

4596

SÜSPANSİYON POLİMERİZASYONU İLE ÜRETİLEN AKRİLİK VE ALKİL
PLAZMALARI İLE MODİFİYE EDİLEN POLİSTİREN BAZLI POLİMERİK
MİKROTASİYİCİLER İLE DESTEKLENMİŞ BHK HÜCRE KÜLTÜRÜ VE SAP VİRÜSÜ
ÜRETİMİNİN DENEYSEL VE MATEMATİKSEL OLARAK İNCELENMESİ

Menemse KİREMİTÇİ

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak Hazırlanmıştır.

ANKARA
Haziran-1988

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

İşbu çalışma, jürimiz tarafından, KİMYA MÜHENDİSLİĞİ Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doc.Dr.Ahmet Rifat ÖZDURAL

Üye : Prof.Dr.Erhan PİSKİN

Üye : Y.Doc.Dr.Mustafa ÖZİLGİN

Üye : Doc.Dr.Tülin KUTSAL

Üye : Y.Doc.Dr.Ütkü MEHMETOĞLU

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

..... / / 1988



Prof. Dr. Acar İsin

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖZET

Sunulan çalışma, mikrotasiyıcı-destekli kültür sistemlerinde kullanılan ticari olarak mevcut tasiyıcılara alternatif olabilecek yeni polimerik mikrotasiyıcıların geliştirilmesi ve bunların sap virüsüne duyarlı "Baby Hamster Kidney" (BHK) hücrelerinin üretiminde kullanımını amaçlamıştır.

Çalışmanın ilk bölümünde, uygun yüzey ve yığın özelliklerine sahip hidrofilik karakterli PHEMA ve hidrofofik karakterli PS mikrotasiyıcılar tarafımızdan geliştirilen yöntemlerle hazırlanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında, hazırlanan mikrotasiyıcıların çeşitli fiziksel özellikleri (yoğunluk, sedimentasyon hızı, vb.) saptanmış, yüzey yapıları uygun yöntemlerle analiz edilmiştir.

Çalışmanın üçüncü basamağında, durgun ve süspansiyon kültür koşullarında mikrotasiyıcıların hücre yapışma, yayılma ve üremesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Mikrotasiyıcı-destekli kültür sistem parametreleri (mikrotasiyıcı konsantrasyonu, hücre inokülasyon yoğunluğu, karıştırma hızı, vb.) değiştirilerek hücre verimi için optimum koşullar belirlenmiştir. Çalışmalar, klasik hücre kültür sistemleriyle ve ticari olarak mevcut mikrotasiyıcılarla tekrarlanmış ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Ayrıca, hücre yapışma ve üreme kinetikleri, araştırma kapsamında geliştirilen matematiksel modellerle değerlendirilmiştir.

Çalışmanın son bölümünde ise, PHEMA mikrotasiyıcı destekli sistemlerde üretilen BHK21 hücrelerinin A22 tipi sap virüsüne duyarlılıkları incelenmiştir.

İlk bölümde gerçekleştirilen çalışmalar, araştırma kapsamında geliştirilen süspansiyon polimerizasyonunu yönteminin istenilen boy (100-200 μ) ve boy dağılım aralığına sahip, şeffaf ve düzgün küresel yapıdaki çapraz bağlı PHEMA mikrotasiyıcıların hazırlanması açısından uygun olduğunu ve yapıya ilave edilen MMA ve DMAEMA monomerleriyle yüzey ve yığın özelliklerinin istenilen düzeye getirilebileceğini göstermiştir. Bu bölümde diğer çalışmalar, çapraz bağlı PS partiküllerin (Biobeads SX2) yüzey özelliklerinin, bu çalışmada geliştirilen plazma polimerizasyon tekniği kullanılarak modifiye edilebileceğini göstermiştir. Yüzey modifikasyonu çeşitli alkilaminlerle (EDA,

ALAM ve TEA) gerçekleştirilmiş ve alkilamin türüne plazma reaksiyon koşullarının (plazma gücü ve süresi) farklı yüzey özelliklerine ulaşılmasında etken olduğu saptanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında hazırlanan mikrotasiyıcıların optimum mikrotasiyıcı özelliklerinin çoğuna sahip oldukları analiz sonuçlarıyla saptanmıştır.

Üçüncü bölümde gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarıyla, PHEMA mikrotasiyıcılarda hücre yapışması ve üremesinin elebilmesi için MMA ve DMAEMA yapılarının gerekli olduğu, 0.13 mol MMA/mol HEMA, 0.15 mol DMAEMA/mol HEMA bileşimine sahip PHEMA mikrotasiyıcıların Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasiyıcılara alternatif olarak kullanılabilceğı saptanmıştır. Yüzeyi modifiye edilmiş PS mikrotasiyıcılarla durgun koşullarda yapılan çalışmalar, TEA kaplı yüzeylerde hücre veriminin, EDA ve ALAM kaplı yüzeylere göre daha yüksek olduğunu ve yüzeyi TEA plazmasında, 10 dakika süreyle ve 10 Watt güçte kaplanan mikrotasiyıcılarla en yüksek hücre yapışma ve üreme değerlerine ulaşıldığını göstermiştir.

Mikrotasiyıcı-destekli sistemlerde hücre yapışma ve üremesini tanımlamak amacıyla geliştirilen matematiksel modellerden elde edilen değerler deneysel verilerle karşılaştırıldığında, aralarındaki uyumun oldukça iyi olduğu, böylelikle bu tür sistemlerde kullanılacakları belirlenmiştir.

Çalışmanın son bölümünde, PHEMA mikrotasiyıcı-destekli sistemde üretilen BHK hücrelerinin sap virüsüne duyarlılıklarının saptanması amacı ile yapılan çalışmalar, söz konusu hücrelerin A22 tipi sap virüsüne duyarlı olduğunu göstermiştir.

Bu sonuçların ışığı altında, araştırma kapsamında hazırlanan PHEMA ve PS mikrotasiyıcıların kullanılmasıyla, BHK hücrelerinin üretim kapasitesinin klasik yöntemlerdekine oranla artırılabilceğı ve virüs üretiminde kullanılabilceğı sonucuna ulaşılmıştır.

SUMMARY

The study presented here, aims the development of the novel polymeric microcarriers as alternatives to the commercial microcarriers used in microcarrier culture systems, in order to facilitated the production of "Baby Hamster Kidney" (BHK) cells which are sensitive to the "Foot and Mouth Disease" (FMD) virus.

In the first part of this study, hydrophilic poly(hydroxyethylmethacrylate) (PHEMA) and hydrophobic polystyrene (PS) microcarriers in suitable surface and bulk properties were prepared by the novel methods developed by us.

In the second part of the study, the physical characteristics (i.e., density, sedimentation velocity, etc.) of the microcarriers were determined and their surface structures investigated by means of the appropriate methods.

In the third part of the study, the cell attachment, spreading and growth characteristics of the microcarriers were investigated in stationary and also submerged culture conditions. By changing the microcarrier-facilitated culture system parameters, (i.e., microcarrier concentration, cell inoculation density, stirring speed, etc.) the optimal conditions were determined in order to achieve higher cell yields. The studies were repeated with the traditional culture systems and also commercial microcarriers (i.e., Cytodex-1, Cytodex-3) and thus, the results were compared. On the other hand, the cell attachment and growth kinetics were evaluated by means of the mathematical models proposed in this study.

In the last part of the study, the virus susceptibilities of BHK cells produced on the PHEMA microcarriers were investigated.

The studies were performed in the first part showed that, the novel suspension polymerization technique is much suitable in order to obtain spherical and transparent crosslinked PHEMA microcarriers in desired size (120-200 μ) and size distribution, and their surface and bulk structures were adjusted by including hydrophobic and charged comonomers, MMA and DMAEMA. The PS microcarriers were prepared by the surface modification of the commercial crosslinked PS particles (Biobeads SX2). The surface treatment of the microcarriers was carried out by a radiofrequency glow discharge polymerization process. Using this technique the surfaces of the microcarriers were coated with plasma polymerized polymeric films formed from primary and tertiary alkylamines (i.e., EDA, ALAM and TEA). By changing the

monomer type and plasma reaction conditions, the chemical nature of the microcarrier's surfaces was varied.

The cell culture studies indicated that, the presence of MMA and DMAEMA monomers in the PHEMA structure are necessary in order to achieve the desired cell attachment and growth and PHEMA microcarriers which includes 0.13 mol MMA/mol HEMA; 0.15 mol EGDMA/mol HEMA can be used as an alternative to the Cytodex-1 and 3 microcarriers in microcarrier facilitated culture systems. The PS microcarrier culture studies showed that while the most rapid attachment occurs on the EDA plasma coated surfaces, the cell growth was best on the TEA coated surfaces. A sharp increase in cell yield occurred when the power of the TEA plasma was increased to 10 Watts, at 10 minutes.

The agreement between model predictions and the experimental data described the kinetics of the cell attachment and growth are reasonably good.

In the last part of the study, it was found that, BHK cells grown on the surface of the PHEMA microcarriers are sensitive to the A22 type FMD virus.

By taking of these results into account, it can be said that, these PS and PHEMA microcarriers may be used in microcarrier facilitated cell culture systems in order to increase the production capacity of BHK cells.

TESEKKÜR

Bu çalışmanın başlatılması ve devamı süresince, bilgi ve yardımlarıyla çok değerli katkılarda bulunan sayın hocam Prof. Dr. Erhan Pişkin'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Hücre kültür çalışmalarının gerçekleştirilmesi sırasında, bu konudaki bilgi ve tecrübeleriyle bizzat katkıda bulunan Sap Enstitüsü Kontrol Laboratuvarı Sefi Uzman Veteriner Hekim Sayın Dr. İsmet Gürhan'a en derin şükranlarımı sunarım.

Matematiksel model çalışmaları sırasında bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, bu konudaki her türlü destek ve yardımda bulunan ODTÜ Gıda Mühendisliği Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Mustafa Özlügil'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın yürütülmesi ve tezimin hazırlanması sırasında yardımlarını esirgemeyen, her zaman destek olan değerli arkadaşlarım Adil Denizli, Haluk Gümüşderehoğlu, Eyüp Ertürk, Vural Evren, Süleyman Ali Tuncel, Emir Baki Dentbas, Günay Demirel ve Ali İhsan Serbelci'ye en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Hücre kültür çalışmalarının yürütülmesinde gereken olanakları sağlayan Ankara Sap enstitüsü ilgililerine, Kontrol, Seroloji ve İmmünoloji Laboratuvarları Şefleri'ne ve personeline saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi ve yardımlarından faydalandığım Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği, Fizik Mühendisliği ve Biyoloji Bölümlerinin tüm üyelerine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
ÖZET	i
SUMMARY	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI	i
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	4
2.1.1. Hücre Kültür Sistemleri	6
2.1.1.1. Tek Tabaka Hücre Kültürü	
2.1.1.1.1. Hücre-Substrat Etkileşimi	
2.1.1.1.2. Tek Tabaka Hücre Kültürlerinde Kullanılan Substratlar	
2.1.1.2. Süspansiyon Hücre Kültürleri	
2.1.2. Hücre Kültür Sistemlerindeki Gelişmeler	12
2.1.3. Mikrotasiyıcı-Destekli Hücre Kültür Sistemleri	15
2.1.3.1. Mikrotasiyıcıların Geliştirilmesi	
2.1.3.2. Mikrotasiyıcı-Destekli Kültür Sistemlerinin Avantajları	
2.1.3.3. Mikrotasiyıcı-Destekli Kültür Sistemlerinin Dezavantajları	
2.1.3.4. Optimum Mikrotasiyıcı Özellikleri	
2.1.3.5. Mikrotasiyıcı Türleri	
2.1.3.6. Mikrotasiyıcı-Destekli Kültürlerin Uygulamaları	
2.1.4. Hücre Kültür Reaktörleri	23
2.1.5. Hücre Kültür Reaktörlerinde Öreme Kinetiği Mikrobiyal Hücre Öreme Kinetiği	27
2.2. ŞAP HASTALIĞI VE AŞISI	29
2.2.1. Şap Virüsü ve Özellikleri	29
2.2.2. Şap Virüs Tipleri	30
2.2.3. Şap Aşısı	30

2.3. SÜSPANSİYON POLİMERİZASYONU	31
2.3.1. Süspansiyon Polimerizasyonunun Özellikleri	32
2.3.2. Hidrofilik Monomerlerin Süspansiyon Polimerizasyonu	33
2.3.3. PHEMA ve Süspansiyon Polimerizasyonu	34
2.4. PLAZMA POLİMERİZASYONU	37
2.4.1. Tanım	37
2.4.2. Plazma Polimerizasyonunun Mekanizması	38
3. DENEYSEL ÇALIŞMA	41
3.1. MİKROTASİYİCİLERİN HAZIRLANMASI	41
3.1.1. PHEMA Mikrotasiyiciler	41
Kullanılan Kimyasallar	
DeneySEL Yöntem	
3.1.2. Polistiren Mikrotasiyiciler	44
3.1.2.1. PS Partiküllerin Yüzey Modifikasyonu	
3.1.2.2. PS Filmlerin Yüzey Modifikasyonu	
3.1.3. Ticari Mikrotasiyiciler	47
3.2. MİKROTASİYİCİ FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN TAYINI	47
3.2.1. Yoğunluk ve Sedimentasyon Hızı Tayini	47
3.2.2. Mikrotasiyici Boy ve Boy Dağılım Tayini	48
3.2.3. Porozite Tayini	49
3.2.4. Yüzey Analizi	49
3.2.4.1. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM Tekniği) Tekniği	
3.2.4.2. X-ışınları Fotoelektron Spektroskopy (XPS) Tekniği	
3.2.5. Şişme Özelliklerinin Tayini	49
3.3. HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARI	49
3.3.1. BHK Hücre Kültürü	50
3.3.2. Döner Şişeli Sistemde Hücre Kültürü	50
3.3.3. Mikrotasiyici-Destekli Hücre Kültürü	51
3.3.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılacak Cam Malzemenin Hazırlanması	
3.3.3.2. Mikrotasiyicilerin Hazırlanması	
Cytodex Mikrotasiyiciler	
PHEMA Mikrotasiyiciler	
PS Mikrotasiyiciler	
3.3.3.3. Hücre Kültür Ortamları	

3.3.4. Hücre Karakteristiklerinin Tayini	55
3.3.4.1. Hücre Yapılması	
3.3.4.2. Hücre Yayılması	
3.3.4.3. Hücre Üremesi	
3.4. VIRÜS ÜRETİMİ	56
3.4.1. Tohum Virüs Seçimi ve Tek Tabaka Hücre Kültüründe Adaptasyonu	57
3.4.2. Virüs İnokülasyonu	57
3.4.3. Virüs Duyarlılığının Belirlenmesi	57
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI	58
4.1. POLİ(HİDROKSİETİLMETAKRİLAT) MİKROTAŞIYICILAR	58
4.1.1. PHEMA Mikrotasıyıcı Seçimi ve Hazırlama Yöntemi	58
4.1.2. Süspansiyon Polimerizasyonu Özellikleri	58
4.1.2.1. Partikül Boy ve Boy Dağılımını Etkileyen Parametreler	
4.1.2.2. Polimerleşme Reaksiyonunu Etkileyen Parametreler	
4.1.2.3. Optimum Polimerizasyon Koşullarının Saptanması	
4.1.3. PHEMA Mikrotasıyıcıların Fizikokimyasal Özellikleri	69
ESCA Tekniğiyle Yüzey Analizi	
4.1.4. Hücre Kültür Çalışmaları	74
4.1.4.1. Hücre Türü, Kültür Ortamı ve Kültür Çalışma Koşullarının Seçimi	
Hücre Türü Seçimi	
Kültür Ortamı Seçimi	
Optimum Çalışma Koşullarının Saptanması	
4.1.4.2. Mikrotasıyıcı-Destekli Durgun Kültür Ortamındaki Çalışmalar	
4.1.4.2.1. Optimum PHEMA Mikrotasıyıcı Seçimi	
4.1.4.2.2. Mikrotasıyıcı-Destekli Durgun Kültürlerde Optimum Çalışma Koşullarının Saptanması	
4.1.3.2.3. PHEMA Mikrotasıyıcıların Tekrar Kullanılabilirliğinin Saptanması	
4.1.4.2.4. Mikrotasıyıcıdan-Mikrotasıyıcıya Hücre Transferi	
4.1.4.3. Mikrotasıyıcı-Destekli Süspansiyon Kültür Ortamındaki Çalışmalar	

4.2. POLİSTİREN MİKROTAŞIYICILAR	99
4.2.1. PS Mikrotasıyıcı Seçimi ve Yüzey Modifikasyonu	99
4.2.2. Plazma Polimerizasyon Özellikleri	101
4.2.3. ESCA Tekniğiyle Yüzey Analizi	103
4.2.3.1. PS Mikrotasıyıcıların Yüzey Analizi	
4.2.3.2. PS Filmlerin Yüzey Analizi	
4.2.3.3. Yüksek Ayrışım Cis Spektrumları	
4.2.4. Hücre Kültür Çalışmaları	111
4.2.4.1. PS Filmlerde Hücre Kültürü	
4.2.4.2. PS Mikrotasıyıcılarda Hücre Kültürü	
4.3. MİKROTAŞIYICI-DESTEKLİ KÜLTÜR SİSTEMLERİNDE HÜCRE YAPISMA VE ÜREMESİNİN MATEMATİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ	116
4.3.1. Hücre Yapısma Kinetiği	120
4.3.1.1. Matematiksel Modelin Tanımı	
4.3.1.2. Önerilen Modelle Mikrotasıyıcı-Destekli Sistemlerde BHK Hücre Yapısmasının Değerlendirilmesi PS Mikrotasıyıcı-Destekli Kültürde Hücre Yapısması PHEMA ve Cytodex Mikrotasıyıcı-Destekli Kültürde Hücre Yapısması	
4.3.2. Hücre Üreme Kinetiği	126
4.3.2.1. Kullanılan Modelin Matematiksel Tanımı	
4.3.2.2. Önerilen Modelin Mikrotasıyıcı-Destekli Sistemlerde BHK Hücre Üremesine Uyarlanması PHEMA ve Cytodex Mikrotasıyıcı-Destekli Süspansiyon Kültürde Hücre Üremesi PHEMA ve Cytodex Mikrotasıyıcı-Destekli Durgun Kültürde Hücre Üremesi PS Mikrotasıyıcı-Destekli Durgun Kültürde Hücre Üremesi	
4.4. SAP VİRÜSÜ ÜRETİMİ	135
4.4.1. Virüs Suşu ve Çalışma Koşullarının Seçimi	135
4.4.2. Virüs Kültür Çalışmaları	136
5. SONUÇLAR	143
6. DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ	146
7. EKLER	152
EK A HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN	

		x
	ORTAMLARIN BİLEŞİMİ	152
EK B	HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN ORTAM VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI	155
EK C	HÜCRE SAYIM YÖNTEMİ	158
EK D	HÜCRELERİN MİKROSKOPİK İNCELENESİ	159
EK E	ŞAP VİRÜSÜ DUYARLILIK TESTLERİ	160
EK F	ORTAY YÖNTEMİ İLE KÖK TAYİNİ	163



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Sekil 2.1. Genelleştirilmiş Hücre Modeli.....	7
Sekil 2.2. Cesitli Yüzeylere Hücre Yapışması.....	9
Sekil 2.3. Hücre Yapışma ve Yayılmasının Sematik Gösterimi a) Negatif ; b) Pozitif Yüklü Hücre Kültür Substratları [dk: divalent kanyonlar; YTG: Yüzeye Tutunan Glikoprotein].....	10
Sekil 2.4. Süspansiyon Kültürde Teorik Üreme Eğrisi.....	13
Sekil 2.5. Yüzeye Bağımlı Hücre Kültür Sistemleri.....	14
Sekil 2.6. Hücre Kültür Reaktörlerinin Çalışma Karakteristikleri.....	23
Sekil 2.7. Hücre Kültürlerinde Kullanılan Biyoreaktörler. A) Karıştırıcı Kap; B) Mikrokapsülasyon Tankı; C) Seramik Matris; D) Hollow-Fiber.....	25
Sekil 2.8. Kesikli Reaktörde İdeal Üreme Kinetiği.....	26
Sekil 2.9. HEMA-EGDMA Kopolimerizasyon/Capraz Bağlanma Reaksiyonu.....	35
Sekil 2.10. Plazma Polimerizasyon Mekanizması.....	39
Sekil 3.1. Süspansiyon Polimerizasyonu Deney Düzenegi.....	42
Sekil 3.2. PS Partiküllerin Yüzey Modifikasyonunda Kullanılan Monomerler.....	44
Sekil 3.3. PS Partiküllerin Yüzey Modifikasyonunda Kullanılan Plazma Reaktörünün Sematik Görünümü.....	45
Sekil 3.4. PS Filmlerin Yüzey Modifikasyonunda Kullanılan Plazma Polimerizasyon Düzenegi.....	46
Sekil 3.5. Çalışmada Kullanılan Cytodex Mikrotasarıyıcılar.....	47
Sekil 3.6. Mikrotasarıyıcı-Destekli Hücre Kültür Reaktörü.....	55
Sekil 4.1. Süspansiyon Polimerizasyonu ile Hazırlanan Capraz Bağlı PHEMA Partiküller. a) Orijinal PHEMA Partiküller; b) Çalışmada Hazırlanan PHEMA Partiküller.....	61
Sekil 4.2. Pervane Tipi Karıştırıcı Kullanılarak Hazırlanmış PHEMA Partiküller.....	62
Sekil 4.3. Karıştırma Hızının Partikül Boyuna Etkisi a) Karıştırma Hızı : 150 rpm; b) Karıştırma Hızı : 600 rpm.....	64
Sekil 4.4. Sıcaklığın Polimerleşme Reaksiyonuna Etkisi.....	65

Sekil 4.5.	Capraz Bağlı PHEMA Partiküllerin Dinamik Sisme Eğrileri.....	67
Sekil 4.6.	MMA ve DMAEMA Monomerlerinin Sisme Üzerindeki Etkisi.....	67
Sekil 4.7.	PHEMA Partiküllerin SEM Fotoğrafı.....	70
Sekil 4.8.	PHEMA Mikrotasiyıcılara ait ESCA Spektrumları a) PHEMA-1; b) PHEMA-2; c) PHEMA-4; d) PHEMA-8.....	71
Sekil 4.9.	Orijinal C1s Spektrumları; a) Capraz Bağlı PHEMA; b) MMA.....	73
Sekil 4.10.	PHEMA Mikrotasiyıcılara Ait C1s Spektrumları a) PHEMA-1; b) PHEMA-2; c) PHEMA-4; d) PHEMA-8.....	75
Sekil 4.11.	Kültür Ortamlarının Hücre Üremesine Etkisi.....	77
Sekil 4.12.	BHK 21 Hücre Veriminin Sıcaklığa Bağımlılığı.....	79
Sekil 4.13.	PHEMA Matris Bileşiminin Hücre Yapışmasına Etkisi (a) MMA Etkisi; (b) DMAEMA Etkisi.....	80
Sekil 4.14.	PHEMA Mikrotasiyıcılarla Cytodex Mikrotasiyıcıların Hücre Yapışması Yönünden Karşılaştırılması.....	81
Sekil 4.15.	Mikrotasiyıcı-Destekli Durgun Kültürde Hücre Yapışması a) PHEMA Mikrotasiyıcı (8 Numaralı Örnek); b) Cytodex-1; c) Cytodex-3.....	83
Sekil 4.16.	PHEMA Mikrotasiyıcılarda Hücre Yayılma ve Üremesi a) İnokülasyondan 12 saat sonra; b) İnokülasyondan 24 saat sonra c) İnokülasyondan 36 saat sonra	85
Sekil 4.17.	Mikrotasiyıcı-Destekli Durgun Kültürde Hücre Üreme Eğrileri.....	86
Sekil 4.18.	İnokülasyon Yoğunluğunun Hücre Verimine Etkisi.....	87
Sekil 4.19.	Mikrotasiyıcı Konsantrasyonunun Hücre Verimine Etkisi.....	88
Sekil 4.20.	PHEMA Mikrotasiyıcıların İkinci Kez Kullanımı a) Hücre Yapışması; b) Hücre Üremesi.....	90
Sekil 4.21.	İkinci Kez Kullanılan PHEMA Mikrotasiyıcılarda Hücre Üremesi.....	90
Sekil 4.22.	PHEMA Mikrotasiyıcılarda Hücre Transferi.....	92
Sekil 4.23.	Mikrotasiyıcı-Destekli Süspans Kültürde Karıştırma Hızının Hücre Üremesine Etkisi.....	93
Sekil 4.24.	Mikrotasiyıcı Yüzeyinden Hücre Dökülmesi.....	93
Sekil 4.25.	Mikrotasiyıcı-Destekli Süspans Kültürde Hücre Üremesi.....	94
Sekil 4.26.	PHEMA-Destekli Süspans Kültürde Hücre Yapışması ve Üremesi a) Hücre Yapışması (4. saat); b) Hücre Ayırılması (12. saat) c) Hücre Üremesi (48. saat); d) Hücre Üremesi (48. saat: boyanmamış).....	95

Sekil 4.27.	Cytodex-Destekli Süspansiyon Kültürde Hücre Yapışması ve Üremesi	
	a) Cytodex-1'de Hücre Yapışması (6. saat)	
	b) Cytodex-1'de Hücre Üremesi (48. saat)	
	c) Cytodex-3'de Hücre Yapışması (6. saat)	
	d) Cytodex-3'de Hücre Üremesi (48. saat).....	97
Sekil 4.28.	PS Partikülleri (Bio beads SX2).....	100
Sekil 4.29.	PS Mikrotasarıyıcılara Ait ESCA Spektrumları	
	(a) TEA; 1 dakika; 2.5 W (8 numaralı PS)	
	(b) TEA; 5 dakika; 2.5 W (9 numaralı PS)	
	(c) TEA; 10 dakika; 2.5 W (10 numaralı PS).....	104
Sekil 4.30.	PS Mikrotasarıyıcılarda Plazma Reaksiyon Süresiyle Yüzey	
	N Bileşiminin Değişimi.....	105
Sekil 4.31.	PS Filmlerde Plazma Reaksiyon Süresiyle Yüzey	
	Azot Bileşiminin Değişimi.....	107
Sekil 4.32.	Modifiye Edilmemiş PS Partiküle ait C1s Spektrumu.....	108
Sekil 4.33.	PS Filmlere ait C1s Spektrumları.....	109
Sekil 4.34.	PS Partiküllere ait C1s Spektrumları.....	110
Sekil 4.35.	PS Yüzeylerde Fibroblastik Hücre Üremesi	
	(Orijinal Büyütme x 150)	
	(a) ALAM Kaplı Yüzey (2.5 W; 5 dakika)	
	(b) EDA Kaplı Yüzey (2.5 W; 5 dakika)	
	(c) TEA Kaplı Yüzey (2.5 W; 5 dakika)	
	(d) PS Doku Kültür Kabı.....	113
Sekil 4.36.	TEA Kaplı PS Yüzeyde Tıpkı Fibroblastik Üreme	
	(Orijinal Büyütme x 60).....	114
Sekil 4.37.	PS Mikrotasarıyıcılara BHK Hücrelerinin Yapışma Kinetiği.....	115
Sekil 4.38.	PS Mikrotasarıyıcılarda BHK Hücrelerinin Yayılması	
	(Orijinal Büyütme x300)	
	a) ALAM Kaplı Yüzey (2.5 W; 5 dakika)	
	b) EDA Kaplı Yüzey (2.5 W; 5 dakika)	
	c) TEA Kaplı Yüzey (2.5 W; 5 dakika).....	117
Sekil 4.39.	TEA Kaplı Mikrotasarıyıcılarda Hücre Üremesi.....	118
Sekil 4.40.	EDA Kaplı Mikrotasarıyıcılarda Hücre Üremesi.....	119
Sekil 4.41.	ALAM Kaplı Mikrotasarıyıcılarda Hücre Üremesi.....	119
Sekil 4.42.	PS Mikrotasarıyıcılarda Hücre Yayılması ve Üremesi.....	120

Sekil 4.43.	k Degerinin Bulunmasında Kullanılan Y-t Grafigi.....	123
Sekil 4.44.	PS Mikrotasviyicilar için Deneyisel ve Model Yapisma Degerlerinin Karstlastirilmesi.....	125
Sekil 4.45.	PHEMA ve Cytodex Mikrotasviyicilar için Deneyisel ve Model Yapisma Degerlerinin Karstlastirilmesi.....	125
Sekil 4.46.	μ ve X_0 Degerlerinin Saptanmasında Kullanılan $t - \ln(X/1-X)$ Grafigi.....	129
Sekil 4.47.	Süspanse Kültür için Deneyisel ve Model Üreme Degerlerinin Karstlastirilmesi.....	130
Sekil 4.48.	Durgun Kültürde PHEMA ve Cytodex Mikrotasviyicilar için Deneyisel ve Model Üreme Degerlerinin Karstlastirilmesi.....	131
Sekil 4.49.	μ ve X_0 Degerlerinin Saptanmasında Kullanılan $t - \ln(X/1-X)$ Grafigi.....	133
Sekil 4.50.	PS Mikrotasviyici-Destekli Kültür için Deneyisel ve Model Üreme Degerlerinin Karstlastirilmesi.....	134
Sekil 4.51.	Petri Kabındaki Tek Tabaka Kültürde Hücrelerin Virüs Tarafından Enfekte Edilmesi a) Hücre kültürü ; b) Virüs kültürü (36. saat); c) Virüs kültürü (36. saat).....	137
Sekil 4.52.	PHEMA Mikrotasviyici-Destekli Durgun Kültürde Hücrelerin Virüs Tarafından Enfekte Edilmesi a) Virüs kültürü (36. saat); b) Virüs kültürü (36. saat).....	138
Sekil 4.53.	Petri Kabındaki Tek Tabaka Kültürde A22 Virüsü Üreme Eğrileri.....	139

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Hücre Kültürleriyle Üretilen Ürünler.	5
Çizelge 2.2.	Hayvansal ve Mikrobiyal Hücrelerin Karşılaştırılması.	6
Çizelge 2.3.	Hücre Kimyasal Bileşimi.	7
Çizelge 2.4.	Yüzeye Bağımlı ve Süspansiyon Hücrelerinin Avantajları.	8
Çizelge 2.5.	Ticari Mikrotasiyıcılar.	19
Çizelge 2.6.	Ticari Olmayan Mikrotasiyıcılar.	20
Çizelge 2.7.	Mikrotasiyıcı-Destekli Kültürlerde Üretilen Hücreler.	21
Çizelge 2.8.	Mikrotasiyıcı-Destekli Kültürlerde Üretilen Virüsler.	22
Çizelge 2.9.	Mikrotasiyıcı-Destekli Kültürlerde Üretilen Biyolojik Maddeler.	22
Çizelge 2.10.	Sap Virüs Tipleri.	30
Çizelge 3.1.	Polimerizasyonda Kullanılan Monomerler.	43
Çizelge 3.2.	Durgun Kültür Koşulları.	53
Çizelge 3.3.	Süspansiyon Kültür Koşulları.	54
Çizelge 4.1.	PHEMA Partiküllerin Elek Analiz Sonuçları.	63
Çizelge 4.2.	Başılatıcı Konsantrasyonunun Dönüşüme Etkisi.	63
Çizelge 4.3.	Capraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Polimerik Yapıya Etkisi.	66
Çizelge 4.4.	Polimerizasyon Koşulları.	68
Çizelge 4.5.	PHEMA Mikrotasiyıcıların Bileşimi ve Fiziksel Özellikleri.	68
Çizelge 4.6.	PHEMA Mikrotasiyıcıların Yüzey Atomik Bileşimi.	70
Çizelge 4.7.	Mikrotasiyıcı- Destekli Durgun Kültürde Hücre Verimi.	82
Çizelge 4.8.	PHEMA Mikrotasiyıcı-Destekli Süspansiyon Kültür Reaktörü ve Döner Siseli Sistem Hücre Verim Değerlerinin Karşılaştırılması.	99
Çizelge 4.9.	PS Partiküllerin Fiziksel Özellikleri.	100
Çizelge 4.10.	Değişik Plazmalarda Renk ve Basıncı Değişimi.	101
Çizelge 4.11.	PS Mikrotasiyıcılar ve Filmler.	102
Çizelge 4.12.	PS Partiküllerin Yüzey Atomik Bileşimi.	105
Çizelge 4.13.	PS Filmlerin Yüzey Atomik Bileşimi.	106
Çizelge 4.14.	PS Film Yüzeylerinde Hücre Verimliliği. (İnokülasyon Yoğunluğu: 3×10^4 hücre/ml. inkübasyon süresi: 4 gün)	112
Çizelge 4.15.	Hücre Yapıma Verilerinin Değerlendirilmesi (PS-4).	122

Çizelge 4.16.	PS Mikrotasiyıcılar için Model Yapıma Parametreleri.	123
Çizelge 4.17.	PS Mikrotasiyıcılar için Deneyse ve Model Yapıma Değerlerinin Karşılaştırılması.	124
Çizelge 4.18.	PHEMA ve Cytodex Mikrotasiyıcılar için Model Yapıma Parametreleri.	124
Çizelge 4.19.	PHEMA Mikrotasiyıcılar için Hücre Üreme Verilerinin Değerlendirilmesi.	128
Çizelge 4.20.	Süspans KÜltür için Saptanan Model Üreme Parametreleri.	129
Çizelge 4.21.	Süspans KÜltür için Deneyse ve Model Üreme Değerlerinin Karşılaştırılması.	130
Çizelge 4.22.	Durgun KÜltürde PHEMA ve Cytodex Mikrotasiyıcılar için Saptanan Model Üreme Parametreleri (Inoküasyon Yoğunluğu: 3×10^5 hücre/ml).	131
Çizelge 4.23.	PS-5 Mikrotasiyıcılar için Hücre Üreme Verilerinin Değerlendirilmesi.	132
Çizelge 4.24.	PS Mikrotasiyıcılar için Saptanan Model Üreme Parametreleri.	
Çizelge 4.25.	PS Mikrotasiyıcı-Destekli KÜltürü için Deneyse ve Model Üreme Değerlerinin Karşılaştırılması.	134
Çizelge 4.26.	Virüs Duyarlılık Testlerinin Sonuçları.	139

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- a : Herhangibir t zamanında mikrotastiyıcı yüzeyine yapışan hücre konsantrasyonu, hücre sayısı/ml
- a_{max} : Yüzeydeki tutunma noktası sayısı, hücre sayısı/ml
- A : Süspansiyon polimerizasyonunda oluşan radikal
- da/dt : Hücrelerin yüzeye yapışma hızı, hücre sayısı/m/dak.
- dx/dt : Hücre üreme hızı, hücre sayısı/ml zaman
- D_0 : Partikülün kuru durumdaki çapı, μ
- D_t : Partikülün sismis durumdaki çapı, μ
- i : Polimerizasyonda başlatıcı molekülü
- k : Başlangıç özgül yapışma hızı, dak^{-1}
- K_s : Michealis-Menten sabiti
- m_i : Yaşam faktörü
- M1 : Süspansiyon polimerizasyonunda HEMA monomeri
- M2 : Süspansiyon polimerizasyonunda EGDMA monomeri
- M : Plazma polimerizasyonunda orijinal materyalden ayrılan atomlar
- M^* : Plazma polimerizasyonunda reaktif iyon, molekül veya radikaller
- P_j : Hücre üreme kinetiğinde ürün konsantrasyonu
- P_p, q, r : Canlı polimer zinciri
- r : Korelasyon katsayısı
- S : Sınırlayıcı substrat konsantrasyonu
- t : Zaman
- t_q : Bekleme fazı süresi
- q_j : j ürününün özgül üretim değeri, g ürün/hücre, saat
- y_i : i substratına bağımlı hücre verimi, g hücre/g harcanan i substratı
- X : Hücre konsantrasyonu, hücre sayısı/ml
- X_0 : Başlangıç hücre konsantrasyonu, hücre sayısı/ml
- X_{max} : Maksimum hücre konsantrasyonu, hücre sayısı/ml
- $X(t)$: t anında ulaşılan hücre konsantrasyonu, hücre sayısı/ml
- x : Boyutsuz hücre konsantrasyonu
- β : Bir katsayı, boyutsuz
- μ : Başlangıç özgül üreme hızı, $zaman^{-1}$
- μ_{max} : Maksimum özgül üreme hızı, $zaman^{-1}$

Kisaltmalar Açıklama

AIBN	Azobisisobutironitril
ALAM	Alimamin
AT	Antijenik titre
BHK	Baby Hamster Kidney
CFT	Komplement Fiksasyon Testi
DEAE	Diethylaminoetil
DMAEMA	Dimetilaminoetilmetakrilat
DMAP	Dimetilaminopropil
DME	Dulbecco's Modified Eagle
DVB	Divinilbenzen
EGDMA	Etilenglikoldimetakrilat
EMA	Etilmetakrilat
ESCA	Electron Spectroscopy for Chemical Analysis
FCS	Foetal Calf Serum
FMD	Foot and Mouth Disease
HEMA	Hidroksietilmetakrilat
IT	Enfektif titre
MEM	Minimum Essential Medium
MMA	Metilmetakrilat
PAA	Poliakrilamid
PBS	Fosfat Tampon Cözeltisi
PHEMA	Polihidroksietilmetakrilat
PS	Polistiren
RF	Radıofrekans
RNA	Ribonükleik Asit
SEM	Scanning Electron Microscope
TEA	Trietilamin
TEAE	Trietilaminoetil
THAMP	Trihidroksiaminopropil
YM3	Virus Medium 3
XPS	X-Ray Photoelectron Spectroscopy

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Modern anlamdaki "hayvansal hücre teknolojisi", günümüzden 30 yıl kadar önce, Earle ve arkadaşları [1] tarafından hücre üremesini destekleyecek besi ortamının geliştirilmesiyle başlamış olup günümüzde çok sayıda önemli biyolojik maddenin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır [2-4]. Bu ürünler arasında tıp ve veterinerlik amaçlı viral asılar, interferon ve plazminojen aktivatörleri en önemli yeri tutmaktadır. Asılar içinde de üretim kapasitesi açısından Şap aşısı "Foot and Mouth Disease Vaccine" birinci sıradadır.

Günümüzde hücre teknolojisi alanında yapılan çalışmalar üretimin endüstriyel boyutlarda gerçekleştirilmesi yönünde ağırlık kazanmıştır. Bu konu, hücrelerin değişik ortamlarda üreyebilme özelliğinden kaynaklanan çeşitli sorunların çözümünü gerektirmektedir.

Bilindiği gibi, kültür ortamında serbest olarak üreyebilen süspansiyon hücreler, mikrobiyal hücrelere benzer şekilde, homojen kültürde ve büyük ölçekte kolaylıkla üretilirler ve elde edilen ürünler çok miktarda ve düşük maliyettedir. Ancak, bazı virus türleri süspansiyon ortamında üremiş hücrelere adapte edilememektedir. Ayrıca, bu tür hücreler normal olmayan kromozomal değişimler ve tümörjenik özellikler göstermektedir. Tüm bunların sonucu olarak süspansiyon hücrelerin biyolojik ürün üretimindeki kullanımları sınırlandırılmış ve Amerikan Sağlık Örgütü, bu tür hücrelerden elde edilen biyolojik amaçlı ürünlerin insan uygulamalarında kullanımını tamamen yasaklamıştır.

Hücre kültürlerinde kullanılan ikinci tür hücreler "yüzeyle bağımlı" hücreler olup, üreyebilmeleri için üzerine tutunabilecekleri uygun bir katı yüzey gerektirirler. Bu amaçla, uzun yıllar, negatif yüklü silikat ya da borat grupları içeren cam en uygun materyal olarak kullanılmıştır. Son yıllarda ise, değişik yüzey ve yığın özelliklerine sahip plastik materyaller geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [5-7].

Klasik yöntemlerde yüzeyle bağımlı hücreler, yukarıda sözü geçen cam ya da plastik malzemeden imal edilmiş petri kaplarının tabanına yapışarak tek tabaka halinde üretilirler. Burada en önemli sorun, yüzey alanının sınırlı olması nedeniyle hücre üretim kapasitesinin düşük olmasıdır. Son yıllarda, büyük kapasiteli üretimlerde kullanılacak yeni sistemlerin geliştirilmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Tüm bu çalışmalarda ulaşılmaya çalışılan hedef, birim hacimdeki yüzey alanını arttırmaktır. Bu amaçla geliştirilen sistemler arasında, döner siseli sistemler [8], spirali film sistemler [9], çok tabakalı üreticiler [10] ve cam küre dolgu kolonlar [11] sayılabilir. Ancak bu tür sistemlerin alan/hacim

oranları, pratik uygulamalar için yine de yetersiz kalmıştır. Bunun yanı sıra, bu sistemlerde homojen kültür koşullarının sağlanamayışı, ölçüm ve kontrol zorluğu gibi dezavantajlar da mevcuttur.

Hücre kültür reaktörlerinde üretim hızı ve kapasitesinin arttırılabilmesi için son yıllarda teknolojik boyutlarda da uygulamaya geçecek düzeye gelen yeni tekniklerin en önemlisi "mikrotasiyıcı-destekli kültür" sistemleridir. Bu yeni sistemde, hücreler, üreme ortamında hafif karıştırmayla süspanse halde tutulabilen ve mikrotasiyıcı olarak adlandırılan, polimerik yapıdaki katı partiküllerin yüzeyinde üretilirler. van Wezel tarafından ileri sürülen söz konusu yöntem ilk olarak, hücrelerin pozitif yüklü dekstran küreler üzerinde üretilmesiyle denenmiş [12], ancak yüzey yük miktarı yüksek olduğundan, hücre üremesi üzerinde inhibisyon etkisi gözlenmiştir. Mikrotasiyıcı sistemlerin kullanılmasıyla, yüzeye bağımlı hücreler de mikrobiyal hücrelere benzer şekilde büyük ölçekli fermentörlerde yüksek üretim kapasitelerinde üretilirler. Mikrotasiyıcı kültürleri, teknolojik boyutta 1000 lt'lik fermentörlerde de gerçekleştirilerek, çeşitli biyolojik maddeler üretilmiştir [13].

Son yıllarda mikrotasiyıcı sistemlerin karakterizasyonu ve uygulamaları üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Jelatin, poliakrilamid, polistiren ve selüloz temelli çeşitli mikrotasiyıcılar ticari amaçlı olarak geliştirilmiş olmasına rağmen en yaygın olarak kullanılanlar dekstrandan türetilmiş olanlardır [14].

Yapılan çalışmada, ticari olarak mevcut taşıyıcılara alternatif olabilecek yeni mikrotasiyıcıların geliştirilmesi ve bunların sap virüsüne duyarlı "Baby Hamster Kidney" (BHK) hücrelerinin üretiminde kullanımı amaçlanmıştır. Bu amaca uygun olarak farklı iki tür polimerik matriks seçilmiştir. Bunlardan birincisi hidrofilik karakterli 2-hidroksiötilmetakrilat (HEMA) monomerinin süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlanan polihidroksiötilmetakrilat (PHEMA), diğeri ise hidrofobik yapıdaki polistiren (PS)'dir.

Çalışmanın ilk basamağında uygun yüzey ve yığın özelliklerine sahip, PHEMA ve PS mikrotasiyıcılar hazırlanmıştır. 120-200 μ capındaki, seffaf ve küresel PHEMA mikrotasiyıcılar akrilik monomerlerin tarafımızdan modifiye edilen süspansiyon kopolimerizasyonu yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu yapıda HEMA monomeri temel bileşen olup, etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) monomeriyle çapraz bağlanmıştır. Yapının yığın ve yüzey özelliklerinin ayarlanması amacıyla da metilmetakrilat (MMA) ve dimetilamino-etilmetakrilat (DMAEMA) monomerleri kullanılmıştır. PS mikrotasiyıcılar ise, "Bicobeads SX2" (BioRad Lab. ABD) isimli PS partiküllerin tarafımızdan geliştirilen yeni bir plazma

polimerizasyon tekniğiyle yüzeylerinin kaplanması sonucu hazırlanmıştır. Yüzey modifikasyonu üç değişik alkilaminle (etilendiamin, alilamin ve trietilamin) ve değişik reaksiyon koşullarında (plazma gücü ve süresi) gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ikinci basamağında, hazırlanan mikrotasiyıcıların çeşitli fizikokimyasal özellikleri (yoğunluk, sedimentasyon hızı, boy ve boy dağılımı, yüzey yapısı ve yükü, vb) uygun yöntemlerle tayin edilmiştir.

Çalışmanın üçüncü basamağında, hazırlanan mikrotasiyıcıların uygunluğu hücre kültür ortamında yürütülen çalışmalarla saptanmıştır. Mikrotasiyıcı-destekli kültür çalışmaları, durgun ve süspansiyon kültür koşullarında, Cytodex-1 ve Cytodex-3 (Pharmacia, İsveç) isimli ticari mikrotasiyıcılarla karşılaştırmalı olarak yürütülmüştür. Durgun kültür koşullarında yapılan çalışmalarla mikrotasiyıcı-destekli kültür sistemine ait çeşitli parametrelerin (mikrotasiyıcı konsantrasyonu, hücre inokülasyon yoğunluğu, vb.) etkisi incelenmiş, hücre yapışma ve üreme kinetikleri matematiksel olarak değerlendirilerek uygun modellerle ifade edilmiştir.

Çalışmanın son basamağında ise, araştırma kapsamında geliştirilen PHEMA mikrotasiyıcıların sap virüsü üretiminde kullanılabilirliği klasik yöntemlerle karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

Yapılan tüm bu çalışmalar ışığında, Türkiye'de halen klasik yöntemlerle BHK hücreleri kullanılarak üretilen ve sap hastalığında aşı olarak kullanılan sap virüsünün mikrotasiyıcı-destekli hücre kültür sistemlerinde üretilmesi için gerekli temel veriler elde edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, yapılan çalışmanın temelini oluşturan, konuyla ilgili literatürde mevcut bilgiler sunulmuştur. Öncelikle hücre kültürü tanımlanmış ve kültür sistemlerinin özellikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Ayrıca, araştırmanın asıl konusunu oluşturan mikrotasiyıcı destekli hücre kültürleri ayrıntılı olarak ele alınmıştır. Bu ilk bölümün sonunda da hücre üreme kinetiğinin teorik esaslarına yer verilmiştir. Sonraki bölümde hücre kültür teknikleriyle üretilen biyolojik maddeler arasında en önemli yeri alan ve araştırma kapsamında da üretimi gerçekleştirilen sap virüsü ve asısı hakkında özet bilgi verilmiştir. Daha sonra ise, polimerik mikrotasiyıcıların hazırlanmasında ve yüzey modifikasyonunda kullanılan süspansiyon polimerizasyonu ve plazma polimerizasyonu yöntemleri tanıtılmıştır.

2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre biyoteknolojisinin temeli, kompleks doku veya organlardan izole edilen hücrelerin suni besi ortamlarında üretilmesi ve üretilen hücrelerin de in vitro koşullarda farklı organizmalar olarak davranmasına dayanır. Hücre kültürleri, hücrelerin yapısal olarak farklılaşmasına, dejenerasyonuna veya transformasyonuna neden olur. Bu durum, yeni ortamda, doku ya da organdakinden farklı bir yapısal düzenin varlığından kaynaklanmaktadır. Eğer hücre popülasyonu, histolojik düzende gerçekleştirilebilirse hücresel fonksiyonlar aynen devam eder, ki bu doku kültürünün gerçek tanımıdır. Hücre kültüründe ise, dokular farklı hücrelere parçalandığından histolojik organizasyon bozulmakta ve bunun sonucu olarak da hücresel fonksiyonlar farklılaşmaktadır.

Biyolojik düşüncenin bir parçası olarak doku kültürü yapımı çok eskilere dayanır. Önceleri sadece inceleme şeklinde yürütülen çalışmalar yirminci yüzyılın ortalarına doğru hızlandırılmış, plazma ve embriyo sıvısı kullanılarak çeşitli dokuların üretilmesi tekniği bir kısım araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. Araştırmacılar bazıları da çeşitli hücrelerin üretilmesi için besi ortamlarının geliştirilmesi üzerinde çalışmışlar ve hayvansal doku hücrelerinin üretililebileceğini göstermişlerdir. İnsan hücrelerinin üretilmesi ve poliomyelitis virüsünün bu hücrelerde çoğalarak sitopatolojik değişiklikler yapması virolojide yeni bir çağın açılmasıdır.

Çizelge 2.1. Hücre Kültürleriyle Üretilen Ürünler.

Grup I. Hücreler	Grup II. Hücresel Ürünler
Sunı Deri	Büyüme Faktörleri
Sunı Organlar	Epidermal Büyüme Faktörü
β -Islet Hücreleri (Pankreas)	Sinirsel Büyüme Faktörü
Hepatositler (Karaciğer)	Kan Faktörleri
Kemik İhçı	Monoklonal Antikorlar
Limfositler	İnterferonlar
	Proteazlar (Ürokinaz, vb.)
	Aşılar
	Hormonlar
	İnsan Büyüme Hormonu
	İnsülin
	Paratiroid Hormonu

Hücre teknolojisindeki modern anlamdaki gelişmeler 30 yıllık bir geçmişe sahiptir. Çeşitli hücreler için uygun besiy ortamlarının hazırlanmasıyla hücrelerin ve hücreleri ürünlerin üretimi mümkün olmuştur. Çizelge 2.1.'de hücre kültürleriyle üretilen bu ürünler verilmiştir.

Doğrudan doku ya da organ olarak kullanılacak hücrelerin üretimi konusunda yoğun çalışmalar yapılmakta olup, klinik uygulamalar için büyük bir gelecek vaat etmektedir. Hücre kültürleriyle üretilen biyolojik ürünler arasında, aşılar ön sırayı almaktadır. Aşılar içinde en geniş yeri kaplayan veteriner amaçlı aşılar olup, sap asısı birinci sırada gelmektedir.

