications Biology* 2(1): 1–12.
- Nims RW, Harbell JW (2017). Best practices for the use and evaluation of animal serum as a component of cell culture medium. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 53(8): 682–690.
- Piletz JE, Drivon J, Eisenga J, Buck W, Yen S, McLin M, Meruvia W, Amaral C, Brue K (2018). Human cells grown with or without substitutes for fetal bovine serum. *Cell Medicine* 10: 1–11.
- Price P (2017). Best practices for media selection for mammalian cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 53(8): 673–681.
- Ringer S (1882). Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *The Journal of Physiology* 3(5–6): 380–393.
- Rothblat G (2012). Growth, nutrition, and metabolism of cells in culture V3 (C. 3). Elsevier.
- Ryu AH, Eckalbar WL, Kreimer A, Yosef N, Ahituv N (2017). Use antibiotics in cell culture with caution: Genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. *Scientific Reports* 7(1): 1–9.
- Salazar A, Keusgen M, Von Hagen J (2016). Amino acids in the cultivation of mammalian cells. *Amino Acids* 48(5): 1161–1171.
- Schnellbaecher A, Binder D, Bellmaine S, Zimmer A (2019). Vitamins in cell culture media: Stability and stabilization strategies. *Biotechnology and Bioengineering* 116(6): 1537–1555.
- Schwartz PB, Ronnekleiv-Kelly SM (2019). Effective cell culture. 157–169.
- Shipman CJ (1969). Evaluation of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) as a tissue culture buffer. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 130(1): 305–310.
- Singh S, Kerndt CC, Davis D (2021). Ringer’s Lactate. *In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 29763209.*
- States BO (2019). Introduction. *The Rhetoric of Dreams* 1–12.
- Sung YH, Lim SW, Chung JY, Lee GM (2004). Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63(5): 527–536.
- van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Fex Svenningsen A, Honegger P, Knudsen LE, Lindl T, Noraberg J, Price A, Scarino ML, Gstraunthaler G (2010). Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 24(4): 1053–1063.
- Verma A, Verma M, Singh A (2020). Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology* 269–293.
- Vogelaar JPM, Erlichman E (1933). A feeding solution for cultures of human fibroblasts. *Am J Cancer* 18: 28–38.

- Wahrheit J, Nicolae A, Heinzle E (2014). Dynamics of growth and metabolism controlled by glutamine availability in Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(4): 1771–1783.
- Wang F (2006). Culture of animal cells: A manual of basic technique, fifth edition. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 42(5): 169.
- WHO World Health Organization (2020). Decontamination and waste management. Geneva: World Health Organization; 2020 (Laboratory biosafety manual, fourth edition and associated monographs). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Yao T, Asayama Y (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology* 16(2): 99–117.