Hücre teknolojisinde son 10 yıl içerisinde yapılan çalışmalarda, üretim kapasitesinin endüstriyel boyutlara çıkarılması başarı kazanmıştır. Seçilen hedef, hayvansal hücreler için de mikrobiyal hücrelerdekine benzer endüstriyel fermentasyon proseslerinin geliştirilmesidir. Ancak, her iki tür hücre için de aynı temel kavramlar geçerli olmasına rağmen, aralarındaki önemli yapısal farklılıklar, hayvansal hücre kültürleri için daha değişik proseslerin tanımlanmasını gerekli kılmıştır. İki hücre türü arasındaki farklılıklar Çizelge 2.2.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Hayvansal ve Mikrobiyal Hücrelerin Karşılaştırılması.

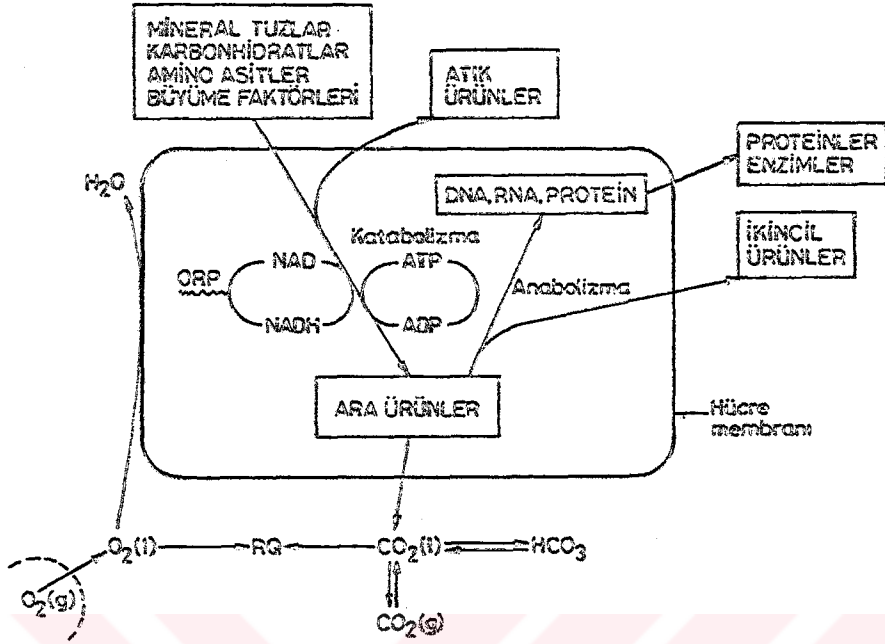
Özellik	Mikrobiyal Hücre	Hayvansal Hücre
Boyut (Çap)	1 - 10 μ	10 - 100 μ
Üreme hızı	İkilenme süresi 0.2 - 2 saat	İkilenme süresi 10 - 72 saat
Metabolizma	İnternal olarak düzenlenir Yüksek metabolik aktivite	İnternal ve eksternal (Hormonal) olarak düzenlenir, düşük metabolik aktivite
Yapı	Sert hücre duvarı	Sadece kolay parçalanan plazma membranı
Çevre	Süspansiyon kültüründe tipik büyüme	Bazı hücreler büyümek için uygun yüzey gerektirir

Mikrobiyal hücreler için üreme ortamı bileşimi esneklik ve toksik metabolit birikimi için tolerans mevcuttur. Oysa ki, hayvansal hücrelerin üremesi çevre koşullarındaki çok dar bir aralıkla sınırlı olup, bu koşulların (örneğin pH, çözünmüş oksijen, vb.) mükemmel kontrolünü gerektirir. Hayvansal hücre kültür ortamı, ozmotik olarak dengelenmiş vitamin, mineral ve amino asitlerin karışımından oluşur. Son yıllarda serumlu ortamda da çalışmalar yapılmasına rağmen, genellikle ortam hayvansal serumla desteklenir. Kimyasal olarak tanımlanmış ortam, büyüme faktörleri, hormonlar, proteinler ve metal tuzlarından oluşur ve çok sayıda hücrenin üremesini sağlar [15-17]. Genellikle hayvansal hücreler CO₂/hava (örneğin, % 5/% 95) atmosferinde ürerler. Şekil 2.1.'de hayvansal hücreler için geliştirilmiş hücre modeli görülmektedir.

Hayvansal hücrelerin kimyasal bileşimi Çizelge 2.3.'de verilmiştir.

2.1.1. Hücre Kültür Sistemleri

Hücre kültür sistemleri, hücre popülasyon yoğunluğuna ve hücrenin bir substrat yüzeyine tutunması veya süspansiyon halinde üremesine bağlı olarak çeşitli alt gruplara ayrılırlar. Hücre yoğunluğunun düşük olduğu (<10⁴ hücre/ml) durumdaki üreme "klonal üreme" olarak adlandırılır ve substrata yapışarak üreyen hücrelerin yanı sıra, yumuşak agar gibi yarıkatı bir ortamda süspansiyon olarak üreyen hücrelerde de görülebilen bir üreme şeklidir.



Sekil 2.1. Genelleştirilmiş Hücre Modeli.

Çizelge 2.3. Hücre Kimyasal Bileşimi.

Bileşenler	pg / hücre	Değer Aralığı	% Bileşim
Yas Ağırlık	3500	3000-6000	-
Kuru Ağırlık	600	300-1200	-
Protein	250	200-300	10-20
Karbonhidrat	150	20-200	10-5
Lipid	120	100-200	-2
DNA	10	8-10	0.3
RNA	25	20-40	0.7
Su	-	-	80-85
Hacim	$4 \times 10^{-9} \text{ cm}^3$	-	-

Hücrelerin bir substrata yapışarak ürettiği yoğun kültürler "tek tabaka hücre kültürü" olarak adlandırılır. Bu tür kültürlerde üreyebilen hücreler de yüzeye bağımlı hücrelerdir ve hücrel verimlilik substratın yüzey alanıyla sınırlıdır. Süspansiyon kültür durumunda ise hücreler herhangi bir yüzeye yapışmaksızın sürekli karıştırılan fer-

Çizelge 2.4. Yüzeye Bağımlı ve Süspanse Hücrelerin Avantajları.

Yüzeye Bağımlı Hücreler	Süspanse Hücreler
Cesitli türleri mevcuttur	Yüksek kapasitede üretilirler
Primer hücreler	Sistemlerin ısıtmaya alınması ve kontrolu kolaydır
Diploid hücreler	Sürekli kültürlerde üretililebilirler
Hat hücreler	Tripsinizasyon gerektirmezler
Virüs türlerine duyarlıdır	Monoklonal antitibi
Tümörjenik özellik göstermezler	Limfoblastoid interferon ve
Yapısal kararlılık gösterirler	Sap virüsünün ticari üretiminde
Fibroblastik interferon	kullanılırlar
Üretiminde kullanılırlar	

mentörlerde ürerler. Çizelge 2.4'de bu iki tür hücrenin avantajları karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir.

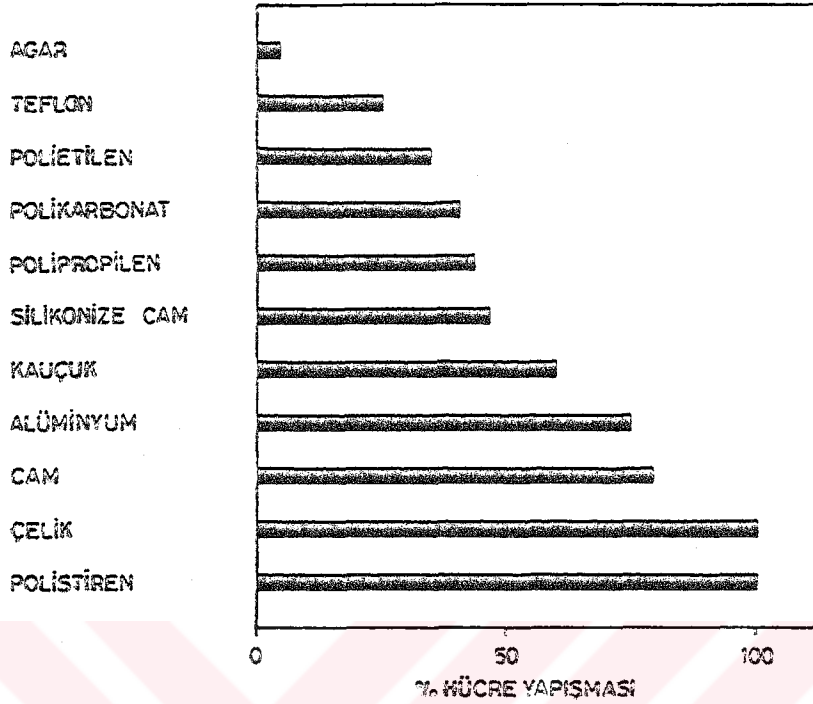
Aşağıda tek tabaka hücre kültürü daha ayrıntılı olmak üzere, her iki kültür sistemi açıklanmıştır.

2.1.1.1. Tek Tabaka Hücre Kültürü

Tek tabaka hücre kültürleri, organ kısımlarının enzimatik parçalanmasıyla elde edilen tek hücre süspanسیونlarından hazırlanırlar. Hücre preparatı, kültür ortamı içeren kültür kabına asılır ve koşulları kontrol edilen bir ortamda inkübe edilerek birincil hücre kültürü oluşturulur. Laboratuvar çalışmalarında bu tür kültürler, birinci kültürlerden izole edilerek, veya hazır hücre susları olarak cesitli organizasyonlardan (örneğin American Type Culture Collection ve Institute for Medical Research gibi) temin edilirler.

2.1.1.1.1. Hücre-Substrat Etkileşimi

Tek tabaka hücre kültürlerinde temel basamak, hücrelerin kültür kabının yüzeyine yapışmasıdır. Hücre yayılma ve üremesi, ancak uygun yüzeye yapışma gerçekleştikten sonra başlar. Bu nedenle en önemli faktör, hücre-substrat yüzey etkileşimidir. Hücreler

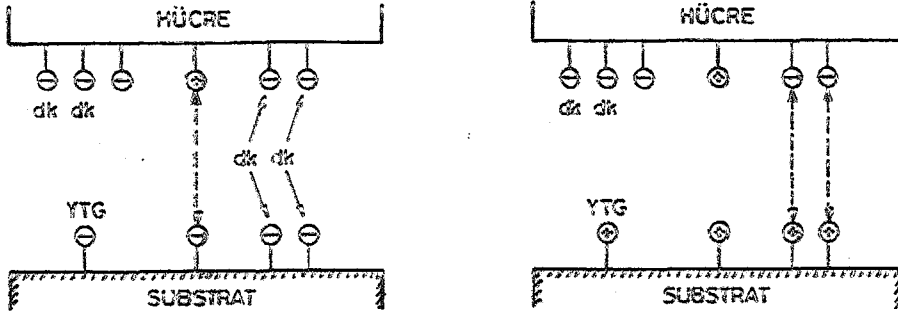


Sekil 2.2. Çeşitli Yüzeylere Hücre Yapışması.

tüm yüzeylere yapışmayacağı gibi, yapışmanın gerçekleştiği yüzeyler de üremeyi inhibe edebilir. Yüzeydeki makromoleküler organizasyon, yük türü ve yoğunluğu, ısıtılabilirlik ve fiziksel yapı, hücre etkileşimini etkileyen önemli substrat özellikleri olarak sıralanabilir.

Yüzeyler taşıdıkları yüzey serbest enerjisine bağlı olarak yüksek veya düşük enerjili yüzeyler olarak adlandırılırlar. Metaller, metal oksitler ve cam yüksek enerjili, organik yüzeyler ise düşük enerjili yüzeylerdir. Orijinal yüzey, fiziksel ya da kimyasal işlemlerle modifiye edilebilir. Böylelikle, örneğin polistirende olduğu gibi, düşük enerjiye sahip yüzey, yüksek enerjili duruma getirilir. Sekil 2.2'de de görüldüğü gibi hücreler yüksek enerjili yüzeye daha iyi yapışmaktadır [18]. Yapılan çalışmalar, hücre yapışmasının negatif ya da pozitif yüzeylerde gerçekleşebileceğini, yük polaritesinden çok, yük yoğunluğunun yapışma ve yayılmada etken olduğunu göstermiştir.

Hayvansal hücreler negatif yüzey yüküne sahiptirler. Klasik kültür yüzeyleri de cam veya plastik olup negatif yüklüdürler. Böylece, iki negatif yük arasındaki elektrostatik itme sonucunda, iyonik etkileşimler ve protein köprüleriyle hücre-yüzey bağlantısı gerçekleşir [19, 20]. Pozitif yüklü substrat durumunda ise, elektrostatik kuvvetlerle bağlantı sağlanır. Her iki mekanizma da birbirine benzer olup, hücre-substrat etkileşimi



Sekil 2.3. Hücre Yapışma ve Yayılmasının Şematik Gösterimi

a) Negatif : b) Pozitif Yüklü Hücre Kültür Substratları

[dk: divalent kanyonlar; YTG: Yüzeye Tutunan Glikoprotein]

fibronektin gibi bir amfoterik protein ve/veya Ca^{++} , Mg^{++} gibi divalent kanyonlar tarafından oluşturulan köprülerle sağlanır. Sekil 2.3'de bu etkileşim sematik olarak gösterilmiştir.

Hücre yapışmasında etkin olan proteinler, hücre tarafından sentezlenebileceği gibi, kültür ortamındaki serumun yapısında da bulunmaktadır. Kültür ortamındaki plazma proteinleri ve serum hücresel yapışmada son derece etkin olup, yüzey tarafından absorplanırlar ve yüzeyin kimyasal özelliklerini değiştirirler. Protein absorpsiyonu ise substratın ıslatılabilirliği ile yakından ilgilidir. Genelde hidrofobik substratlar hücre yapışmasını desteklemez. Çalışmalar, substrat ıslatılabilirliğinin artmasıyla hücre yapışma ve yayılmasının mükemmelleştiğini göstermiştir [21,22]. Ancak, ıslatılabilirlik dereceleri yüksek olmasına rağmen, hücre yapışmasına izin vermeyen iki substrat, agar ve poli(HEMA), bu durumun dışında kalmaktadır [23].

Hücre yapışmasında etkin diğer bir parametre substratın fiziksel yapısıdır. Hücreler katı yüzeylere yapışırlar. Çalışmalar sıvı fosfolipid yüzeylerde yapışma olmadığını göstermiştir [24]. Bu durum, hücrelerin substrat yüzeyinde etkileşebileceği, küçük, yoğun ve sert katı bağlanma noktalarının varlığıyla açıklanmıştır [25]. Akışkan substratlarda bu tür kararlı bağlanma noktaları yoktur.

2.1.1.1. 2. Tek Tabaka Hücre Kültürlerinde Kullanılan Substratlar

Daha önce de söz edildiği gibi, tek tabaka kültürlerdeki hücreler, üremeleri için uygun bir substrata yapışma eğilimindedirler. Seçilecek ideal yüzey toksik olmamalı, biyolojik

asidan inert ve seffaf olmalıdır. Tüm bunların ötesinde, hücre yapışmasına ve üreme sırasındaki hücre hareketliliğe izin vermelidir. Bu özellikler dikkate alınarak seçilmiş çeşitli substratlar mevcut olup, bunları doğal ve yapay substratlar olarak 2 grupta toplamak mümkündür.

Doğal substratlar: In vivo koşullarda hücrelerin yapıştığı diğer hücre veya yapılar "hücre dışı matriks" olarak adlandırılır. Sözkonusu matriks, hücre için sadece bir destek materyal olmakla kalmayıp, aynı zamanda, hücre metabolizması ve farklılaşmasını da etkiler [26]. Hücre dışı matriksin yapısında bulunan bileşenlerin önemlileri aşağıda kısaca özetlenmiştir.

- **Kollajenler:** Kollajenler, üçlü sarmal yapıdaki proteinler olup, yüksek glisin, prolin ve hidroksiprolin içeriğine sahiptirler. Tekrarlanan yapı Gly-X-Y şeklindedir. Genetik açıdan 5 farklı türde kollajen mevcuttur. I. Deri, kemik ve tendonlarda ; II. Epitel hücrelerin membranında; III. Deri, plasenta ve kasda ; IV. Kan damarları ve iç organların parankimasında bulunan ; V. Kartilaj. Bunlardan I, IV ve V fibriller yapıdadır. II. tür ise fibriller olmayıp hücreler için uygun yüzeyi sağlar.

- **Proteoglikanlar:** Bu yapılar, merkezi proteine yapışmış çok sayıda glikozaminoglikanlardan oluşur. Glikozaminoglikanlar ise hekzoamin ve diğer bir şeker molekülü içeren tekrarlanabilir disakkarit birimlerinden oluşan uzun polianyonik zincirlerdir. 4 önemli türü mevcuttur. Hyaluronik asit, kondrotin sülfat, keratin sülfat ve heparan sülfat. Tüm yapılar son derece kompleksdir ve merkezi proteine yapışmış glikozaminoglikan türünün değişimiyle, farklı yapıdaki hücreler için uygun substratlar sağlanır.

- **Diğer proteinler:** Hücre dışı matriksin yapısında bulunan diğer proteinler, fibronektin, laminin, elastin, entaktin, kondronektin ve çok sayıda isimli glikoproteinlerdir. Glikoproteinlerin bileşimi ve miktarlarındaki değişimlerle, farklı hücre dışı matriksler elde edilir ve bunlar değişik tür hücreler için hücre yapışmayı sağlarlar. Örneğin fibroblastlar için fibronektin, epitel hücreler için laminin yapışmada etkindir [27].

Özetlemek gerekirse, hücre dışı matriks son derece karmaşık yapıda olup, hücre yapışma ve üremesini desteklemek amacıyla bu matriksin çeşitli bileşenleri, yapay substratların yüzeyinde kullanılır. Kollajen kaplı yüzeylerin kullanımı çeşitli hücre hatları için denenmiştir [28]. Bu doğal yapılarla gerçekleştirilen çalışmalar, hücre üremesi ve farklılaşmasında matriksin rolünün anlaşılmasını sağlamıştır, ancak ticari boyutlardaki

çalışmalar için teminleri son derece zor ve pahalı olduğundan, bu tür uygulamalarda doğal substratların yerini alacak yapay substratlar geliştirilmiştir.

Yapay Substratlar: Bu gruptaki substratlar cam ve plastikler olmak üzere iki türdür.

- Cam: Cam yüzeyler, soda camı (normal cam) ve alüminyum borosilikat camı olarak 2 gruba ayrılırlar. Hücreler soda camında üreyebilir, fakat özellikle sterilizasyon sırasındaki yüksek sıcaklıklarda, yapıdaki alkalinin ortama salınması hücre üzerinde toksik etkiye neden olur. Alkali oksit içeriğinin soda camından 10 kat daha düşük olması ve yüksek hidrolik direnci nedeniyle alüminyum borosilikat camı hücreler için daha uygundur [29]. Ayrıca, selüloz, karbon veya kollojen kaplı cam yüzeyler de geliştirilmiştir.

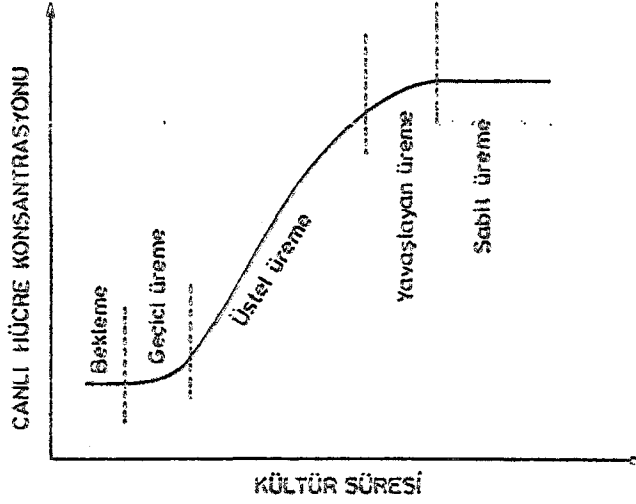
- Plastik: Hücreler, değişik kimyasal yapıdaki plastik yüzeylere, örneğin, polistiren, polietilen, polikarbonat, polipropilen, polivinilklorür, teflon, selüloz asetat, selüloz ve diğerlerine yapışır ve ürerler. Ancak, ticari olarak mevcut plastik yapıların bazıları hücre kültürü için uygun değildir ve hücreler bu tür yüzeylere yapışmazlar. Bakteriyojik polistiren petri kapları bu türdür. Çeşitli kimyasal ve fiziksel tekniklerle polistiren yüzeyler hücre kültürü için uygun duruma getirilmiş ve piyasaya sunulmuştur [30-33].

2.1.1.2. Süspansiyon Hücre Kültürleri

Tümör hücreleri, örneğin HeLa hücreleri ve limfoblastoidler üremeleri için bir yüzey gerektirmeyen süspansiyon hücreler olup, bakteriyel fermentasyondakine benzer ekipmanlarda üretilirler. Süspansiyon kültürlerinde hücre üreme kinetiği karakteristik olup Sekti 2.4’ de verilen teorik üreme eğrisiyle tanımlanır.

2.1.2. Hücre Kültür Sistemlerindeki Gelişmeler

Hücre kültürünün endüstriyel boyutlarda gerçekleştirilmesi amacıyla son yıllarda yapılan çalışmalar yeni hücre kültür sistemlerinin geliştirilmesi yönünde yoğunluk kazanmıştır. Endüstriyel boyutdaki sistemlerde karşılaşılan sorunlar şunlardır:



Sekil 2.4. Süspansiyon Kültürde Teorik Üreme Eğrisi.

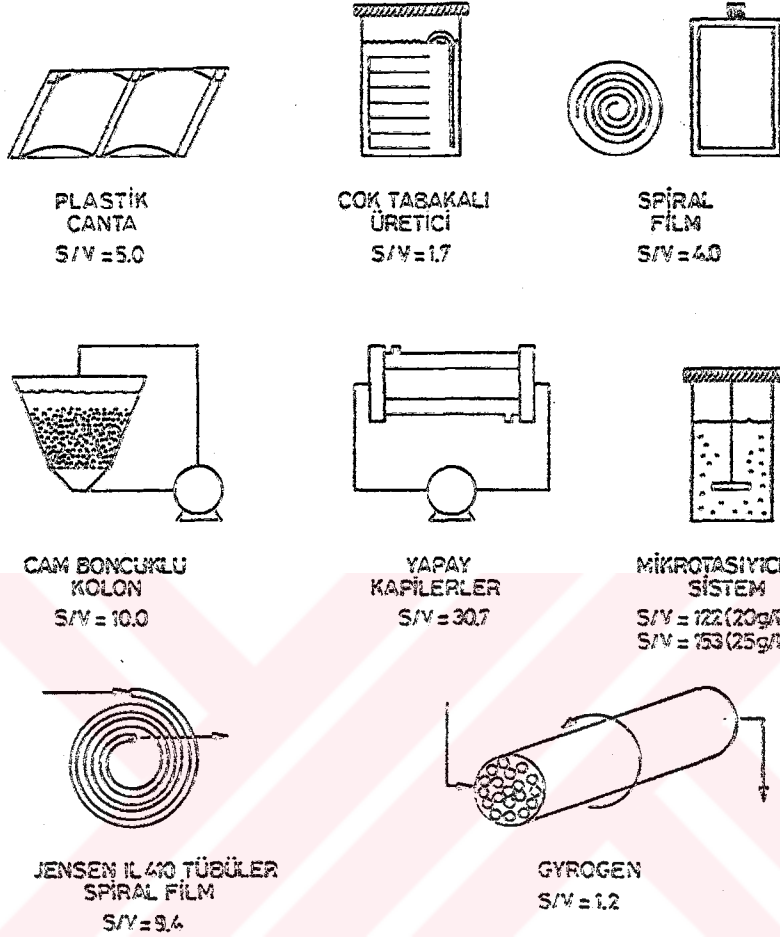
Kısmen çözümlenmiş, ancak bazı eksiklikleri olan sorunlar

- Yüzeye bağımlı hücre kültürleri için düşük alan/hacim oranı
- Süspansiyon hücre kültürlerinde kayma kuvvetlerine duyarlılık

Halen çözüm bekleyen sorunlar

- Oksijen transfer kısıtlamaları
- Toksik atık ürünlerin birikimi
- Yüksek serum maliyeti
- Proses kontrolü için düzenleyicilerin yetersizliği

Yüzeye bağımlı hücrelerin üretiminde yaygın olarak kullanılan cihazlar, petri kapları ve döner siselerdir [34]. 1 litrelik döner sise yaklaşık 500 cm^2 'lik iç yüzey alanına sahiptir ve hücre yapışması ve üremesi, iç yüzey duvarında gerçekleşir. Siseler inkübatöre yerleştirilip, yavaş hızda döndürülerek iç yüzeyin tümünün hücre tarafından kullanılması sağlanır. Sise hacmi başına yüzey alanı son derece düşük olduğundan, ticari boyutdaki çalışmalar için sise sayısının artırılması gerekmektedir. Bu durum da, yüksek yatırım ve işletme maliyetine ve ortam koşullarının kontrolünün zorlaşmasına neden olur. Birim hacimdeki yüzey alanının artırılması için son yıllarda geliştirilen sistemler Sekil 2.5'de sematik olarak verilmiştir.



Şekil 2. 5. Yüzeye Bağımlı Hücre Kültür Sistemleri.

Sistemlerin tümünde alan/hacim oranı diğer siselli sistemlerden daha yüksektir. Ancak, çok tabakalı üreticiler [10], spiral film [9], plastik torbalar [32] ve Gyrogen [35] sistemlerinin alan/hacim oranları, pratik uygulamalar için yine de yetersiz kalmıştır. Cam kürelerin kullanıldığı sistem [11], kürelerin hücreleri deforme etmesi nedeniyle pratik uygulaması olmayan bir sistemdir. Yapay kapiler sistem [36], boş bir silindirin içinin diyaliz tüp demetiyle doldurulmasıyla oluşmuştur. Hücreler dış yüzeyde ürerken, kültür ortamı da kapillerlerin iç kısmından akıtılır. Besin maddeleri kapiler duvarından hücrelere difüze olur, oksijen ise, silindirin kabuk tarafından yollanan havayla sağlanır. Jensen'in IL410 tübüler spiral filmi [37], gaz geçirgen filminden yapılmış bir tüpten oluşmuştur. Hücreler, tüpün içinde ürerler, oksijen ise gaz geçirgen film boyunca tüpün dışından beslenir. Son iki sistem de, ilk anlatılanlara göre son derece pratiktir. En uygun

sistem ise "mikrotasıyıcı-destekli kültür sistemleri" olup Bölüm 2.1.3'de ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

Hayvansal hücreler, koruyucu hücre çeperine sahip olmadıkları için, süspansiyon ortamdaki kayma kuvvetlerine karşı çok duyarlıdır. Bu nedenle, yüzeye bağımlı hücre üretimi amacıyla yeni tekniklerin geliştirilmesinde ana hedef, alan/hacim oranının artırılması iken, süspansiyon hücre kültüründeki yeni tekniklerde hedef, kayma'nın minimuma indirilmesidir. Önerilen yöntemlerden ilki, değişik tür karıştırıcı dizaynına yöneliktir [38]. Diğer yöntem ise, hücre duvarına ek olarak yapay bir hücre duvarının geliştirilmesidir. "Mikrokapsüllenmiş sistemler" olarak adlandırılan bu yeni sistemde, hücreler, agaroz veya aljinal'dan hazırlanmış yaklaşık 500 μ boyutundaki küreler içerisinde immobilize durumdadır. Yöntem ilk olarak 1980'de Lim ve Sun tarafından [39] pankreatik islet hücrelerin immobilizasyonu amacıyla kullanılmıştır. Bu sistemde, mikrokapsüle kütle transferi önemli bir sorundur ve normal süspansiyon kültürle karşılaştırıldığında hücrelerin ikilenme süresinin daha uzun olduğu görülmüştür.

2.1.3. Mikrotasıyıcı-Destekli Hücre Kültür Sistemleri

2.1.3.1. Mikrotasıyıcıların Geliştirilmesi

Yüzeye bağımlı hücre kültürlerinin mikrotasıyıcı sistemlerde yürütülmesi fikri ilk olarak van Wezel tarafından ortaya atılmış ve DEAE (diethylaminoethyl)-Sephadex A-50 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), ticari iyon-değiştirici reçine mikrotasıyıcı olarak kullanılmıştır [12]. Bu mikrotasıyıcı, yük kapasitesi 3.5 mEq/g kuru materyal olan, tersiyer amin grupları (DEAE) içeren çapraz bağlı dekstran matrisinden oluşmuştur. Sözü edilen mikrotasıyıcı sistem kullanılarak birincil hücreler ve insan diploid hücre serilerinden elde edilen hücreler üretilmiş ve poliomelyelitis virüsü hazırlanmıştır [12]. Ancak, mikrotasıyıcı konsantrasyonu 1 g DEAE-Sephadex A-50/litre kültür, değerini aştığında hücreler üzerinde toksik etki olduğu gözlemlenmiş ve hücre verimi % 50 azalmıştır [40]. Mikrotasıyıcı konsantrasyonu 2 g/litre değerini aştığında ise, hücreler tamamen ölmüştür.

Sonraki çalışmalar, toksik etkinin azaltılması konusunda yoğunlaşmıştır. En önemli yaklaşımlar, mikrotasıyıcıların serum proteinleri [41], nitroselüloz [42] veya karboksimetilselüloz [43] ile kaplanmasıdır. Fakat bu tür mikrotasıyıcılar ticari olarak geliştirilememiştir. Daha sonraki çalışmalarda mikrotasıyıcı yük kapasitesinin, ticari ürününün % 40'ına, yani 1.5 mEq/g kuru materyal, değerine düşürülmesinin uygun

olduğu bulunmuştur [44,45]. İnsan diploid hücre serisinden elde edilen hücreler, yeni hazırlanmış, düşük yük kapasitesine sahip DEAE-dekstran matrislerde (5 g/litre mikrotasiyıcı konsantrasyonu) üretildiğinde 4×10^6 hücre/ml hücre konsantrasyonu değerine ulaşmıştır. Yeni gelişmeler ve yüzeye bağımlı hücrelerin endüstriyel ölçekte üretimine duyulan gereksinimin artışı, bu düşük yüke sahip DEAE-dekstran mikrotasiyıcıların ticari olarak üretimine yol açmıştır.

Bu konuda yapılan çalışmalar, söz konusu mikrotasiyıcıların pek çok hücre türü için uygun olduğunu göstermiştir [46]. Ancak, hücre üretimi ve ürün eldesiyle ilgili bazı sorunların varlığı, dünya üzerinde çok sayıda ticari şirket ve araştırmacının, değişik özelliklerde ve daha uygun yapılarla mikrotasiyıcıların geliştirilmesi konusuna yönelmelerine neden olmuştur [47].

2.1.3.2. Mikrotasiyıcı-Destekli Kültür Sistemlerinin Avantajları

Mikrotasiyıcı-destekli kültür sistemleri, diğer büyük ölçekli yüzeye bağımlı hücre kültür tekniklerine göre aşağıda açıklanan avantajlara sahiptirler.

- Yüksek alan/hacim oranına ulaşılır ve ayrıca mikrotasiyıcı konsantrasyonu değiştirilerek istenilen alan/hacim değeri sağlanabilir. Bu durum, birim hacimde yüksek hücre konsantrasyonuna neden olur ve dolayısıyla ürün verimini artırır. Mikrotasiyıcı perfüz kültürleri kullanılarak, 9×10^6 hücre/ml hücre verimliliğine ulaşılmıştır [48].

- Hücre üretiminin, birçok küçük üretim ünitesi yerine, tek bir yüksek üretim kapasitesindeki reaktörde gerçekleştirilmesiyle, kültür ortamının son derece ekonomik bir biçimde kullanılması sağlanmış olur. 2 litrelik mikrotasiyıcı hücre kültüründe 5 litre ortam kullanıldığında, hücre ve virüs verimliliğinin, 25 litre ortam kullanılan 250 adet döner süseye eşit olduğu bulunmuştur [49]. Ayrıca tek bir reaktördeki hücre üretimi, manipülasyon işlemlerinin azalmasına, dolayısıyla maliyet ve kontaminasyon riskinin azalmasına neden olur.

- İyi karıştırılan mikrotasiyıcı süspansiyon kültürlerinde, hücrelerin homojen dağılımı çevre koşullarının (örneğin, pH, pO_2 ve ortam bileşenlerinin konsantrasyonu) kontrolünü mümkün kılar, böylelikle hücre üretimi ve ürün veriminde tekrarlanabilir sonuçlar sağlanır.

- Diğer tekniklerin çoğunda mümkün olmayan, mikroskopik inceleme veya kimyasal testler için örnek alınması mümkündür.

• Mikrotasviyicilar, süspansiyon ortamında kolaylıkla cöktürülebileceklerinden, hücrelerin ortamdaki ayrılması son derece kolaydır.

• Son yıllarda, sistemin kullanımını çok daha kolaylaştıracak yeni hücresel manipölasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Örneğin, proteolitik enzim kullanmaksızın hücre transferi, kolonilerde hücre kültür perfüzyonları [50], büyük ölçekli mitotik hücre geri kazanımı [51] ve üç boyutlu matrisde hücre farklılaşma çalışmaları [52], bunlar arasında sayılabilir.

• Bakteri ve süspanse hayvan hücre kültürlerinde kullanılan alışlagelmiş ekipman (fermentörler) kullanılarak, üretim kapasitesi istenilen boyutlara çıkarılabilir.

2.1.3.3. Mikrotasviyici-Destekli Kültür Sistemlerinin Dezavantajları

Mikrotasviyici-destekli kültür sistemlerinde karşılaşılan dezavantajlar aşağıda verilmiştir.

• Mikrotasviyici süspanse sistemleri de, diğer hücre süspanse kültürlerinde karşılaşılan zayıf oksijen transfer özelliğini gösterirler. Oksijen transfer karakteristiklerinin geliştirilmesi için çeşitli yöntemler önerilmesine rağmen, maliyetin artması düşündürücü olmaktadır.

• Her tür hücrenin mikrotasviyici yüzeyinden ayrılması aynı kolaylıkta olmamaktadır.

• Mikrotasviyiciler, sistem maliyetini arttırmırlar. Örneğin, 5 g partikül/l'te kültür miktarında mikrotasviyici kullanıldığında sistemin maliyeti 50 ABD Doları/l'tir. Ancak sistemin yeniden kullanılabilir olması maliyeti azaltır.

• Kültür ortamında sisebilme özelliğine sahip mikrotasviyiciler, (örneğin Cytodex vb.) ortamdaki besin maddelerini absorplayarak, zamanla ortamın fakirleşmesine neden olurlar. Ancak, bu sorun sismeyen yapıdaki yeni mikrotasviyicilerin geliştirilmesiyle ortadan kalkmıştır.

2.1.3.4. Optimum Mikrotasviyici Özellikleri

Hücre kültürlerinde mikrotasviyici olarak kullanılacak materyallerin sahip olması istenilen özellikler aşağıda sıralanmıştır.

- Mikrotasıyıcı yüzey özellikleri, hücre yapışma, yayılma ve üremesine izin verecek şekilde olmalıdır. Hücrelerin homojen üremesi için yüzey özelliklerinin de homojen olması gerekir.

- Mikrotasıyıcı yoğunluğu, ortam yoğunluğundan daha fazla olmalıdır. Böylelikle, mikrotasıyıcılar hafif karırtırmayla kültür ortamında süspansiyon halinde tutulabilirler. Standart kültür koşullarında mikrotasıyıcı yoğunluğu 1.030-1.045 g/ml değerinde olmalıdır.

- Mikrotasıyıcılar, genellikle küresel ve çapı 100-300 μ dolayında olmalıdır. Boy dağılımı da mümkün olduğunca düşük olmalıdır.

- Mikrotasıyıcı optik özellikleri, mikroskop altında hücre özelliklerinin kolaylıkla incelenmesine izin verecek şekilde olmalıdır.

- Mikrotasıyıcılar toksik, mutajenik ve karsinojenik olmamalı, kolaylıkla sterilenebilmelidir.

- Karırtırma sırasında hücre deformasyonuna neden olunmaması için mikrotasıyıcılar esnek yapıda olmalıdır.

2.1.3.5. Mikrotasıyıcı Türleri

Hücre kültür sistemlerinde kullanılan çeşitli ticari mikrotasıyıcılar ve ticari olmayanlar aşağıda listelenmiştir.

Ticari Mikrotasıyıcılar: Bu mikrotasıyıcılar 5 grupta toplanabilirler:

1) Tersiyer amin grubu içeren mikrotasıyıcılar (Biocarrıer, Cytodex-1, Superbeads). Bu mikrotasıyıcılar, gözenekli hidrofilik matristen oluşurlar (dekstran veya poliakrilamid) ve pozitif yüklü tersiyer amino grupları tüm matriste içerisinde dağılmış durumdadır.

2) Yüzeyi yüklü mikrotasıyıcılar (Cytodex-2). Bu mikrotasıyıcıların dış yüzeyi kuaterner amin gruplarıyla yüklenmiştir.

3) Jelatin veya kollojen kaplı mikrotasıyıcılar (Cytodex-3, Ventragei, Gelibeads). Mikrotasıyıcıların dış yüzeyi çok ince denatüre kollojen veya çapraz bağli jelatin ile kaplanmıştır.

Çizelge 2.5. Ticari Mikrotasıyıcılar.

Ticari Adı	Özelligi	Yüklü Grup	Matriks	Şekil Boyut	Yoğunluk (g/ml)	Porozite	Şeffaflık
Cytodex 1 (Pharmacia)	Pozitif gruplar matrikstedir	DEAE	Dekstran	Küresel 131-210 μ	1.03	+	+
Cytodex 2 (Pharmacia)	Pozitif gruplar yüzeydedir	THAMP	Dekstran	Küresel 114-196 μ	1.04	+	+
Cytodex 3 (Pharmacia)	Kollojen kaplıdır	Kollojen	Dekstran	Küresel 133-215 μ	1.04	+	+
Biocarrier (Bic-Rad)	Pozitif gruplar matrikstedir	DMAP	PAA	Küresel 120-180 μ	1.04	+	+
Ventragei	Jelatin	Jelatin	Jelatin	Küresel 150-250 μ	-	+	+
Biosilon	PS	Negatif	PS	Küresel 160-300 μ	1.05	-	-
Whatman	Pozitif gruplar matrikstedir	DEAE	Selüloz	Silindirik 40-50 μ çap 80-400 μ boy	-	+	+

4) Polistiren mikrotasıyıcılar (Biosilon, Cytospheres). Bu mikrotasıyıcılar, hidrofobik, gozeneksiz polistiren matriksten hazırlanmıştır ve yüzeyinde düşük negatif yüke sahiptir.

5) DEAE-Selüloz mikrotasıyıcılar (DE-53). Silindirik yapıdaki selüloz matriksten oluşmuşlar ve matris boyunca tersiyer amin grupları dağılmıştır.

Çizelge 2.6. Ticari Olmayan Mikrotasarıyıcılar.

Mikrotasarıyıcı	Referans
Protein kaplı DEAE-Sephadex	[53]
Jelatin mikrotasarıyıcı	[54]
Poliilisın, jelatin veya heparin kaplı mikrotasarıyıcılar	[55]
Pozitif yüklü (tersiyer amin) PS	[56]
İci boş cam küreler	[57]
Negatif yüklü (sülfolanmış) pozitif yüklü (polietilenimin) kollojen, BSA, laminin veya fibronektin kaplı PS-DVB	[58]
Pozitif yüklü (poliilisın, DEAE veya diaminohexan) veya jelatin türevli agaroz-polialdehit	[59]
Primer amin türevli poliakrilamid	[60]

Yukarıda sözü edilen ticari mikrotasarıyıcıların ayrıntılı özellikleri Çizelge 2.5'de listelenmiştir.

Ticari Olmayan Mikrotasarıyıcılar: Ticari mikrotasarıyıcılar, biyolojik ürünlerin endüstriyel boyutlardaki üretimi için gerekli özellikleri taşıyacak şekilde tasarlanmıştır. Ancak, bazı araştırmacılar, bu mikrotasarıyıcıları kendi kültür sistemleri için uygun bulmamışlar ve değişik özelliklere sahip, yeni mikrotasarıyıcıların geliştirilmesi üzerine çalışmışlardır. Bu mikrotasarıyıcılar, Çizelge 2.6'da verilmiştir.

2.1.3.6. Mikrotasarıyıcı-Destekli Kültürlerin Uygulamaları

Hücre Üretimi: Çizelge 2.7'de, değişik mikrotasarıyıcıların kullanıldığı kültür sistemlerinde üretilen hücrelere örnekler verilmiştir. Balık, kus, omurga ve memeli orijinli hücreler, transforme olmuş ve normal hücreler, fibroblastik veya epitel hücreler ve son olarak da genetik olarak modifiye edilmiş hücreler, mikrotasarıyıcılar üzerinde üretilmiştir.

Çizelge 2.7. Mikrotasarııcı-Destekli Kùltürlerde Üretilen Hücreler.

Hücre Türü	Referans
Primer veya sekonder hücreler	[62-66]
Sığır böbrek hücreleri	
Sığır endotelyum hücreleri	
Köpek böbrek hücreleri	
Fare fibroblastları	
Domuz tiroid hücreleri	
Tavşan endotel hücreleri	
İnsan hepatositleri, endotel hücreleri	
İmmfositler ve amniotik hücreler	
Normal veya transforme hücreler	[67-71]
MDCK	IBR-52
BHK	LIC-MK2
CHO	CV1
Namalva	BSC1
HeLa	HEp-2
İnsan diploid hücre serileri	[43, 63, 72, 73]
WI-38, MRC-5, IMR-90, HEL-299, FS-4	

Geleneksel tek tabaka kùltürlerinde hücre üretimi amacıyla kullanılan kùltür ortamlarının mikrotasarııcı-destekli kùltür sistemleri için de uygun olduğu saptanmıştır. Ayrıca, serumuz ortamda gerçekleştirilen mikrotasarııcı kùltür çalışmaları da vardır [61].

Virüs Üretimi: Mikrotasarııcılar üzerinde üretilen hücreler virüs üretimi amacıyla kullanılırlar. Çizelge 2.8'de listelenen virüsler, mikrotasarııcı-destekli kùltürlerde üretilmiştir. Bazı durumlarda, virüs verimi düşük olmasına rağmen [74], hücresel verimliliğin yüksek oluşu, büyük boyutta virüs üretimi için avantaj sağlamaktadır. Poliomyelitis virüsü ve sap virüsü, endüstriyel boyutta ası üretimi amacıyla, DEAE-dekstran mikrotasarııcı kùltürlerinde üretilmişlerdir.

Viröl Olmayan Biyolojik Ürünlerin Üretimi: Çizelge 2.9'da sıralanan çeşitli biyolojik ürünler mikrotasarııcı kùltürlerinde üretilmişlerdir. Bu ürünler, en iyi

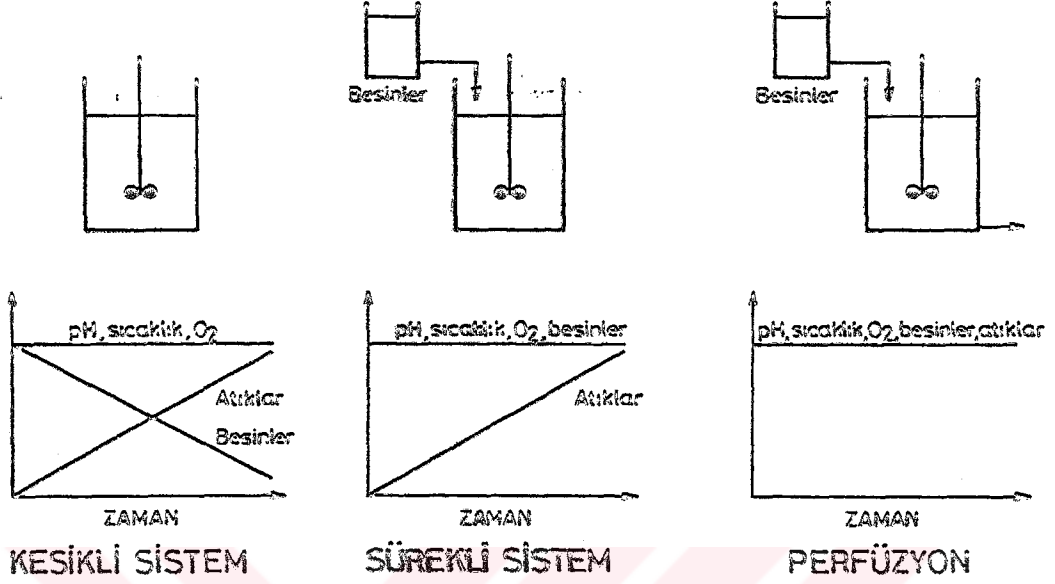
Çizelge 2.8. Mikrotasiyıcı-Destekli Kültürlerde Üretilen Virüsler.

Virüs	Referans
Sap virüsü (FMD virüsü)	[41, 75]
Herpes virüs	[76]
İnfluenza	[77]
Marek virüs	[78]
Onkoma virüsler	[79]
Papovavirüs	[80]
Porovirüs	[81]
Poliovirüs	[82]
Rabies virüs	[83]
Rubella virüs	[77]
Simian virüs 40	[63]
Vezikular stomatitis virüs	[84]

Çizelge 2.9. Mikrotasiyıcı-Destekli Kültürlerde Üretilen Biyolojik Maddeler.

Biyolojik Madde	Referans
Karsinoembryonik antijen	[56, 85]
İnterferon	[63, 74, 86]
İnsan (β)	
Fare	
İnterleukin-1	[87]
Plazminojen aktivatörleri	[88, 89]

şekilde kesikli sistemlerde üretilirler (örneğin, β -insan interferonu). Ancak, ürün kendiliğinden oluşuyorsa veya üretiliyorsa, sürekli ya da yarıkesikli sistemler uygulanabilir (örneğin, karsinoembryonik antijen). Bu ürünler arasında büyük boyutdaki sistemlerde üretilenler β -fibroblast interferon [86] ve plazminojen aktivatörüdür [89]. Genetik olarak modifiye edilmiş hücreler de viral antijen (örneğin



Şekil 2.6. Hücre Kültür Reaktörlerinin Çalışma Karakteristikleri.

hepatitis), doku plazminojen aktivatörü, plazma proteinleri ve hormon üretiminde son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.1.4. Hücre Kültür Reaktörleri

Büyük ölçekli süspans ve mikrotastayıcı kültürleri, karıştırmalı reaktörlerde gerçekleştirilir. Mikrobiyol fermentörlerde olduğu gibi, karıştırmalı reaktörlerde de çalışmalar üç şekilde yürütülür.

- Kesikli
- Sürekli
- Perfüzyon sistemler.

Bu üç sistem, Şekil 2.6'da şematik olarak gösterilmiştir.

Kesikli sistemde, oksijen dışında herhangi bir besin maddesinin işlem sırasında ortama ilavesi söz konusu değildir. Kontrol edilen parametreler, sıcaklık, havalandırma ve pH'dır. Böylelikle, kesikli kültürde hücreler, besin maddesinin azalması ve atık ürünlerin birikmesi sonucu sürekli olarak değişen bir ortamla temas halindedir. Hücre üremesi ve/veya ürün oluşumu, besin kısıtlaması veya toksik madde birikimi nedeniyle

inhibe olur. Bu sorun, harcanan besi ortamının yerine tazesi konularak, kısmen çözümlenebilir.

Sürekli sistemler kültür çalışmaları için daha uygundur. Bu hücrelerin gereksinimi olan bileşenler, sisteme sürekli olarak beslenir, böylelikle, sabit besin konsantrasyonu sağlanır. Çevresel parametreler kontrol edilebileceği için, hücre üremesi ve ürün oluşumu en iyi şekilde optimize edilebilir. Ancak bu sistemlerde de, atık ürün sorunu vardır. Atık madde konsantrasyonunun sınırlandırılması besin maddesi akışını ayarlayarak gerçekleştirilir. Ayrıca, mikrotasiyıcı sistemlerde sürekli çalışmak, ortama proteolitik enzim (örneğin tripsin) ilavesi yapılmaksızın hücrelerin mikrotasiyıcı yüzeyinden ayrılması ve ortama yeni eklenen mikrotasiyıcılara yapışması mümkün olmayacağından zordur. Bu konuda araştırmalar devam etmektedir [90].

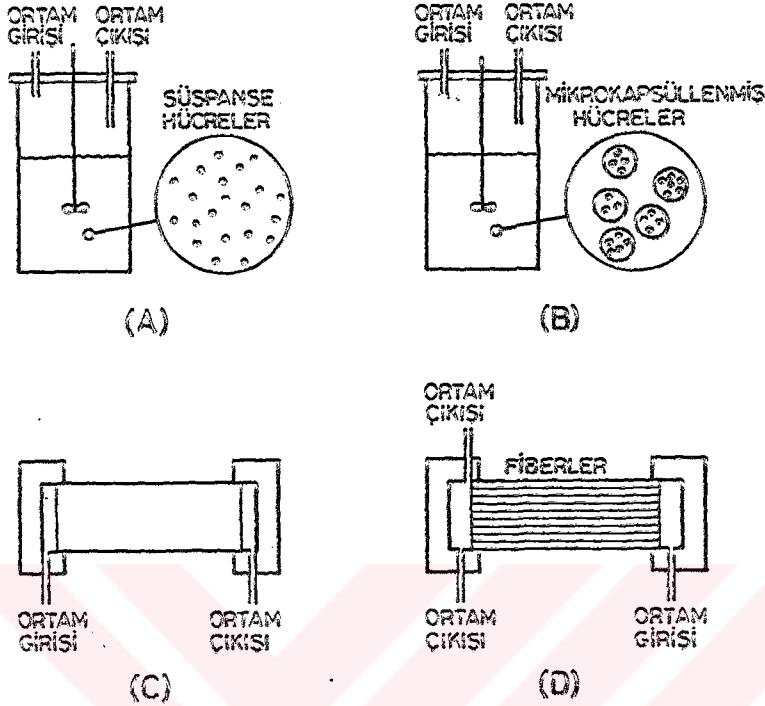
Perfüzyon sistemlerde, sistemin seyrelme hızı ayarlanarak besin maddesi ve atık ürün konsantrasyonları kontrol edilebilir. Seyrelme hızı artırılarak, besin maddesi miktarı artırılır ve atık ürün konsantrasyonu azaltılır. Fakat, perfüzyon sistemi de periyodik olarak yenilenen kesikli sistemle aynı dezavantajlara sahiptir. Çünkü, besin maddesinin reaktörden dışarı atılması, prosesi ekonomik yönden başarısızlığa uğratmaktadır.

Hücre kültürleri genellikle karıştırma reaktörlerde yürütülmesine rağmen, bu sistemler çeşitli dezavantajlara sahiptir. Süspansiyon hücre kültürlerinde, ortam yenilendiğinde, hücrelerin reaktörde alıkonması zordur. Bunun sonucu olarak da süspansiyon kültürde ulaşılabilecek maksimum hücre konsantrasyonu, dokuda elde edilen değerden 2 kat daha düşüktür. Bu durumun önlenmesi için "spinning filtre" geliştirilmiştir [91]. Fakat bu defa da filtrenin zamanla tıkanması sorunu ortaya çıkmaktadır. Mikrotasiyıcı kültürlerde, mikrotasiyıcı konsantrasyonunun artırılmasıyla, hücre konsantrasyonu da artırılmış olur. Fakat ortamdaki kangasadan dolayı hücreler kolaylıkla mikrotasiyıcı yüzeyinden ayrılırlar. Bu sorunların yanısıra kayma kuvvetlerine karşı duyarlılık da önemli bir sorun olarak çözüm beklemektedir.

Bu sorunların giderilmesi için 3 değişik tür biyoreaktör tasarlanmıştır.

- Hollow-fiber reaktörler
- Seramik matrisler
- Mikrokapsüller

Sekil 2.7'de biyoreaktörler sematik olarak gösterilmiştir.



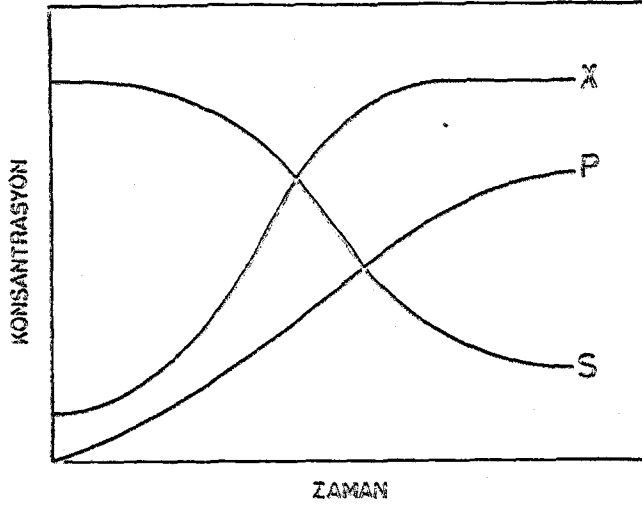
Sekil 2.7. Hücre Kültürlerinde Kullanılan Biyoreaktörler.

- A) Karıştırma Kap; B) Mikrokapsülasyon Tankı;
C) Seramik Matriks; D) Hollow-Fiber

Hollow-fiber reaktörlerin hücre kültüründe kullanımı, 1970'lerin başında gerçekleşmiştir [92]. Besin maddeleri ve atıklar, kapiler örgüden difüze oldukları için hücre kaybı olmaksızın yüksek hücre konsantrasyonlarına ulaşılır. Hollow - fiber sistemler, hem süspanse, hem de yüzeye bağımlı hücreler için kullanılır. Sistemin son uygulaması monoklonal antideği üretimidir.

Son yıllarda, yüzeye bağımlı hücrelerin üretimi için, "KC Biological ve Corning" [93] araştırmacıları tarafından tanımlanan "seramik matriks" sistem, yeni bir monolitik destek içermektedir. Bu destek materyali, seramik olup, kare kesitli kanallar içermekte, dolayısıyla yüksek alan/hacim değeri sağlamaktadır. Mikrotasıyıcı sistemlerle ulaşılan kapasitelere ulaşılabilmesi için seramik matrislerde reaktörün çok fazla büyütilmesinin gerekmesi önemli bir dezavantajdır.

Mikrokapsülenenmiş sistemler Bölüm 2.1.2'de açıklanmıştır.



Sekil 2.8. Kesikli Reaktörde İdeal Üreme Kinetiği.

2.1.5. Hücre Kültür Reaktörlerinde Üreme Kinetiği

Biyokimyasal prosesler, sürekli ya da kesikli karırtırmalı reaktörlerde gerçekleştirilir. Hücre kültür çalışmalarının yürüldüğü biyoreaktörlerin pek çoğu kesikli türden olup, reaktör içerisindeki hücre konsantrasyonu zamanla artar. Böyle bir reaktörde ideal üreme kinetiği Sekil 2.8'de grafiksel olarak ifade edilmiştir.

Hücre üremesi, besin maddesi harcanma ve ürün oluşum kinetikleri, sırasıyla aşağıdaki eşitliklerle verilmektedir.

$$dx / dt = \mu X \quad (2.1)$$

$$dS_i / dt = - \mu X / y_i - m_i X \quad (2.2)$$

$$dp_j / dt = q_j X \quad (2.3)$$

Yukarıdaki denliklerde X , S_i ve P_j sırasıyla hücre, besin maddesi ve ürün konsantrasyonlarıdır. μ özgül üreme hızı, y_i , i substratına bağımlı hücre verimi (oluşan g hücre kütlesi veya hücre sayısı/ g harcanan i substratı), q_j ise, j ürününün özgül üretim değeridir (g ürün/hücre-saat). Eşitlik (2.2.)deki m_i , Pirt tarafından "yasam faktörü" olarak tanımlanmıştır [94]. İleri sürülen görüşe göre, hücreler tarafından

harcanan substrat iki kategoriye ayrılır, ilk kısım hücre üremesi için kullanılırken, ikincisi hücrelerin yaşamlarını sürdürmeleri amacıyla harcanır. Başka bir ifadeyle, m_1 terimi, harcanan substratın doğrudan hücre üremesinde kullanılmayan kısmını ifade etmek amacıyla denkleğe ilave edilmiştir.

Mikrobiyal Hücre Üreme Kinetiği

Mikrobiyal hücre kültürü söz konusu olduğunda hücre üremesi, üremenin ortamdaki tek bir substrat konsantrasyonuyla sınırlı olduğunu varsayan Monod modeliyle ifade edilir [95]. Bu modelde özgül üreme hızı aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$\mu = \mu_{\max} S / (K_s + S) \quad (2.4)$$

Bu eşitlikte: $\mu_{\max}$: Maksimum özgül üreme hızı ; K_s : Michaelis-Menten sabiti; S : Sınırlayıcı substrat konsantrasyonudur.

$(1/\mu)$ ya karşı $(1/S)$ grafiğinde, eğim $K_s/\mu_{\max}$, y eksenini kesim noktası ise $1/\mu_{\max}$ 'dir. Bu model, üremeyi sınırlayan substratın bulunduğu durumlarda, kesikli ve sürekli kültürlerde hücre üremesini son derece iyi bir şekilde ifade eder..

Bailly ve Ollis [96] tarafından açıklandığı gibi, kesikli kültürde hücre üreme hızı, hücre konsantrasyonundaki artışın yalnızca hücre konsantrasyonunun fonksiyonu olduğu varsayımıyla, en basit olarak aşağıdaki bağıntıyla verilir.

$$dx / dt = f(x) \quad (2.5)$$

Eşitlik (2.5.)'de verilen genel forma ait en basit model Malthus kanunu olarak bilinir ve aşağıdaki şekilde ifade edilir.

$$f(x) = \mu x \quad (2.6)$$

Burada μ , bir sabittir.

Bu yaklaşım, üremede düşüşün başladığı gerileme bölgesini içermez. 1844'de Verlhurst ve Pearl, 1920'de Reed, üreme için inhibisyon faktörünü de içeren bir teori önermişlerdir. Bu durumda kesikli fermentördeki hücre konsantrasyonunun değişimi

$$dX / dt = k X (1 - \beta X) \quad (2.7)$$

şeklinde ifade edilmiştir.

Esitlik (2.7.), Weiss, Ollis ve Klimek tarafından [97, 98]

$$dX / dt = \mu X [1 - (X / X_{max})] \quad (2.8)$$

formuna dönüştürülmüştür. Lojistik esitlik olarak bilinen Esitlik 2.8'de ; μ : Başlangıç özgül üreme hızı; X_{max} : Başlangıç koşullarında ulaşılacak maksimum hücre konsantrasyonudur.

2.7 numaralı esitlik, substratın üremede neden olduğu inhibisyon gözönüne alınarak modifiye edilmiştir. Mikrobiyal hücrelerin kesikli üremesi sırasında, hücre konsantrasyonu artarken, substrat konsantrasyonu ve substrat inhibisyonu azalır. Böylece, hücre üreme hızı, Esitlik 2.8'deki x değerinden "m" mertebesi kadar artar. Bu durum gözönüne alındığında lojistik denklik aşağıdaki şekilde yazılabilir.

$$dX / dt = \mu X^m [1 - (X / X_{max})] \quad (2.9)$$

Esitlik 2.9 yeniden düzenlenirse:

$$\ln \left[\frac{1}{(1 - X / X_{max})} \cdot \frac{dX}{dt} \right] = m \ln X + \ln \mu \quad (2.10)$$

dX/dt türevi, deneysel verilerden faydalanarak nümerik olarak çözümlenir. Esitlik 2.10'deki $\ln \left[\frac{dX}{(1 - X / X_{max}) dt} \right]$, $\ln X$ 'e karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrunun ordinatı kesim noktası $\ln \mu$ 'ı verir, eğimden de m bulunur.

Modifiye edilmiş lojistik denklik, hücre konsantrasyonunun yalnızca zamanın fonksiyonu olduğunu ifade eder. Diğer bir zamana bağlı degiskene, örneğin, substrat konsantrasyonuna bağımlı değildir. X_{max} , m ve μ bilindiğinde herhangi bir t zamanı için hücre konsantrasyonu bulunabilir.

2.2. SAP HASTALIĞI VE ASISI

Sap hastalığı, çift tırnaklı evcil ve yabani hayvanlarda salgınlar şeklinde görülen, ateşli, akut ve çok bulaşıcı bir hastalık olarak uzun yıllardır bilinmektedir. Avrupa'da 1514 yılında görüldüğü kaydedilmiş, hastalık hakkında ilk bilgi 1546 yılında verilmiştir. Hastalığın yaygın olarak görüldüğü ülkelerden biri olan Türkiye'de de 3-5 yıllık aralıklarla tekrarlanan salgınlar ekonomik açıdan büyük zararlara neden olmaktadır [99].

2.2.1. Sap Virüsü ve Özellikleri

Hastalık etkeni, Löffler ve Frosch tarafından, üreme kabiliyeti olan, adi besi ortamlarında üremeyen ve filtrelerden geçebilen bir virüs olarak saptanmıştır [100]. Etken olarak bilinen en küçük virüslerden olup (7-22 μ), Picarno virüs grubuna dahil edilmiştir. Elektronmikroskopta kok benzeri, ovalimsi şekillerde ve toplu haldе zincir, halka şeklinde veya kümelenmiş olarak görülür [101]. Kimyasal yapı bakımından ortada Ribonükleik Asit (RNA) ve çevresindeki protein yapısında kapsid'den oluşmaktadır. Silindirik yapıdaki kapsidinde 42 kapsomeri bulunup, çevre membranı yoktur. Virüs bir nükleoprotein olup, glüsit ve lipid içermez. Bu nedenle kloroform, eter, aseton ve alkolle karşı dayanıklıdır. Virüs % 31 RNA, % 69 protein içeriğine sahiptir. RNA, sadece enfektiftir, protein ise antijenik ve immunojeniktir. RNA, % 24 Guanin, % 26 Adenin, % 28 Sitosin ve % 22 Ürasil olmak üzere 4 çeşit bazdan oluşmuştur.

Virüsün canlı organizma dışında uzun zaman yaşayabilmesi için bir hücre veya doku içerisinde olması gerekir. Hücre dışında kısa sürede ölür. Güneş ışınlarına ve ısıya dayanıksızdır. Sap virusu, pH:7.0-7.7'de kararlıdır. Virüs inaktivasyonu pH:6.8'de başlar ve pH:6.0'da tam olarak inaktive olur. Bazik ortamlarda pH:10-12'de enfektif özelliğini kaybeder. Virüs, formol, asetik etilenimin, beta propiolakton, gliseraldehit gibi kimyasal maddelerle ve ultraviyole ile inaktive edilebilir. Sap virüsünün karakteristik fiziksel özelliklerinden biri de ultraviyole ışınları absorplamasıdır.

Sap virusunun molekül ağırlığı 8.6×10^6 dalton, yoğunluğu ise 1.43 g/cm^3 olarak saptanmıştır. Proteinin molekül ağırlığı 6×10^6 dalton, RNA'nın 2.6×10^6 daltondur. Virüs proteini 4 çeşit alt protein yapısına sahiptir. Bunlar, molekül ağırlıklarına göre şöyle sıralanabilir.

Çizelge 2.10. Sap Virüs Tipleri.

Virüsün Tipi	Yılı	İzole Edildiği Yer	İzole Eden	Alt Tip Sayısı
O	1922	Fransa, L'Oise	H. Valie ve Care	11
A	1922	Fransa, Ardennes	H. Valie ve Care	30
C	1926	Almanya	Waldman ve Trautwein	5
SAT.1	1950	Güney Afrika	Brooksby ve Galloway	7
SAT.2	1951	Güney Afrika	Brooksby ve Galloway	3
SAT.3	1951	Rodezya	Brooksby ve Galloway	4
ASIA 1	1954	Pakistan	Brooksby ve Galloway	3

VP₁: 34.000 Dalton

VP₂: 30.000 Dalton

VP₃: 26.000 Dalton

VP₄: 13.000 Dalton

Bunlardan VP₄ en içte RNA'ya yapışık olarak bulunur VP₁ en dışta virüsü çevrelemektedir. Bu dört proteinden sadece VP₁ immünojenik karaktere sahiptir, enzimlere duyarlı olup immünite için gereklidir. Sap virüsü enfekte organizmada çeşitli antikorlar oluşturur, bunlardan en önemlileri, nötralizan, komplemanı tutan ve köktürücü antikorlardır.

2.2.2. Sap Virüs Tipleri

Fransa'da 1920 yılında çıkan sap salgınlarında kullanılan sığır serumlarının bazı bölgelerde etkisiz kaldığı görüldükçe, çeşitli sap virüsü tiplerinin varlığı ileri sürülmüştür. Bulunan virüslerin tipleri, yılı, izole edildiği yer, kimin tarafından izole edildiği ve alt tiplerinin sayısı Çizelge 2.10'da verilmiştir.

2.2.3. Sap Asısı

Değişik tip ve alt tipleri bulunan sap hastalığıyla mücadele amacıyla ülkeler ekonomik durumlarına göre kesim, asılama ve kesim, asılama ve karantina gibi çeşitli yöntemler uygulamaktadırlar. Bunlar arasında hayvanlarda aktif bağışıklık mekanizması oluşturan asılama yöntemi en yaygın olarak kullanılmaktadır. Söz konusu yöntem sap virüsünün

antijenik olduğu ve bağışıklık verdiğinin saptanması ile aktif bağışıklık yöntemi olarak uygulanmaya başlanmıştır. İlk etkili inaktif aşı Schmidt, Waidmann ve Koebe tarafından geliştirilmiş ve aşıya "Waidmann-Schmidt" aşısı adı verilmiştir [102].

Sap aşısı hazırlanmasında en önemli nokta, immünojenik, serolojik ve biyolojik olarak aşı üretimine elverişli virüs susunun seçimidir. Sonraki aşamada ise seçilen bu sus uygun virüs üretim yöntemine adapte edilir. Virüs üretimi amacıyla kullanılan çok sayıda yöntem mevcut olup, sığır dili epiteli ya da diğer adıyla Frenkel yöntemi, birincil böbrek hücre kültürü yöntemi, BHK tek tabaka ve BHK süspansiyon hücre kültür yöntemleri, bunlar arasında en yaygın olarak kullanılanlardır [103].

"Baby Hamster Kidney" (BHK) hücre kültür yöntemi, virüs üretiminde kullanılan en yeni ve gelişmiş yöntemdir. Burada, birincil hücre kültürleri ve Frenkel kültürlerinde karşılaşılan güçlük ve sınırlamalar ortadan kaldırılmış ve üretim standartlaştırılmıştır.

BHK hücre susu 1962 yılında Macpherson ve Stoker tarafından 1 günlük yavru hamster böbrek kültüründen izole edilmiş ve BHK-21 serisi olarak tanımlanmıştır [104]. Bu hücrelerin birbirine paralel olarak üreyebilen fibroblast benzeri görünümde, tek tabaka kültürlerde ortalama ikilenme sürelerinin 12 saat ve karyotiplerinin $\times 55$, $2n=44$ olduğu bildirilmiştir [105]. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda bu hücrelerin sap virüsüne duyarlı oldukları bildirilmiş [106] ve virüs üretiminde kullanılmaya başlanılmışlardır.

Hücreye virüs adaptasyonu son derece kolaydır. Virüs ekimi yapılan kültürlerde hücreler enfekte olup döküldüklerinde virüs toplanır, bu zamanda virüs en yüksek enfektiviteye ve antijeniteye sahip olup, aşı hazırlamasında kullanılır.

2.3. SÜSPANSİYON POLİMERİZASYONU

Küresel polimerik partiküller, endüstriyel uygulamalarda giderek artan bir öneme sahiptir. 5-200 μ boyutundaki polimerik mikropartiküllerin en yaygın kullanımlarından biri, düşük ya da yüksek molekül ağırlıklı çözünmüş maddelerin kromatografik olarak ayrılmasıdır [107]. Söz konusu partiküllerin diğer uygulamaları arasında, kolonlarda dolgu maddesi olarak kullanım, biyomühendislik alanında protein ve lipid

adsorpsiyonu, enzim immobilizasyonu, farmakolojide ilaç salımı ve son olarak da reaksiyonlarda katalizör olarak kullanımları sayılabilir [108-110].

5-500 μ boyut aralığındaki polimerik mikropartiküller, genellikle, "süspansiyon polimerizasyonu" prosesiyle, daha küçük boyutdakiler ise "emülsiyon polimerizasyonu" ile hazırlanırlar. İki yöntem mekanizma olarak birbirinden tamamen farklıdır.

Süspansiyon polimerizasyon fikri ilk olarak 1910 yılında ortaya atılmış olup, ticari ölçekte hazırlanan ilk polimer, polivinilkloroasetat'dır. Günümüzde proses, akrilik ve metakrilik asitler, stiren ve kopolimeri, vinil asetat, vinil klorür, vinildiklorür, tetra-floroetilen, klorotrifloroetilen ve daha birçok doymamış monomerin polimerizasyonunda kullanılmaktadır.

2.3.1. Süspansiyon Polimerizasyonunun Özellikleri

Süspansiyon polimerizasyonu, inci veya tane polimerizasyonu olarak da bilinir. Prosesde, monomer uygun bir dağıtma ortamında, ki bu genellikle sudur, süspansiyon haline getirilir. Başlatıcı, suda dağılmış halde bulunan monomer damlacıklarının içinde çözünmüştür. Ortam sürekli karıştırılarak, monomer süspansiyonunun devamlılığı sağlanır. Dağıtma ortamında çözünen süspansiyon stabilizörleri ve emülsifiye edicilerle süspansiyonun kararlılığı desteklenir. Sisteme uygulanan ısıtma programı ile monomer damlacıkların küresel polimer tanecikleri haline dönüşmesi sağlanır. Bu prosesde sistem parametrelerinin ayarlanmasıyla, 5 μ 'dan 10 mm'ye kadar istenilen boyda polimer taneciklerin eldesi mümkün olmaktadır.

Süspansiyon polimerizasyonu aslında, uygun bir ortam içinde yürütülen yığın polimerizasyonudur. Her monomer damlacığı yeterli başlatıcı içerir ve ısıtılınca diğerlerinden bağımsız olarak polimerleşir. Reaksiyon hızı, yığın polimerizasyondan daha yüksektir. Sonlanma ve zincir transferi yavaş olduğundan, daha büyük molekül ağırlıklarına ulaşılır. Yığın prosese göre bu prosesin en önemli avantajı, düşük ortam viskozitesi ve iyi karıştırma nedeniyle sıcaklık kontrolünün mükemmel olmasıdır. Yığın polimerizasyonuna göre dezavantajları ise, sürekli karıştırma gerektirmesi ve süzme, yıkama, kurutma gibi fabrikasyonu daha karmaşık ve pahalı hale getiren yardımcı işlemler içermesidir. Ayrıca, ürün yüzeyine adsorbe olan stabilizörler ve diğer katkı maddeleri ürünün kirlenmesine neden olmaktadır.

Süspansiyon proseslerinin, emülsiyon proseslerine göre önemli avantajlarından biri, bu yöntemde ürün tanecek boyunun çok daha kolay ayarlanabilmesi ve istenilen boy ve boy dağılım aralığında ürün elde edilebilmesidir. Ayrıca, katkı maddelerinin neden olduğu kirlenme, emülsiyon polimerizasyonuna göre daha azdır ve ürün bağılı olarak daha ucuz ve basit ayırma ve saflaştırma işlemlerinden sonra piyasaya sunulabilmektedir.

Süspansiyon polimerizasyonunda oluşan partiküllerin özellikleri iki parametreye bağlıdır; karıştırma özellikleri ve süspansiyonun arayüzey gerilimi. Süspansiyon prosesinde birleşme ve yığılmayı önlemek için yeterli karıştırma hız ve düzeni sağlanmalıdır. Karıştırma hız ve düzeni aynı zamanda partikül boy ve boy dağılımını da belirler. Ayrıca, iyi karıştırma ile iyi sıcaklık kontrolü yapılabilir ve böylece ürünün molekül ağırlığı da daha iyi ayarlanabilir. Süspansiyon polimerizasyonunda ayarlanması gerekli diğer bir parametre de monomer/su oranıdır. Ortam viskozitesinin artmasını, dolayısıyla sıcaklık kontrolünün zorlaşmasını önlemek amacıyla monomer/su oranı 1/4-1/1 arasında olmalıdır. Reaksiyon ilerledikçe, organik faz viskozitesinin değişmesine bağlı olarak arayüzey gerilimi değişir ve bu durum partikül boy ve boy dağılımını önemli ölçüde etkiler.

Günümüzde, süspansiyon polimerizasyonu konusundaki çalışmalar, dar boy dağılım aralığına sahip partiküllerin elde edilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Partikül boyunu etkileyen parametrelerden bazıları (örneğin, reaktör geometrisi, karıştırıcı türü, karıştırma hızı, süspansiyon stabilizörlerinin yapısı ve konsantrasyonu, su ve organik fazların bağıli miktarları) kontrol edilebilir olmasına karşılık, diğerleri (örneğin, monomer ve su fazlarının yoğunlukları, viskoziteleri) kontrol edilemezler. Bu nedenle, dar boy dağılım aralığında partikül eldesi, süspansiyon polimerizasyon reaktörü tasarımının son derece mükemmel olmasını gerektirir.

2.3.2. Hidrofilik Monomerlerin Süspansiyon Polimerizasyonu

Hidrofobik monomerler için süspansiyon polimerizasyonu çok iyi anlaşılmış ve geliştirilmiş olmasına rağmen, hidrofilik monomerler için aynı durum geçerli değildir. Bu durumun başlıca nedeni, hidrofilik monomerlerin su ortamında süspansiyon haline getirilmesindeki zorluklardır. Genellikle, bu tür monomerler için organik süspansiyon ortamı kullanılır. Fakat bu kez de, elde edilen ürünlerdeki safsızlıkların fazlalığı, istenmeyen bir durum olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle biyotıp uygulamaları ve iyon-değiştiriciler için yüksek saflıkta polimerik mikropartiküller istenmektedir.

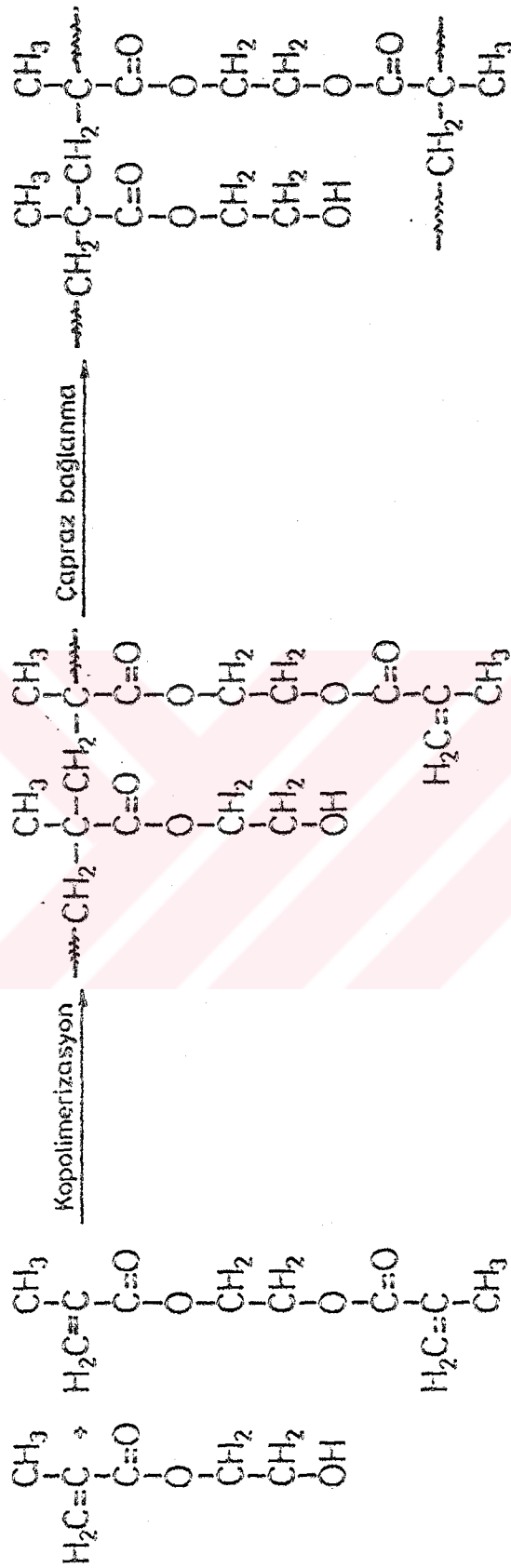
Sen yıllarda, Mueller, Horak ve Peppas tarafından üç yeni polimerizasyon tekniği geliştirilmiştir olup, 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomerinin polimerizasyonunda kullanılmıştır [111-113].

2.3.3. PHEMA ve Süspansiyon Polimerizasyonu

PHEMA, 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomerinin, uygun başlatıcılar (azobisisobisisobütironitril, amonyum persulfat, redoks çiftleri, vb. gibi) kullanılarak polimerleştirilmesi ile elde edilmektedir. Yapısındaki hidroksil grubu nedeniyle, hidrofilik bir polimer olan PHEMA, yığın, süspansiyon ve emülsiyon polimerizasyon süreçleri ile üretilmektedir.

PHEMA ilk defa 1936 yılında Dupond araştırmacıları tarafından üretilmiştir. Ancak HEMA monomeri yeterli kadar sarılaşmadığı için sonuç ürün capraz bağlı, termoset yapıda olmuştur. Biyolojik amacı PHEMA, 1960'lı yıllarda Lim ve Wichterle tarafından sentezlenmiştir [114] ve ilk uygulaması yumuşak kontakt lens yapımıdır. Daha sonraki yıllarda, yüksek biyokompatibilitesi nedeniyle PHEMA jellerin biyolojik uygulamaları ile ilgili örnekler hızla artarak, günümüzdeki boyutlara ulaşmıştır. Capraz bağlı PHEMA mikropartiküller, özellikle, biyotıp ve farmakoloji alanlarında yaygın bir kullanıma sahiptir. Bu mikropartiküller, HEMA monomerinin az miktarda capraz bağlayıcı ajanla (EGDMA veya TEGDMA) kopolimerizasyon/capraz bağlanma reaksiyonu sonucu hazırlanmaktadır. Reaksiyon, Şekil 2.9'da gösterilmiştir. Kopolimerizasyon reaksiyonunda, pendan metakril gruplarıyla lineer polimer zincirleri oluşmakta ve bu gruplar diğer üreyen (canlı) zincirlerle etkileşerek, yüksek derecede dallanmış, capraz bağlı polimer zincirleri meydana getirmektedir.

Çok yakın bir zamana kadar, hidrofilik HEMA monomerini süspansiyon durumuna getirebilecek uygun bir ajanın bulunamayışı nedeniyle capraz bağlı PHEMA mikropartiküllerin üretimi gerçekleştirilememiştir. Mueller [111], Horak [112] ve Peppas [113] tarafından yürütülen çalışmalarla 3 yeni teknik geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde, dağıtma ortamı olarak $Mg(OH)_2$ çözeltisi ve alkol karışımları (dodekanol ve sikloheksanol) kullanılmış ve 10-800 μ boyut aralığında partiküller elde edilmiştir.

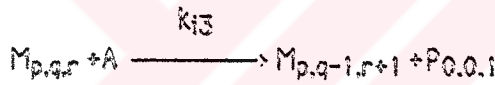
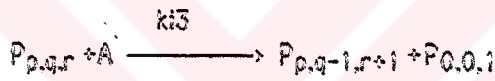
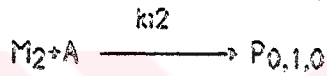
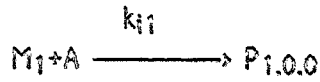
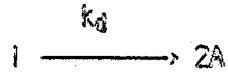


Şekil 2. 9. NEMA-EGDMA Kopolimerizasyon/Çapraz Bağlanma Reaksiyonu.

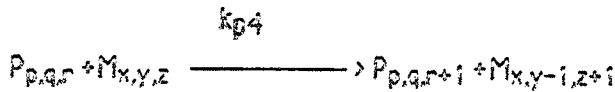
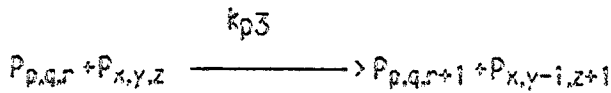
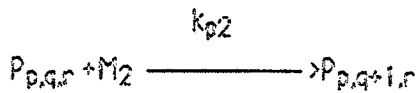
Kinetik mekanizma aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır.

- Başlama
- Üreme ve çapraz bağlanma
- Sonlanma

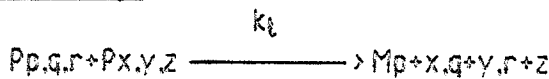
Başlama basamağı:



Üreme ve çapraz bağlanma basamağı:



Sonlanma basamağı:



Yukarıdaki denkliliklerde; I: Başlatıcı; M₁: HEMA monomeri; M₂: EGDMA monomeri; A: Oluşan radikal; P_{p,q,r} : Canlı polimer zinciri; M_{p,q,r} : Ölü polimer zinciri'dir. p, q, r alt indisleri ise sırasıyla zincirdeki monometakril birimleri, pendant metakril grupları ve zincirdeki çapraz bağları simgelemektedir.

2.4. PLAZMA POLİMERİZASYONU

2.4.1. Tanım

"Plazma" terimi, iyonlaşmış gaz halini ifade eder. İyonlaşmış durumdaki gaz, pozitif yüklü molekül veya atomlar (iyonlar) ve negatif yüklü elektronları içerir. Bazı organik bileşiklerin çeşitli türde "yük boşalımıyla" oluşturulan plazma ortamında polimerleştikleri uzun süreden beri bilinmektedir [115]. Fakat, bu polimerizasyon tekniğinin çeşitli yüzeyler üzerinde özel bir tür kaplama oluşturmak üzere kullanımı ancak 1960'lı yıllarda gerçekleşmiştir [116]. Bu tür kaplamanın ince kaplama oluşu, yüzeye iyi tutunması, kimyasal inertliği ve düşük dielektrik sabitine sahip olması gibi avantajları anlaşıldıktan sonra kullanımı yaygınlaşmıştır.

Organik veya organometalik bileşiklerin plazma ortamındaki polimerizasyonu, klasik polimerizasyon reaksiyonlarından çok farklıdır. Tüm klasik polimerizasyonların oluşabilmesi için vinil çift bağı veya fonksiyonel grupların bulunması koşulu olmasına rağmen, plazma polimerizasyonu için böyle bir sınırlama söz konusu değildir. Hemen tüm organik bileşikler plazmayla polimerleşeceği gibi, diğer klasik monomerler, örneğin vinil monomerleri ve bunların doymuş bileşikleri de, plazmada aynı ya da daha yüksek hızla polimerleşirler. Plazma polimerizasyonu ile oluşan polimerler, genellikle yüksek derecede dallanmış ve çapraz bağı yapıda olup, katı yüzeye yapışırlar. Bununla birlikte, reaksiyon koşullarına bağlı olarak çözünabilen yapıda polimerler de elde edilebilir. Oluşan bu polimerler yapı olarak diğer yöntemlerle elde edilenlerden çok farklıdır, başka bir deyişle, aynı monomerler kullanıldığında farklı polimerik yapılar elde edilir. Bu nedenle, plazma polimerizasyonu, polimerlerin özel şekillerinin hazırlanması amacıyla kullanılır.

Plazma polimerizasyonu, "graft polimerizasyonun" özel bir türü olarak da düşünülebilir. Bu düşünce, plazma polimerizasyonunu, yüzeyin tamamen yeni bir polimerik materyalle kaplandığı ve polimerin substrat yapısına nüfuz etmediği bir yüzey graft yöntemi olarak tanımlar. Graft polimerizasyonunda, işlemin etkinliği, yüzey-monomer uyumuna bağlı olduğundan, her monomer, her yüzeyde graft oluşturamaz. Plazma polimerizasyonu ise yüzeye bağlı değildir. Polimer, substratın cam, polimer ya da metal olmasına bakmaksızın her yüzeyde benzer biçimde birikir.

2.4.2. Plazma Polimerizasyonunun Mekanizması

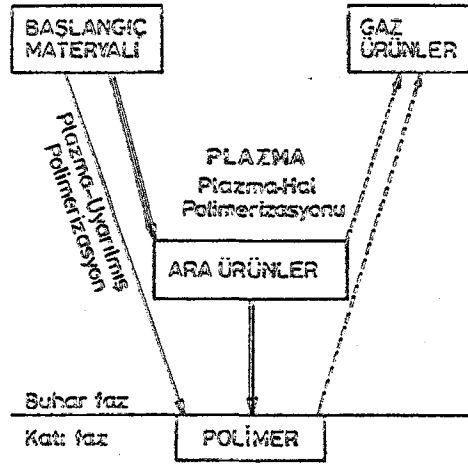
Organik ve organometalik bileşiklerin plazma polimerizasyon mekanizması çok karmaşıktır ve "serbest radikal mekanizması" şeklinde yürür. Bir organik molekülden serbest radikalın oluşum basamağı henüz tam olarak açıklanamamıştır. İleri sürülen görüşe göre, elektriksel yük boşalımı sonucunda, serbest elektronlar oluşturulan elektriksel alandan enerji kazanırlar ve nötral gaz molekülleriyle çarpışarak enerjilerini kaybederler. Enerjinin moleküllere transferi, serbest radikaller, atomlar ve iyonları içeren yeni oluşumlara götürür. Serbest radikal oluşumunu takiben polimerizasyon, radyasyon polimerizasyonuna benzer şekilde gerçekleşir. Ancak, plazma polimerizasyonu buhar fazdaki monomerle, radyasyon polimerizasyonu ise kondense fazdaki reaksiyonla ilgilendiğinden, iki polimerizasyonu doğrudan karşılaştırmak mümkün değildir. İki polimerizasyon arasındaki en önemli fark, polimerizasyonun başlama hızı ve prosesin doz hızıdır. Plazmadaki serbest radikal konsantrasyonu, radyasyon polimerizasyonuna göre çok yüksektir. Westwood, plazma polimerizasyonundaki doz hızının, radyasyondan 10^6 kat daha fazla olduğunu göstermiştir [117]. Sonuç olarak, plazma polimerizasyonu, çok yüksek doz hızında gerçekleşen radyasyon polimerizasyonu olarak düşünülebilir.

Plazma polimerizasyonunda çok yüksek doz hızı nedeniyle, serbest radikallerin konsantrasyonu artar ve bu serbest radikallerin birleşmesi, yani "sonlanma" basamağı en etkindir. Oysa ki, klasik polimerizasyon mekanizmalarında, polimer oluşumundaki en önemli basamak, reaktif çift bağlara katılmanın gerçekleştiği "üreme" basamağıdır. Serbest radikallerin birleşmesiyle oluşan oligomerlerin sürekli olarak başlangıç basamağını tekrarlamalarıyla yüksek molekül ağırlıklı yapılar elde edilir.

Plazma polimerizasyon mekanizmasını iki grupta incelemek gerekir.

- Plazma-uyarılmış polimerizasyon
- Plazma-hal polimerizasyonu

Moleküler türdeki polimerizasyon plazma-uyarılmış, atomik proses şeklinde gerçekleşen ise plazma-hal polimerizasyonu olarak adlandırılır. İki polimerizasyon arasındaki en önemli fark, plazma-hal polimerizasyonunda, polimer yapısına girmeyen gaz-faz ürünlerin oluşmasıdır. Bu durum, plazma-hal polimerizasyonu oluşurken, plazma fazındaki bileşenlerin değişimine neden olur. Sonuç olarak, gaz-plazma ürünleri, sistem için önemli bir faktör olarak belirir.

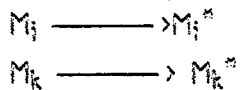


Sekil 2.10. Plazma Polimerizasyon Mekanizması.

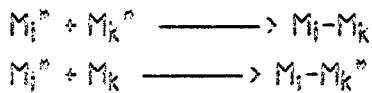
Plazma polimerizasyonu her iki polimerizasyonun toplamı şeklinde oluşur. Yalnızca başlangıç materyalinin kimyasal yapısı değil, reaksiyon koşullarına da bağlı olarak bu iki mekanizmadan biri daha baskın olarak ortaya çıkar. Sekil 2.10'da her iki mekanizma sematik olarak ifade edilmiştir.

Plazma-hal polimerizasyonu aşağıdaki mekanizmayla gerçekleşir.

Başlangıç ve tekrar başlama:



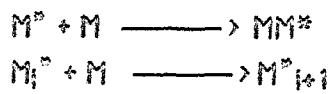
Üreme ve sonlanma:



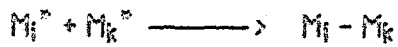
Burada; i ve k: Tekrarlanan birimler ; $M^{\bullet}$: Reaktif maddeleri içerir, ki bunlar iyon, molekül veya $M^{\bullet}$ 'den oluşan serbest radikallerdir. M : Orijinal materyalden ayrılan atom veya parçalarıdır.

Polimer, yukarıda tanımlanan basamakların tekrarlanmasıyla oluşur. Plazma-uyarımış polimerizasyon ise, zincir üreme mekanizması olarak aşağıdaki şekilde ifade edilir.

Üreme:



Seçilenme:



Plazma-uyarımış polimerizasyon, polimerleşen yapı üzerinden yürüdüğü için gaz-faz ürünleri oluşmaz.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

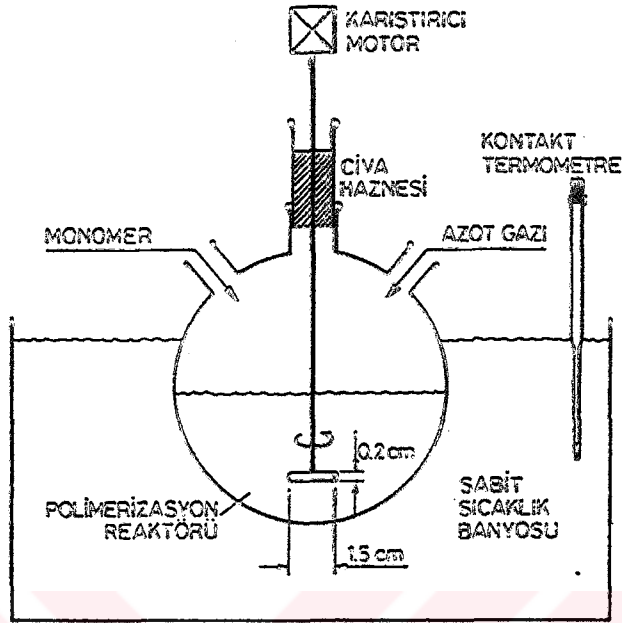
Araştırma kapsamında yapılan deneysel çalışmaları aşağıda verilen dört ana grup altında incelemek mümkündür.

- Mikrotasiyıcıların Hazırlanması
- Mikrotasiyıcı Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini
- Hücre Kültür Çalışmaları
- Sap Virüsü Üretimi

3.1. MİKROTASİYİCİLERİN HAZIRLANMASI

3.1.1. PHEMA Mikrotasiyıcılar

Yapılan çalışmada PHEMA mikrotasiyıcılar, 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomerinin, etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) monomeri ile çapraz bağlanma / kopolimerizasyon reaksiyonu sonucu hazırlanmıştır. Bölüm 2.3.3'de ayrıntılı olarak açıklanan reaksiyon, süspansiyon ortamında yürütüldüğünden, bir süspansiyon polimerizasyon prosesidir. Bu çalışmada hidrofilik monomerlerin süspansiyon polimerizasyonu için Peppas tarafından geliştirilen teknik tarafımızdan modifiye edilerek kullanılmıştır. Polimerizasyon sistemi ve kontrol elemanları Şekil 3.1'de sematik olarak gösterilmiştir. Polimerizasyon reaktörü, 500 ml hacminde, pyrex camdan imal edilmiş, üç boyunlu, laboratuvar tipi bir balondur. Karıştırma işlemi, reaktör tabanından 1.5 cm yüksekliğe yerleştirilen bıçak tipi karıştırıcı taşıyan bir mekanik karıştırıcı (Heidolph, 50111, Batı Almanya) ile sağlanmıştır. Karıştırıcı, reaktörün ortadaki boyun kısmından sakulmuş ve bu kısımda sızdırmazlığın sağlanabilmesi için civa ile doldurulmuş cam bir hazne kullanılmıştır. Reaktördeki diğer iki boyunun birinden monomer beslemesi yapılırken, diğerinden de azot gazı gönderilmektedir. Bu kısımlar cam rodajlarla kapatılarak sızdırmazlık sağlanmıştır. Isıtma, sabit sıcaklık banyosuyla (Nüve, Termomix, Türkiye) yapılmıştır. Banyo sıcaklığı civalı kontakt termometre ve röleden oluşan bir sistemle kontrol edilmiştir.



Sekil 3.1. Süspansiyon Polimerizasyonu Deney Düzenegi.

Kullanılan Kimyasallar

HEMA mikrotasıyıcıların hazırlanmasında kullanılan temel monomer HEMA olup Sigma (Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Hidrofobik yapıdaki MMA (BDH, İngiltere) ve pozitif yük taşıyan monomer DMAEMA (Merck, Batı Almanya) komonomer olarak kullanılmıştır. EGDMA, Merck (Batı Almanya) firmasından temin edilmiş ve çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılmıştır. Polimerizasyon başlatıcısı 2,2'-Azobisisobutyronitril (AIBN, BDH, İngiltere)'dir. Dağıtma ortamının esas bileşeni olan magnezyum oksit (MgO) BDH (İngiltere) firmasından alınmıştır. Polimerizasyonda kullanılan monomerler ve kimyasal yapıları Çizge 3.1'de verilmiştir.

Deneysel Yöntem

HEMA monomerinin süspansiyon polimerizasyonu aşağıda verilen işlem sırası izlenerek gerçekleştirilmiştir.

- Monomer dağıtma ortamı olarak kullanılacak MgO çözeltisi hazırlanır. Bu işlem için, MgO'nun doygun çözeltisi polimerizasyon reaktöründe 1 saat boyunca, 70°C'de ve 500-600 devir/dakika (rpm) hızda karıştırılır.

Çizelge 3.1. Polimerizasyonda Kullanılan Monomerler.

Monomer	Kimyasal Yapı
HEMA (Hidroksietilmetakrilat)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 = \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{O} = \text{C} - \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$
MMA (Metilmetakrilat)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 = \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{COOCH}_3 \end{array}$
EGDMA (Etilenglikoldimetakrilat)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 = \text{C} - \text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OC} = \text{O} \\ \\ \text{CH}_2 = \text{C} - \text{CH}_3 \end{array}$
AIBN (Azobisisobutyronitril)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{N} = \text{N} - \text{C} - \text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{CN} \quad \quad \text{CN} \end{array}$
DMAEMA (Dimetilamincetilmetakrilat)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2 = \text{C} - \text{COOCH}_2\text{CH}_2 - \text{N} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$

• Uygun miktarda AIBN, HEMA monomeri içerisinde çözüldükten sonra, çapraz bağlayıcı, EGDMA ilave edilerek hazırlanan karışım reaktöre boşaltılır.

• Karıştırma hızı istenilen değere getirilir. Çalışmada 150-600 rpm aralığında üç değişik hızda çalışılmıştır.

• Polimerizasyon süresince uygun ısıtma programı uygulanır. Bu amaçla, ilk üç saat 70°C'da sonraki bir saatte ise 90°C'da çalışılmıştır.

• Reaksiyon süresi sonunda polimerizasyon ortamı karıştırılarak soğutulur.

• Ortama % 37'lik HCl çözeltisi ilave edilerek kalan MgO'ın çözünmesi sağlanır.

• Polimerizasyon sonucu oluşan partiküller filtrasyonla ortamdan ayrılır, sırasıyla destile su ve etanol ile yıkandıktan sonra 1 gün süreyle oda sıcaklığında ve daha sonra 40°C'da ve 150 mm Hg basınçlı vakum desikatöründe (Nüve, EY 018, Türkiye) üç gün süreyle kurutulur.

$\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$	ETİLENDİAMİN (EDA)
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$	ALİLAMİN (ALAM)
$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$	TRİETİLAMİN (TEA)

Şekil 3. 2. PS Partiküllerin Yüzey Modifikasyonunda Kullanılan Monomerler.

Polimerizasyon azot atmosferinde gerçekleştirilmiş ve karıştırma hızının yarısına, başlatıcı konsantrasyonu, sıcaklık ve değişik sisme özelliklerine sahip PHEMA partiküllerin elde edilmesi için çapraz bağlayıcı, EGDMA, miktarı da değiştirilmiştir. Partiküllerin yüzey ve yığın yapıları, polimerizasyon karışımına değişik oranlarda ilave edilen MMA ve DMAEMA monomerleriyle düzenlenerek, hücre kültür çalışmaları için uygun duruma getirilmiştir.

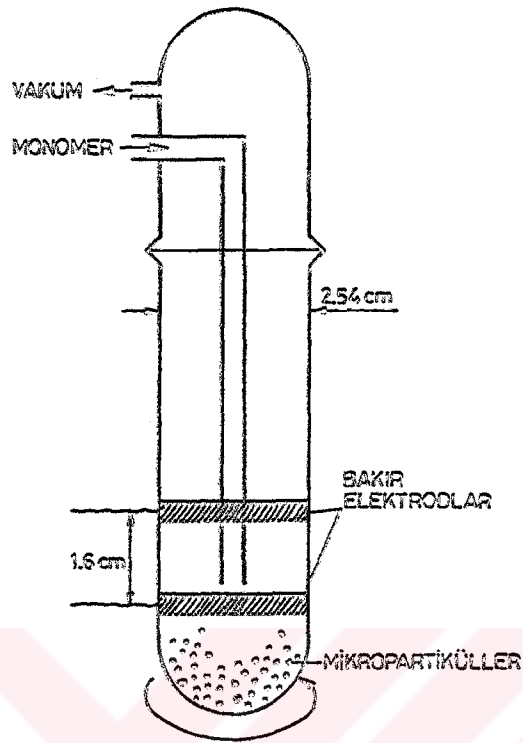
3.1.2. Polistiren Mikrotasarıyıcılar

Sunulan araştırmanın hücre kültür çalışmalarında test edilen ikinci tür mikrotasarıyıcı, BioRad (BioRad Laboratories Inc., ABD) firması tarafından üretilen polistiren (PS) bazlı partiküllerin yüzey modifikasyonu ile hazırlanmıştır. Sözü edilen partiküller 37-74 µm çapında, küresel ve 2-divinilbenzen (DVB) ile çapraz bağlanmış bir yapıda olup "Biobeads SX2" ticari adıyla piyasada mevcuttur. BioRad firmasından temin edilen partiküllerin yüzey özelliklerinin modifikasyonunda Piskin ve arkadaşları tarafından önerilen yeni bir yöntem uygulanmıştır [115]. Yöntemin ayrıntıları aşağıda açıklanmıştır.

3.1.2.1. PS Partiküllerin Yüzey Modifikasyonu

- PS partiküllerin yüzey modifikasyonu, ilk olarak bu çalışmada geliştirilen yeni bir "plazma yük boşalım" sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Monomer olarak üç değişik alkilamin kullanılmıştır. Şekil 3.2.'de kimyasal yapıları verilmiş olan bu monomerler, etilendiamin (EDA), alilamin (ALAM) ve trietilamin (TEA) olup her üçü de Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiş ve herhangi bir sarılaştırma işlemi yapılmaksızın kullanılmışlardır. İşlem öncesi, monomerlerde mevcut oksijen vakumla uzaklaştırılmıştır.

Partikül yüzey modifikasyonunda kullanılan plazma polimerizasyon reaktörü Şekil 3.3'de sematik olarak gösterilmiştir. Reaktör, 15 cm uzunluğunda ve 2.54 cm iç çapında pyrex camdan imal edilmiştir. 1.2 cm genişliğindeki 2 bakır elektrod 1.6 cm aralıkla reaktörün

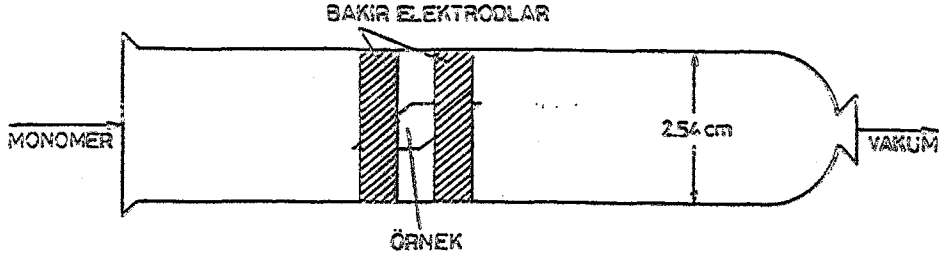


Sekil 3. 3. PS Partiküllerin Yüzey Modifikasyonunda Kullanılan Plazma Reaktörünün Sematik Görünümü.

dışına yerleştirilmiş ve 13.56 MHz gücündeki radyofrekans (RF) jeneratörüne bağlanmıştır. PS partikül yüzeyinin alkilaminlerle kaplanmasında izlenen yöntem şöyledir.

- Kaplama işlemi başlamadan önce 1 gram PS partikül reaktöre yerleştirilir.
- Reaktör kapatılıp 10 dakika süreyle vakum uygulanır (10 mm Hg).
- Reaktöre 250 μ basınca monomer yollanır.
- Reaksiyon süresi sonunda monomer akışı durdurularak, reaktöre tekrar vakum uygulanır.
- Argon geri beslemesiyle sistem atmosferik basınca getirildikten sonra, açılarak partiküller reaktor dışına alınır.

Plazma gücü tüm deneylerde 2,5 Watt değerinde sabit tutulmuş, yalnızca TEA monomeri için 10 Watt değerinde de çalışılmıştır. Plazma reaksiyon süresi 1, 5 ve 10 dakika olarak değiştirilmiştir. Reaksiyon sırasında, reaktör bir vorteks karıştırıcıya monte edilmiş ve



Şekil 3.4. PS Filmlerin Yüzey Modifikasyonunda Kullanılan Plazma Polimerizasyon Düzenekli

böylelikle sürekli karıştırma uygulanarak, reaktör içerisindeki tüm partiküllerin yüzey modifikasyonunun homojen şekilde gerçekleştirilmesine çalışılmıştır.

Yeni geliştirilen bu yöntemin, yüzey modifikasyonu açısından uygunluğunun araştırılması için, klasik plazma polimerizasyon yöntemiyle, aynı reaksiyon koşullarında PS filmlerin yüzeyi kaplanmış ve sonucunda ulaşılan yüzey yapıları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

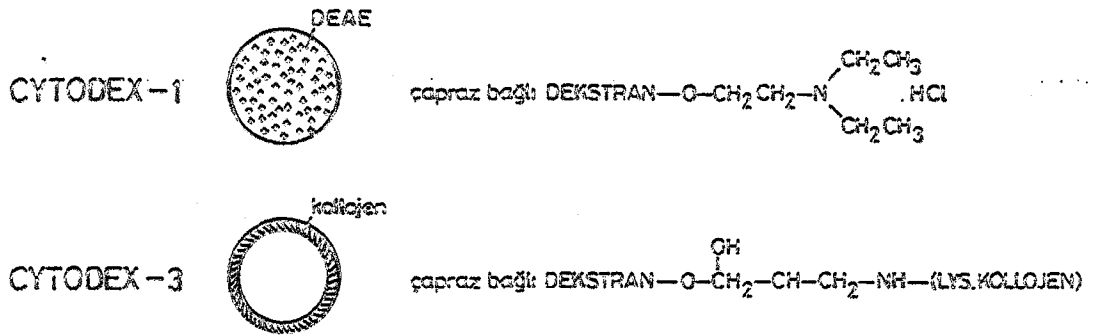
3.1.2.2. PS Filmlerin Yüzey Modifikasyonu

Çalışmanın bu aşamasında, PS'den imal edilen bakteriyolojik doku kültür kapları (Falcon, ABD), 1 cm x 1 cm boyutlarında kesildikten sonra asetona ve etanol ortamlarında ultrasonik yıkayıcıyla yıkanarak temizlenmiş ve PS film olarak çalışmada kullanılmıştır.

PS filmlerin yüzey kaplaması Şekil 3.4'de sematik görünümü verilen pyrex cam reaktörde gerçekleştirilmiştir. Reaktör 77 cm uzunluğunda ve 2.54 cm çapındadır. Bakır elektrotlar, Bölüm 3.1.2.1'de sözü edilen plazma reaktöründe kullanılanlarla aynı özelliklere sahip olup reaktör dışına konulmuşlardır. PS filmler ise bakır elektrotlar arasında olacak şekilde ve yatay konumda reaktör içine yerleştirilmiştir. Plazma gücü, çalışma basınçları ve reaksiyon süresi bir önceki sistemle aynı tutularak film yüzeyleri EDA, ALAM ve TEA monomerleriyle kaplanmıştır.

3.1.3. Ticari Mikrotasarıyıcılar

Araştırma kapsamında hazırlanan mikrotasarıyıcıların, mikrotasarıyıcı destekli hücre kültür sistemlerinde kullanılabilirliğinin saptanması amacıyla bu tür sistemlerde halen en yaygın olarak kullanılan ticari mikrotasarıyıcılarla paralel çalışmalar yürütülmüştür.



Sekil 3.5. Çalışmada Kullanılan Cytodex Mikrotasıyıcılar.

Çalışmalarda, Pharmacia (İsvec) firmasından bağıs olarak sağlanan iki tür mikrotasıyıcı kullanılmıştır. Bunlar, Cytodex-1 ve Cytodex-3 olarak adlandırılan çapraz bağı dekstran matrislerdir. Cytodex-1'de pozitif yüklü N, N-diethylaminoetil (DEAE) grupları matris içersinde dağıtılmış, Cytodex-3'de ise matris yüzeyi kollojen ile kaplanarak, matrisler hücre kültür uygulamaları için elverişli hale getirilmişlerdir (Sekil 3.5).

3.2. MİKROTASIYICI FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN TAYİNİ

Mikrotasıyıcıların hücre kültür ortamında başarıyla kullanılabilmeleri için Bölüm 2.1.3.4 'de açıklanan optimum özelliklere sahip olmaları istenir. Sunulan çalışmanın bu bölümünde araştırma kapsamında hazırlanan mikrotasıyıcıların fizikokimyasal özelliklerinin tayini amacıyla yapılan analiz yöntemleri anlatılmıştır.

3.2.1. Yoğunluk ve Sedimentasyon Hızı Tayini

Çalışmada hazırlanan PHEMA ve PS mikrotasıyıcıların yoğunlukları, Türkiye Cimento Müstahsilleri Araştırma Merkezi'nde bulunan hava karsılaştırmalı piknometre (Beckman, ABD) ile tayin edilmiştir.

Mikrotasıyıcı sedimentasyon hızları "cam-kolon" yöntemiyle saptanmıştır. Yöntem şu şekildedir. 20 cm uzunluğundaki cam kolon, 8/10 (ağırlık/hacim) oranında fosfat tampon çözeltisi (PBS) içeren 10 ml'lik partikül süspansiyonuyla doldurulur. Mikrotasıyıcılar cökme bırakılır ve sedimentasyon süresi belirlenir, ve buradan (cm/dakika) olarak sedimentasyon hızına geçilir.

3.2.2. Mikrotasiyıcı Boy ve Boy Dağılım Tayini

Mikrotasiyıcı çapı, doğrudan optik mikroskop mikrometresiyle (Nicon, Alphabot mikroskop, Japonya) ölçülerek saptanmıştır. Yaklaşık 150 adet partikülün mikrometrik çap ölçümleriyle partikül boy dağılımı bulunmuştur.

Süspansiyon polimerizasyonu yöntemiyle üretilen PHEMA bazlı partiküllerin boy dağılımı elek analiziyle saptanmıştır. Bu amaçla, Türkiye Çimento Müstahsilleri Araştırma Merkezi'nde bulunan Alphine jet eleği (Stephan-Werke Hameln, Augsburg) kullanılmıştır. İzlenen yöntem kısaca şöyledir:

- 10 gram ağırlığındaki PHEMA mikrotasiyıcı örnekleri sırasıyla çeşitli elek tepsipleri (gözenek çapı: 45, 63, 90, 125, 300, 430 μ , Tyler Co., ABD) üzerine konularak, basınçlı havayla partiküller elekten geçmeye zorlanır.
- 3 dakikalık süre sonunda elek tepsipleri üzerinde kalan partikül miktarı tartılarak tesbit edilir.
- Tüm elek tepsipleri için tekrarlanarak elekler üzerinde kalan % partikül miktarı bulunur.

3.2.3. Porozite Tayini

Süspansiyon polimerizasyonu ile üretilen PHEMA bazlı mikrotasiyıcıların poroziteleri, ODTÜ Petrol Mühendisliği Bölümü'nde bulunan bir civalı porozimetrede (Mercury Porosimeter, Kat. No. 1053, 805 RUSKA INST.) ölçülmüştür.

3.2.4. Yüzey Analizi

Çalışmada hazırlanan mikrotasiyıcıların yüzey yapıları aşağıda verilen iki teknikte incelenmiştir.

3.2.4.1. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM, Scanning Electron Microscope) Tekniği

Yüzey yapısı incelenecek örneklerin yüzeyi 200 Å kalınlığında altın ile kaplanarak iletken hale getirilmiş ve Türkiye Çimento Müstahsilleri Araştırma Merkezi'nde bulunan SEM cihazı (LEITZ-AMR 1000, Raster-Elektronen Microscope, İngiltere) kullanılarak yüzey SEM fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.4.2. X- Işınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS, X-Ray Photoelectron Spectroscopy) Tekniğı

Bu yöntem "ESCA" (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) olarak da adlandırılır ve günümüzde özellikle biyomateryal yüzeylerinin analizinde kullanılan en mükemmel teknik olarak bilinmektedir. Çalışmada hazırlanan mikrotasiyıcı örneklerin yüzey atomik bileşimi Washington Üniversitesi, Biyotıp Problemleri için Ulusal ESCA ve Yüzey Analiz Merkezi'ndeki (NESAC/BIO) SSX-100 ESCA Spektrofotometre (Surface Science Model) ile analiz edilmiştir. Mikrotasiyıcı örnekler, yapışkan bant üzerine tutturulduktan sonra ESCA örnek yuvasına yerleştirilmiştir. Tüm örnekler için "alan tarama" spektrumları ve yüksek ayrışım C1s spektrumları (high resolution C1s spectra) çekilmiştir.

3.2.5. Sisme Özelliklerinin Tayini

Mikrotasiyıcıların sisme özelliğı, kültür sırasında besi ortamı bileşenlerinin mikrotasiyıcı tarafından absorplanması sonucuna götürdüğü için istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle, araştırma kapsamında hazırlanan mikrotasiyıcıların sisme özellikleri denge sisme deneyleriyle incelenmiştir. Deneyler $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ sabit sıcaklıktaki saf su ortamında yapılmıştır. Başlangıçta kuru halde bulunan 2-3 gram ağırlığındaki partiküller ortama konulmuş ve belirli zaman aralıklarıyla ortamdan alınarak Shimadzu Libror EB-280 (Japonya, $\pm 1 \times 10^{-4}$ g) elektronik terazide tartılarak sismis partiküllerin su içeriğı değerleri saptanmıştır. Partiküllerin dinamik sisme davranışı da optik mikroskop (Nicon, Alphabet, Japonya) ile incelenmiştir. Çapı bilinen partikül, petri kabı içerisine konularak mikroskop tablasına yerleştirilmiş ve suyun partiküle difüzyonu takip edilerek, sisme tamamlandığında sismis durumdaki partikül çapı oküler mikrometre ile ölçülmüştür.

3.3. HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARI

Bu bölümde "Baby Hamster Kidney" (BHK 21) hücre hattı kullanılarak yapılan deneysel çalışmalar ayrıntılı bir biçimde anlatılmıştır. İlk olarak BHK hücre kültürünün hazırlanması ve halen ticari boyutlardaki çalışmaların yürütüldüğü döner siseli sistemlerdeki hücre kültürü açıklanmıştır. Daha sonra durgun ve süspansiyon kültür ortamlarında gerçekleştirilen mikrotasiyıcı-destekli hücre kültür çalışmaları ve bu

çalışmalarda izlenen deneysel yöntemler verilmiştir. Söz konusu hücre kültür çalışmaları, Ankara Şap Enstitüsü Kontrol Laboratuvarında yapılmıştır.

3.3.1. BHK Hücre Kültürü

Hücre kültür çalışmaları, "Syrian Hamster Kidney" hücre hattı (BHK 21) ile yapılmıştır. Söz konusu hücreler "Pirbright Virolojik Araştırma Enstitüsü"nden (İngiltere) Ankara Şap Enstitüsüne gönderilmiş olup, 29. pasajda ve ortalama ikilenme süresi yaklaşık 12 saatdir. Fibroblastik yapıdaki bu hücre hattı yalnızca tek tabaka kültürde üreyebilmektedir ve şap virüsüne son derece duyarlıdır.

Çalışmalarda, döner siselerdeki stok hücre kültürlerinden alınan hücreler kullanılmaktadır. Bu işlem şu şekilde gerçekleştirilir: Döner sisedeki hücre kültürü, hacimce % 0.2 oranında tripsin (DIFCO, ABD) içeren fosfat tampon çözeltisiyle (PBS) tripsinize edilerek, hücrelerin cam sise yüzeyinden kopması sağlanır ve % 0.1'lik (ağırlık/hacim) trypan blue (BDH, ABD) çözeltisiyle hücre canlılığının kontrolünden sonra, hemositometreyle (Bürker) hücre sayımı yapılır. Hemositometreyle hücre sayım yöntemi EK-C'de verilmiştir. Yeni hazırlanacak hücre kültüründe istenilen inokülasyon yoğunluğuna ulaşılması için gerekli sayıdaki hücre, steril haldeki kültür ortamına aktarılarak çalışma başlatılır.

Çalışmalar "Glasgow Minimum Essential Medium" (MEM) ve "Dulbecco" tarafından modifiye edilmiş "Eagle" (DME) vasatlarıyla yapılmıştır. Her iki vasat da GIBCO (ABD) firmasından temin edilmiştir. Ortamlar % 15 (hacimce) fetal calf serum (FCS; DIFCO, ABD) ile zenginleştirilmiştir. Ayrıca, antibiyotik olarak 100 µg/ml gentamycin ilavesi yapılmıştır. Kültür ortamının sterilizasyonu 0.2 µ boyutundaki Sartorius filtrelerle gerçekleştirilmiştir. MEM ve DME ortamlarının bileşimi EK-A'da verilmiştir. Araştırma kapsamındaki steril ortam gerektiren çalışmaların tümü laminar akışlı steril hücre odası (Vertical, ESI, Kat. 1, Fransa) yapılmıştır.

3.3.2. Döner Siseli Sistemde Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan BHK 21 hücre hattı, yalnızca tek tabaka kültür ortamında üreyebilme özelliğine sahiptir ve Ankara Şap Enstitüsü'nde döner siseli sistemde üretilmektedir. Mikrotasiyıcı-destekli hücre kültür sisteminin avantajlarının ayrıca belirtilmesi amacıyla döner siseli sistemde paralel çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmaların yapılmasında izlenen yöntem şöyledir: Bölüm 3.3.1.'de anlatılan şekilde hazırlanan hücre kültüründen 150 ml alınarak 1 lt hacmindeki cam siseye aktarılır. Sisenin ağzı steril iastik mantarla

kapatılır ve sac kapaklar da kapatıldıktan sonra etüvdeki (37°C) döner sisteme yatay konumda yerleştirilir. Sistem dakikada 5 devir hızla döndürülür ve böylelikle şise yüzeyine yapışan hücrelerin kültür ortamı ile temas etmesi sağlanır. Üreme tamamlandıncı şise sistemden çıkarılır, ortam uzaklaştırıldıktan sonra tripsinizasyon işlemiyle hücreler cam yüzeyinden koparılır ve hemositometreyle hücre sayımı yapılarak hücre üremesi belirlenir.

3.3.3. Mikrotasıyıcı-Destekli Hücre Kültürü

3.3.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılacak Cam Malzemenin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan her tür cam malzemenin (petri kapları, kültür reaktörleri, şiseler, pipetler, vb.) iç yüzeyi, mikrotasıyıcıların cam yüzeye yapışmasının önlenmesi amacıyla silikonize edilmiştir. Bu amaçla dimetildiklorosilan'ın (BDH, Kat. No: 33164, İngiltere) kloroformda çözülmesiyle hazırlanan, hacimce % 5'lik çözelti kullanılmıştır. Temiz cam malzemenin iç yüzeyinin tamamı bu çözeltiyle temas ettirildikten sonra çözeltinin fazlası uzaklaştırılıp, malzeme etüvde kurutulmuştur (100°C). En az iki kez distile su ile yıkanan malzeme 120°C, 20 psi buhar basıncında otoklavda (VEB MLW, Medizinische Geräte, Berlin) yarım saat süreyle sterilizasyon edilmiştir.

3.3.3.2. Mikrotasıyıcıların Hazırlanması

Bölüm 3.1.'de hazırlama yöntemleri verilen mikrotasıyıcılar, hücre kültür çalışmaları öncesinde aşağıda açıklanan işlemlerle kullanıma hazır duruma getirilmiştir. İzlenen yöntemler mikrotasıyıcı türüne bağlı olarak kısmen farklılık gösterdiği için, değişik alt başlıklar altında toplanarak aşağıda ayrı ayrı verilmiştir.

Cytodex Mikrotasıyıcılar

Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasıyıcılar için aynı işlemler uygulanmıştır. Mikrotasıyıcılar cam tüpler içerisinde, Ca^{++} , Mg^{++} iyonları içermeyen fosfat tampon çözeltisiyle sisirilmıştır. PBS miktarı, mikrotasıyıcı gram ağırlığı başına 100 ml olarak saptanmış olup, sisirme işlemi $37 \pm 0.5^\circ C$ 'daki etüvde 2 saat süresince devam ettirilmiştir. İşlem sırasında belirli aralıklarla karıştırma uygulanmıştır. 800 rpm hızda, 5 dakika santrifüjleme işleminden sonra çözelti süzülerek uzaklaştırılmış ve mikrotasıyıcılar yeni hazırlanmış PBS çözeltisiyle (Ca^{++} , Mg^{++} iyonları içermeyen, 50 ml/g Cytodex miktarında) yıkanmışlar ve yıkama çözeltisi uzaklaştırılarak, aynı özellikteki taze PBS çözeltisi ilave

edilmiştir. PBS ortamındaki mikrotasıyıcılar 115°C, 15 psi buhar basıncında otoklavda 15 dakika sterillenmişlerdir. Cytodex-3 mikrotasıyıcılar PBS ortamına konulduklarında başlangıç-yüzey gerilimi mikrotasıyıcıların ıslanması ve cökmesini önlediği için ortama 2-3 damla Tween 80 ilave edilmiştir.

PHEMA Mikrotasıyıcılar

PHEMA mikrotasıyıcıların sterilizasyonu γ -radyasyonuyla gerçekleştirilmiştir. Kuru haldeki mikrotasıyıcılar, Co^{60} - kaynağında (Gammacell 220, doz hızı: 0.15 MRad/saat) 17 saatte toplam 2.5 MRad doza ulaşılacak şekilde ısıtılmış ve steril mikrotasıyıcılar, Ca^{++} ve Mg^{++} iyonları içeren, steril PBS içerisinde (100 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 100 mg/l CaCl_2 ile hazırlanmış) bir gece bekletilmiştir (37°C'da). Santrifüjleme ve süzme işlemlerinden sonra mikrotasıyıcılar hücre kültür ortamında kullanıma hazır duruma gelmiştir.

PS Mikrotasıyıcılar

PS mikrotasıyıcılar da γ -radyasyonu ile sterillenmiştir. Yöntem, PHEMA mikrotasıyıcılar için kullanılanın aynıdır. Mikrotasıyıcılar taze hazırlanmış ve divalent katyonlar (Ca^{++} ve Mg^{++}) içermeyen steril PBS içerisinde 37°C sıcaklıktaki etüvde bir gece bekletildikten sonra santrifüjlenmiş ve PBS uzaklaştırılmıştır.

3.3.3.3. Hücre Kültür Ortamları

Mikrotasıyıcı-destekli hücre kültür çalışmaları iki farklı kültür ortamında gerçekleştirilmiştir.

- Durgun kültür ortamındaki çalışmalar
- Süspansiyon kültür ortamındaki çalışmalar

Aşağıda, her iki çalışmada izlenen deneysel yöntemler açıklanmıştır.

Durgun Kültür Ortamındaki Çalışmalar

Çalışma kapsamında hazırlanan tüm mikrotasıyıcılar öncelikle durgun kültür ortamında yürütülen hücre kültürlerinde denenmiştir. Bu çalışmalarda, hücre karakteristikleri yani hücre yapısına, yayılma ve üreme özelliklerinin yanı sıra, ortam koşullarının etkisi (pH, besi ortamı, serum içeriği, divalent katyonların varlığı, vb.), başlangıç hücre yoğunluğu

Cizelge 3.2. Durgun Kültür Koşulları.

Kültür Kabı:	Bakteriyolojik PS Petri Kabı (35 x 10 mm)
Kültür Ortamı:	2 ml Glasgow MEM + % 15 FCS veya 2 ml DME + % 15 FCS
Hücre İnokülasyon Yoğunluğu:	1 x 10 ⁵ hücre /ml
	3 x 10 ⁵ hücre /ml
	6 x 10 ⁵ hücre /ml
Mikrotasycıcı Konsantrasyonu:	5 g / lt (Cytodex Mikrotasycıcılar)
	10 g / lt (PHEMA Mikrotasycıcılar)
	20 g / lt (PS ve PHEMA Mikrotasycıcılar)
İnkübasyon Ortamı:	CO ₂ etüvü (% 95-98 nem, % 5 CO ₂ + % 95 hava)
İnkübasyon Süresi:	4 gün (PHEMA, Cytodex Mikrotasycıcılar)
	6 gün (PS Mikrotasycıcılar)
Sıcaklık:	37 ± 0.5°C
pH:	7.2 - 7.6

(inokülasyon yoğunluğu) ve mikrotasycıcı konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir. Ayrıca, mikrotasycıcıların tekrar kullanılabilirliği ve mikrotasycıcıdan-mikrotasycıcıya hücre transfer özellikleri de incelenmiştir.

Bu gruptaki çalışmalar 3.5 cm çapındaki bakteriyolojik polistiren petri kaplarında (Nunc, Danimarka) yürütülmüştür. Bölüm 3.3.2.2'de anlatılan ön işlemlerden geçirilen mikrotasycıcılar taze hazırlanmış, ılık kültür ortamıyla (50 ml/g mikrotasycıcı) caikalanıp, mikrotasycıcılar cöktürüldükten sonra kültür vasatı uzaklaştırılmıştır. İşlemin bu basamağı, özellikle küçük hacimlerle çalışıldığında, kültür ortamının PBS ile seyrelmesinin önlenmesi açısından son derece önemlidir. İşlemin sonraki basamağında, Bölüm 3.3.1'de açıklanan yöntemle hazırlanan hücre kültüründen istenilen başlangıç hücre yoğunluğu değerinde alınan uygun miktar, mikrotasycıcılarla birlikte petri kabına aktarılmış ve petriler CO₂ etüvüne yerleştirilmiştir. Etüv çalışma sıcaklığı 37.0±0.5°C'dir (LEEC Model GA3, İngiltere). Petri kaplarındaki çalışma koşulları Cizelge 3.2'de özetlenmiştir.

Durgun koşullardaki mikrotasycıcı destekli hücre kültür çalışmalarında mikrotasycıcıya hücre yapışması ve mikrotasycıcı üzerinde hücre yayılma ve üremesi Bölüm 3.3.4'de açıklanan yöntemlerle izlenmiştir.

Cizelge 3.3. Süspanse Kültür Koşulları.

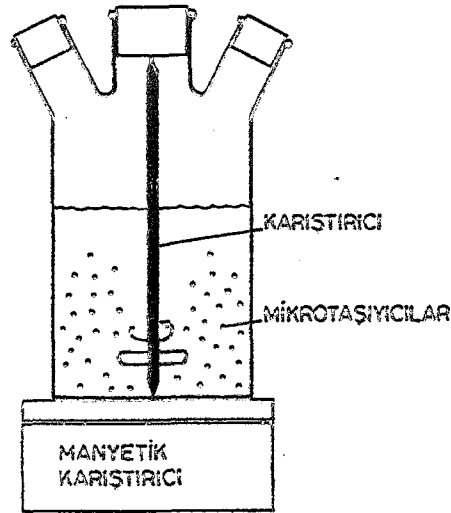
Reaktör : Spinner Flask (Bellco)
Reaktör Hacmi: 100 ml
Çalışma Hacmi: 50 ml
Karıştırma Türü ve Hızı: Magnetik Karıştırma, 60 rpm
Kültür Ortamı: 50 ml DME + % 15 FCS
Hücre İnokülasyon Yoğunluğu: 6×10^5 hücre / ml
Mikrotasıyıcı Konsantrasyonu: 5 g/lt (Cytodex- 1 ve 3)
10 g / lt (PHEMA)
İnkübasyon süresi: 4 gün
Sıcaklık: $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$
pH: 7.2 - 7.6

Durgun kültür koşullarında yapılan çalışmalarda PHEMA mikrotasıyıcıların kültür ortamında bir kezden fazla kullanımı da araştırılmıştır. Bir kez kullanılan mikrotasıyıcılar, yüzeyinden hücrelerin koparılıp ayrılmasından sonra, steril PBS çözeltisiyle 3 kez yıkanmış ve yeni kültür ortamına aktarılmıştır. İlk kez kullanımdaki çalışmalar aynen tekrarlanarak hücre üremesi incelenmiştir. Ayrıca, hücre üremesinin tamamlandığı kültür ortamına yeni mikrotasıyıcılar ve taze kültür ortamı ilave edilerek, üremenin tamamlandığı mikrotasıyıcılardan yenilerine hücre transferi ve hücre üremesi araştırılmıştır.

Süspanse Kültür Çalışmaları

Durgun kültür koşullarında gerçekleştirilen çalışmalarla mikrotasıyıcı destekli hücre kültür sistemleri için optimum özellikler ve çalışma koşulları saptanmıştır. Saptanan bu koşulların ışığı altında süspanse kültür çalışmaları yapılmıştır. Bu gruptaki çalışmalarda yalnızca PHEMA mikrotasıyıcılar kullanılmış ve sonuçlar Cytodex mikrotasıyıcılar için elde edilenlerle karşılaştırılmıştır.

Çalışmalar Şekil 3.6'da sematik olarak gösterilen 100 ml hacmindeki reaktörlerde (Bellco, Model 3002, ABD) yürütülmüştür. Hücre inokülasyonundan sonra 4 saat süresince ortam çok hafif karıştırılmış, daha sonra 60 rpm hızda karıştırma 4 gün boyunca sürdürülmüştür (Gallenkamp, Almanya). Cizelge 3.3'de süspanse kültür koşulları verilmiştir.



Sekil 3.6. Mikrotasıyıcı-Destekli Hücre Kültür Reaktörü.

Süspansiyon koşullarında hücre üremesi Bölüm 3.3.4'de açıklanan yöntemle izlenmiştir.

Durgun ve süspansiyon koşullardaki hücre kültür çalışmalarının her ikisinde de, inokülasyondan 48 saat sonra kültür ortamının % 50'si sistemden alınarak yerine taze ortam ilave edilmiştir.

3.3.4. Hücre Karakteristiklerinin Tayini

3.3.4.1. Hücre Yapışması

BHK hücresinin mikrotasıyıcı yüzeyine yapışması, inokülasyondan sonra, 2 saat süresince, her 30 dakikada bir ortamdan alınan örneklerdeki hücre sayımlarıyla incelenmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilebilmesi için yapılacak ilk işlem, hücrelerin mikrotasıyıcı yüzeyinden koparılmasıdır.

Hücrelerin mikrotasıyıcı yüzeyinden koparılması proteolitik enzimlerle sağlanır. Çalışmada izlenen yöntem şöyledir: Kültür ortamı sistemden uzaklaştırılarak, % 0,1 (ağırlık/hacim) oranında tripsin içeren PBS çözeltisi ilave edilir. Çözelti miktarı, mikrotasıyıcı gram ağırlığı başına 50 ml'dir. Hücrelerin mikrotasıyıcı yüzeyinden kopması için bu ortamda, 37°C'da 15 dakika inkübe edilmesi yeterlidir. Bu süre sonunda ortam pipetlenerek, hücrelerin yüzeyden tamamen kopması sağlanır.

Bundan sonraki işlem, yüzeyden koparılmış hücrelerin mikrotasarııcılarından ayrılmasıdır. Literatürde bu işlem için önerilmiş çeşitli yöntemler bulunmaktadır [96], ancak yapılan çalışmada güvenilirliği açısından "filtrasyon" yöntemi seçilmiştir. 100 mesh'lik sterillenebilir naylon filtrelerle (Zurich Bolting, Rüschlikon, İsviçre) yapılan filtrasyon işlemi sonucunda mikrotasarııcılarla hücreler ayrılmış ve EK-C'de verilen hemositometrik sayım yöntemi uygulanarak ortamdaki hücre sayısı belirlenmiştir. Bulunan değer, mikrotasarııcı yüzeyine yapışan hücre sayısını göstermektedir.

Yukarıda açıklanan yöntem, hücre inokülasyonundan sonraki 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda ortamdan alınan tüm örnekler için uygulanarak, mikrotasarııcı yüzeyine yapışan hücre kesri zamana bağımlı olarak bulunmuştur.

Çalışmada, mikrotasarııcı yüzeyine hücre yapışması mikroskobik olarak da incelenmiş ve optik fotoğraflarla belgelenmiştir.

3.3.4.2. Hücre Yayılması

Hücrelerin mikrotasarııcı yüzeyinde yayılması mikroskobik olarak incelenmiş ve belirli zaman aralıklarında çekilen fotoğraflarla tespit edilmiştir.

3.3.4.3. Hücre Üremesi

Hücre üremesi, inkübasyon süresince 24 saatlik aralıklarla ortamdan alınan örneklere Bölüm 3.3.4.1'de açıklanan işlemleri uygulayarak hücre sayım değerlerinin bulunmasıyla incelenmiştir. Ayrıca, yüzey üzerinde üremiş hücrelerin optik fotoğrafları çekilmiştir.

Çalışmada, mikroskobik incelemeler için hücreler glutaraldehitte sabitleştirildikten sonra % 0.1'lik (ağırlık/hacim) kristal viyole çözeltisiyle boyanmıştır. Hematoksilin ile boyama yöntemi de denenmiş, fakat kristal viyole ile boyamanın yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Hücrelerin sabitleştirilmesi ve boyanması için izlenen yöntemler EK-D'de verilmiştir.

3.4. Virüs Üretimi

Araştırma kapsamında geliştirilen PHEMA mikrotasarııcıların sap virüsü üretiminde kullanılabilirliği aşağıda özetlenen çalışmalarla saptanmıştır. Çalışmalar, Ankara Sap Enstitüsü Seroloji ve İmmünoloji Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.4.1. Tohum Virüs Seçimi ve Tek Tabaka Hücre Kültüründe Adaptasyonu

Çalışmada, sahadan secilerek alınan, sığırlarda pasajları yapıp doku kültürüne adapte edilen ve -70°C'de saklanan A22/Mahmatlı sap virüs susları kullanılmıştır. Söz konusu virüsten 1 gram alınarak, pH'ı 7.5'e ayarlanmış 10 ml Eagle ortamında çözümüştür. Elde edilen 1/10'luk virüs çözeltisi Torax omnimixer'de iyice ezilerek virüs ekstraksiyonu sağlanmıştır. Bu karışım 2500 rpm hızda 15 dakika santrifüjlendikten sonra dibе cöken epitel artıkları atılarak üstte kalan virus çözeltisi toplanmıştır. Virüs, hücre kültürüne inoküle edilmeden önce canlılığı ve antijenik gücü, fare inokülasyonu ve yarı-kantitatif "komplement fiksasyon" testleriyle saptanmıştır.

3.4.2. Virüs İnokülasyonu

Yapılan çalışmada virüs üretimi, optimum durgun kültür koşullarındaki, PHEMA mikrotasiyıcı-destekli BHK hücre kültür sisteminde gerçekleştirilmiştir. Kontrol amacıyla da, petri kaplarında hazırlanan hücre kültürleri kullanılmıştır. Mikrotasiyıcı-destekli kültür sisteminde hücre üremesi tamamlandıktan sonra, kültür ortamı uzaklaştırılıp serumsuz "Virüs Medium 3" (VM3) ortamı ile 2 defa yıkanmıştır. Bu yıkama işlemiyle, hücre üretiminde kullanılan serumda bulunan ve virüs üremesine etki yapma ihtimali bulunan antikorun ortadan kaldırılması sağlanır. Hazırlanan virüs, 20 hücre/pfu konsantrasyonunda olacak şekilde, hücre kültürüne inoküle edilmiş ve daha sonra serumsuz VM3 ortamı ilave edilerek 37°C'de etüvde üremeye bırakılmıştır. Hücrelerin virüsle enfekte olmaları, virüs inokülasyonundan sonra belli saatlerde (12., 24., 36.) alınan örneklerin mikroskop altında incelenmesiyle belirlenmiştir. Kültürlerin virüs duyarlılıkları ise bu örneklerin antijenite ve enfektivite titrelerinin bulunmasıyla gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. Virüs Duyarlılığının Belirlenmesi

Mikrotasiyıcı-destekli hücre kültür sistemlerinde üretilen virüslerin duyarlılığı, antijenite ve enfektivite testleriyle saptanmıştır. Virüslerin antijenik titreleri yarı-kantitatif "komplement fiksasyon testi" (CFT) ile tayin edilmiştir. Enfektif titreleri ise plak test yöntemi ile, "Tylose yarı katı örtme" ortamı kullanılıp plak oluşum birimi "plaque forming unit", pfu/ml olarak belirlenmiştir.

Yukarıda sözü edilen yöntemler EK-E'de açıklanmıştır. Virüs üretiminde kullanılan çözeltilerin bileşimleri EK-B'de verilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI

Bu bölümde, yüzeye bağımlı hücrelerin üretim kapasitesinin artırılması amacıyla çeşitli polimerik mikrotasıyıcıların hazırlanması ve bunların hücre kültür sistemlerinde kullanımıyla ilgili olarak yapılan deneysel çalışmaların sonuçları sunulmuş ve yeri geldikçe bulgular üzerinde tartışmalar yapılmıştır. Deneysel sonuçlar dört ana grup altında incelenmiş olup, ilk iki bölümde sırasıyla PHEMA ve PS bazlı mikrotasıyıcıların hazırlama yöntemi, fizikokimyasal özellikleri ve bu mikrotasıyıcılarla hücre kültür ortamlarında yapılan çalışmaların sonuçları ele alınmıştır. Sonraki bölümde mikrotasıyıcı-destekli kültür sistemlerinde hücre yapışma ve üreme kinetiklerinin matematiksel değerlendirilmesiyle ilgili sonuçlar sunulmuştur. Dördüncü bölümde ise hücre kültür çalışmalarının bir uygulaması olarak gerçekleştirilen PHEMA mikrotasıyıcılarda sap virüsü üretiminin sonuçlarına yer verilmiştir.

4.1. POLİ(HİDROKSİETİLMETAKRİLAT) MİKROTAŞIYICILAR

4.1.1. PHEMA Mikrotasıyıcı Seçimi ve Hazırlama Yöntemi

Bölüm 2.1.1'de açıklandığı gibi, yüzeye bağımlı hücrelerin üreyebilecekleri substratlar uygun özelliklere sahip olmalıdır. Bunlar arasında, katılık, yüzey yükü, yük yoğunluğu ve ıslatılabilirlik sayılabilir. Esas olarak yüzey özellikleri nedeniyle substrat yüzeyine glikoproteinler (örneğin, fibronektin) bağlanır ve bunun sonucunda hücre yapışması ve yayılması gerçekleşir. Hücre kültür çalışmalarının pek çoğu polimerik substratlarla yürütüldüğü için, sentetik polimerlerin fibronektin bağlama özellikleri araştırılarak, hücre yapışma ve yayılmasıyla, bu özellik arasındaki ilişkinin varlığı kanıtlanmıştır [119]. Yapılan araştırmaların sonucunda, fibronektin bağlamayan tek polimerik yapının PHEMA olduğu ve bu nedenle, PHEMA'nın hücre yapışması ve üremesini desteklemeyeceği ileri sürülmüştür [120]. Diğer yandan, PHEMA'nın toksik ve antijenik özellikler taşıması ve biyokompatibilitesi çok yüksek bir polimer olması, hücre ve doku kültür çalışmaları açısından tercih edilmesine neden olmuş ve bu amaca uygun olarak, PHEMA yüzeylerin çeşitli yöntemlerle modifiye edilmesi planlanmıştır. Bu yöntemler, yüzeyin yük bosalım tekniğiyle modifikasyonu ve yapıya çeşitli proteinlerin (kollojen, vb.) ya da hidrofobik ve iyonik monomerlerin (MMA, EMA, DEAE, TEAEMA) ilave edilmesidir [121]. Bu şekilde hazırlanmış PHEMA filmler yapay damar uygulamalarında kullanılmaktadır. Ancak, yüzeye bağımlı hücrelerin üretim kapasitesinin artırılması amacıyla ileri sürülen mikrotasıyıcı-destekli

kültür sistemlerinde kullanılmak üzere polimerik bazlı çeşitli mikrotasiyıcılar geliştirilmiş olmasına rağmen, PHEMA bazlı herhangi bir mikrotasiyıcı bulunmamaktadır.

Yukarıda açıklanan durumlar gözönüne alınarak, sunulan çalışmada, PHEMA bazlı mikrotasiyıcıların geliştirilmesi ve hücre kültür ortamlarında kullanılabilirliğinin araştırılması planlanmıştır.

100-200 μ boyutlarında olması istenilen PHEMA mikrotasiyıcılar, Bölüm 3.1.1'de açıklanan süspansiyon polimerizasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Yöntem, organik safsızlıklar içermeyen, dar boy dağılım aralığına sahip, düzgün küresel partikül oluşumuna götürmesi nedeniyle seçilmiş ve polimerizasyon koşulları ayarlanarak, optimum mikrotasiyıcı özelliklerine sahip PHEMA mikrotasiyıcıların elde edilmesine çalışılmıştır.

PHEMA matrisin hücre yapışması ve dolayısıyla üremesi için uygun duruma getirilmesi, polimerizasyon sırasında ortama eklenen MMA ve DMAEMA monomerleriyle sağlanmıştır. MMA, matrisin ısıtılabilirliğini, başka bir deyişle hidrofilitite/hidrofobisite oranını ayarlamak için, DMAEMA ise matris yapısında pozitif yük oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

4.1.2. Süspansiyon Polimerizasyonu Özellikleri

Bu çalışmada hazırlanan mikrotasiyıcı matris, EGDMA ile çapraz bağlanmış PHEMA'den oluşmaktadır. Bu nedenle, süspansiyon polimerizasyon özellikleri, HEMA-EGDMA çapraz bağlanma/kopolimerizasyon reaksiyonu gözönüne alınarak incelenmiş ve oluşan PHEMA mikrotasiyıcı özelliklerini ve polimerleşme reaksiyonunu etkileyen parametreler tartışılmıştır.

4.1.2.1. Partikül Boy ve Boy Dağılımını Etkileyen Parametreler

PHEMA partiküllerin süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlanmasındaki en önemli zorluk, hidrofilik yapıdaki HEMA monomeri için uygun bir dağıtma ortamının bulunamayışından kaynaklanmıştır. Önceki çalışmalarda, çeşitli organik çözücüler dağıtma ortamı olarak kullanılmış, ancak bu ortamlar partikül safsızlığına yol açarak, özellikle biyotip uygulamalarında sorun yaratmıştır. Son yıllarda geliştirilen 3 yeni polimerizasyon yöntemiyle [111-113] reaksiyonlar sulu fazda gerçekleştirilmiş ve safsızlık sorunu önlenmiştir. Ancak, bu yöntemlerle elde edilen partiküllerin geniş boy dağılım aralığına sahip olması çözüm bekleyen bir sorundur. Yukarıda sözü edilen yöntemlerin Peppas tarafından geliştirilmesinde, polimerizasyon, $MgCl_2$ ve NaOH karışımıyla hazırlanan jel

yapısındaki $Mg(OH)_2$ ortamında yürütülmüştür. Yapılan çalışmada, bu yöntem tarafımızdan modifiye edilerek kullanılmış ve öncelikle partikül boy dağılımını ve şeklini etkileyen parametreler, dar boy dağılımını ve düzgünlüğünü sağlayacak şekilde ayarlanmıştır. Bu parametreler aşağıda sıralanmıştır.

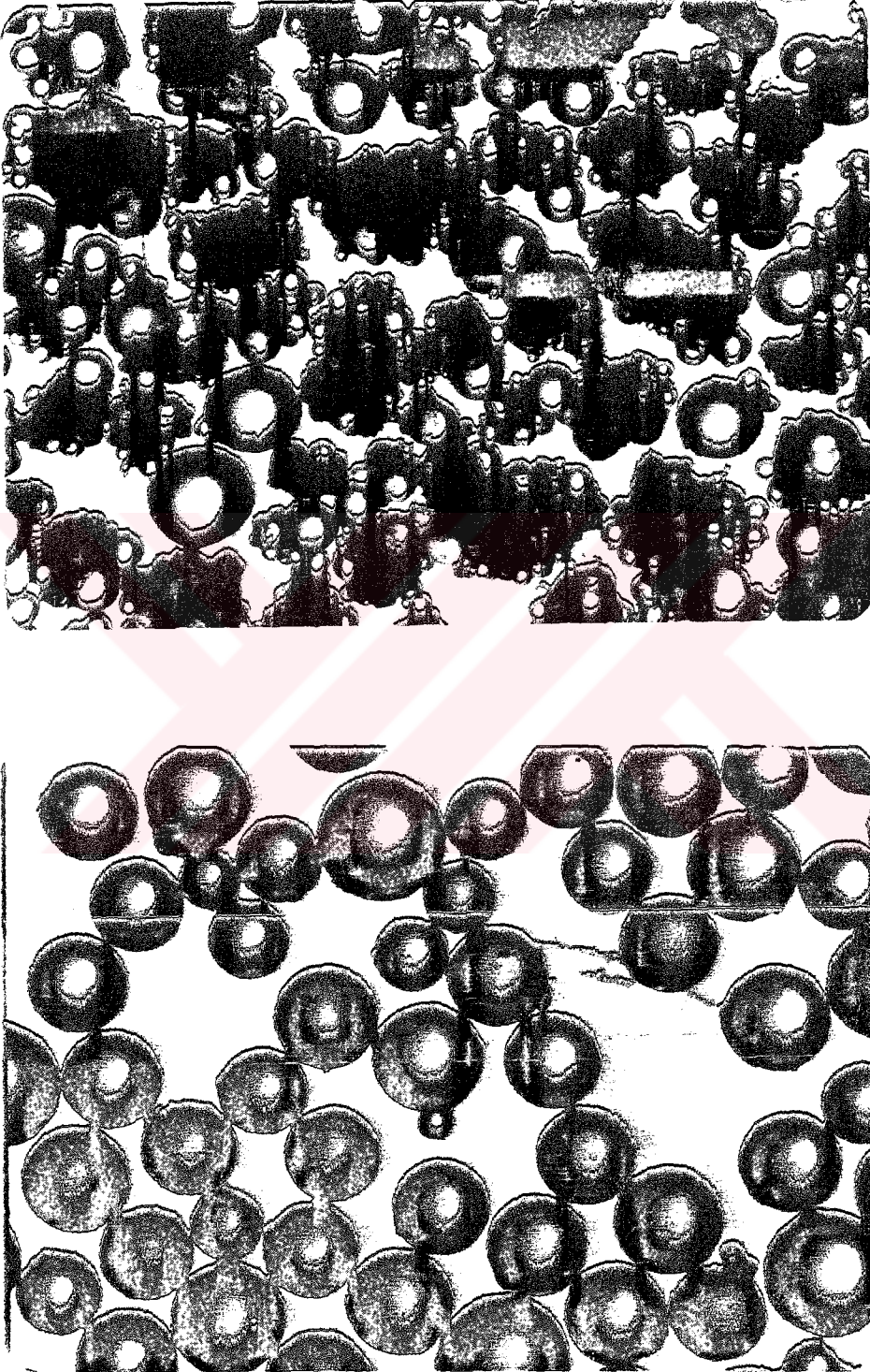
- Dağıtma ortamı bileşimi
- Monomer / dağıtma ortamı oranı
- Reaktör tasarımı (karıştırıcı türü, hızı, boyutları, vb.)
- Sıcaklık kontrolü

Tarafımızdan modifiye edilen polimerizasyon yönteminde dağıtma ortamı olarak doygun MgO çözeltisi kullanılmıştır. HEMA ve EGDMA monomerlerinin her ikisi de suda yüksek çözünürlük değerine sahip olduklarından, su fazına MgO ilave edilerek monomerlerin ortamdaki çözünürlükleri en düşük düzeye indirilmiştir. "Salting-out" ismi olarak adlandırılan bu teknik, suda çözünebilir monomerlerin polimerizasyonunda, değişik şekillerde uygulanmaktadır [123].

Polimerizasyonlarda değişik monomer/dağıtma ortamı oranlarında çalışılmış (örneğin, 1/2, 1/4, 1/10, vb.) ve en dar boy dağılımına 1/10 değerinde ulaşılması nedeniyle, bu değer optimum olarak belirlenmiş ve tüm reaksiyonlar bu değerde gerçekleştirilmiştir. Bilindiği gibi, monomer/dağıtma ortamı oranı, polimerizasyon ortam viskozitesini değiştirmektedir. Bu oranın düşük değerde tutulması, reaksiyon ilerledikçe viskozitede oluşabilecek artışı azaltmakta ve sistem parametrelerinin (örneğin, sıcaklık) kontrolünü kolaylaştırmaktadır.

Süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilen partiküllerin boy dağılımını ve şeklini etkileyen diğer bir parametre, polimerizasyon reaktörünün özellikleridir. Reaktörün tipi (yapımında kullanılan malzemenin cam ya da çelik olması, tabanının küresel olması, vb.), karıştırıcı türü (pervane, çapa ya da bıçak tipinde olması), karıştırıcının reaktördeki yerleştiriliş düzeni (tabandan yüksekliği ve konumu) ve karıştırma hızı (hızın ayarlı ve yeterli olması) ile ilgili olarak yapılan ön çalışmalar sonucunda Şekil 3.1'de sematik olarak gösterilen reaktörün tasarımı yapılmış ve deneysel çalışmalar bu reaktörde yürütülmüştür.

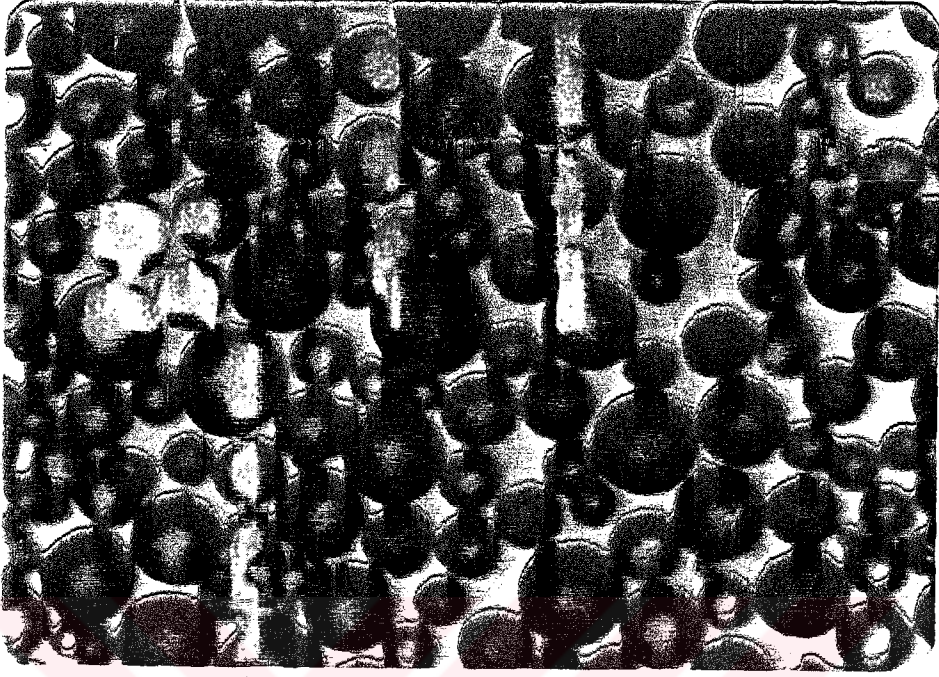
Şekil 4.1. a ve b'de sırasıyla, Peppas ve arkadaşları tarafından daha önce açıklanan yöntem kullanılarak hazırlanan ve bu yöntemin tarafımızdan modifiye edilmesiyle hazırlanan capraz bağı PHEMA partiküllere ait optik fotoğraflar verilmiştir. Her iki tür partikül de 300 rpm karıştırma hızında elde edilmiştir. Fotoğraflardan açıkça görüleceği gibi, yapılan çalışmada hazırlanan partiküller, diğerlerine göre çok dar boy dağılım aralığına sahip ve şekil olarak da oldukça düzgün kürelerdir.



Şekil 4.1. Süspansiyon Polimerizasyonu ile Hazırlanan Çapraz Bağlı PHEMA Partiküller.

a) Orijinal PHEMA Partiküller

b) Çalışmada Hazırlanan PHEMA Partiküller



Sekil 4.2. Pervane Tipi Karıştırıcı Kullanılarak Hazırlanmış PHEMA Partiküller.

Sekil 4.2'de, 300 rpm karıştırma hızında, pervane türü bir karıştırıcı kullanılarak hazırlanan PHEMA partiküller görülmektedir. Karıştırıcı türünün değişimi, partikül boy dağılımını arttırmış ve küresellikten sapmalara neden olmuştur.

Partikül boyunun ayarlanması ve istenilen boyda partikül eldesi, karıştırma hızı değiştirilerek gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar, 3 değişik karıştırma hızında (150, 300, 600 rpm) yapılmış ve elde edilen partiküllere ait elek analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge değerlerinden de görüleceği gibi partikül boy dağılım aralığı oldukça dardır. Sekil 4.3'de 150 ve 600 rpm karıştırma hızlarında elde edilmiş PHEMA partiküllerinin optik fotoğrafları verilmiştir. Karıştırma hızındaki artışın, partikül boyunu önemli ölçüde arttırdığı fotoğraflardan görülmektedir.

4.1.2.2. Polimerleşme Reaksiyonunu Etkileyen Parametreler

Bölüm 2.3.3'de de açıklandığı gibi, PHEMA partiküller, HEMA monomerinin EGDMA monomeri ile kopolimerizasyon/capraz bağlanma reaksiyonu sonucu hazırlanmakta ve reaksiyon serbest radikal mekanizmasıyla gerçekleşmektedir. Reaksiyon başlangıcında,

Cizelge 4.1. PHEMA Partiküllerin Elek Analiz Sonuçları.

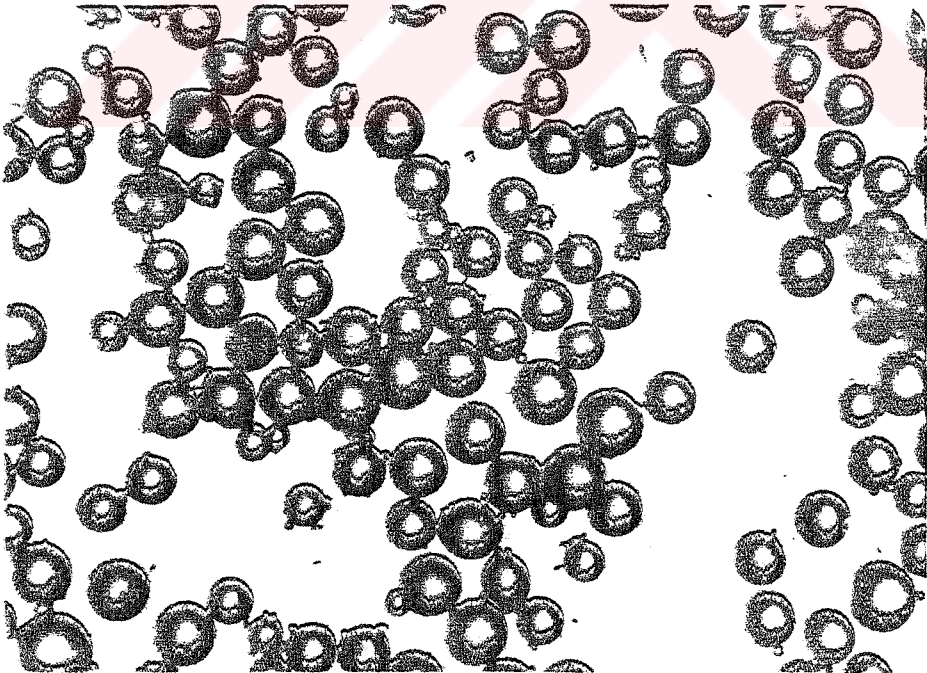
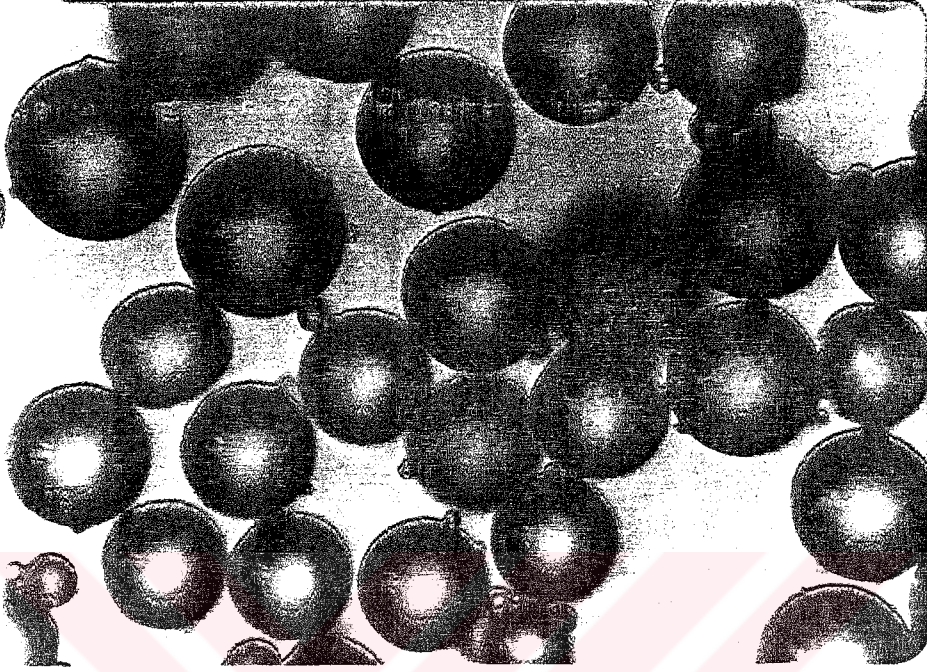
Partikül Çapı (μ)	Ağırlık Kesri (%)		
	Karıştırma Hızı (rpm)		
	150	300	600
65 - 80	0.00	0.00	56.3
80 - 105	2.50	9.90	30.2
105 - 210	6.80	85.70	10.4
210 - 300	15.30	5.40	3.3
300 - 430	75.40	0.00	0.0

başlatıcı molekülleri, makromoleküler zincir oluşumunu sağlayacak serbest radikaller oluşturmakta ve çapraz bağlayıcı ajan (EGDMA) da, uzayan zincir yapısına katılarak zincirler arasında çapraz bağ meydana getirmektedir. Polimerik örgünün oluşabilmesi için bir zincirde en az iki çapraz bağ bulunmalıdır, ki polimerizasyonda bu nokta "jelleşme noktası" olarak tanımlanır. Reaksiyon jelleşme noktasından sonra da devam eder ve "vitritifikasyon noktasına" ulaşılır. Çeşitli parametreler, örneğin, başlatıcı konsantrasyonu, çapraz bağlayıcı miktarı, v.b., reaksiyon ilerleyişini etkileyerek, bu noktalara farklı sürelerde ulaşılmasına ya da ulaşılmasına neden olur. Aşağıda bu parametrelerin etkisi tartışılmıştır.

Başlatıcı Konsantrasyonu: Polimerizasyonda başlatıcı olarak AIBN kullanılmış ve yapılan çalışmalar AIBN konsantrasyonunun polimerleşmede etkili olduğunu göstermiştir. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu 0.01 mol EGDMA/mol HEMA değerinde sabit tutularak, polimerizasyon üç değişik AIBN konsantrasyonunda başlatılmış ve 4 saatlik reaksiyon süresi sonunda Cizelge 4.2'de verilen dönüşüm değerlerine ulaşılmıştır.

Cizelge 4.2. Başlatıcı Konsantrasyonunun Dönüşüm Etkisi.

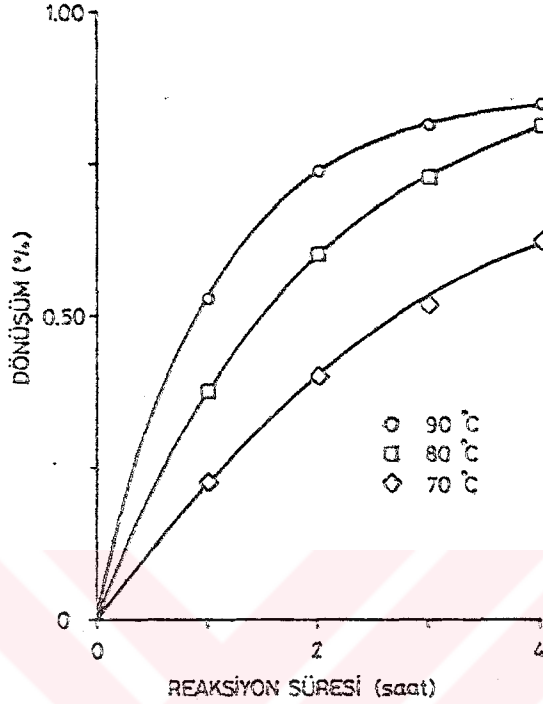
AIBN konsantrasyonu (mol AIBN/mol HEMA)	Dönüşüm (%)
0.010	72.0
0.020	54.0
0.030	0.00



Şekil 4.3. Karıştırma Hızının Partikül Boyuna Etkisi

a) Karıştırma Hızı : 150 rpm

b) Karıştırma Hızı : 600 rpm



Sekil 4.4. Sıcaklığın Polimerleşme Reaksiyonuna Etkisi.

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi, aynı EGDMA konsantrasyonunda, AIBN konsantrasyonunun artmasıyla % dönüşüm azalmaktadır. AIBN konsantrasyonu 0.030 değerine yükseltildiğinde ise çapraz bağlı ürün elde edilememiştir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; AIBN konsantrasyonu artırıldığında, reaksiyon başlangıcında çok sayıda serbest radikal oluşmakta ve böylelikle çok sayıda, kısa PHEMA zincirleri elde edilmektedir. Dolayısıyla, aynı çapraz bağlayıcı konsantrasyonunda çalışıldığında, çapraz bağlayıcı miktarı tüm zincirlerin bağlanması için yeterli olmamakta ve bu da polimerizasyon verimini düşürmektedir. Başlatıcı miktarının daha da artması sonucu jelleşme noktasına ulaşılamamakta ve çapraz bağlı ürün elde edilememektedir.

Sıcaklık: HEMA-EGDMA çapraz bağlanma/kopolimerizasyon reaksiyonu 70-90°C aralığında yürütülmüş ve bu aralıkta sıcaklığın artışıyla dönüşüm oranının da arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Bu durum, yüksek dönüşümlerde viskoziteye bağlı olarak artan viskoziteyle yavaşlayan monomer difüzyonunun, sıcaklığın yükselmesiyle hızlanarak, dönüşümü arttırması şeklinde yorumlanabilir.

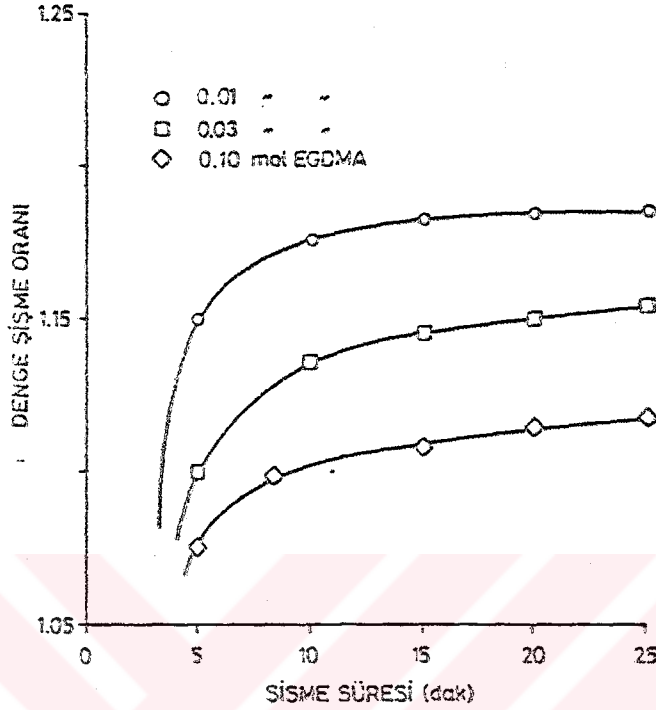
Çizelge 4.3. Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Polimerik Yapıya Etkisi.

EGDMA Konsantrasyonu (mol EGDMA/mol HEMA)	Denge Sisme Oranı
0.005	-
0.010	1.65
0.030	1.46
0.060	1.30
0.100	1.24

Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonu: Yapılan çalışmada, başlatıcı konsantrasyonu 0.015 mol AIBN/mol HEMA değerinde sabit tutularak, 5 değişik EGDMA konsantrasyonunda çalışılmış ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun polimerleşme reaksiyonuna etkisi, oluşan partiküllerin sisme davranışlarıyla incelenmiştir. Çizelge 4.3'de farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında yürütülen polimerleşme reaksiyonlarıyla elde edilen partiküllerin denge sisme değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi çapraz bağlayıcı konsantrasyonu 0.005 mol EGDMA/mol HEMA değerindeyken çapraz bağlı polimerik yapı elde edilememiştir. Bu durumun nedeni, çalışılan başlatıcı konsantrasyonunda, EGDMA oranının oluşan serbest polimerik zincirler arasında çapraz bağ oluşturmak için yetersiz kalmasıyla açıklanabilir. Ulaşılan bu sonuç, çapraz bağlı PHEMA partiküllerin oluşabilmesi için, başlatıcı konsantrasyonuna bağlı olarak, belirli bir çapraz bağlayıcı konsantrasyonunda çalışılması gerektiğini vurgulamaktadır. Çalışmadaki diğer tüm EGDMA konsantrasyonlarında çapraz bağlı yapılar elde edilmiş ve artan EGDMA konsantrasyonuyla, denge sisme değerlerinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Bu beklenen bir durum olup, artan EGDMA konsantrasyonunun, yapıdaki çapraz bağ yoğunluğunu arttırması ve sonuçta çok daha sıkı bir polimerik örgünün oluşması şeklinde yorumlanabilir.

Çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun, oluşan PHEMA partiküllerin dinamik sisme davranışları üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, Bölüm 3.2.5 'de anlatılan yöntemle, sismevle partikül içinde oluşan artış saptanarak D_t/D_0 oranı bulunmuştur. D_t : Sismenin t anında çapı değeri; D_0 : Partikülün kuru haldeki çapı değeridir. Dinamik sisme deneyleri 200 μ çapındaki PHEMA partiküllerle gerçekleştirilmiş ve saptanan D_t/D_0 değerleri, zamana karşı grafiğe alınarak Şekil 4.5'de verilmiş olan sisme eğrileri elde edilmiştir.



Şekil 4.5. Çapraz Bağlı PHEMA Partiküllerinin Dinamik Şişme Eğrileri.

Eğriler incelendiğinde, düşük EGDMA konsantrasyonlarında şişmenin çok hızlı bir şekilde gerçekleşerek, yaklaşık 15 dakikada dengeye ulaştığı, EGDMA konsantrasyonunun artışıyla ise şişme hızının azaldığı ve dengeye ulaşma süresinin uzadığı görülmektedir.

4.1.2.3. Optimum Polimerizasyon Kosullarının Saptanması

Yapılan çalışmada, hazırlanan çapraz bağlı PHEMA partiküllerinin mikrotasiyıcı-destekli kültür sistemlerinde kullanımı amaçlandığından, Bölüm 2.1.3.4 'de açıklanan optimum mikrotasiyıcı özellikleri gözönüne alınarak, bu özelliklere sahip partiküllerin elde edilmesi planlanmıştır.

Hazırlanması istenilen PHEMA partiküller, yaklaşık 100-200 μ çapında ve dar boy dağılımı aralığına sahip olmalı, ayrıca kültür ortamında şişmemelidir. Ön çalışmalarla belirlenen ve Bölüm 4.1.2.1 ve 4.1.2.2 'de tartışılan sonuçların ışığında, bu özelliklere sahip PHEMA partiküllerin elde edilebileceği polimerizasyon koşulları saptanmış ve Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Polimerizasyon Koşulları.

Dağıtma Ortamı	MgO Cözeltisi, pH : 10
Monomer/Dağıtma Ortamı (v/v)	1 / 10
Karıştırma Hızı	300 rpm
Sıcaklık	70°C (3 saat) + 90°C (1 saat)
Başlatıcı Konsantrasyonu	0.015 mol AIBN / mol HEMA
Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonu	0.1 mol EGDMA / mol HEMA

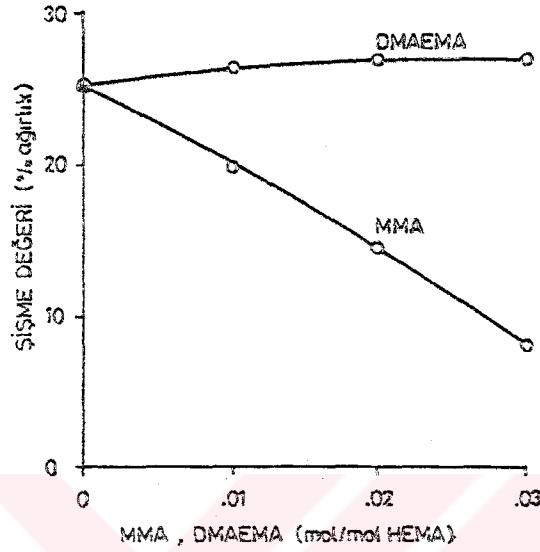
Çizelge 4.4'deki polimerizasyon koşullarında hazırlanan çapraz bağlı PHEMA partiküllerin mikrotasıyıcı olarak kullanılabilmeleri için, yüzey hidrofilitatesinin azaltılması ve yüzeyde yapısmayı sağlayacak yüklü grupların oluşturulması gerekir. Bu özellikler yapıya ilave edilen MMA ve DMAEMA monomerleriyle kazandırılmıştır. MMA ve DMAEMA miktarları değiştirilerek, Çizelge 4.5'de listelenen mikrotasıyıcılar hazırlanmıştır.

MMA ilavesi yapının hidrofobitesini arttırarak sisme yüzdesini azaltmış, DMAEMA ilavesiyle ise sisme değerinde değişim gözlenmemiştir. Şekil 4.6 'da her iki monomerin değişik oranlarda ilave edilmesi sonucu, yapının sisme özelliğindeki değişim gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. PHEMA Mikrotasıyıcıların Bileşimi ve Fiziksel Özellikleri.

Mikrotasıyıcı No	HEMA (mol)	MMA*	DMAEMA*	Yoğunluk (g/ml)	Sedimentasyon Hızı (cm/dak)
1	1	-	-	1.20	5.10
2	1	0.05	-	1.20	5.10
3	1	0.10	-	1.18	4.90
4	1	0.13	-	1.17	4.90
5	1	-	0.10	1.10	4.70
6	1	-	0.15	1.10	4.70
7	1	-	0.30	1.06	4.10
8	1	0.13	0.15	1.10	4.70

* mol/mol HEMA



Şekil 4.6. MMA ve DMAEMA Monomerlerinin Şişme Üzerindeki Etkisi.

4.1.3. PHEMA Mikrotasıyıcıların Fizikokimyasal Özellikleri

Hücre kültür çalışmalarında kullanılmak amacıyla hazırlanan ve örnek olarak seçilmiş PHEMA mikrotasıyıcıların bileşimi ve araştırma kapsamında septanan fiziksel özelliklerinden bazıları Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Porozimetrik ölçümler, yukarıda bileşimi verilen partiküllerin kuru halde gözenek yapısına sahip olmadığını göstermiştir.

Şekil 4.7'de 8 numaralı PHEMA partiküllere ait SEM fotoğrafı verilmiştir. Fotoğraftan da görüldüğü gibi, partiküller oldukça düzgün yüzey yapısına ve dar boy dağılımına sahiptir.

ESCA Tekniğiyle Yüzey Analizi

Sunulan çalışmanın bu bölümünde, araştırma kapsamında hazırlanan PHEMA mikrotasıyıcılardan seçilmiş örneklerle ait ESCA tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiş yüzey analiz sonuçları verilmiştir.



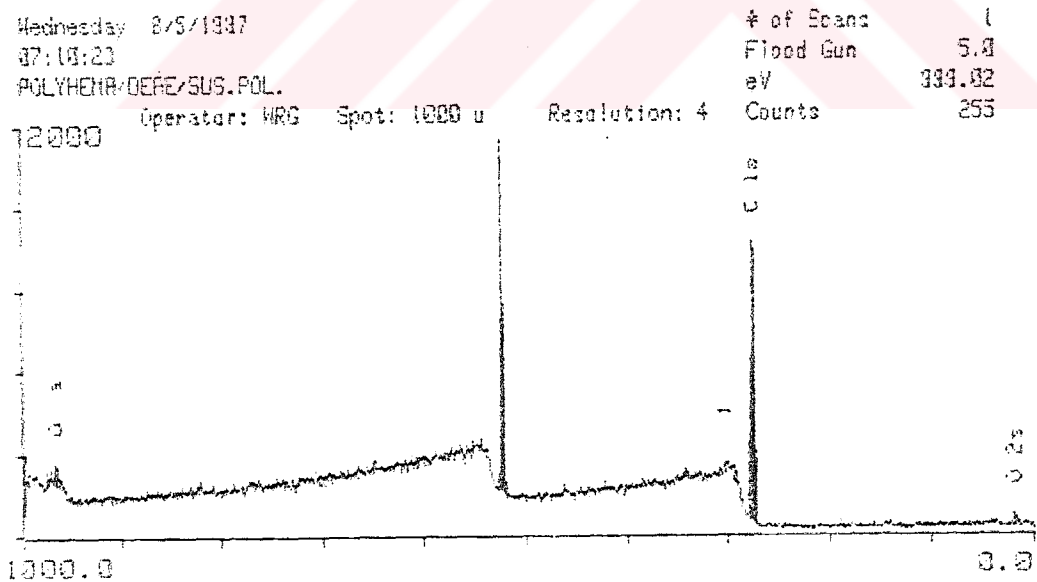
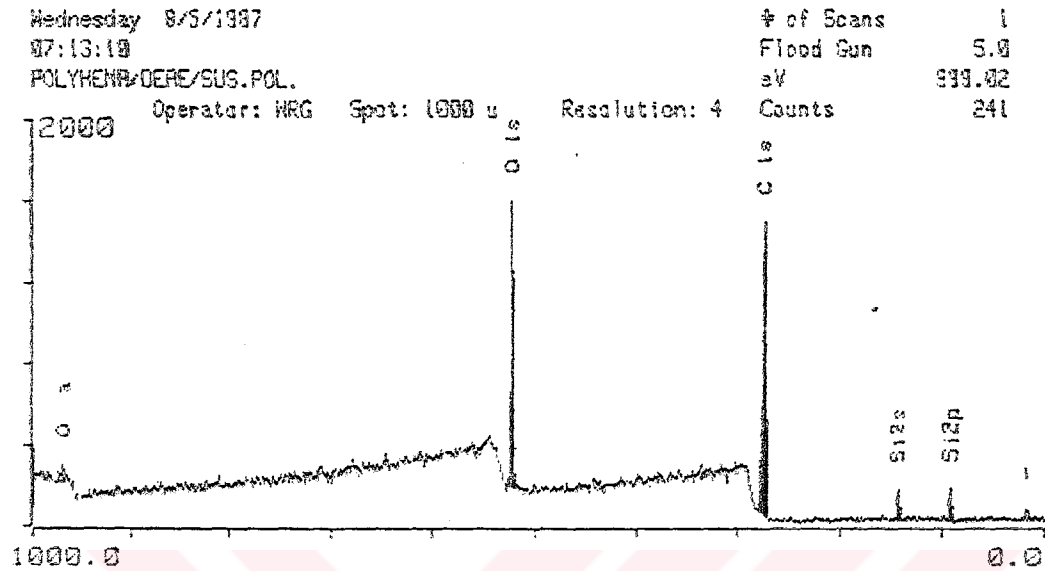
Sekil 4.7. PHEMA Partiküllerinin SEM Fotoğrafı.

Sekil 4.8'de, 1, 2, 4 ve 8 numaralı PHEMA mikrotasiyıcılara (Çizelge 4.5) ait ESCA spektrumları verilmiştir. Spektrumlardaki piklerden görüleceği gibi yüzeyde C ve O elementlerinin yanısıra, silikon ve magnezyum elementleri de bulunmaktadır.

Çizelge 4.6'da PHEMA mikrotasiyıcıların ESCA ile belirlenen atomik bileşimleri verilmiştir. 4 ve 8 numaralı örneklerin yüzeyinde bulunan Mg, polimerizasyon işleminin yürütüldüğü dağıtma ortamından kaynaklanmış olup, polimerizasyon sonrasında örneklerin iyi yıkanmamış olması sonucu ortaya çıktığı söylenebilir. 1, 4 ve 8 numaralı örneklerde görülen silikonun ise, laboratuvar işlemleri sırasındaki kirlenmeden kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Çizelge 4.6. PHEMA Mikrotasiyıcıların Yüzey Atomik Bileşimi.

Mikrotasiyıcı No	Si	ATOMİK BİLEŞİM		
		Mg	C	O
1	-	-	72.39	27.61
2	6.12	-	69.02	24.85
4	2.69	5.53	63.35	24.63
8	4.64	9.19	58.34	27.83



Şekil 4.3. PHEMA Mikrotasviricileri ait ESCA Spextrumları

a) PHEMA-1; b) PHEMA-2

c) PHEMA-4; d) PHEMA-6

Wednesday 8/5/1987

07:18:12

POLYHENA/DERE/SUS.POL.

Operator: WRG

Spot: 1000 u

Resolution: 4

of Scans

1

Flood Gun

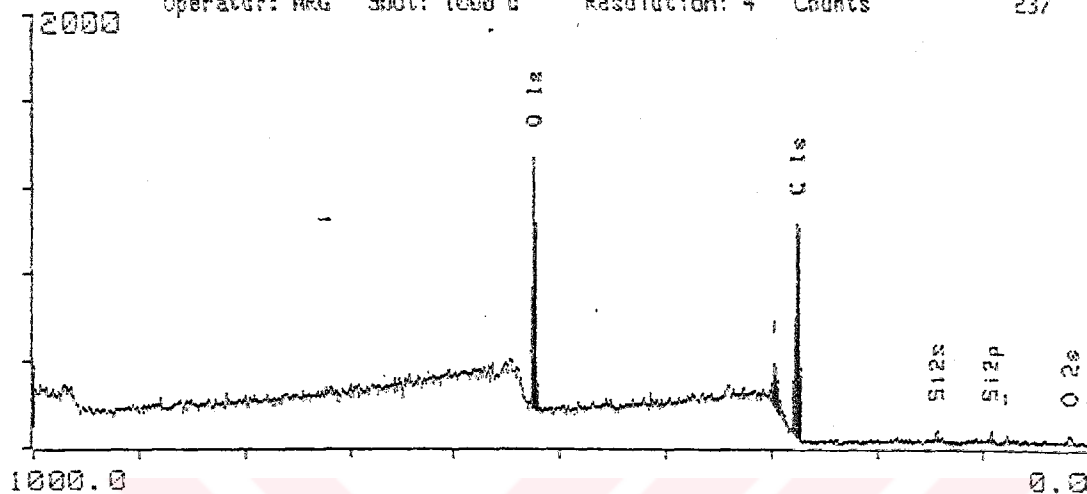
5.0

eV

999.02

Counts

237



Wednesday 8/5/1987

07:15:34

POLYHENA/DERE/SUS.POL.

Operator: WRG

Spot: 1000 u

Resolution: 4

of Scans

1

Flood Gun

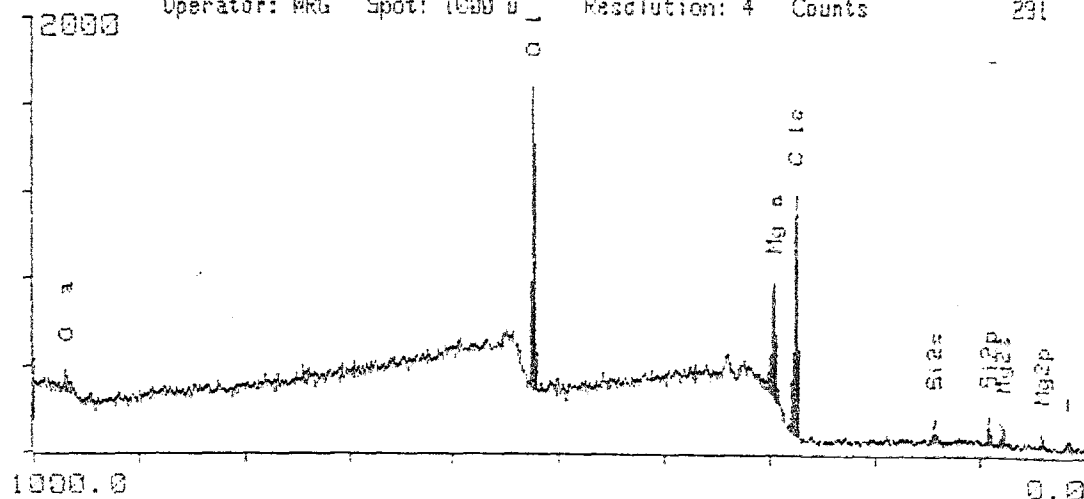
5.0

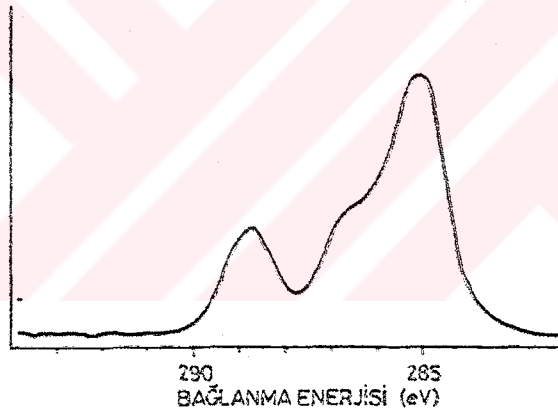
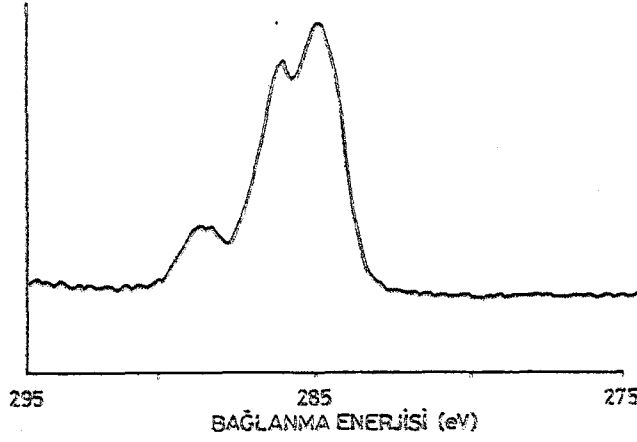
eV

999.02

Counts

291





Şekil 4.9. Orijinal C1s Spektrumları: a) Çapraz Bağlı PHEMA; b) MMA

4 ve 8 numaralı PHEMA mikrotasiyıcılar, yapılarında DMAEMA içerdiklerinden yüzeyde, amin grubundan kaynaklanan N elementinin de bulunması gerekmektedir. Ancak, hidrofilik yapılarda amin grubu, yüzeyin iç tarafına doğru yönlendiğinden, normal analiz işlemiyle yüzeydeki amin grupları tayin edilememektedir. Tayinin yapılabilmesi için, örneklerin dondurulmuş durumda cihaza yerleştirilmesi ve analiz sırasında bu durumda tutulması gerekir. Çalışmaların yapıldığı cihazda, sürekli soğutmayı sağlayacak aksesuarın bulunmaması nedeniyle bu işlem yapılamamış ve yüzeydeki N bileşimi tayin edilememiştir.

Şekil 4.9'da çapraz bağlı PHEMA ve PMMA'a ait, literatürden alınan [124,125] orijinal yüksek ayrısım C1s spektrumları verilmiştir. Spektrumlarda 285 eV'daki belirgin pik hidrokarbon yapısını göstermektedir. PMMA'da, PHEMA'dan farklı olarak 287 eV'da oksijene

bağlı karbon atomlarını gösteren bir pik bulunmaktadır. Her 2 spektrumda da 289 eV'de görülen pik ise ester karbonlarını göstermektedir.

Sekil 4.10'da 1, 2, 4 ve 8 numaralı mikrotasiyicılara ait yüksek ayrışım C1s spektrumları verilmiştir. Spektrumlar, Sekil 4.9'da yer alan orijinal örneklerle ait spektrumlarla karşılaştırıldığında 285 eV'daki hidrokarbon pikinin tüm örneklerde bulunduğu, yapıya MMA ilave edildiğinde 287 eV'daki pikin belirginleştiği, DMAEMA ilavesiyle de 289 eV'daki pik siddetinin azaldığı görülmektedir.

4.1.4. Hücre Kültür Çalışmaları

Sunulan araştırmanın bu bölümünde, öncelikle, hücre kültür çalışmalarında kullanılan hücre türü, kültür ortamı ve çalışma koşullarının (pH, sıcaklık, v.b.) seçim nedenleri tartışılmış ve saptanan koşullardaki durgun kültür ortamında PHEMA ve Cytodex mikrotasiyicılarla yürütülen çalışmaların sonuçları verilmiştir. Bu bölümün sonunda da, süspanse kültür ortamında PHEMA mikrotasiyicılarla yapılan çalışmaların sonuçları, Cytodex mikrotasiyicılarla karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

4.1.4.1. Hücre Türü, Kültür Ortamı ve Kültür Çalışma Koşullarının Seçimi

Hücre Türü Seçimi

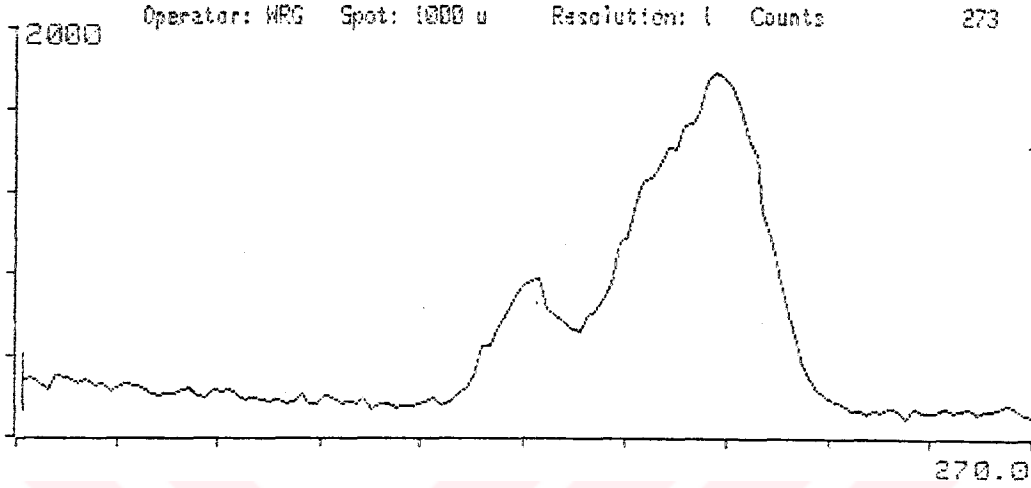
Bölüm 2.2.1'de de belirtildiği gibi, mikrotasiyıcı-destekli hücre kültürleri, yüzeye yapışarak tek tabaka halinde üreyen hücrelerin üretim kapasitesinin artırılması amacıyla geliştirilmiş bir sistemdir. Bu durum, yapılan çalışmada da, bu tür özellik gösteren bir hücre türünün seçimini gerektirmiş ve çalışmalar, fibroblast yapısındaki BHK hücreleriyle gerçekleştirilmiştir. Bu hücrelerden süspanse koşullarda üreyebilme özelliğine sahip hücre hatları da elde edilmiş olmakla birlikte [126], çalışmada, yalnızca tek tabaka kültürlerde üreyebilen BHK 21 hücre hattı kullanılmıştır. Söz konusu hücre hattının sap virusüne son derece duyarlı olması ve sap aşısı üretiminde yaygın olarak kullanılması, hücre türü seçimini etkileyen yan faktörler olarak sayılabilir.

Kültür Ortamı Seçimi

Kültür ortamı, hücre beslenmesi ve uremesi için gerekli bileşenlerden oluşmuştur ve hücreye özgüdür. Bu nedenle, ortam seçiminde, kültür sisteminin özelliğine (tek tabaka ya da süspanse kültür oluşu) bakılmaksızın, birinci etken olarak hücre türü dikkate alınmıştır.

Wednesday 8/5/1987
07:11:28
POLYHEMR/DERE/SUS.POL.

of Scans 23
Flood Gun 5.0
eV 283.84
Counts 273

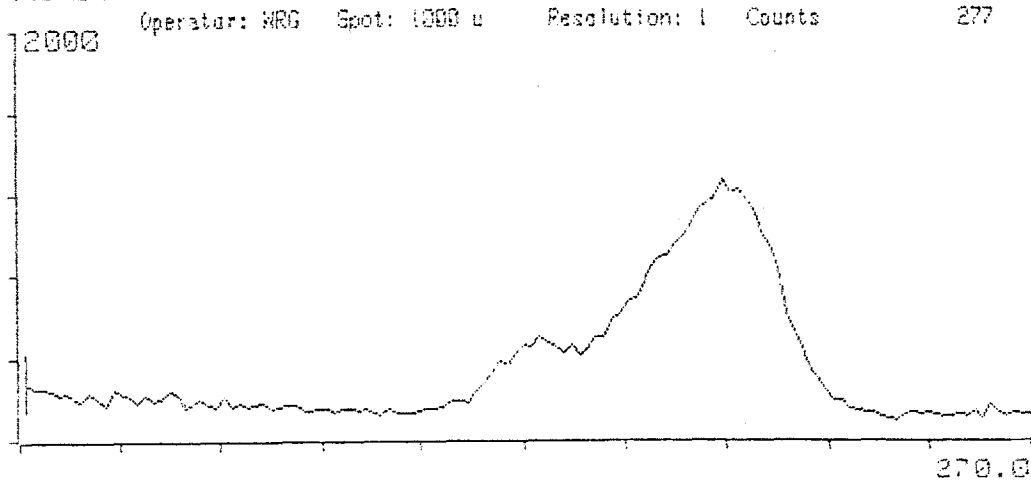


File PHEMR3, Region 1, from Tuesday 8/4/1987
POLYHEMR/DERE/SUS.POL.
Loaded into spectral area 1

WRG

Wednesday 8/5/1987
07:33:11
POLYHEMR/DERE/SUS.POL.

of Scans 23
Flood Gun 5.0
eV 283.84
Counts 277



Sekil 4.10. PHEMA Mikrotasiyicılara Ait C1s Spektrumları

a) PHEMA-1; b) PHEMA-2

c) PHEMA-4; d) PHEMA-8

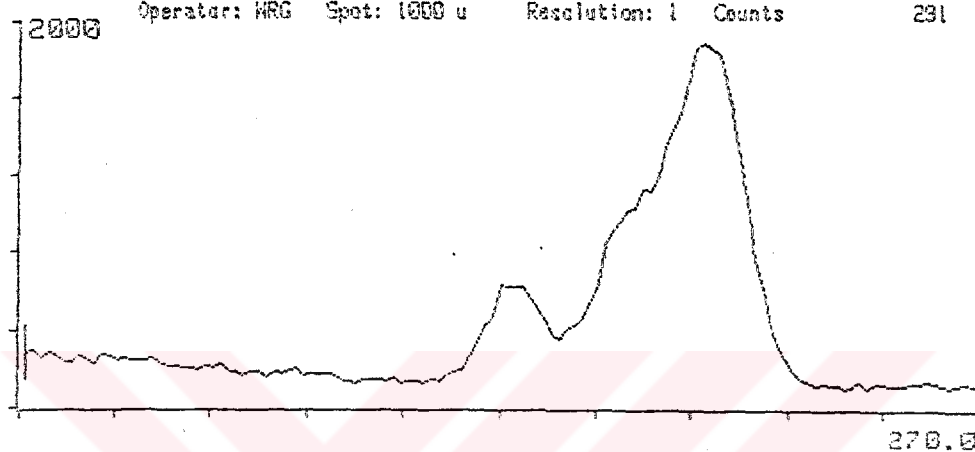
Wednesday 8/5/1987
07:13:48
POLYHEMA/DERE/SUS.POL.

Operator: HRC

Spot: 1000 u

Resolution: 1

# of Scans	23
Flood Gun	5.0
eV	281.84
Counts	231



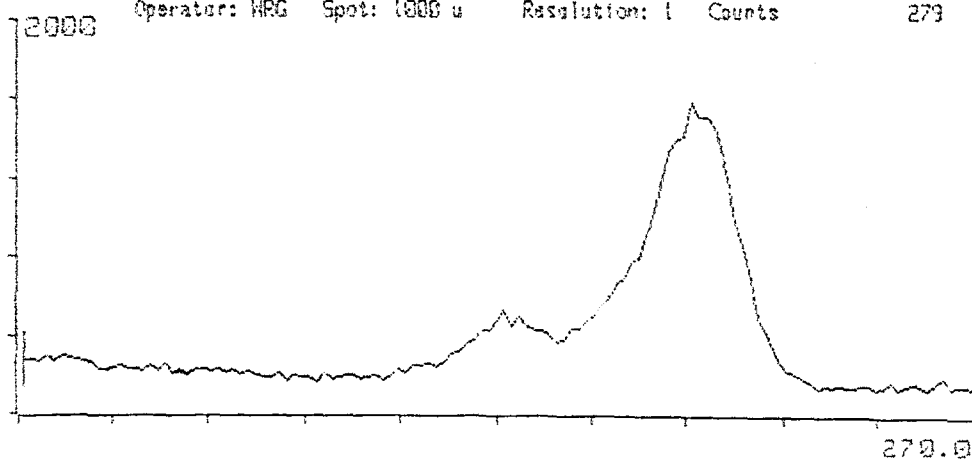
Wednesday 8/5/1987
07:16:28
POLYHEMA/DERE/SUS.POL.

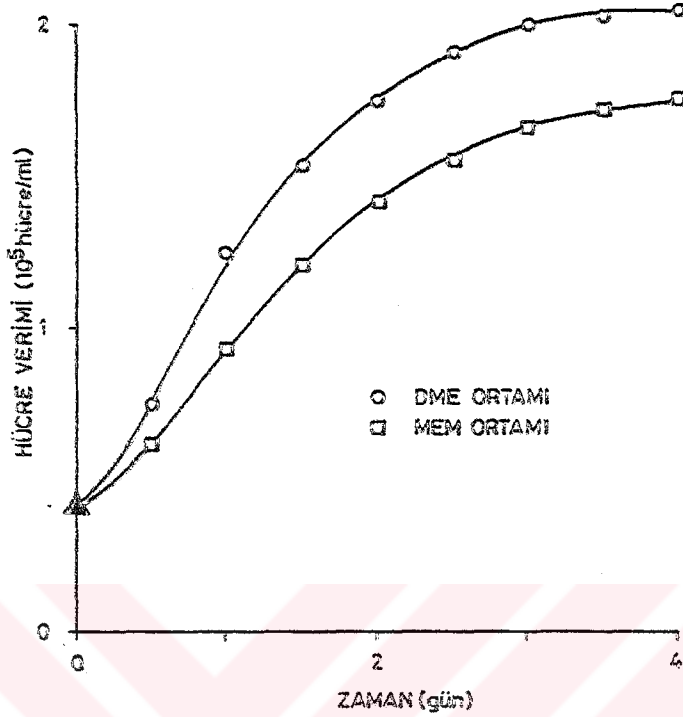
Operator: HRC

Spot: 1000 u

Resolution: 1

# of Scans	23
Flood Gun	5.0
eV	281.84
Counts	279





Şekil 4.11. Kültür Ortamlarının Hücre Üremesine Etkisi.

Ankara Sap Enstitüsü'nde BHK 21 hücre hattıyla yapılan daha önceki çalışmalar ve literatür bilgisi, MEM ortamının hücresel fonksiyonların devamlılığı açısından uygun olduğunu göstermiştir [14]. DME ortamı, ise MEM'e göre birkaç kat daha fazla amino asit ve vitamin içermesi nedeniyle yüksek hücre yoğunluğunda ($>10^6$ hücre/ml) yapılan çalışmalarda tercih edilir. EK-A'da her iki ortamın kimyasal bileşimi verilmiştir.

Çalışmanın başlangıcında, mikrotasiyıcı kullanılmadan DME ve MEM ortamlarıyla petri kaplarında hazırlanan kültürde, BHK hücrelerinin üreme özelliği incelenmiştir. Şekil 4.11'den de görüleceği DME ortamıyla daha yüksek hücre verimine ulaşılabacağı bulunmuş ve sonraki tüm çalışmalar bu ortamla yapılmıştır.

Kültür ortamı, hacimce % 15 oranında eklenen "foetal calf" serumla zenginleştirilmiştir. Serum ilavesinin nedeni, serumun aşağıda sıralanan fonksiyonlara sahip olmasıyla açıklanır. Serum,

- Hücre fonksiyonu için gerekli hormonlar ve büyüme faktörlerini içerir.
- Hücrenin yüzeye yapışması için gerekli faktörleri sağlar.
- pH tamponu olarak davranır.
- Toksik materyalleri bağlar ya da aktivitelerinin kaybına neden olur.

- Proteaz inhibitörlerini içerir.
- Hücresel metabolizma için gerekli besin maddelerini sağlar.

Çalışmalar sırasında mikroorganizmaların neden olacağı kontaminasyon riskinin azaltılması amacıyla kültür ortamına antibiyotik ilavesi de yapılmıştır. Kültür işlemi sırasında, 48 saatlik zaman aralıklarıyla, eski ortamın % 50'si yenisiyle değiştirilmek suretiyle kültür ortamı yenilenmiştir. Bu işlemin nedenleri şöyle sıralanabilir:

- Hücre üremesi sonucu azaltılan temel besin maddelerinin karşılanması
- Büyümeyi inhibe edici metabolizma ürünlerinin ortamdaki uzaklaştırılması
- pH kontrolünün sağlanması

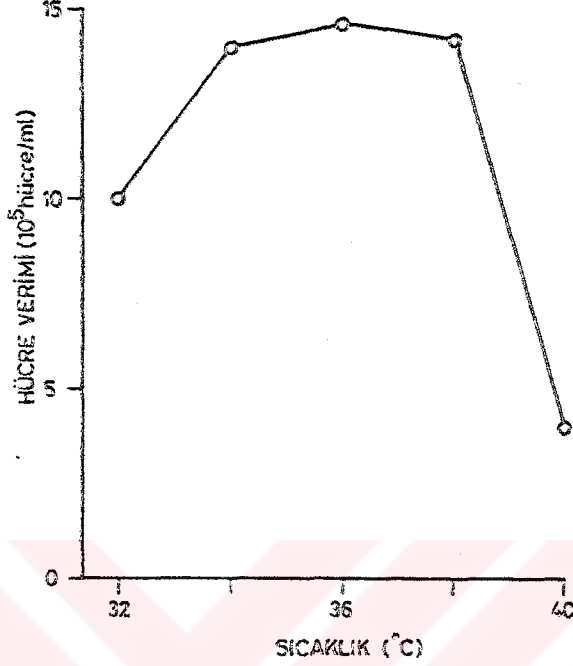
Optimum Çalışma Kosullarının Saptanması

pH : Çalışma pH'sı, hücrelerin kültür ortamındaki canlılığı, yüzeye bağlanması, üremesi ve fonksiyonu üzerinde önemli bir etken olduğundan, optimum pH değeri saptanması yüksek hücre verimi açısından önemli bir basamaktır. İlgili literatürde BHK hücreleri için optimum pH aralığı 7.2-7.6 değeri verilmis olduğundan çalışmalar da bu aralıkta yürütülmüştür. pH ayarı NaHCO_3 tamponuyla yapılmıştır.

Sıcaklık: Petri kabında yapılan çalışmalarda BHK 21 hücre hattı için optimum sıcaklık aralığı 33-38°C olarak belirlenmiş ve çalışmalar $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Sekil 4.12'den de görüleceği gibi, 38°C'in üzerindeki sıcaklıklarda hücre ölümü sonucunda, canlı hücre sayısı, dolayısıyla hücre verimi aniden azalmaktadır.

4.1.4.2. Mikrotasiyıcı-Destekli Durgun Kültür Ortamındaki Çalışmalar

Bölüm 4.1.2'de verilen polimerizasyon koşulları kullanılarak hazırlanan değişik bileşimlerdeki PHEMA mikrotasiyıcıların hücre yapışması ve üremesi açısından uygunluğu durgun kültür koşullarında yürütülen çalışmalarla saptanmıştır. Bu çalışmaların ışığında, mikrotasiyıcı-destekli kültür sistemlerinde kullanılacak en uygun PHEMA mikrotasiyıcı seçilmiş ve optimum çalışma koşulları bulunmuştur. Çalışmalar, Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasiyıcılarla paralel olarak yürütülmüştür. Aşağıda bu çalışmaların sonuçları tartışılmıştır.



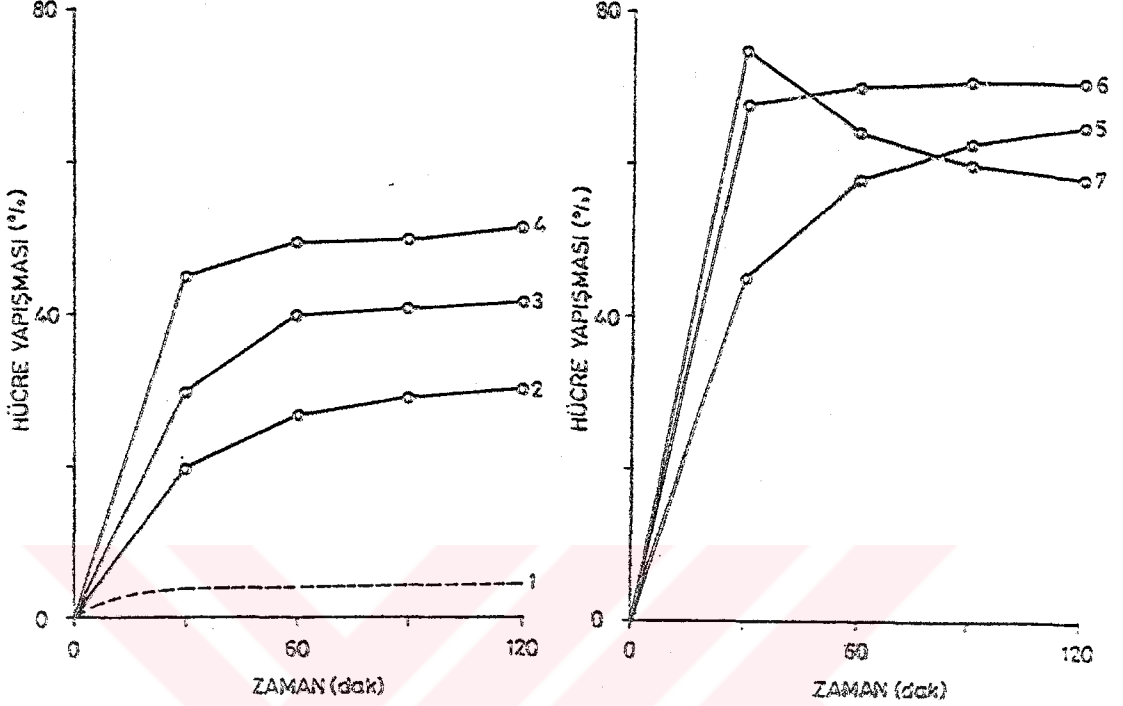
Sekil 4.12. BHK 21 Hücre Veriminin Sıcaklığa Bağımlılığı.

4.1.4.2.1. Optimum PHEMA Mikrotasycı Seçimi

Bu bölümdeki çalışmalar, Çizelge. 4.5.'de bileşimleri verilen PHEMA mikrotasycılar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Petri kaplarında yapılan çalışmalarda hücrelerin PHEMA ve Cytodex mikrotasycılara yapışması, yayılma ve üreme özellikleri incelenmiştir. Çalışmalar 37°C ve pH:7.2-7.6 aralığında ve 6×10^5 hücre/ml inokülasyon yoğunluğunda yapılmıştır.

Hücre Yapışma Özellikleri: BHK hücrelerinin mikrotasycı yüzeyine yapışma davranışı, inokülasyondan sonraki 2 saatlik sürede incelenmiş ve Bölüm 3.3.4.1'de açıklanan yöntemle % hücre yapışma değerleri saptanmıştır. Bulunan sonuçlar, PHEMA matris bileşiminin ve mikrotasycının hazırlanması sırasında kullanılan ortamın etkisi gözönüne alınarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

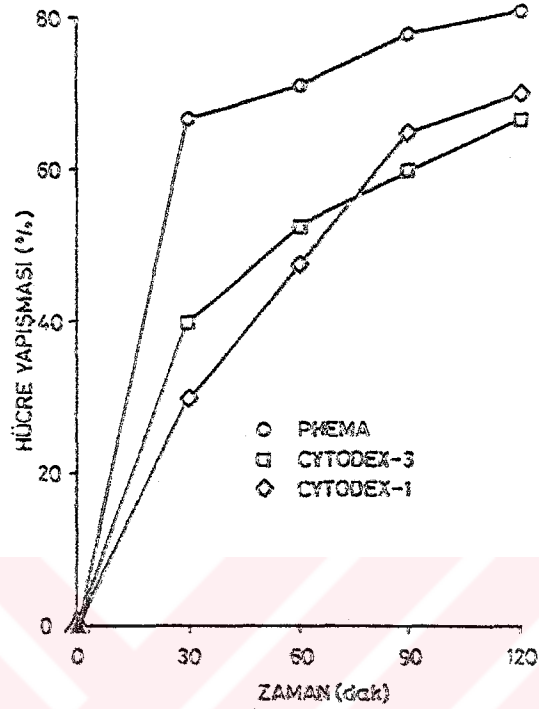
• Matris Bileşiminin Etkisi: Sekil 4.13'de PHEMA matrisdeki MMA ve DMAEMA gruplarının hücre yapışması üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Buradan görüleceği gibi, yalnızca caprez bağlı PHEMA matristen oluşan mikrotasycılar durumunda yüzeye yapışma olmamaktadır. Bu beklenen bir sonuç olup, PHEMA yüzeylerin yüksek ısılatılabilirlik



Sekil 4.13. PHEMA Matris Bileşiminin Hücre Yapışmasına Etkisi
(a) MMA Etkisi; (b) DMAEMA Etkisi

özelliklerinden kaynaklanmaktadır [127]. Mevcut çalışmalarda da belirtildiği gibi hücreler, temas açısı 35° olan orta düzeyde ıslatılabilirlik değerine sahip yüzeylere iyi bir şekilde yapışabilmektedirler [128]. Yapılan çalışmada PHEMA matrisin ıslatılabilirliğini azaltmak için yapıya MMA monomeri ilave edilmiştir. Şekil 4.13.a'da MMA bileşiminin yapışma üzerindeki etkisini açıkça görmek mümkündür. Yapıdaki MMA varlığıyla, yüzeye hücre yapışması gerçekleşmekte ve artan MMA miktarıyla $\%$ yapışma değeri de artmaktadır. MMA içeriğinin 0.13 mol/mol HEMA değerinin üzerine çıkarılması, yüzey ıslatılabilirliğinin önemli ölçüde azalmasına neden olarak hücre yapışmasını engellediği gibi, matris sertliğinin artmasıyla da hücre deformasyonuna neden olmuştur. PHEMA/MMA mikrotasiyıcılarla 2 saatte hücre yapışması $\%$ 50 dolayında kalmıştır. Bu durum, yüzey yükü oluşturacak bir bileşenin katkısını gerektirmiştir.

Sekil 4.13.b'den de görüleceği gibi DMAEMA matrisde pozitif yük oluşturarak hücre yapışmasını önemli miktarda arttırmıştır. Matrisde yüklü grupların varlığı hücre yapışması için gereklidir, ancak, yüksek konsantrasyonlar, toksik etki yaratarak hücre üremesini inhibe etmektedir. DMAEMA konsantrasyonu 0.30 mol/mol HEMA değerine



Sekil 4.14. PHEMA Mikrotasıyıcılarla Cytodex Mikrotasıyıcıların Hücre Yapışması Yönünden Karşılaştırılması.

yükseltildiğinde, ilk 30 dakika'da hücrelerin % 70'inin yüzeye yapıştığı, fakat daha sonra hızlı bir düşme kaydettiği gözlenmiştir. Bu durumun, yukarıda sözü edilen inhibisyon etkisinden kaynaklandığı söylenebilir.

Yapışma deneylerinden elde edilen bu sonuçlarla, hazırlanacak matrisin farklı bileşimlerde MMA ve DMAEMA monomerlerinin kombinasyonundan oluşturulmasına karar verilmiştir. Bu şekilde hazırlanan çeşitli mikrotasıyıcılarla yapılan çalışmaların sonucunda, 0.13 mol MMA ve 0.15 mol DMAEMA/mol HEMA bileşimine sahip PHEMA mikrotasıyıcılarla 2 saatlik sürede % 75 dolayında hücre yapışması değerine ulaşıldığı bulunmuştur. Sekil 4.14'de bu sonuç Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasıyıcılarla karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Değerlerden görüleceği gibi, PHEMA mikrotasıyıcılara hücre yapışması ilk 30 dakika'da çok hızlı bir şekilde gerçekleşmekte, daha sonra yavaşlayarak 120 dakikada denge değerine ulaşmaktadır. Cytodex mikrotasıyıcıların her ikisinde de yapışma daha yavaş olmakta ve 2 saat sonucunda PHEMA mikrotasıyıcılardan daha düşük yüzde yapışma değerleri (ü % 65) gözlenmektedir.

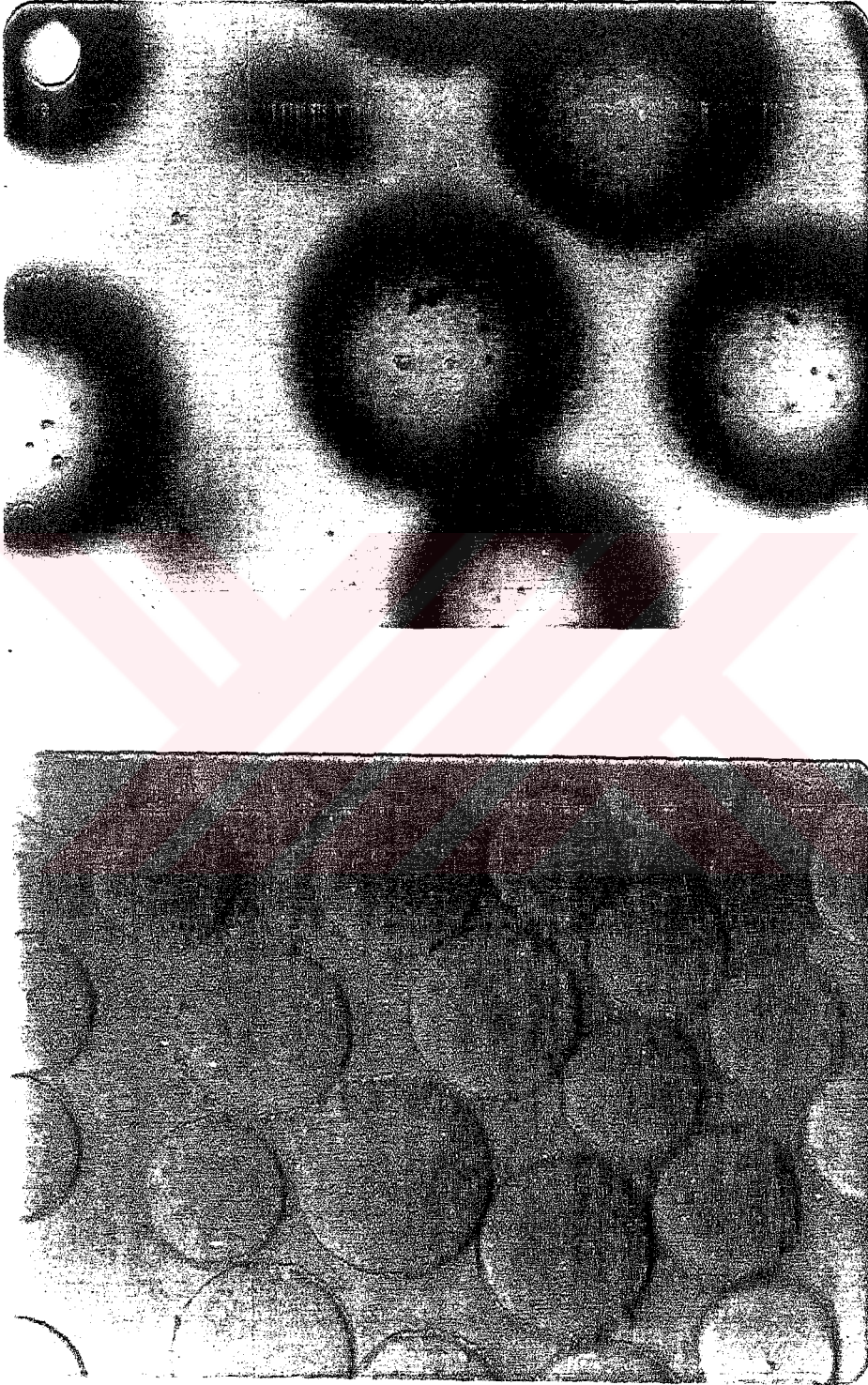
• **Sişirme Ortamının Etkisi:** Hücre kültür çalışmalarında kullanılacak PHEMA mikrotasıyıcıların ön hazırlanma işlemlerinin anlatıldığı bölüm'de (Bölüm 3.3.2.2) de belirtildiği gibi, mikrotasıyıcılar 2 değerlikli iyonlar (Ca^{++} ve Mg^{++}) içeren PBS ortamında (100 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg/l CaCl_2 ve % 10 FCS) bir gece bekletilerek dengeye ulaşmaları sağlanmıştır. Aynı işlem, Ca^{++} , Mg^{++} iyonları içermeyen PBS ortamında tekrarlandığında, hücre yapışmasının, diğer yöntemle hazırlanan mikrotasıyıcılardakine göre % 20 oranında azaldığı gözlenmiştir. Bu durumun, divalent katyonların serumun yapısındaki fibronektin'i mikrotasıyıcı yüzeyine etkin bir şekilde bağlayarak, mikrotasıyıcı yüzeyinde hücrelerin yapışabileceği aktif merkez sayısını arttırmalarından kaynaklandığı söylenebilir. Cytodex mikrotasıyıcılar yüksek derecede şisme özelliği gösterdiğinden, ortamdaki divalent katyonları absorblamaları sonucu, matriks içerisindeki iyon dengesi bozulacağından Ca^{++} ve Mg^{++} iyonları içermeyen PBS ortamında şişirilmislerdir.

Mikrotasıyıcı yüzeyine hücre yapışması mikroskopik olarak da incelenmiş ve fotoğraflarla belgelenmiştir. Sekil 4.15'de PHEMA ve Cytodex mikrotasıyıcılara yapışmış BHK hücrelerine ait optik fotoğraflar görülmektedir. Fotoğraflardan görüleceği gibi yüzeye yapışan hücreler küre şeklindedir.

Hücre Yayılma ve Üremesi: Çizelge 4.5'de verilen PHEMA mikrotasıyıcılar ve Cytodex mikrotasıyıcılarla yapılan deneylerde hücre yayılması mikroskopik olarak incelenmiş, hücre üremesi ise Bölüm 3.3.4.4'de açıklanan yöntem izlenerek saptanmış ve ortalama "ikilenme süresi" değerleri ile birlikte Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Mikrotasıyıcı- Destekli Durgun Kültürde Hücre Verimi.

Mikrotasıyıcı	Hücre Verimi (hücre/ml)	Ortalama İkilenme Süresi (saat)
Cytodex-1	2.45×10^6	23.7
Cytodex-3	2.20×10^6	25.7
PHEMA -1	-	-
PHEMA -2	-	-
PHEMA -3	-	-
PHEMA -4	1.43×10^6	38.3
PHEMA -5	-	-
PHEMA -6	1.70×10^6	31.9
PHEMA -7	-	-
PHEMA -8	2.70×10^6	22.1



Şekil 4.15. Mikrot taşıyıcı-destekli durgun kültürde hücre yapışması

a) PHEMA Mikrot taşıyıcı (8 Numaralı Örnek)

b) Cytodex-1

c) Cytodex-3



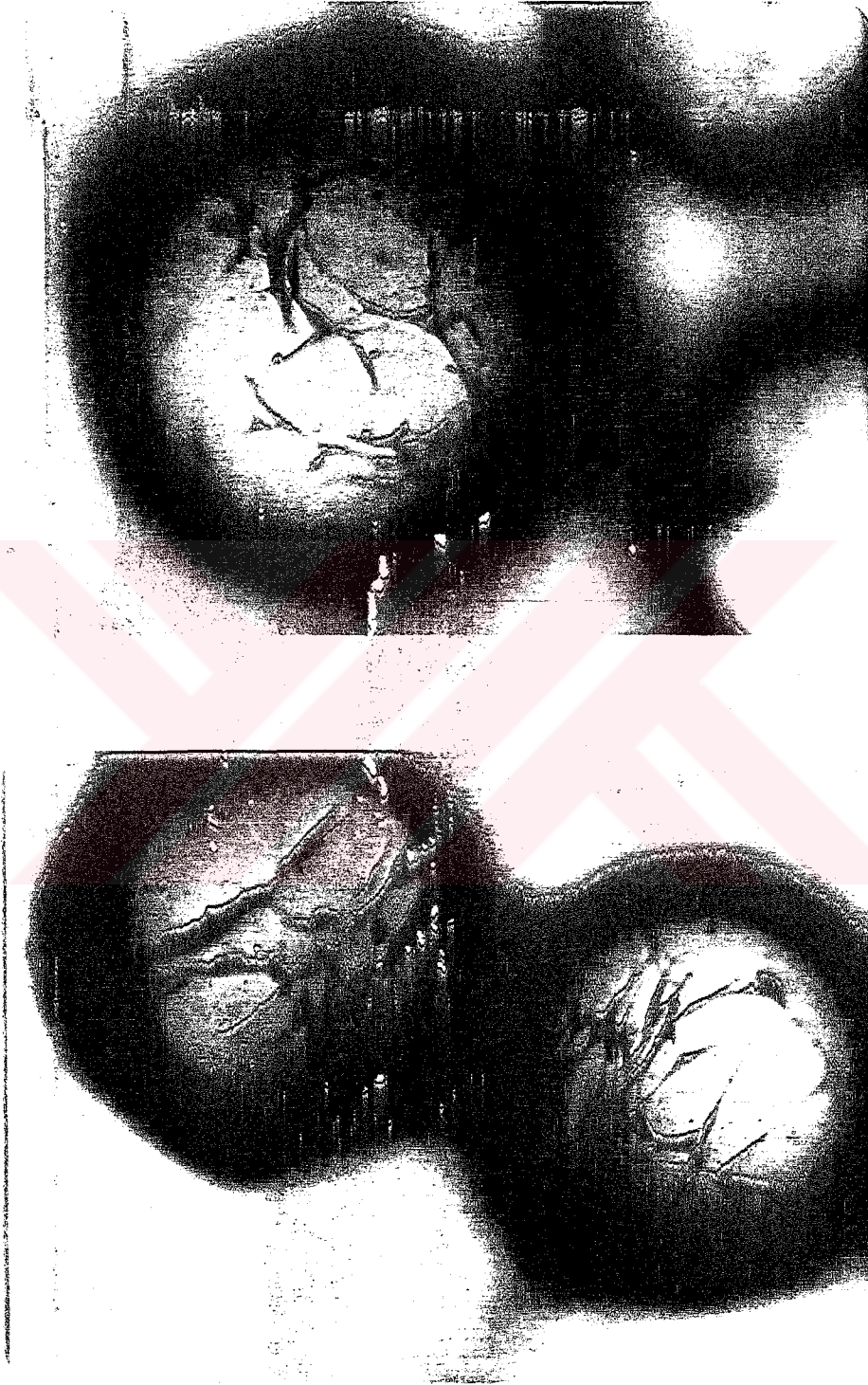
c

Mikrotasıyıcı sistemde hücre üremesinin gerçekleşmesi için belli sayıda hücrenin yüzeye yapışması gerekmektedir. Yapışmanın olmadığı ya da düşük düzeyde kaldığı yüzeylerde hücre verim değerlerinin septanamayısı bu durumun sonucudur. 7 numaralı PHEMA mikrotasıyıcıda başlangıçtaki hücre yapışması yüksek değerde olmasına rağmen, daha önce de sözü edilen DMAE gruplarının yarattığı toksik etkiden dolayı, hücre üremesi gerçekleşmemiştir. En yüksek verim değerine 8 numaralı PHEMA mikrotasıyıcılarla ulaşılmıştır.

Sekil 4.16'da 8 numaralı PHEMA mikrotasıyıcıda hücre yayılması ve üremesini gösteren optik fotoğraflar verilmiştir. Mikroskopik inceleme, hücre yayılmasının inokülasyondan 2 saat sonra başladığını ve yaklaşık 36 saat'te yüzeyin hücrelerle tamamen kaplandığını göstermektedir. Fotoğraflardan açıkça görüleceği gibi, yapışma safhasında küresel şekilde olan hücreler, tipik fibroblast şeklini alarak yüzeyde yayılmaktadırlar.

Sekil 4.17'de 8 numaralı PHEMA mikrotasıyıcı ve Cytodex mikrotasıyıcılarla durgun kültür ortamında yapılan çalışmalar sonucu elde edilen üreme eğrileri verilmiştir. Eğrilerden görüleceği gibi, hücre üremesinin büyük kısmı inkübasyon süresinin ilk iki günlük bölümünde gerçekleşmekte, daha sonra yavaşlayarak sabit üreme evresine ulaşmaktadır.

Durgun kültür ortamında gerçekleştirilen mikrotasıyıcı-destekli hücre kültür çalışmalarının sonucunda 0.13 mol MMA/mol HEMA, 0.15 mol DMAEMA/mol HEMA bileşimindeki çapraz bağlı PHEMA partiküllerin ticari olarak mevcut Cytodex-i ve Cytodex-3 mikrotasıyıcılara alternatif olarak kullanılabileceği septanmıştır.

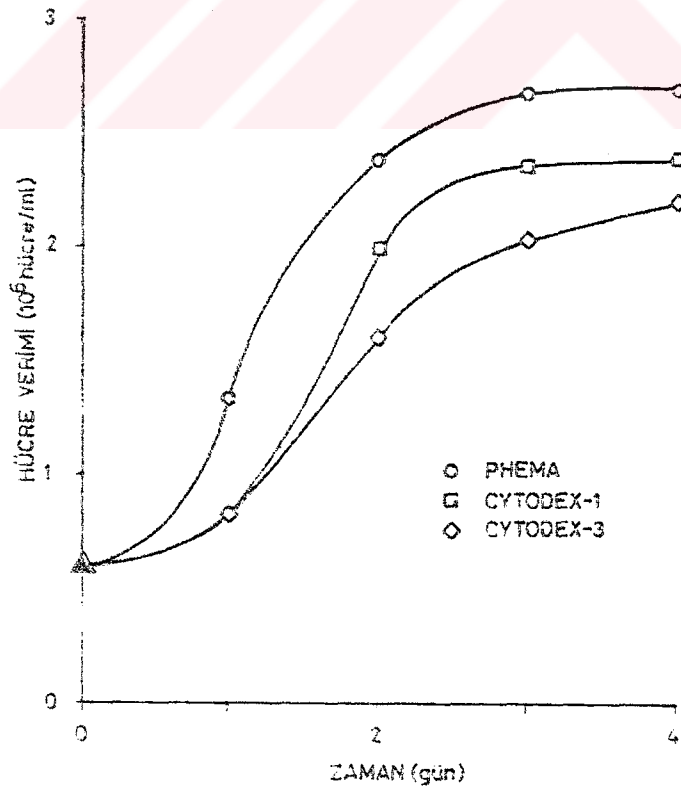
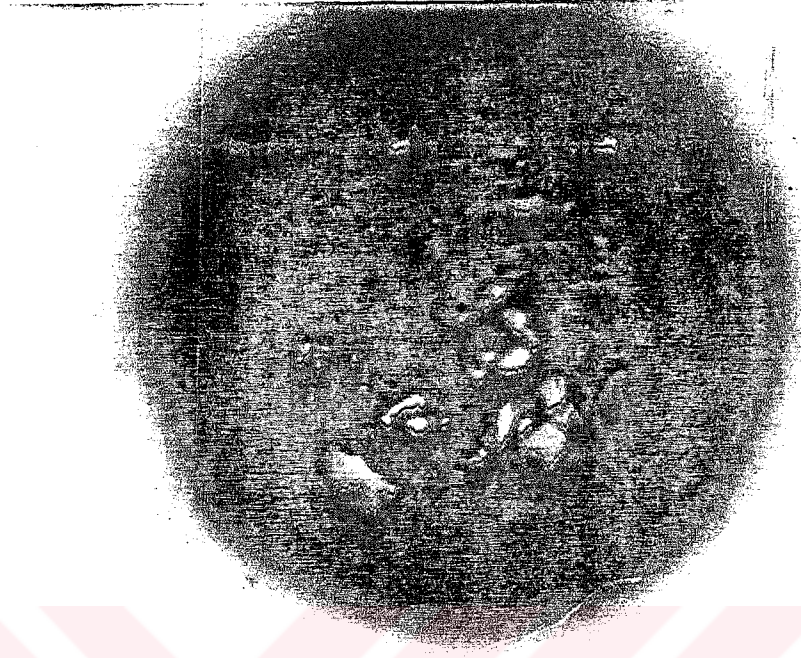


Sekil 4.16. PHEMA Mikrotasiyicılarda Hücre Yayıma ve Üremesi

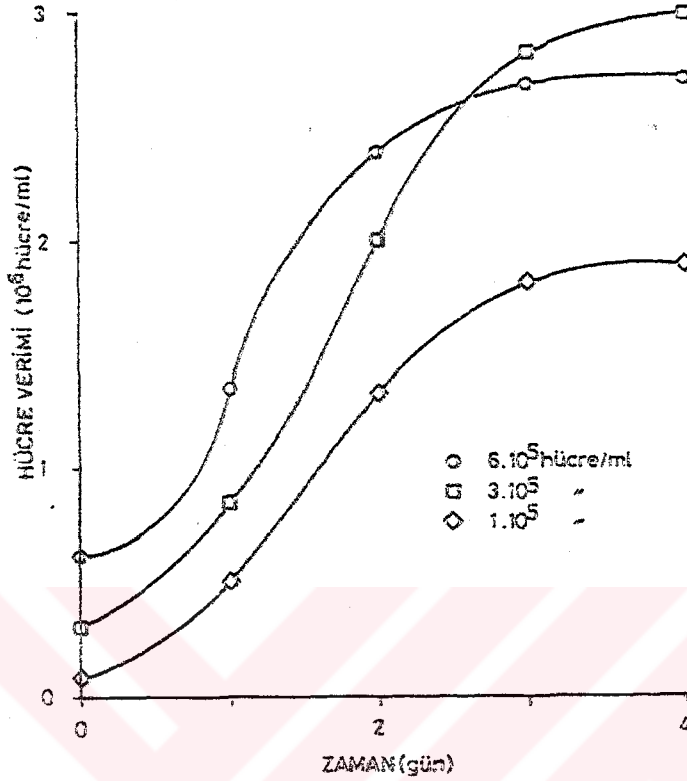
a) Inokülasyondan 12 saat sonra

b) Inokülasyondan 24 saat sonra

c) Inokülasyondan 36 saat sonra



Şekil 4.17. Mikrotasycı-Destekli Durgun Kültürde Hücre Üreme Eğrileri.



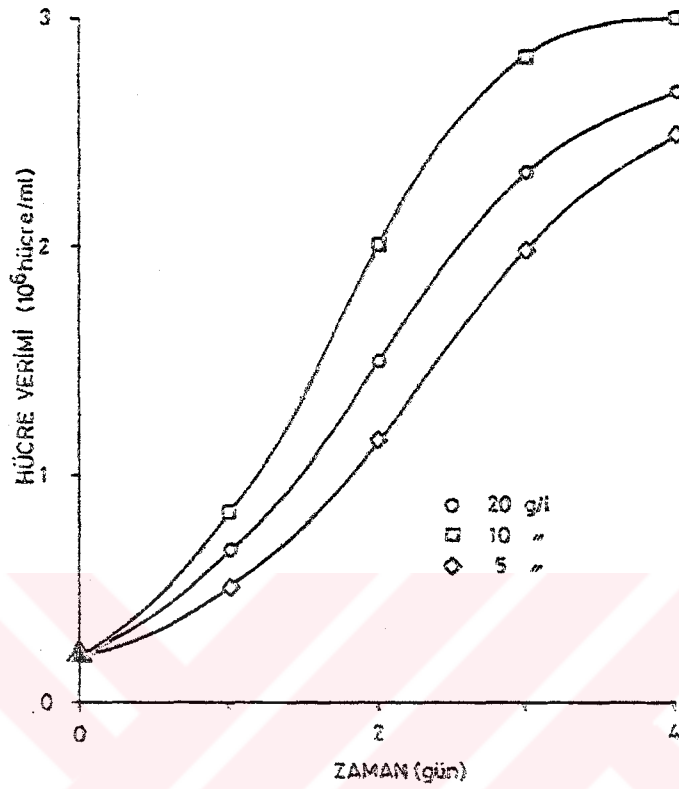
Sekil 4.18. İnokülasyon Yoğunluğunun Hücre Verimine Etkisi.

Çalışmanın bundan sonraki bölümleri, yukarıda bileşimi verilen PHEMA mikrotasiyıcılarla yapılmıştır.

4.1.4.2.2. Mikrotasiyıcı-Destekli Durgun Kültürlerde Optimum Çalışma Koşullarının Saptanması

Mikrotasiyıcı-destekli kültürlerde hücre verimi, hücre inokülasyon yoğunluğu ve mikrotasiyıcı konsantrasyonuyla ilişkilidir. Yapılan çalışmada, inokülasyon yoğunluğunun hücre verimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, PHEMA mikrotasiyıcı konsantrasyonu 10 g/l değerinde tutularak, üç farklı inokülasyon yoğunluğunda (1×10^5 , 3×10^5 ve 6×10^5 hücre/ml) çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Sekil 4.18'de verilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde, inokülasyon yoğunluğunun 1×10^5 hücre/ml değerinden 3×10^5 hücre/ml değerine yükselmesiyle, inokülasyon süresi sonunda ulaşılan hücre veriminin 1.9×10^6 hücre/ml'den 3.0×10^6 hücre/ml'ye yükseldiği görülmektedir. Ancak, inokülasyon yoğunluğunun daha fazla artırılarak 6×10^5 hücre/ml değerine yükseltilmesi sonucunda



Sekil 4.19. Mikrotasiyıcı Konsantrasyonunun Hücre Verimine Etkisi.

ulaşılan hücre veriminde azalmaya neden olmuştur. BHK hücrelerinin üreme özellikleri ve kültür koşullarının sonucu olarak ortaya çıkan bu durum gözönüne alınarak, optimum inokülasyon yoğunluğu 3×10^5 hücre/ml olarak saptanmıştır.

Mikrotasiyıcı konsantrasyonunun hücre verimi üzerindeki etkisi, 3×10^5 hücre/ml inokülasyon yoğunluğunda, üç farklı mikrotasiyıcı konsantrasyonuyla (5 g/l, 10 g/l, 20 g/l) yapılan hücre-kültür çalışmalarıyla belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Sekil 4.19'da verilmiştir. Ulaşılan hücre verim değerlerinden de görüleceği gibi mikrotasiyıcı konsantrasyonunun 5 g/l değerinden 10 g/l değerine artırılması hücre verimini önemli ölçüde arttırmaktadır. Bu beklenen bir sonuç olup, artan mikrotasiyıcı konsantrasyonunun hücre üremesi için gerekli yüzey alanını, dolayısıyla hücre verimini arttırması şeklinde yorumlanabilir. Ancak, mikrotasiyıcı konsantrasyonu 20 g/l değerine yükseltildiğinde, yüzey alanı daha fazla artmış olmasına rağmen hücre verimi, 10 g/l değerindekinden daha düşük bir değere ulaşmıştır. Bu durum, kültür ortamı yoğunluğunun artması sonucu hücre üremesinin engellenmiş olmasıyla açıklanabilir.

Elde edilen sonuçlar, 3×10^5 hücre/ml inokülasyon yoğunluğunda, 10 g/l konsantrasyonundaki PHEMA mikrotasıyıcılarla çalışılması gerektiğini vurgulamaktadır.

4.1.3.2.3. PHEMA Mikrotasıyıcıların Tekrar Kullanılabilirliğinin Saptanması

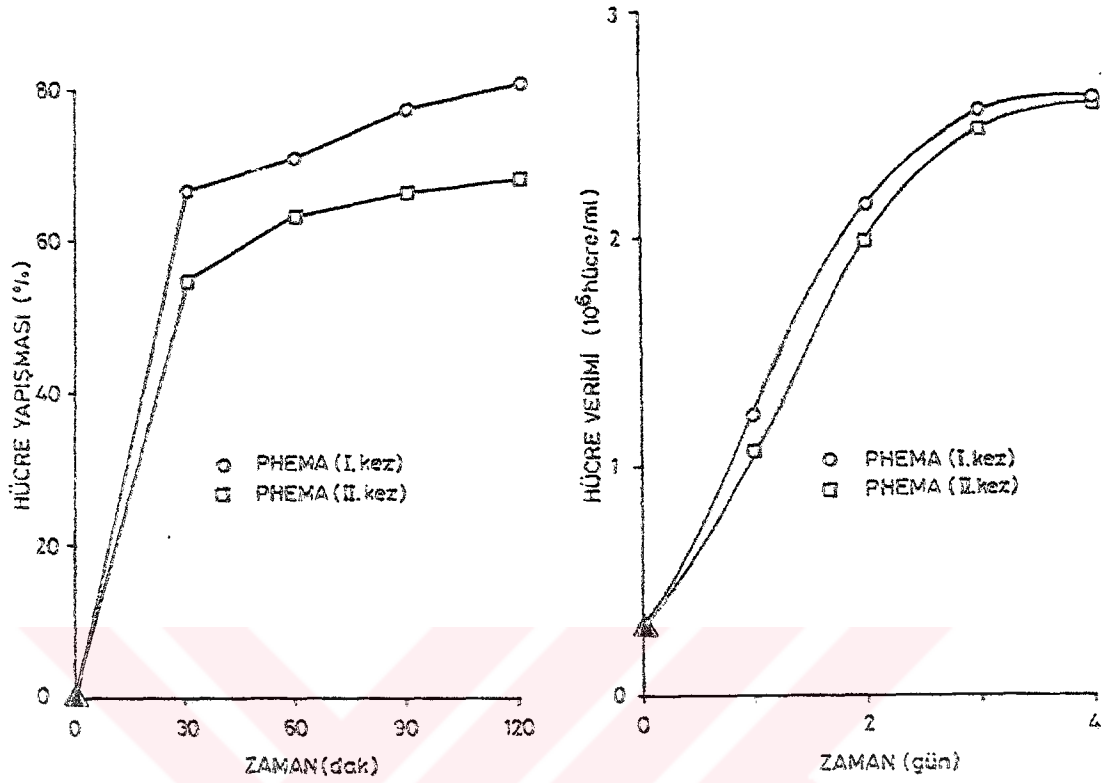
Mikrotasıyıcı-destekli kültür sistemlerinin en önemli dezavantajlarından biri, mikrotasıyıcı kullanımının üretim maliyetini arttırmasıdır. Bu dezavantaj, mikrotasıyıcıların kültür ortamında yeniden kullanılabilirliğiyle ortadan kaldırılabilir. Mikrotasıyıcıların yeniden kullanılabilirliğinde karşılaşılan sorun ise üremiş hücreler yüzeyden kaldırıldıktan sonra, geride kalan artık maddelerin uzaklaştırılabilmesi için mikrotasıyıcıların kuvvetli asidik ve bazik çözeltililerle yıkanmasının gerekli olmasıdır.

Cytodex-1 mikrotasıyıcılarda, yıkama işlemi, pH'daki farklılıklar nedeniyle mikrotasıyıcı matriksi ve yük yoğunluğunu değiştirmekte, bu durumun sonucu olarak da mikrotasıyıcının yeni kültür ortamında ikinci kez kullanımıyla düşük hücre verim değerlerine ulaşılmaktadır.

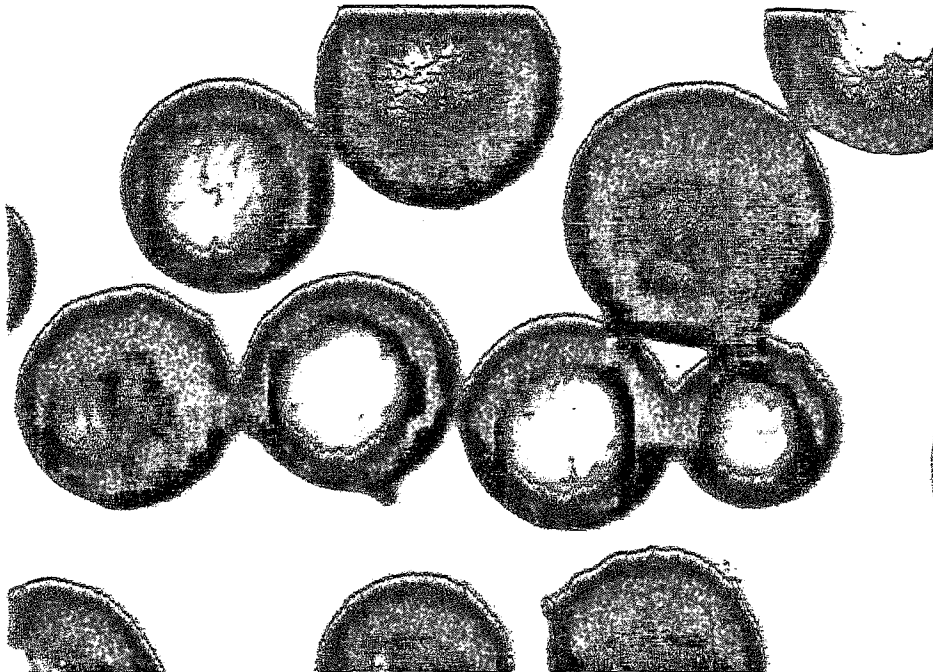
Cytodex-3 mikrotasıyıcıların tekrar kullanılabilirliği söz konusu değildir. Daha önce söz edildiği gibi Cytodex-3 mikrotasıyıcılar kollojen kaplı dekstran matriksden oluşmuştur. Hücrelerin yüzeyden kaldırılması amacıyla kullanılan tripsin, proteolitik bir enzim olduğundan kollojen tabakasını parçalamakta, geride kalan dekstran matriks de hücre yapışma ve üremesini destekleyememektedir.

Yapılan çalışmada, PHEMA mikrotasıyıcıların, durgun kültür koşullarında ikinci kez kullanılabilirliği araştırılmıştır. Şekil 4.20'de PHEMA mikrotasıyıcıların tekrar kullanımıyla ulaşılan hücre yapışma ve üreme değerleri, ilk kez kullanımdaki değerlerle karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. İkinci kez kullanımda, hücrenin yüzeye yapışma hızı ilkinen oranla azalmış, ancak üreme eğrilerinde belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuç, PHEMA matriksin kimyasal kararlılığı nedeniyle, tripsinizasyon ve yıkama işlemlerinden etkilanmemesiyle açıklanabilir.

Şekil 4.21'de kültür ortamında ikinci kez kullanılan mikrotasıyıcılarda hücre üremesini gösteren optik fotoğraf verilmiştir.



Şekil 4.20. PHEMA Mikrotasıyıcıların İkinci Kez Kullanımı
a) Hücre Yapışması : b) Hücre Üremesi



Şekil 4.21. İkinci Kez Kullanılan PHEMA Mikrotasıyıcılarda Hücre Üremesi.

4.1.4.2.4. Mikrotasıyıcıdan-Mikrotasıyıcıya Hücre Transferi

Hücre üremesi tamamlanmış mikrotasıyıcılardan, ortama yeni ilave edilen mikrotasıyıcılara hücre transfer işlemi, mikrotasıyıcı-destekli kültür sistemlerinde kullanılacak tohum hücrelerin hazırlanması amacıyla döner siseli sistemlerin gerekliliğini ortadan kaldırması açısından, özellikle büyük kapasiteli sistemler için son derece önemlidir.

Bu çalışmada, PHEMA mikrotasıyıcılarda hücre transferi durgun kültür ortamında incelenmiştir. Hücre üremesinin tamamlandığı kültür ortamına yeni mikrotasıyıcılar ve taze ortam ilave edildiğinde, BHK hücrelerinin eski mikrotasıyıcılar üzerinde üremeye devam ederek, yeni mikrotasıyıcılar üzerine yayıldıkları ve burada üreyerek, mikrotasıyıcı yüzeyini kapladıkları gözlenmiştir. Şekil 4.22'de yer alan optik fotoğrafta bu durum açıkça görülmektedir. Fotoğrafta kolaylıkla ayırtedilebilmesi için tohum mikrotasıyıcı olarak 300 µ capındaki PHEMA mikrotasıyıcılar kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmayla, üzerinde üreme tamamlanmış PHEMA mikrotasıyıcıların tohum mikrotasıyıcı olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, sözü edilen mikrotasıyıcılar +4°C'da 1 hafta süreyle bekletildiklerinde de hücre canlılığının korunduğu gözlenmiştir.

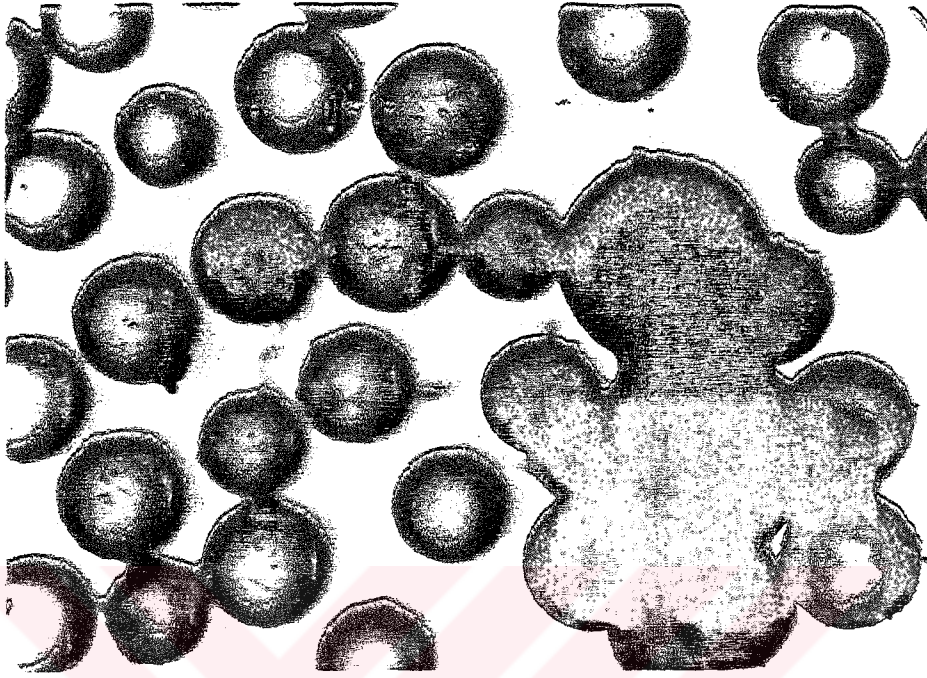
4.1.4.3. Mikrotasıyıcı-Destekli Süspans Kùltür Ortamındaki Çalışmalar

Mikrotasıyıcı-destekli süspans kùltür çalışmaları durgun kùltür ortamında septanan optimum koşullarda yapılmıştır. Çalışmalarda, 100 ml hacmindeki "spinner flask" türündeki reaktörlerde 50 ml kùltür ortamı kullanılmıştır. Reaktörün yarı kapasitede çalıştırılmasının nedeni, reaktör üst boşluğunda yer alan hava ile, hücre üremesi için gerekli olan karbondioksit ve oksijen gazlarının sağlanmasıdır.

Durgun kùltür ortamında yapılan hücre kùltür çalışmaları, 3×10^5 hücre/ml inokùlasyon yoğunluğunun optimum değer olduğunu göstermesine rağmen, süspans kùltür koşullarında daha yüksek hücre yoğunluğunda çalışılmasının gerekli oluşu nedeniyle, çalışmanın bu bölümü 6×10^5 hücre/ml inokùlasyon yoğunluğunda yürütülmüştür.

Çalışmada öncelikle uygun karıştırma hızının saptanması amaçlanmıştır. Süspans kùltürlerde karıştırmanın nedenleri şu şekilde sıralanabilir.

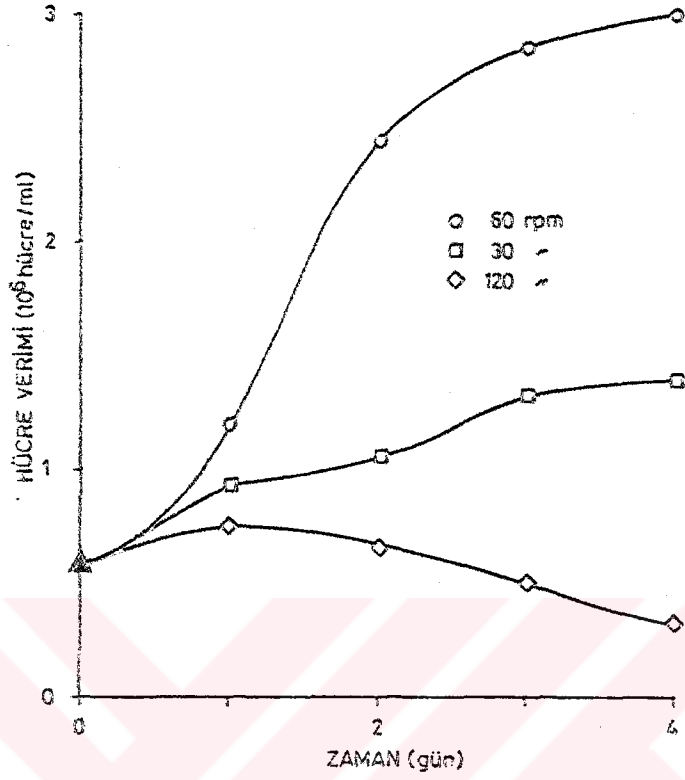
- Homojen kùltür ortamı oluşturmak
- Kùltür ortamı ve reaktör üst boşluğu arasındaki gaz transferini kolaylaştırmak
- Hücre üremesi sonucu mikrotasıyıcıların cökmesini önlemek.



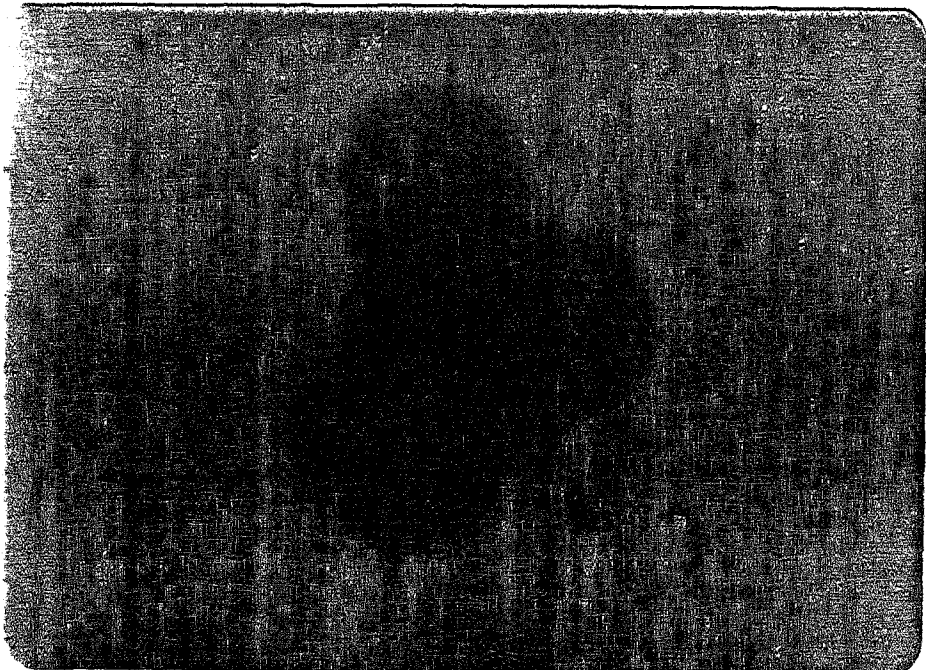
Sekil 4.22. PHEMA Mikrotasıyıcılarda Hücre Transferi.

Dolayısıyla kültürün karıştırılma hızı, hücre verimini etkileyen önemli bir parametredir. Bu etkiler gözönüne alınarak, PHEMA mikrotasıyıcılarla yapılan süspanse kültür çalışmalarında karıştırma hızı, 30, 60 ve 120 rpm olarak değiştirilmiş ve böylelikle karıştırma hızının hücre üremesi üzerindeki etkisi saptanmıştır. Sekil 4.23'de bu etkiler gösterilmiştir.

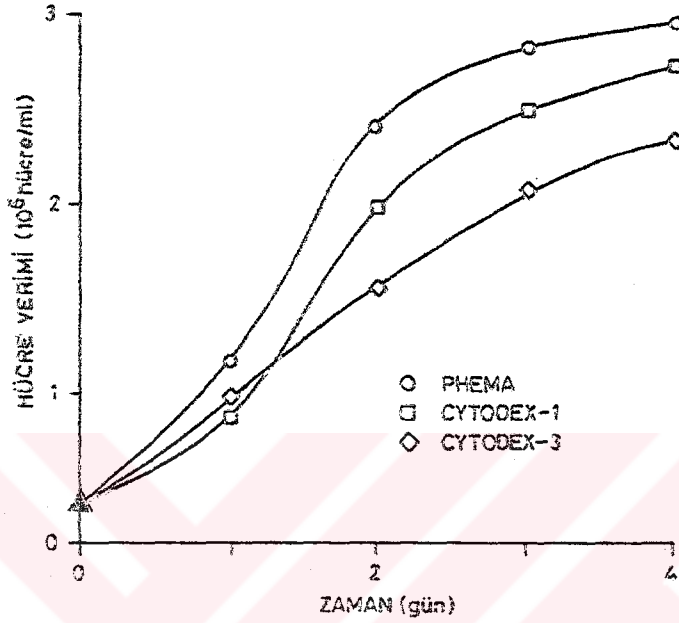
Sekil 4.23'deki değişik karıştırma hızlarına ait eğrilerden de görüleceği gibi, karıştırma hızı 60 rpm değerindeyken en yüksek hücre verimine ulaşılmıştır. 30 rpm hız değeri hücre üremesi için yetersiz olmuştur. Düşük karıştırma hızları, kayma kuvvetlerini azaltarak hücrelerin mikrotasıyıcı yüzeyine yapışmasını kolaylaştırmasına rağmen, gaz transferinin yetersiz kalışı ve mikrotasıyıcıların çökmesi nedenlerinden dolayı uygun bulunmamıştır. Karıştırma hızı 120 rpm değerine yükseltildiğinde hücrelerin yüzeye tutunamayarak kopması sonucunda hücre verimi düşmüştür. Sekil 4.24'de karıştırma hızı 120 rpm değerindeyken hücrelerin mikrotasıyıcı yüzeyinden dökülmesini gösteren optik fotoğraf verilmiştir. Fotoğrafta, mikrotasıyıcıların çevresindeki küçük siyah küreler, yüzeyden dökülmüş hücreleri göstermektedir.



Şekil 4.23. Mikrotasıyıcı-Destekli Süspanse Kültürde Karıştırma Hızının Hücre Üremesine Etkisi.



Şekil 4.24. Mikrotasıyıcı Yüzeyinden Hücre Dökülmesi.

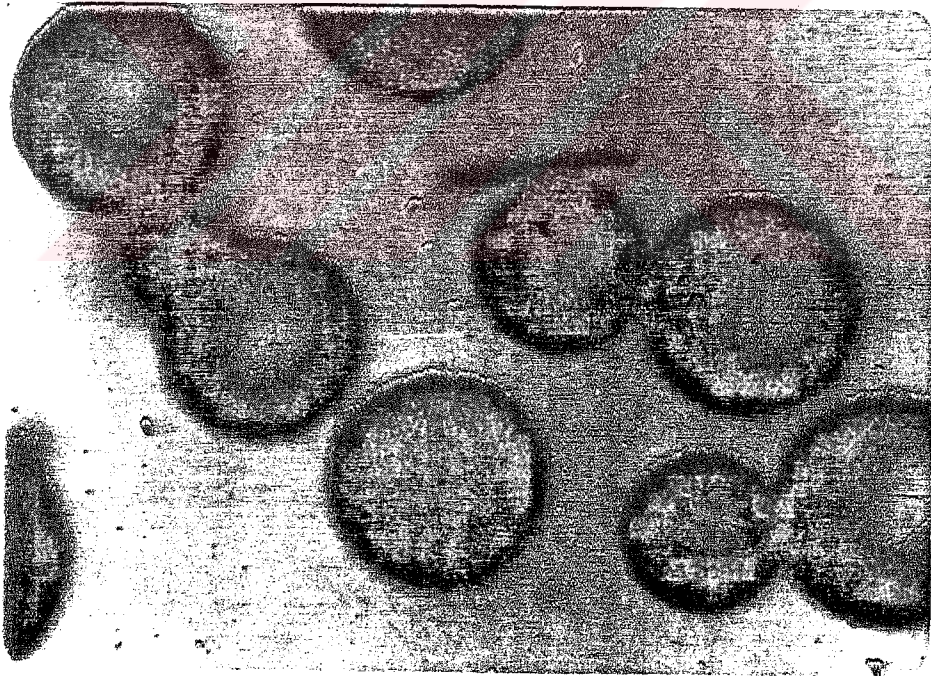
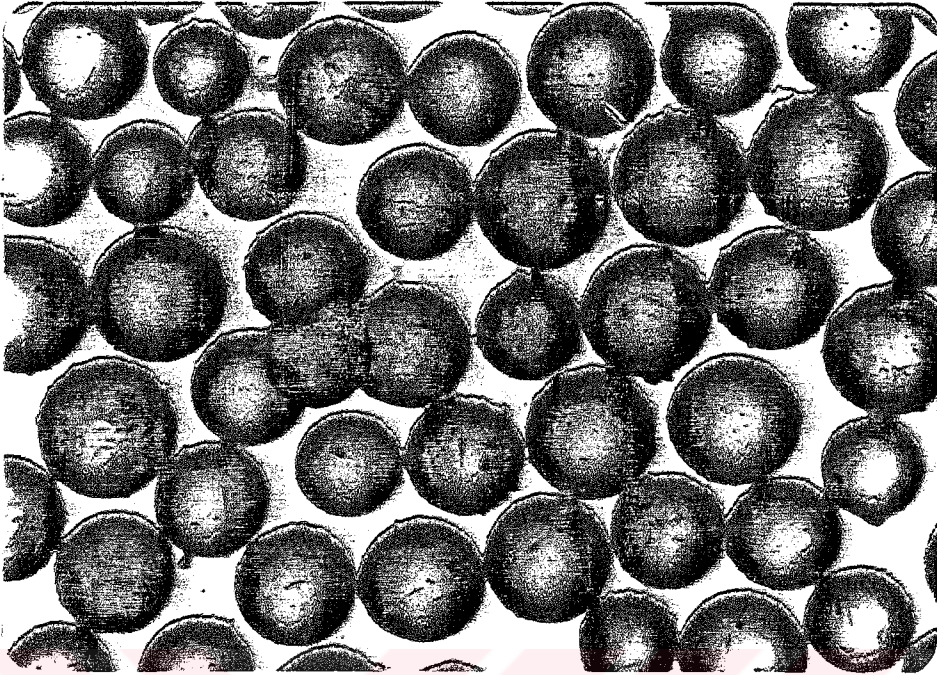


Şekil 4.25. Mikrotasıyıcı-Destekli Süspanse Kültürde Hücre Üremesi.

Süspanse kültür ortamında, 60 rpm karıştırma hızında PHEMA ve Cytodex mikrotasıyıcılarla yapılan çalışmaların sonucunda Şekil 4.25'de görülen hücre üreme eğrileri elde edilmiştir. Eğrilerden görüleceği gibi, çalışılan kültür koşullarında, PHEMA mikrotasıyıcılarla, Cytodex mikrotasıyıcılara göre daha yüksek hücre verimine ulaşılmıştır.

Şekil 4.26'da süspanse kültürdeki PHEMA mikrotasıyıcılarda hücre yapışması ve üremesini gösteren fotoğraflar verilmiştir. Şekil 4.27'de ise Cytodex mikrotasıyıcılardaki yapışma ve üreme fotoğraflarına yer verilmiştir.

PHEMA mikrotasıyıcılarda gerçekleştirilen süspanse kültür çalışmalarında elde edilen sonuçlar, Bölüm 3.3.2'de açıklanan döner şişeli sistemlerde elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış (Çizelge 4.8) ve mikrotasıyıcı-destekli sistemle, hücre veriminde 3-90'lık bir artış olduğu görülmüştür.



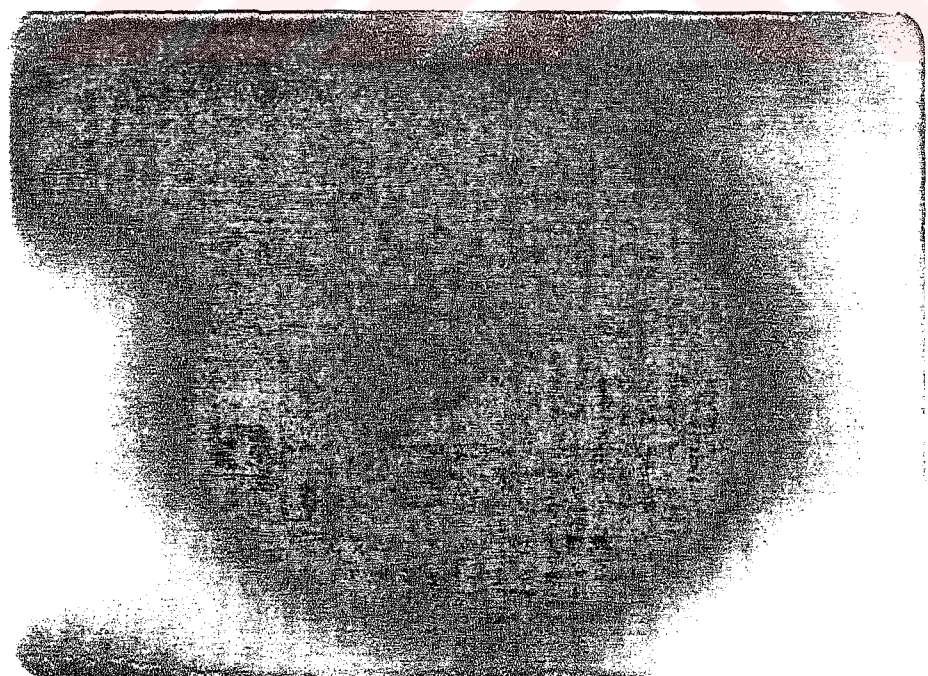
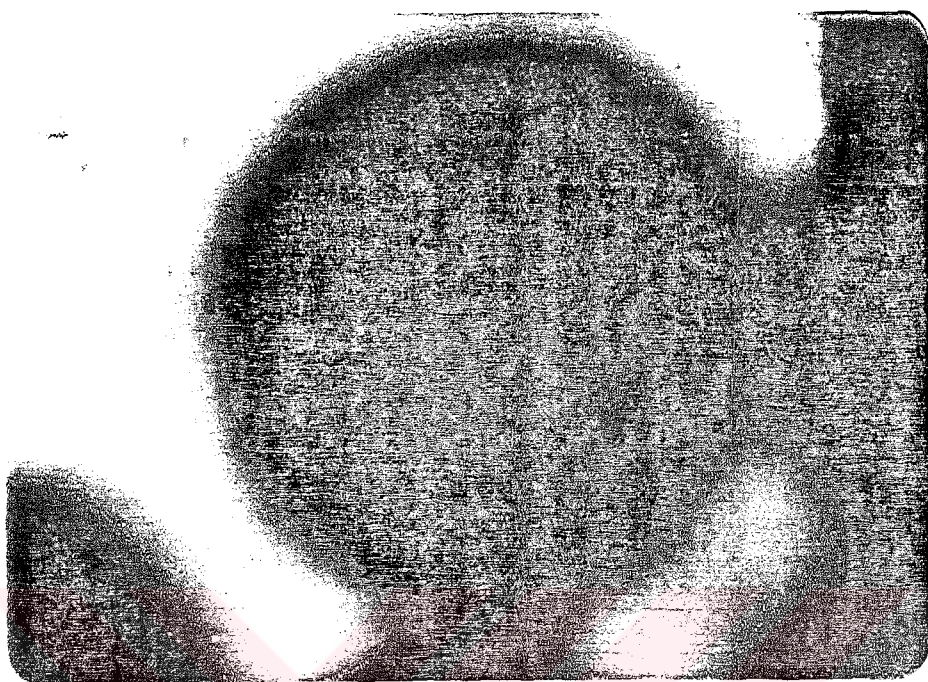
Sekil 4.26. PHEMA-Destekli Süspansiyon Kültürde Hücre Yapışması ve Üremesi

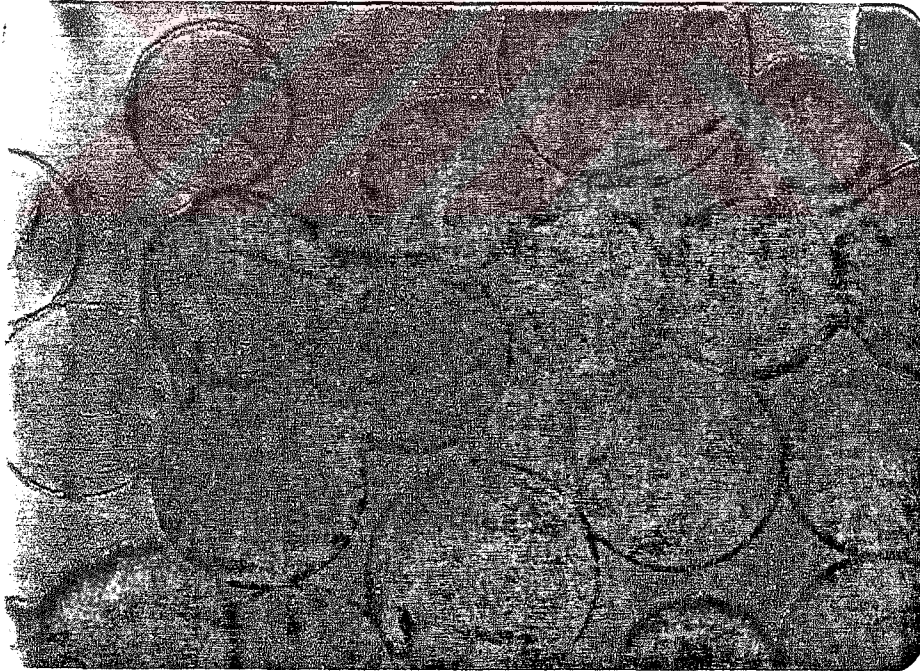
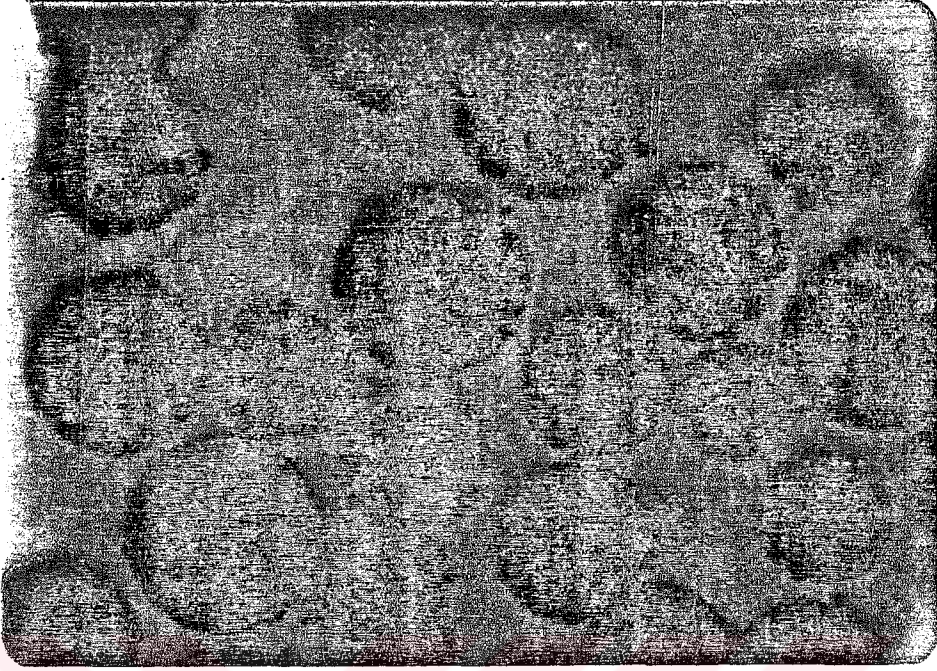
a) Hücre Yapışması (4. saat)

b) Hücre Yayılması (12. saat)

c) Hücre Üremesi (48. saat)

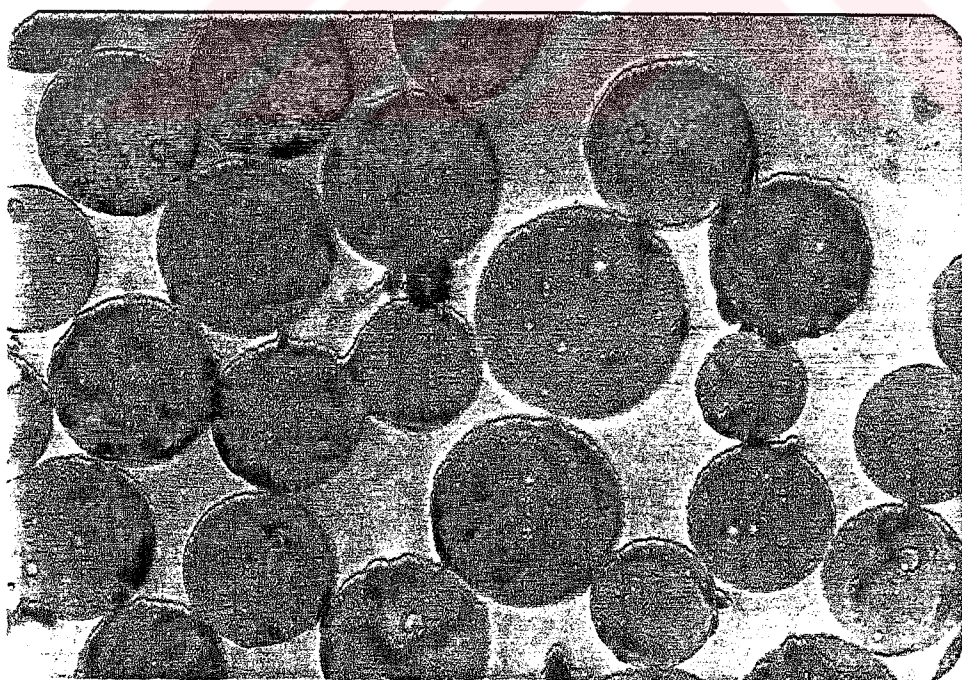
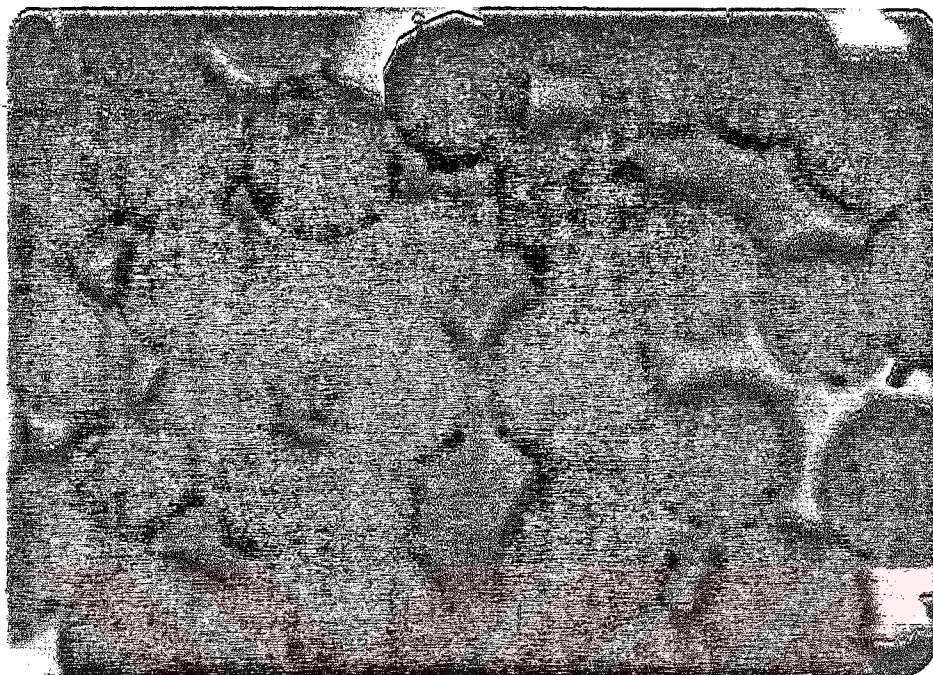
d) Hücre Üremesi (48. saat: boyanmamış)





Şekil 4.27. Cytodex-destekli Süspanse Kültürde Hücre Yapışması ve Üremesi

- a) Cytodex-1'de Hücre Yapışması (6. saat)
- b) Cytodex-1'de Hücre Üremesi (48.saat)
- c) Cytodex-3'de Hücre Yapışması (6. saat)
- d) Cytodex-3'de Hücre Üremesi (48.saat)



Cizzege 4.8. PHEMA Mikrotasıyıcı-Destekli Süspansiyon Kültür Reaktörü ve Döner Şişeli Sistem Hücre Verim Değerlerinin Karşılaştırılması.

Sistem	Inokülasyon Yoğunluğu ($\times 10^{-5}$)/ml	Hücre Verimi ($\times 10^{-6}$)/ml
Döner Şişe	6	1.65
PHEMA Mikrotasıyıcı- Destekli "Spinner Flask"	6	3.00

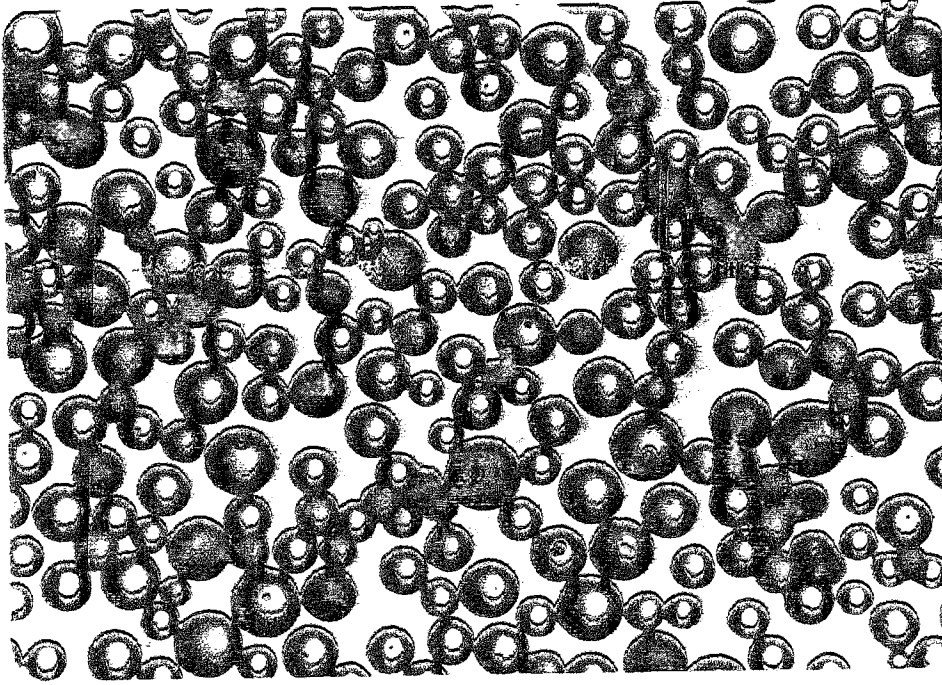
4.2. POLİSTİREN MİKROTASIYICILAR

4.2.1. PS Mikrotasıyıcı Seçimi ve Yüzey Modifikasyonu

Hücre kültür çalışmalarının yürütüldüğü polimerik materyaller arasında, en uygun fiziksel özelliklere sahip bulunması nedeniyle birinci sırayı polistiren almakta ve çok çeşitli hücresel ürünlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır [127]. Polistiren petri kaplarının hücre kültüründe kullanımı 1965'lerde başlamıştır. Ancak, üretici firmalar tarafından da açıklandığı gibi herhangi bir işlem görmemiş PS yüzeyler, hücre yapışmasına izin vermedikleri için hücre üremesini de desteklemezler. Bu durum, PS'nin yüzey kimyasından kaynaklanmaktadır. Yüzeyin hücre yapışma ve yayılması açısından uygun hale getirilmesi, kısacası yüzey modifikasyonu, çeşitli kimyasal işlemlerle gerçekleştirilmektedir. Bunlar arasında sülfürik asitle sülfolama, kromik asitle etkileştirme ve plazma polimerizasyon yöntemleri sayılabilir [30-33, 128-130]. Doku kültür amaçlı PS petri kaplarının, bakteriyolojik petri kaplarının plazma polimerizasyon tekniği kullanılarak modifiye edilmesiyle imal edilmekte olduğu bilinmekte, ancak işlemin spesifikasyonları üretici firmalar tarafından gizli tutulmaktadır. Ayrıca, negatif yüzey yüküne sahip PS mikrotasıyıcılar da ticari olarak geliştirilmiş olup, hücre kültür çalışmalarında başarıyla kullanılmaktadır [131].

Yukarıda açıklanan bu durumlar gözönünde bulundurularak, yapılan çalışmada PHEMA mikrotasıyıcıların yanısıra PS bazlı yeni bir mikrotasıyıcı türünün de geliştirilmesi planlanmıştır.

Kimyasal kararlılığı, toksik olmayışı, seffaflığı ve sterilenebilirliği nedeniyle BioRad firması tarafından üretilen % 2 oranında DVB ile çapraz bağlı PS matristen oluşan "Biobeads SX2" isimli küresel partiküllerin taşıyıcı matristen olarak kullanılması uygun görülmüştür. Şekil 4.28'deki optik fotoğraf PS partiküllerin boy ve boy dağılımını göstermektedir.



Şekil 4.28. PS Partiküller (Biobeads SX2).

Partikül fizikokimyasal özellikleri Bölüm 3.2'de açıklanan yöntemlerle tayin edilmiş ve Çizelge 4.9'da verilmiştir. Çizelge'deki değerlerden de görüleceği gibi PS partiküller van Wezel tarafından açıklanan optimum mikrotasiyıcı özelliklerinin çoğuna sahiptir.

Çizelge 4.9. PS Partiküllerin Fiziksel Özellikleri.

Çap (μ)	Yoğunluk (g/ml)	Sedimentasyon Hızı (cm / dakika)	Porozite	Şeffaflık
37-74	1.05	4.52	-	+

Ancak, en önemli husus , partikül yüzeyinin mikrotasiyıcı olarak kullanıma elverişli hale getirilmesidir. Bu amaçla, PS partikül yüzeyinin, ilk kez bu çalışmada geliştirilen yeni bir "megafrekans yük besleme tekniği" kullanılarak çeşitli alkilaminlerle kaplanması düşünülmüştür. Böylelikle, yüzeye pozitif yük birikimi sağlanmasının yanısıra yüzey hidrofilik/hidrofobik oranı da istenilen düzeye getirilmesi planlanmıştır.

Çizelge 4.10. Değişik Plazmalarda Renk ve Basınc Değişimi.

Monomer	Plazma Rengi	Sonuç Basınc Değeri (µmHg)	
		Partikül Reaktörü	Film Reaktörü
Trietilamin	Merkezde Pembe	300	400
	Kenarda Mavi		
Alilamin	Mavi-Gri	350	400
Etilendiamin	Pariak Pembe	270	400

Plazma yük bosalım prosesi, materyal yığın yapısını değiştirmeksizin sadece yüzey özelliklerinin modifiye edilmesini sağlayan bir yöntem olup, özellikle biyomateriyallerin yüzey modifikasyonunda başarıyla kullanılmaktadır [132-134]. Bu durum, PS partiküllerin yüzey modifikasyonunda da aynı yöntemin seçimine götürmüştür. Ancak, klasik plazma polimerizasyon reaktörleri, mikron boyutundaki küresel partikül yüzeylerinin homojen bir şekilde kaplanması için uygun olmadığından yeni bir plazma polimerizasyon tekniğinin geliştirilmesi düşünülmüş ve çalışmalar Bölüm 3.1.2.a'da ayrıntılarıyla açıklanan plazma reaktöründe yürütülmüştür.

İlgili literatürde de bulunabileceği gibi, mikrotasiyıcı yüzey yükü, çeşitli amin gruplarının varlığıyla sağlanmaktadır [14]. Yapılan çalışmada üç yeni alkilamin monomeri kullanılarak yüzeyde pozitif yük oluşumu amaçlanmıştır. Şekil 3.2.'deki kimyasal formülasyondan da görüleceği gibi, EDA ve ALAM primer aminler olup, ALAM daha uzun hidrofobik zincire sahiptir. TEA ise tersiyer bir amindir. Böylelikle, amin türünün farklılığından kaynaklanan yüzey özelliklerinin karşılaştırılması ve hücre kültürü üzerindeki etkilerinin incelenmesinin mümkün olacağı öngörülmüştür.

Ayrıca, ileri sürülen bu yöntemin, plazma polimerizasyonu açısından uygunluğu, klasik plazma polimerizasyon reaktöründe aynı koşullarda modifikasyonu gerçekleştirilen PS filmler ile karşılaştırılarak saptanmıştır.

4.2.2. Plazma Polimerizasyon Özellikleri

Plazma polimerizasyonunda, plazma ortamındaki renk ve basınç değişimleri monomer türü için karakteristiktir. Çizelge 4.10'da PS mikrotasiyıcılar ve PS filmler için üç değişik alkilamin plazmasındaki renk ve basınç değişimleri verilmiştir.

Çizelge 4.11. PS Mikrotasıyıcılar ve Filmler.

Örnek Numarası	Monomer	Plazma Kosulları	
		Süre (dakika)	Güç (watt)
1	-	-	-
2	ALAM	1	2.5
3	ALAM	5	2.5
4	ALAM	10	2.5
5	EDA	1	2.5
6	EDA	5	2.5
7	EDA	10	2.5
8	TEA	1	2.5
9	TEA	5	2.5
10	TEA	10	2.5
11	TEA	10	10.0

Çizelge'den de görüleceği gibi, her iki reaktörde, üç ayrı monomer durumunda da plazma rengi aynı kalmaktadır. İşlem sırasında monomer türüne bağımlı olarak basınç artışı oluşmakta ve bu artış, PS filmlerin kaplandığı polimerizasyon reaktöründe diğerine göre daha fazla olmaktadır. Basınç artışı, plazma ortamında monomer moleküllerinin birbirinden ayrılarak, reaktördeki gazın toplam mol sayısını arttırmalarıyla açıklanabilir [118]. PS partiküller, PS filmlerden daha geniş yüzey alanına sahip oldukları için daha fazla aktif plazma bölgesi işgal ederler ve dolayısıyla gaz fazdaki basınç artışı PS filmlere göre daha az olur. Çizelge 4.10. yeniden incelenirse, partikül reaktöründe ALAM plazması durumunda basınç artışının en fazla olduğu, bunu sırasıyla TEA ve EDA plazmalarının izlediği görülür. Film reaktöründe ise monomer türüne bağımlı olarak basınç değişimi oluşmamaktadır.

Sunulan araştırmanın bu bölümünde, alkilamin türünün yanısıra, plazma reaksiyon koşulları, yani, reaksiyon süresi ve RF gücü de değiştirilerek, farklı yüzey özelliklerine sahip PS mikrotasıyıcılar ve filmler hazırlanmıştır. Çizelge 4.11'de PS mikrotasıyıcılar ve PS filmlerin hazırlanma koşulları listelenmiştir.

4.2.3. ESCA Tekniğiyle Yüzey Analizi

Yapılan bu çalışmada, aikilaminlerle modifiye edilmiş PS yüzeylerin atomik bileşimi, dolayısıyla yüzey yapısı ESCA tekniği kullanılarak, Bölüm 3.2.4.b'de anlatılan şekilde analiz edilmiştir.

4.2.3.1. PS Mikrotasıyıcıların Yüzey Analizi

Sekil 4.29'da, 8,9 ve 10 numaralı PS mikrotasıyıcılara ait ESCA spektrumları örnek olarak verilmiştir. Piklerden görüleceği gibi yüzeyde C ve O elementlerinin yanısıra, aikilamin yapısından kaynaklanan N bulunmaktadır.

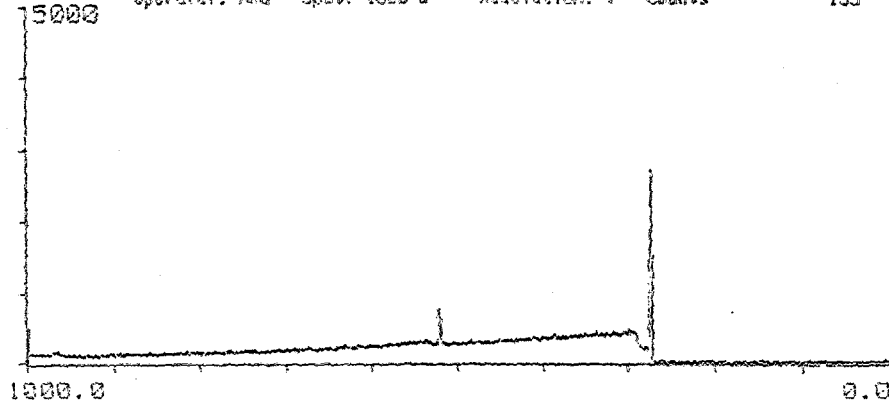
Cizelge 4.12'de PS mikrotasıyıcıların ESCA ile tayin edilen atomik bileşimleri verilmiştir. Yüzeyi plazmayla modifiye edilmemiş olan PS partiküller kontrol amacıyla kullanılmış ve ESCA analiz sonuçlarına göre yüzeyinde karbona ilaveten, oksijen ve silikon'un varlığı da gözlenmiştir. Bunlardan silikonun laboratuvar işlemleri sırasındaki kontaminasyon sonucunda ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. Partiküllerin amin plazmasıyla modifikasyonu, yüzeyde azot varlığına ve oksijen miktarının artmasına neden olmuştur. Yüzeyde oksijen varlığı çeşitli şekillerde açıklanabilir. Başlangıç monomerlerinin tamamen degaze edilememiş olması, reaktör çeperlerine adsorplanmış suyun varlığı ya da reaktörde olabilecek ufak kaçaklar bunlar arasında sayılabilir. Diğer bu açıklama ise, reaktör açıldığında, atmosferik oksijenin partikül yüzeyinde serbest radikaller oluşturmalarıdır. Plazma polimerizasyonu ile ilgili daha önceki çalışmalar incelendiğinde de, başlangıç monomeri oksijen içermemesine rağmen, sonucdaki polimerin genellikle oksijen içerdigi görülmüştür [135].

Cizelge 4.12 incelenilecek olursa, TEA plazmasında, plazma gücünün 2.5 Watt'den 10 Watt'a arttırılması, partikül yüzeyindeki azot bileşiminin % 5.1'den % 12.7'e yükselmesine neden olmuştur. Yüzeydeki oksijen miktarı da % 5.6'dan % 9.5'a yükselmiştir. Bu sonuç, plazma gücündeki artışın aktif merkez sayısını arttırması ve dolayısıyla partikül yüzeyindeki birikimin artmasına neden olmasıyla açıklanabilir.

Sekil 4.30'da reaksiyon süresindeki artışla, mikrotasıyıcı yüzeyinde biriken azot miktarı arasındaki ilişki her bir monomer için verilmiştir. Grafik'deki eğrilerden de görülebileceği gibi, reaksiyon süresinin artışı, yüzeyde daha fazla miktarda azot birikimine neden olmaktadır.

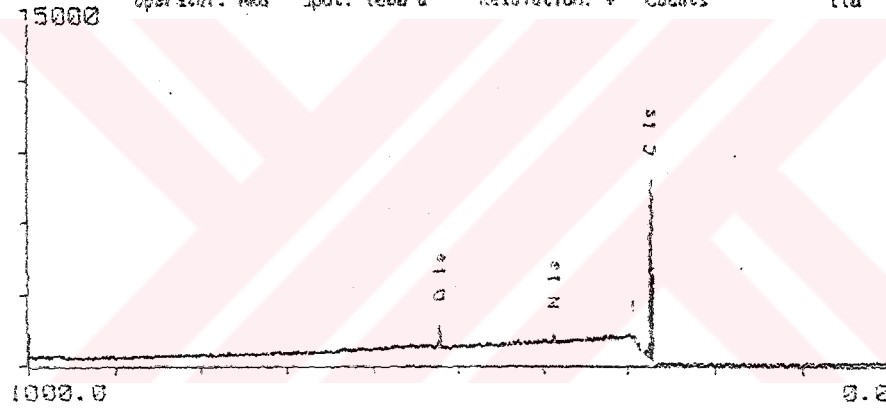
Wednesday 8/5/1987
 07:22:08
 POLYSTYRENE/TRIETHYLAMINE/250w/2.5W/min/LONG
 Operator: WPG Spot: 1000 u Resolution: 4

of Scans 1
 Flood Gun 5.0
 eV 999.02
 Counts 155



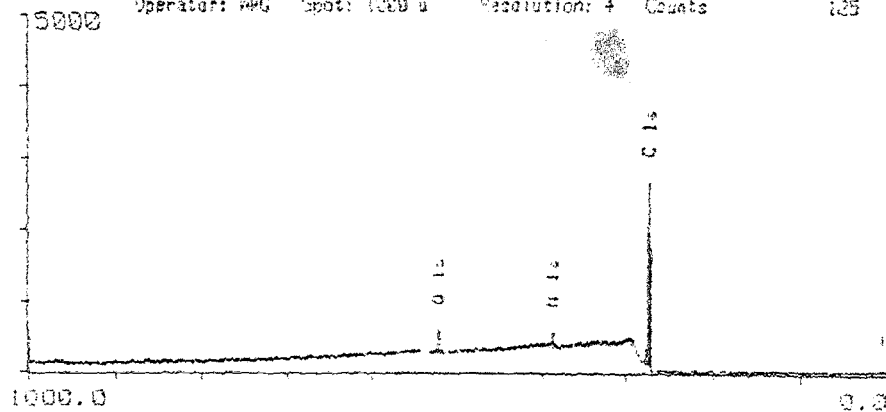
Wednesday 8/5/1987
 07:25:44
 POLYSTYRENE/TRIETHYLAMINE/250w/2.5W/5min/SHORT
 Operator: WPG Spot: 1000 u Resolution: 4

of Scans 1
 Flood Gun 5.0
 eV 999.02
 Counts 110



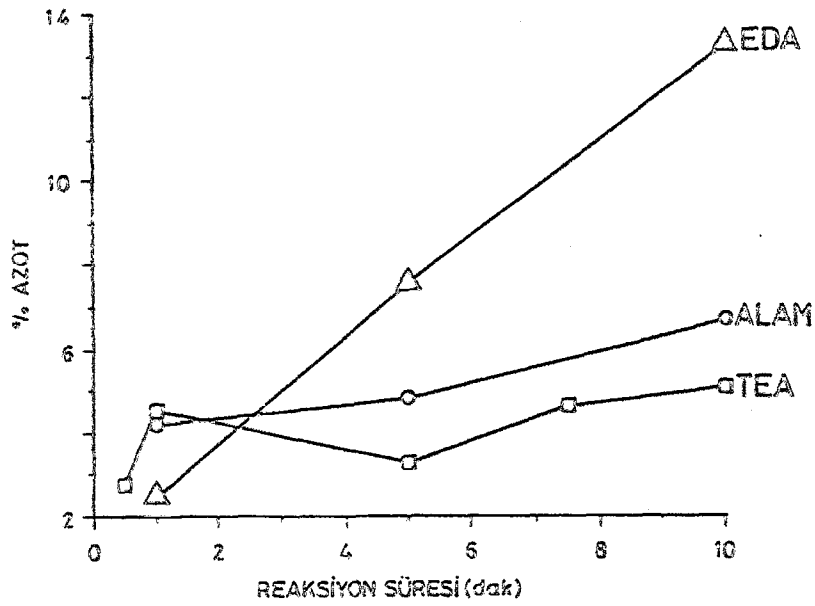
Wednesday 8/5/1987
 07:29:13
 POLYSTYRENE/TRIETHYLAMINE/250w/2.5W/10min/SHORT
 Operator: WPG Spot: 1000 u Resolution: 4

of Scans 1
 Flood Gun 5.0
 eV 999.02
 Counts 125



Sekil 4. 29. PS Mikrotastiyicilara Alt ESCA Spektrumları

- (a) TEA; 1 dakika; 2.5 W (8 numaralı PS)
- (b) TEA; 5 dakika; 2.5 W (9 numaralı PS)
- (c) TEA; 10 dakika; 2.5 W (10 numaralı PS)



Sekil 4.30. PS Mikrotasıyıcılarında Plazma Reaksiyon Süresiyle Yüzey N Bileşiminin Değişimi.

Çizelge 4.12. PS Partiküllerin Yüzey Atomik Bileşimi.

Monomer	Reaksiyon Süresi (dakika)	Atomik Bileşim (%)			
		Si	C	O	N
Kontrol		1.7	93.5	4.8	
Trietilemin	0.5	2.3	87.8	7.1	2.8
	1.0		86.0	9.5	4.5
	5.0		90.6	6.1	3.3
	7.5		89.4	6.0	4.6
	10.0		89.3	5.6	5.1
*	10.0		77.8	9.5	12.7
Allilamin	1.0		89.1	6.7	4.2
	5.0		86.8	8.4	4.8
	10.0		86.5	6.8	6.7
Etilendiamin	1.0		89.4	8.1	2.5
	5.0		82.4	10.0	7.6
	10.0		75.0	11.7	13.3

* 250 μ Hg / 10 Watts

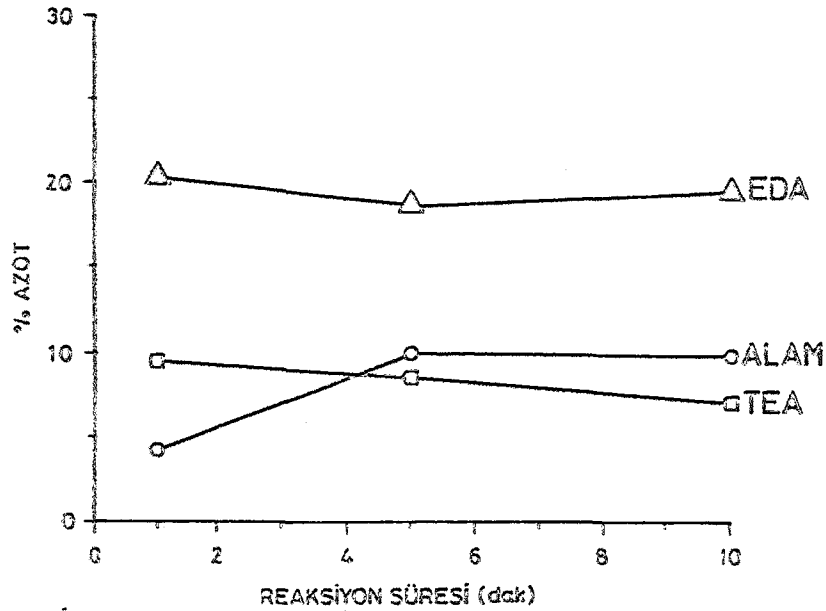
Çizelge 4.13. PS Filmlerin Yüzey Atomik Bileşimi.

Monomer	Reaksiyon Süresi (dakika)	Atomik Bileşim (%)				
		Si	S	C	O	N
Kontrol				98.7	1.3	
Trietilamin	1.0	1.7	1.1	74.6	13.1	9.5
	5.0	1.9	1.0	75.2	13.4	8.5
	10.0	4.4	1.0	72.3	15.2	7.1
Alilamin	1.0	5.1	1.3	75.7	13.7	4.2
	5.0	1.0	1.2	73.6	14.3	9.9
	10.0	1.8		73.9	14.5	9.8
Etilendiamin	1.0		2.4	61.5	15.8	20.3
	5.0		1.9	64.6	14.7	18.8
	10.0	3.1	1.0	64.9	11.4	19.4

Plazma gücü 2.5 Watt değerindeyken 10 dakikalık reaksiyon sonucunda, EDA plazmasında modifiye edilen mikrotasıyıcının yüzey azot %'si 12.7 iken, ALAM ve TEA plazmalarında sırasıyla 6.7 ve 5.1'dir. Bu farklılığın nedeni, monomerlerin Şekil 3.2'de verilen kimyasal yapıları incelendiğinde açıkça görülmektedir. EDA molekülü 2 azot atomu içermesine karşılık, ALAM ve TEA molekülleri sadece 1 azot atomuna sahiptir. Dolayısıyla, EDA plazması, ALAM ve TEA'e göre daha fazla aktif azot merkezi taşımaktadır. Şekil 4.30'daki herbir eğrinin eğim değeri, polimer birikim hızı olarak ifade edilir ve 3 eğri karşılaştırıldığında, EDA plazmasında polimer birikim hızının TEA ve ALAM plazmalarından çok daha yüksek olduğu kolaylıkla görülebilir.

4.2.3.2. PS Filmlerin Yüzey Analizi

Çizelge 4.13'de PS filmlere ait ESCA analiz sonuçları verilmiştir. Kontrol amacıyla kullanılan PS film yalnızca karbon ve az miktarda oksijen içermektedir. Plazma polimerizasyon işlemi sonucunda elde edilen tüm yüzeyler ise, azot, silikon, kükürt ve oksijen içermektedir. Oksijenin varlığı, önceki bölümde partikül yüzeyindeki oksijen varlığıyla aynı şekilde açıklanabilir. Silikon ve kükürt çok az miktarlarda olup, tamamıyla laboratuvar koşullarındaki kontaminasyondan kaynaklanmaktadır.



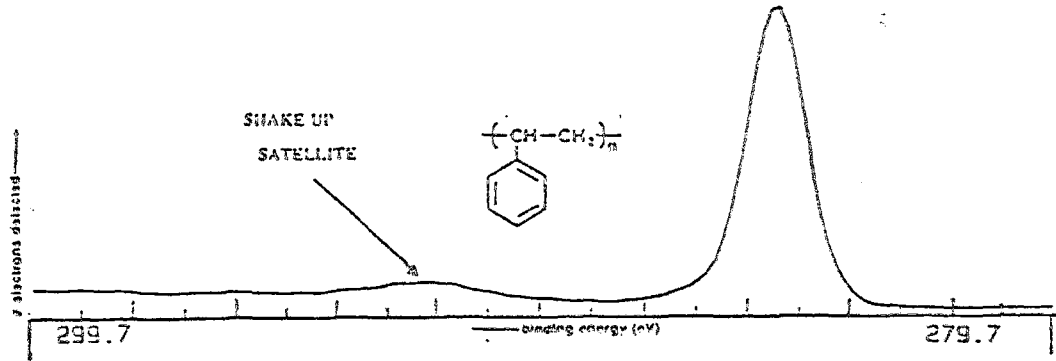
Şekil 4.31. PS Filmlerde Plazma Reaksiyon Süresiyle Yüzey Azot Bileşiminin Değişimi.

Şekil 4.31'de plazma reaksiyon süresinin film yüzeyinde biriken azot bileşimine etkisi gösterilmiştir. Eğrilerden görüleceği gibi, reaksiyonun yaklaşık beşinci dakikasında tüm yüzeylerdeki azot miktarı maksimum değere ulaşmaktadır. En yüksek azot yüzdesine (% 20) EDA plazmasıyla ulaşılmaktadır. Bu eğilim, PS partiküllerdekiyle aynı olmasına rağmen, film durumunda, yüzey azot bileşiminin çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Ulaşılan bu sonuçlar aşağıda verilen "yüksek ayrışım C1s" spektrumlarıyla yorumlanabilir.

4.2.3.3. Yüksek Ayrışım C1s Spektrumları

Yüksek ayrışım C1s spektrumları, PS film ve mikrotasıyıcıların plazma polimerizasyonu ile kaplanması sırasındaki farklılıkları iyi bir şekilde açıklamaktadır. Şekil 4.32'de yüzeyi modifiye edilmemiş PS partikülü örneğin C1s spektrumu gösterilmiştir. Modifiye edilmemiş PS film için de aynı spektrum elde edilmiştir.

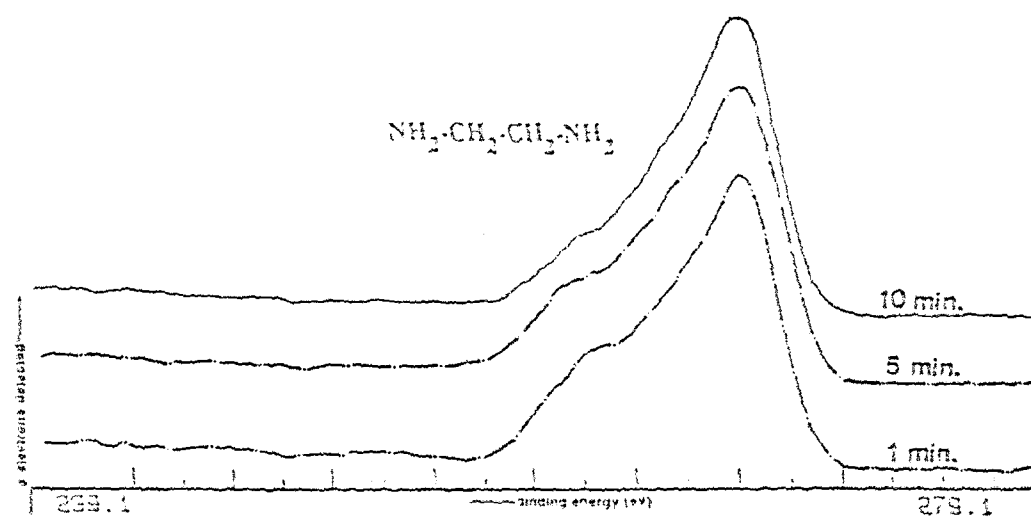
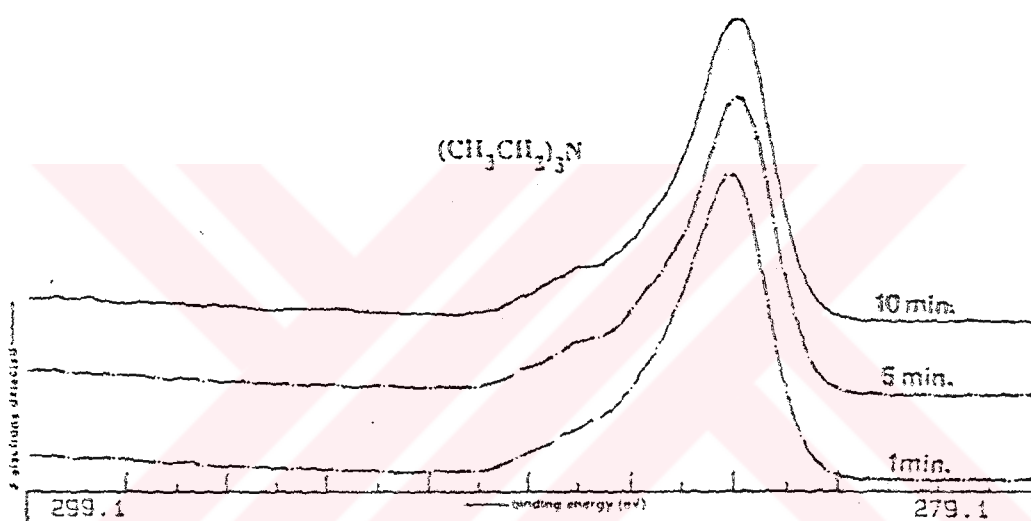
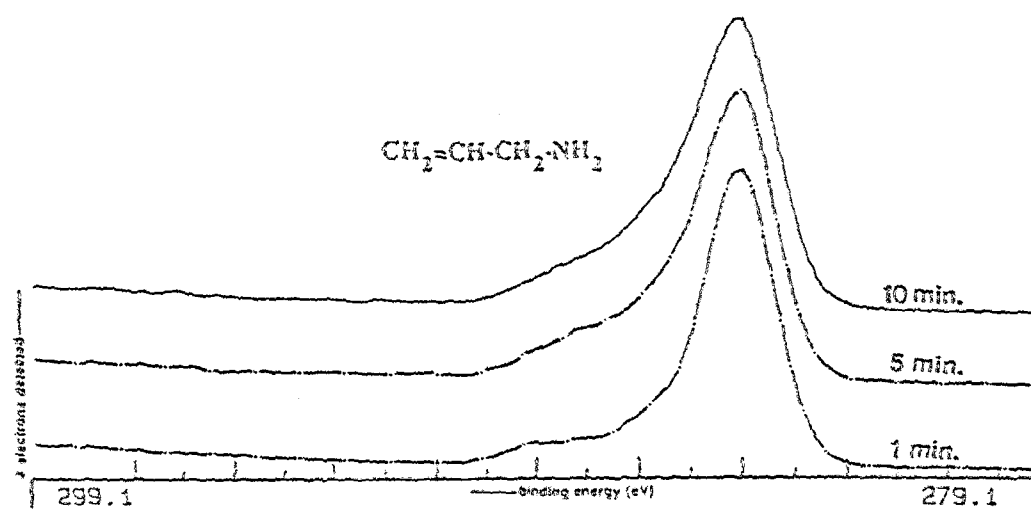
Spektrumda açık olarak iki pik görülmektedir. Bunların ilki, 285 eV'da görülen dar bir pik olup, PS'deki alkil ve aromatik C-C gruplarına aittir. 292 eV'daki daha geniş yer tutan pik "yeniden düzenlenmiş uydu pik" (shake up satellite) olarak adlandırılır. ESCA yönteminde, bir atomdan merkezi elektronun ayrılması, değerlik elektronlarının elektronik alandan yeniden düzenlenmesiyle birlikte gerçekleşir. Elektronların bu şekilde seviye değiştirmesi "shake up" prosesi olarak adlandırılır [136]. Bu proses Şekil 4.32'de görülen pikin varlığına



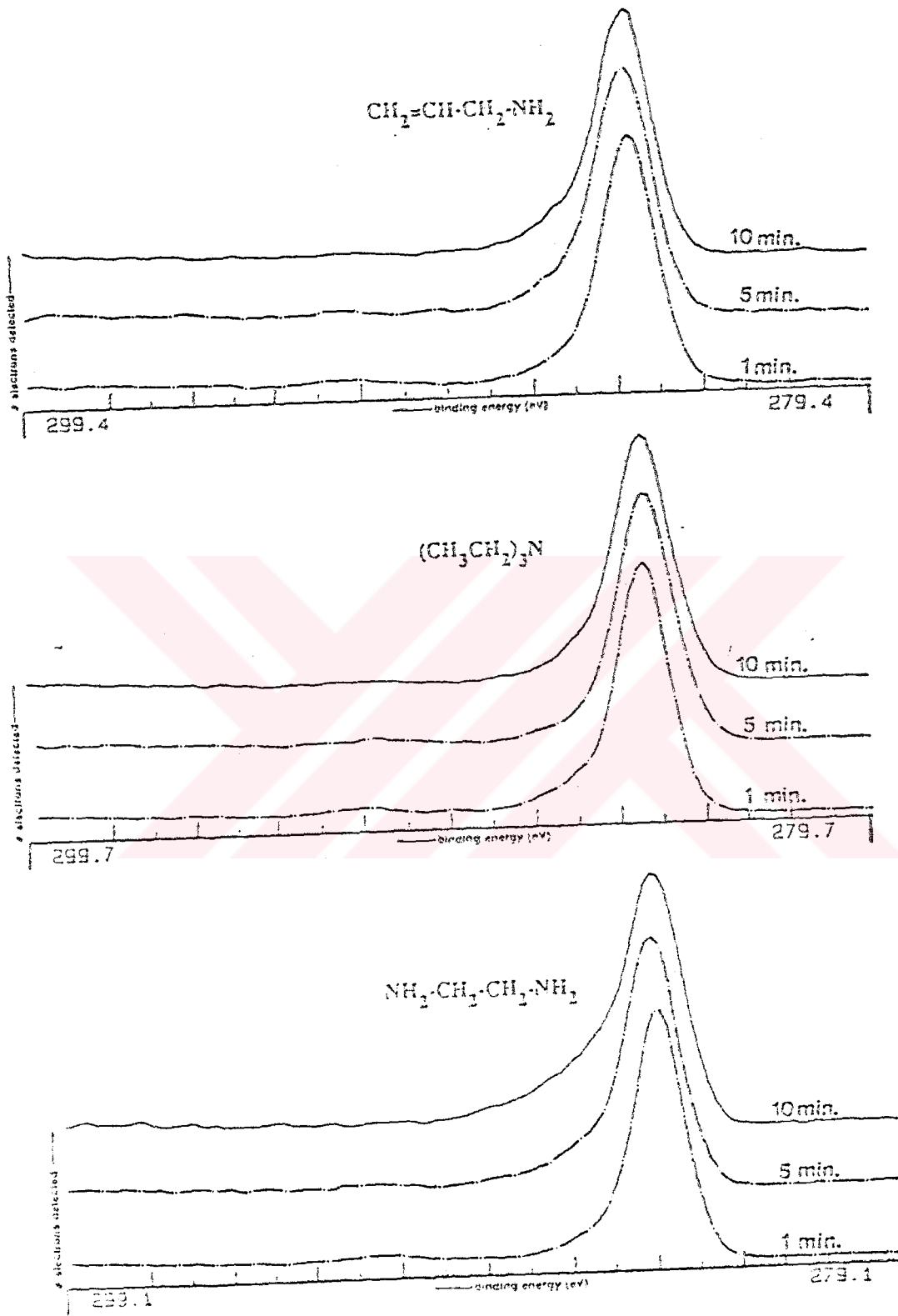
Şekil 4.32. Modifiye Edilmemiş PS Partiküle ait C1s Spektrumu.

neden olur. Plazmayla polimerleştirilmiş film kaplamalar, genellikle böyle bir pike neden olabilecek gruplar içermediklerinden, bu pik yüzey kaplamasını çok iyi bir şekilde ifade eder. Pikin yokoluşu, substrat yüzeyinin kaplandığının göstergesidir. Şekil 4.33, 1, 5 ve 10 dakikalık sürelerde üç tür amin monomeriyle modifiye edilmiş PS filmlere ait yüksek ayrışım C1s spektrumlarını göstermektedir. Bu spektrumla kontrol PS örneğine ait spektrum (Şekil 4.32.) arasındaki en çarpıcı farklılık, 285 eV'deki hidrokarbon pikinin yüksek enerjili kısmındaki çıkıntının varlığıdır. Bu pik plazmayla polimerleştirilmiş polimer filmindeki amin grubundan kaynaklanmaktadır ve EDA plazmasındaki 1, 5 ve 10 dakikalık reaksiyonlarda büyüklük açısından sabit kalmaktadır. TEA ve ALAM plazmalarında ise, reaksiyon süresi 1 dakika'den 5 dakikaya uzatıldığında pik'de belirgin bir büyüme gözlenmekte, fakat 5 dakikadan sonra süre uzatıldığı halde pik boyutunda herhangi bir değişim gözlenmemektedir. Bu durum, polimerizasyon reaksiyonunun ilk 5 dakikasında yüzeyin alkilaminle tamamen kaplandığını göstermektedir. 10 dakikalık reaksiyon süresine ait spektrumlarda "shake up satellite" pikinin bulunmaması da bu sonucu desteklemektedir.

Şekil 4.34, 3 tür alkilaminle, farklı sürelerde modifiye edilmiş PS partiküllere ait yüksek ayrışım C1s spektrumlarını göstermektedir. 1 dakikalık reaksiyon süresi sonucunda tüm örneklerdeki amin piki çok zayıftır. 285 eV'deki çok dar hidrokarbon piki PS için karakteristik piktir ve tüm örneklerde "shake up satellite" piki belirgin bir şekilde yer almaktadır. Bu spektruma dayanarak, 1 dakikalık sürede partikül yüzeyinin çok az bir bölümünün kaplanmış olduğu kolaylıkla söylenebilir. Kaplama süresi 5 dakikaya çıkarıldığında amin pikinin siddeti artmış ve "shake up satellite" piki zayıflamıştır. Süre 10 dakikaya çıkarıldığında ise, tüm spektrumlarda amin piki belirginleşmiş, "shake up satellite" piki ise yokolmuştur. Fakat, amin piki yine de PS filmlerdekine göre genişliğe ulaşamamakta, dolayısıyla PS mikrotasarıyıcılarındaki azot içeriği PS filmlerdekine göre düşük düzeyde kalmaktadır.



Bekil 4.33. PS Filmlere ait C1s Spektremleri.



Şekil 4.34. PS Partiküllere ait C1s Spektrumları.

Bu sonuçlar, iki şekilde açıklanabilir. Birincisi, reaktördeki karıştırmanın kısa reaksiyon sürelerinde yeterli olamayışı, dolayısıyla tüm partiküllerin monomerle temas edemeyişidir. Sonuç olarak, ortamdaki partiküllerin bir kısmı kaplanırken, diğerleri kaplanmadan kalmaktadır. Diğer açıklamaya göre ise, tüm partiküller kaplanmıştır, ancak PS film örneklerine göre kaplama kalınlığı yeterli değildir. PS partiküller, PS filmlere göre çok daha geniş bir yüzey alanına sahip olduklarından yüzeyin, PS filmlerdeki kalınlıkta kaplanması için aynı reaksiyon süresinde daha fazla monomer gerekmektedir. Başka bir deyişle, kaplamanın yeterli olabilmesi için reaksiyon süresi 10 dakikanın üzerine çıkarılmalıdır.

4.2.4. Hücre Kültür Çalışmaları

Bölüm 4.2.2'de tartışılan plazma polimerizasyon yöntemiyle yüzeyleri modifiye edilemek suretiyle hazırlanan PS mikrotasıyıcılar ve filmlerle BHK hücre kültür ortamında yapılan çalışmaların sonuçları aşağıda sunulmuştur.

Söz konusu hücre kültür çalışmaları, PHEMA ve Cytodex mikrotasıyıcılarla daha önce yapılan ve sonuçları Bölüm 4.1.4'de verilen çalışmalarda saptanan optimum koşullarda ve durgun kültür ortamında gerçekleştirilmiştir.

4.2.4.1. PS Filmlerde Hücre Kültürü

Hücre Yapışması: Hücre inokülasyonu sonrasında tüm yüzeylerde BHK hücrelerinin yapışma özelliği mikroskopik olarak incelenmiş ve primer aminlerle (ALAM ve EDA) modifiye edilmiş yüzeylerde TEA ile modifiye edilenlere göre yapışmanın daha hızlı olduğu bulunmuştur. ALAM ve EDA plazmalarıyla modifikasyonlarda farklılık gözlenememiş, ayrıca plazma reaksiyon süresindeki artışın hücre yapışma özelliğini değiştirmediği görülmüştür. Bu durum, ESCA analiz sonuçlarıyla da gösterilmiş olup, 5 dakikalık reaksiyon süresinin yüzeylerin tamamıyla kaplanması için yeterli oluşuyla açıklanmıştır ve dolayısıyla bu beklenen bir durumdur.

Hücre Yayılması ve Üremesi: Mikroskopik gözlemler, hücre yayılmasının tüm yüzeylerde, inokülasyondan 2 saat sonra başladığını göstermiştir. Çizelge 4.14'de alkilaminle kaplanmış PS film yüzeylerde 4 günlük inkübasyon süresi sonucunda ulaşılan hücre üreme değerleri (hücre/ml) olarak verilmiştir. Bu değerler incelendiğinde, TEA kaplı yüzeylerde üremenin en iyi olduğu açıkça görülmektedir.

Çizelge 4.14. PS Film Yüzeylerde Hücre Verimliliği. (Inokülasyon Yoğunluğu: 3×10^4 hücre/ml, inkübasyon süresi: 4 gün)

PS Film No	Kapılama Koşulları	Hücre Üremesi (hücre/ml)
1	ALAM; 2.5 W; 1 dakika	1.8×10^5
2	ALAM; 2.5 W; 10 dakika	2.1×10^5
3	EDA; 2.5 W; 1 dakika	1.9×10^5
4	EDA; 2.5 W; 10 dakika	2.4×10^5
5	TEA; 2.5 W; 1 dakika	2.1×10^5
6	TEA; 2.5 W; 10 dakika	2.8×10^5

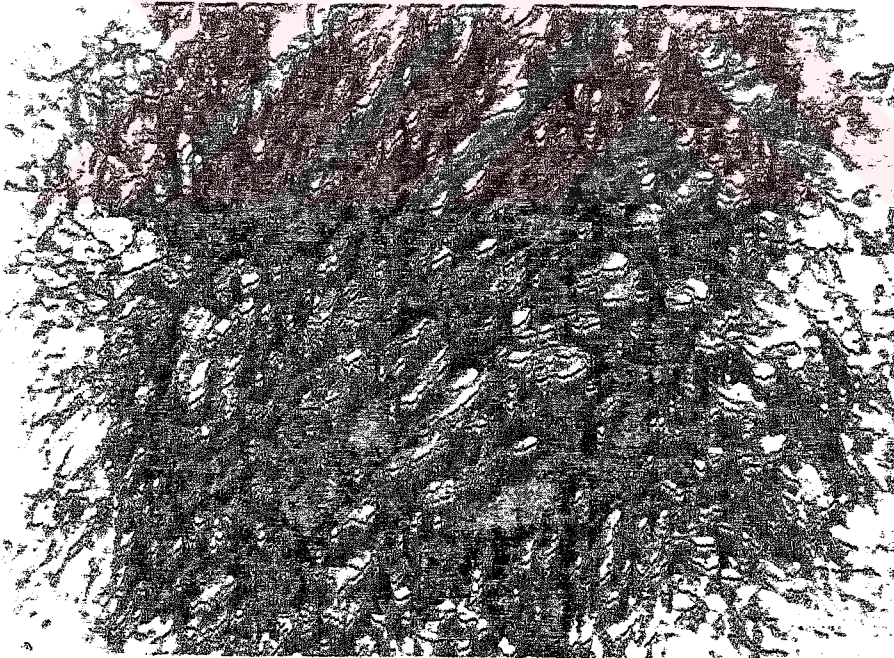
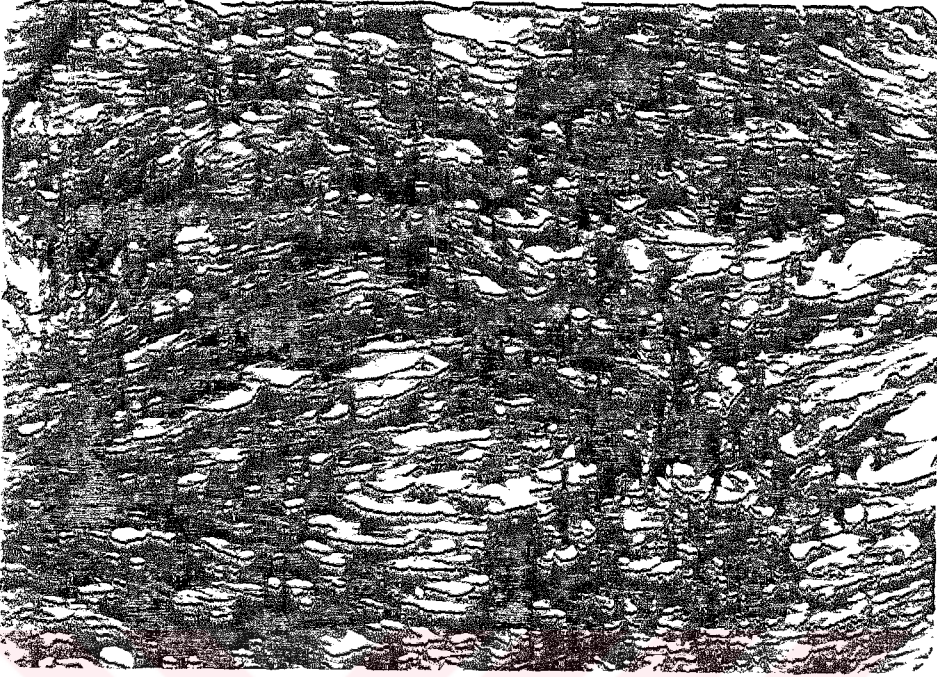
Sekil 4.35'de, inokülasyonun 4. gününde PS yüzeylerde hücre üremesini gösteren optik fotoğraflar verilmiştir. Bu fotoğraflardan da görüleceği gibi ALAM ve EDA kaplı yüzeylerde hücre üremesi benzer şekildedir. Kontrol amacıyla kullanılan PS doku kültür kabında da aynı tip üreme gözlenmiştir. TEA kaplı yüzeylerde ise hücre üremesi sarmal yapı göstermektedir. Bu yapı, fibroblastlar için karakteristik olup hücre üremesinin mükemmelliğini gösterir. Sekil 4.36'da TEA kaplı yüzeydeki sarmal yapı daha açık bir şekilde görülmektedir.

ESCA analiz sonuçlarından da görüleceği gibi, ALAM ve TEA kaplı yüzeyler hemen hemen aynı miktarda azot içeriğine sahip olmalarına rağmen, hücre üreme karakteristikleri çok farklıdır. Bu farklılık, monomerlerin kimyasal yapılarından kaynaklanmaktadır.

4.2.4.2. PS Mikrotasıyıcılarında Hücre Kültürü

Hücre Yapışma Kinetiği: Bu gruptaki deneylerde, hücre inokülasyonundan sonra, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda alınan hücre sayımlarıyla, bu süre içinde mikrotasıyıcı yüzeyine yapışan hücre kesri belirlenmiştir. Sekil 4.37'de tüm mikrotasıyıcılar için bu deneylerin sonuçları verilmiş olup, grafikteki eğrilerden alkilamin türünün hücre yapışma kinetiği üzerindeki etkisini karşılaştırmalı olarak incelemek mümkündür.

Sekil 4.37'de görüldüğü gibi, yüzeyi modifiye edilmemiş PS partiküllerde hücre yapışması gerçekleşmemektedir. Diğer tüm mikrotasıyıcılarda, ilk 30 dakikalık sürede çok hızlı bir yapışma olmakta ve yaklaşık toplam yapışmanın % 80'ini oluşturmaktadır. Plazma reaksiyon süresi, monomer türü ve TEA plazmasında, plazma gücü, mikrotasıyıcı yüzeyine hücre yapışmasını etkilemekte ve farklı yapışma özelliklerine ulaşılmaktadır.

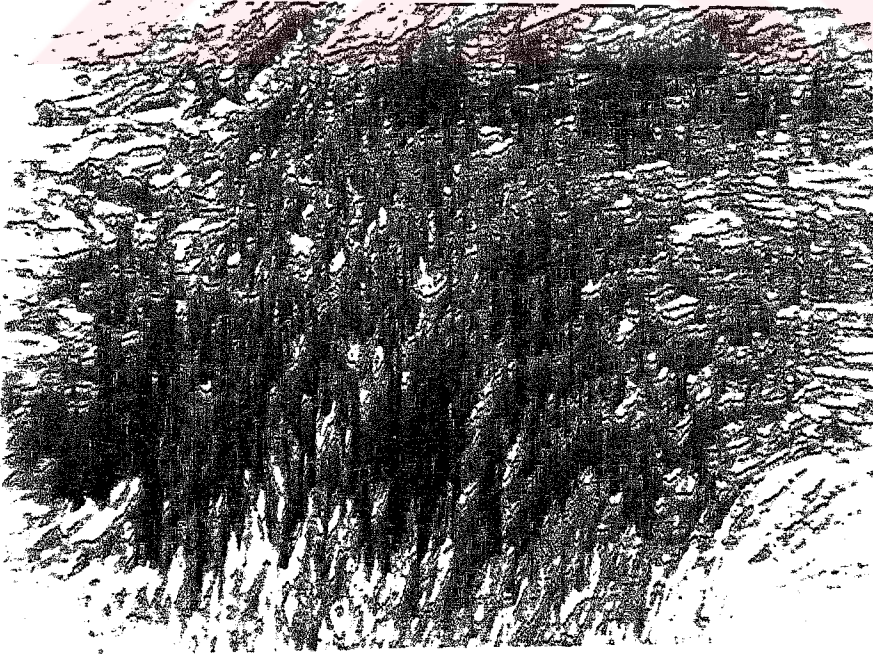
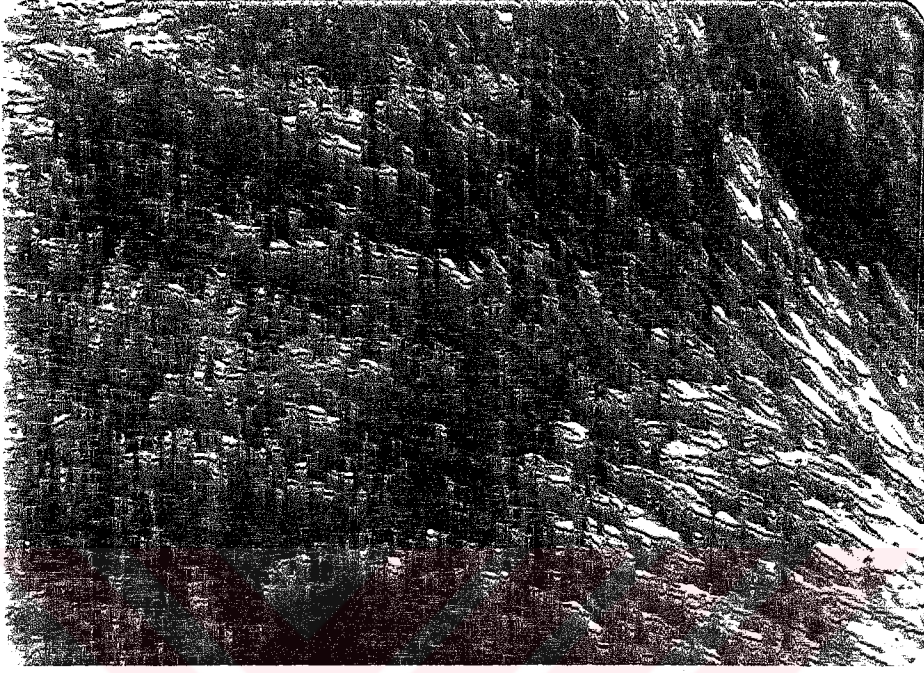


Şekil 4.35. PS Yüzeylerde Fibroblastik Hücre Üremesi (Oriijinal Büyütme x 150)

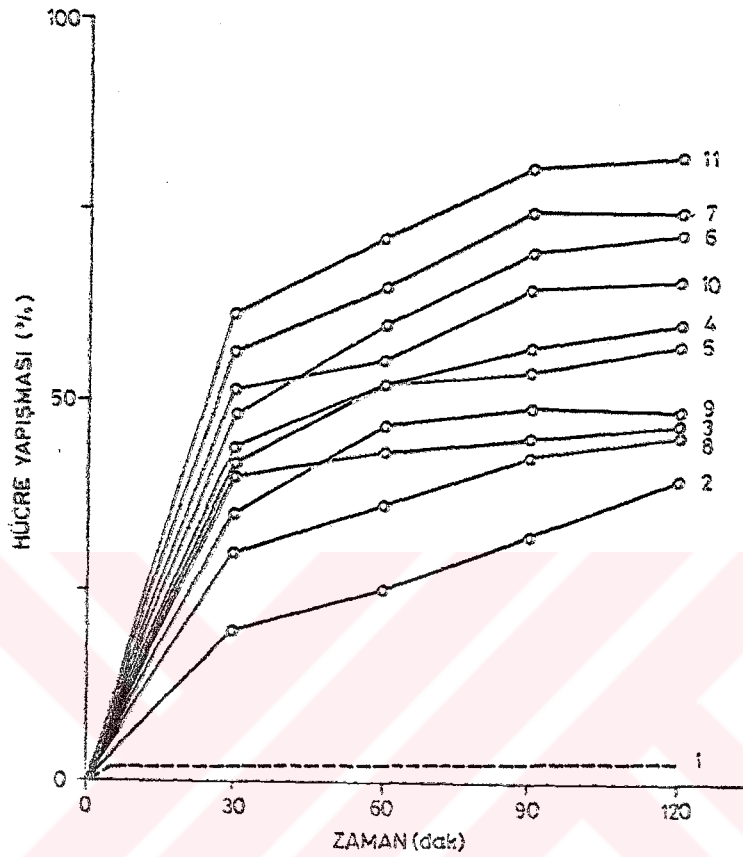
(a) ALAM Kaplı Yüzey (2.5 W; 5 dakika)

(b) EDA Kaplı Yüzey (2.5 W; 5 dakika)

(c) TEA Kaplı Yüzey (2.5 W; 5 dakika)



Sekil 4.36. TEA Kaplı PS Yüzeyde Tipik Fibroblastik Üreme (Orijinal Büyütme x 60).



Sekil 4.37. PS Mikrotasiyıcılara BHK Hücrelerinin Yapışma Kinetiği
 (Eğri Yanındaki Numaralar, Çizelge 4.11'deki Örneklerle Aittir)
 İnokülasyon Yoğunluğu: 3×10^5 hücre/ml;
 Mikrotasiyıcı Konsantrasyonu: 20 g/lt.

Primer aminler karşılaştırıldığında, EDA'nın hücre yapışması için ALAM'e oranla daha uygun bir yüzey oluşturduğu söylenebilir. Plazma reaksiyon süresinin artması, kaplı mikrotasiyıcı yüzeyinde yapışmayı arttırmaktadır. Bu durum çalışılan tüm plazmalar için geçerli olup, ESCA analiz sonuçlarıyla da uyum sağlamaktadır.

Yüzeyi TEA ile 10 dakikalık sürede ve 10 Watt plazma gücünde modifiye edilen mikrotasiyıcılarda hücre yapışmasının en iyi olduğu ve 2 saatlik süre sonucunda, ortama başlangıçta konulan hücrelerin % 80'inin yüzeye yapıştığı gözlenmektedir. TEA durumunda, plazma reaksiyon süresi ve gücündeki artış EDA ve ALAM plazmalarına göre yapışmayı daha fazla arttırmaktadır.

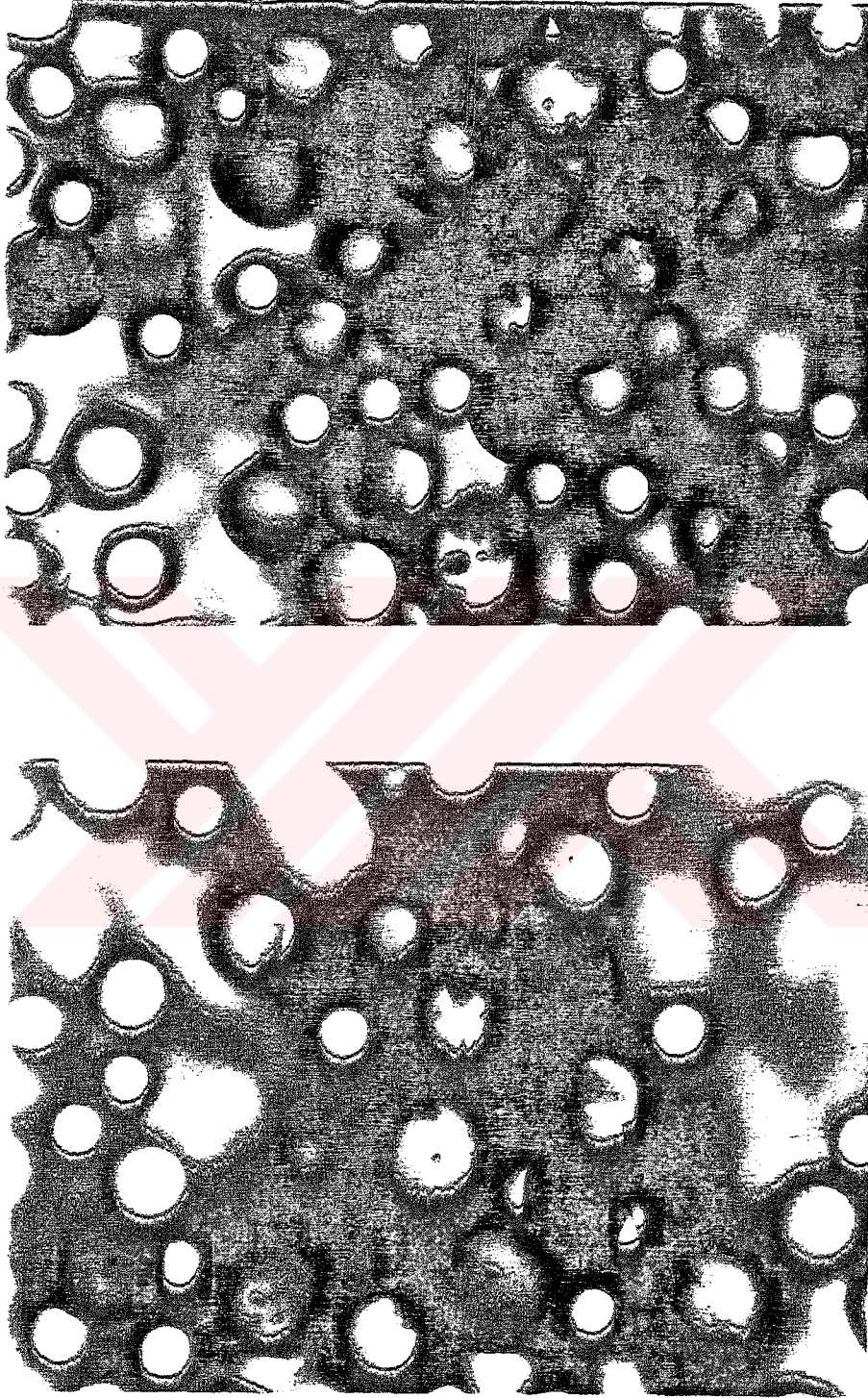
Hücre Yayılması: Şekil 4.38'de, alkilaminlerle modifiye edilmiş PS mikrotasıyıcıların yüzeyinde hücre yayılmasını gösteren optik mikroskop ile çekilmiş fotoğraflar verilmiştir. Mikroskopik incelemeler, hücre yayılmasının tüm yüzeylerde inokülasyondan 3 saat sonra oluştuğunu göstermiştir. Primer amin kaplı yüzeylerde yayılma tersiyer amin kaplı yüzeye göre daha hızlı olmaktadır.

Hücre Üremesi: Çalışmada hazırlanan PS mikrotasıyıcılarda hücre üreme özellikleri durgun kültür koşullarında incelenmiş ve üremenin 6 günde tamamlandığı gözlenmiştir. Şekil 4.39, 4.40 ve 4.41'de sırasıyla TEA, EDA ve ALAM ile modifiye edilmiş PS mikrotasıyıcılardaki üreme eğrileri verilmiştir. Eğri numaraları, Çizelge 4.4'de verilen kaplama koşullarını belirtmektedir. Eğrilerden görüleceği gibi, plazma reaksiyon süresinin artışı üremeyi arttırmaktadır. Bu durum, TEA için en belirgin olup, plazma gücünün 2,5 Watt'dan 10 Watt'a çıkarılması hücre üremesini önemli derecede arttırmaktadır. Plazma koşulları aynı olduğunda, TEA kaplı mikrotasıyıcılar, EDA ve ALAM ile kaplı olanlara göre hücre üremesinde artışa neden olmaktadır.

PS mikrotasıyıcılarla gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları, mikrotasıyıcı boyutunun hücre yayılması ve üremesi açısından önemli bir etken olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.9'da belirtildiği gibi çalışmada kullanılan PS mikrotasıyıcılar 37-74 μ boyutundadır ve Şekil 4.28'e dikkat edilecek olursa, küçük çaplı partiküller sayıca daha fazladır. Hücre kültür ortamında yapılan incelemeler, BHK hücrelerinin mikrotasıyıcı yüzeyine kolaylıkla yapıştığını, fakat küçük boyutdaki mikrotasıyıcılar üzerinde yayılmasının çok zor olduğunu ve yüzeye yayılan hücrenin mikrotasıyıcıyı içine alarak petri kabının tabanına yapıştığını göstermiştir. Şekil 4.42'de tabana yapışmış durumdaki hücre ve mikrotasıyıcılar görülmektedir. Bu durum, hücre veriminin düşmesine neden olmaktadır. Verimin artırılabilmesi için PHEMA ve Cytodex mikrotasıyıcılarda olduğu gibi 100-200 μ boyut aralığında PS mikrotasıyıcıların hazırlanması gerekmektedir.

4.3. MİKROTAŞIYICI-DESTEKLİ KÜLTÜR SİSTEMLERİNDE HÜCRE YAPISMA VE ÜREMESİNİN MATEMATİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Yapılan çalışmada, mikrotasıyıcı-destekli kültür sistemlerinde BHK hücrelerinin mikrotasıyıcı yüzeyine yapışma ve yüzeyce üreme kinetikleri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar, Bölüm 4.1.4. ve 4.2.4'de tartışılmıştır. Bu bölümde de sonuçların matematiksel olarak değerlendirilmesi yapılmıştır.

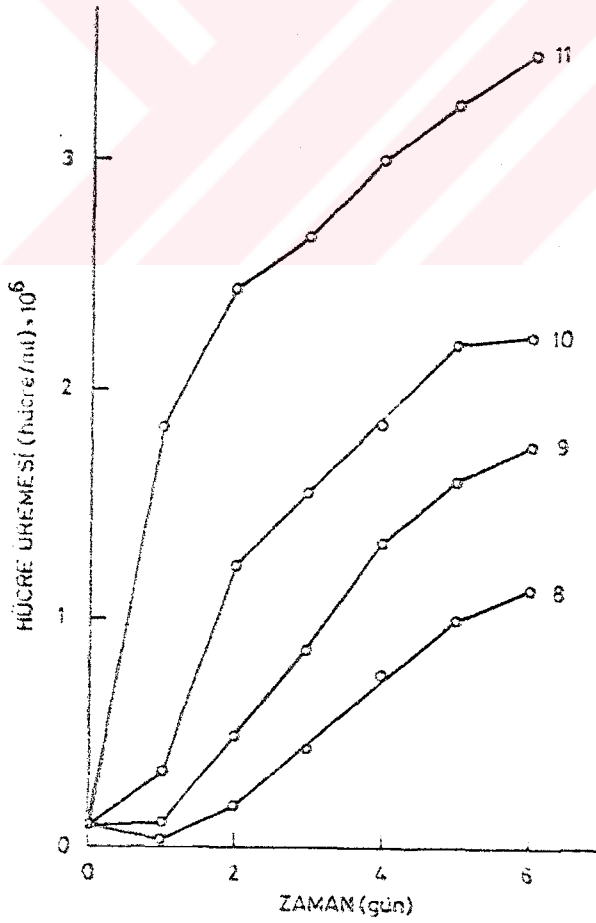
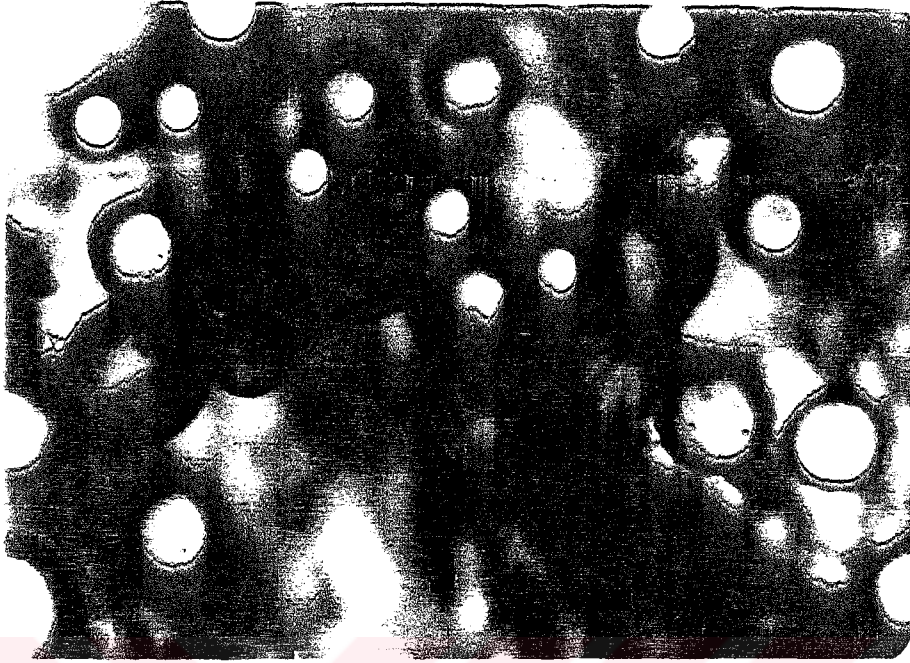


Şekil 4.36 . PS Mikrotasiyıcılar da BHK Hücrelerinin Yayılması (Orjinal Büyütme x 300)

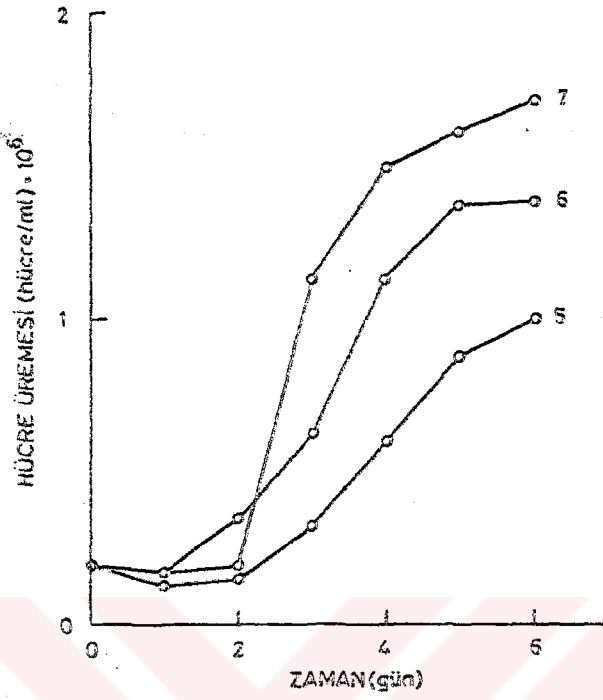
a) ALAM Kaplı Yüzey (2,5 W; 5 dakika)

b) EDA Kaplı Yüzey (2,5 W; 5 dakika)

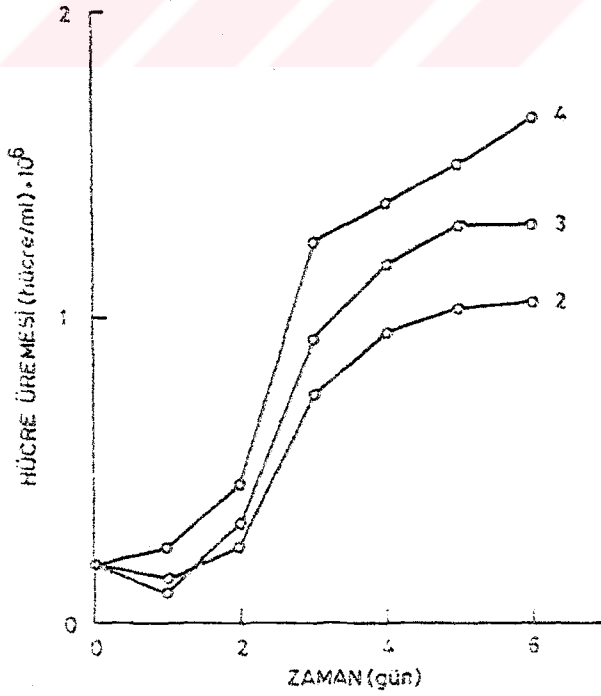
c) TEA Kaplı Yüzey (2,5 W; 5 dakika)



Sekil 4.39. TEA Kaplı Mikrotasviyicilerde Hücre Üremesi



Şekil 4.40. EDA Kaplı Mikrot taşıyıcılarda Hücre Üremesi



Şekil 4.41. ALAM Kaplı Mikrot taşıyıcılarda Hücre Üremesi



Sekil 4.42. PS Mikrotasıyıcılarında Hücre Yayılması ve Üremesi.

Bölüm 4.1.4. ve 4.2.4'deki sonuçlardan da görülebileceği gibi, hücrelerin mikrotasıyıcı yüzeyine yapışması, inkübasyon süresinin ilk 2 saatinde gerçekleşmekte ve hücre üremesi, bu sürenin sonunda başlamaktadır. Bu durum gözönüne alınarak, hücre yapışması ve üremesinin iki farklı davranış olduğu düşünülmüş ve hücre yapışma ve üremesini tanımlamak üzere iki ayrı model kullanılmıştır.

Aşağıda her iki modelin matematiksel tanımı yapılmış ve mikrotasıyıcı-destekli kültür sistemlerine uygulanması sonucu elde edilen model değerleri, deneysel değerlerle karşılaştırılarak modellerin bu tür sistemler için geçerliliği tartışılmıştır.

4.3.1. Hücre Yapışma Kinetiği

Bölüm 2.1.1'de açıklandığı gibi hücrelerin substrat yüzeyine yapışması, yüzeyde bulunan katı tutunma noktalarının varlığıyla gerçekleşmektedir. Yüzey özelliklerine bağlı olarak bu noktaların sayısı değişmekte, dolayısıyla yüzeye yapışan hücre sayısı artmakta ya da azalmaktadır.

4.3.1.1. Matematiksel Modelin Tanımı

Hücre yapışmasının matematiksel olarak tanımlanmasında, yukarıdaki açıklama gözönüne alınarak Eşitlik 4.1. türetilir.

$$\frac{da}{dt} = k \times \left(1 - \frac{a}{a_{\max}} \right) \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte; X : Herhangibir t zamanında ortamda bulunan serbest hücre konsantrasyonu (hücre/ml); a : Herhangibir t zamanında mikrotasıyıcı yüzeyine yapışan hücre konsantrasyonu (hücre/ml) ; $a_{\max}$: Yüzeydeki tutunma noktası sayısı (hücre/ml) ; k : Başlangıç özgül yapışma hızı (dakika^{-1})'dir.

Serbest hücre konsantrasyonu $X = X_0 - a$ olarak tanımlanırsa Eşitlik 4.1. aşağıdaki duruma gelir:

$$\frac{da}{dt} = k (X_0 - a) \left(1 - \frac{a}{a_{\max}} \right) \quad (4.2)$$

Burada; X_0 : Başlangıç hücre konsantrasyonudur (hücre/ml).

Eşitlik 4.2. yüzeydeki her bir tutunma noktasına tek bir hücrenin yapıştığını ve başlangıçta hızlı bir şekilde gerçekleşen yapışmanın, zamanla yüzeyde bulunan, tutunma noktalarının hücreler tarafından işgal edilerek azalması sonucu yavaşladığını ifade etmektedir. Yüzeyde boş nokta kalmadığı durumda yapışma söz konusu değildir.

Eşitlik (4.2.) aşağıdaki sınır koşulları kullanılarak integre edildiğinde;

$$\begin{array}{ll} t = 0 & a = 0 \\ t = t & a = a \end{array}$$

$$\frac{a_{\max}}{X_0 - a_{\max}} \left[\ln \left(\frac{X_0 - a}{X_0} \right) - \ln \left(\frac{a_{\max} - a}{a_{\max}} \right) \right] = k t \quad (4.3)$$

eşitliği elde edilir.

Çizelge 4. 15. Hücre Yapışma Verilerinin Değerlendirilmesi (PS-4).

Zaman (dakika)	$\frac{a_{max}}{X_0 - a_{max}} \left[\ln \frac{(X_0 - a) / X_0}{(a_{max} - a) / a_{max}} \right] = Y$
0	0.000
30	0.979
60	1.919
90	3.026
120	-

Esitlik (4.3) yeniden düzenlendiğinde

$$\frac{a_{max}}{X_0 - a_{max}} \left[\ln \frac{(X_0 - a) / X_0}{(a_{max} - a) / a_{max}} \right] = k t \quad (4.4)$$

şekline dönüşür.

Zamana karşı, $(a_{max} / X_0 - a_{max}) \ln \{ (X_0 - a) / X_0 / (a_{max} - a) / a_{max} \}$ terimi grafiğe alınarak, elde edilen doğrunun eğiminden k değeri bulunur.

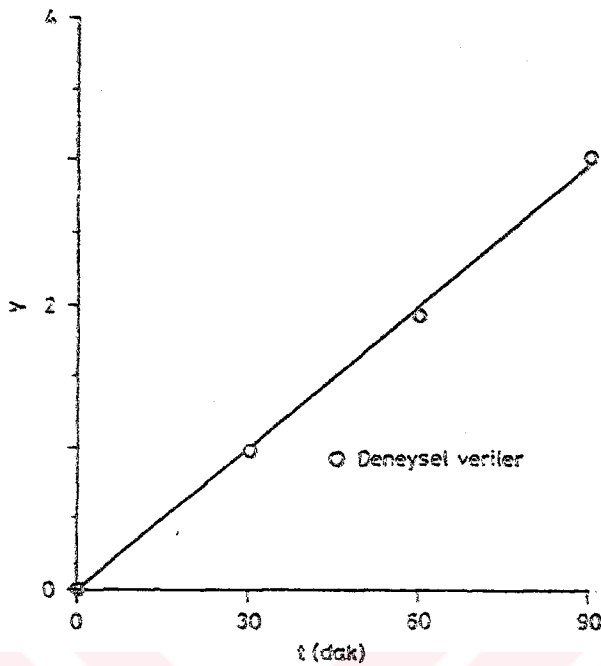
4.3.1.2. Önerilen Modelle Mikrotasıyıcı-Destekli Sistemlerde BHK Hücre Yapışmasının Değerlendirilmesi

Bölüm 4.3.1.1'de tanımlanan model PHEMA, Cytodex ve PS mikrotasıyıcı-destekli kültür sistemlerinde mikrotasıyıcı yüzeyine BHK hücrelerinin yapışmasını ifade etmek amacıyla kullanılmıştır. Model parametreleri deneysel verilerden elde edilmiştir.

PS Mikrotasıyıcı-Destekli Kültürde Hücre Yapışması

PS mikrotasıyıcılarla yapılan hücre kültür çalışmaları sonucunda elde edilen hücre yapışma kinetiğine ait veriler değerlendirilerek modelin uygunluğu tartışılmıştır.

Model parametrelerinin saptanması amacıyla izlenen yöntem, 4 numaralı PS mikrotasıyıcı (Çizelge 4.15) ile elde edilen deneysel veriler örnek alınarak açıklanmıştır. Deneysel veriler kullanılarak hazırlanan Çizelge 4.15 yukarıda verilmiştir.



Şekil 4.43. k Değerinin Bulunmasında Kullanılan Y-t Grafiği.

X_0 , hücre inokülasyon yoğunluğu olup 3×10^5 hücre/ml'dir. a_{max} ise inokülasyon süresi sonunda yüzeye yapışan ortalama hücre konsantrasyonu olarak alınmış olup 1.80×10^5 hücre/ml değerine sahiptir.

Çizelge 4.15 'de Y ile tanımlanan terim zamana karşı grafiğe geçirilerek elde edilen noktalara en iyi uyan doğru "Texas Instruments TI 55" hesap makinesinde bulunan "lineer regresyon" programıyla saptanmış ve doğrunun eğiminden k değeri bulunmuştur (Şekil 4.43).

2 ve 5 numaralı PS mikrotasıyıcılar içinde aynı işlemin uygulanmasıyla bulunan sonuçlar Çizelge 4.16 'da verilmiştir.

Çizelge 4. 16. PS Mikrotasıyıcılar İçin Model Yapışma Parametreleri.

Mikrotasıyıcı	k (dakika ⁻¹)	r ²
PS-2	0.0089	0.99
PS-4	0.0334	1.00
PS-5	0.0310	0.99

r²: Korelasyon katsayısı'dır.

Çizelge 4.17. PS Mikrotasıyıcılar İçin Deneyssel ve Model Yapışma Değerlerinin Karşılaştırılması.

Mikrotasıyıcı	Yapışan Hücre Sayısı (10^5 hücre/ml)	Zaman (dakika)			
		30	60	90	120
PS - 2	Deneyssel Değer	0.60	0.75	0.96	1.22
	Model Değer	0.54	0.81	0.96	1.22
PS - 4	Deneyssel Değer	1.26	1.57	1.71	1.82
	Model Değer	1.27	1.58	1.71	1.82
PS - 5	Deneyssel Değer	1.26	1.57	1.62	1.73
	Model Değer	1.21	1.51	1.63	1.73

"a" değerleri, Eşitlik (4.4) kullanılarak "Bolzano Yöntemi"ne dayalı olarak çalışan ve lineer olmayan denklemlerde kök tayini yapabilen "Ortay" programı ile EPSON QX-10 tipi bilgisayarda ± 1 duyarlılıkla saptanmıştır. Program, EK-F'de verilmiştir.

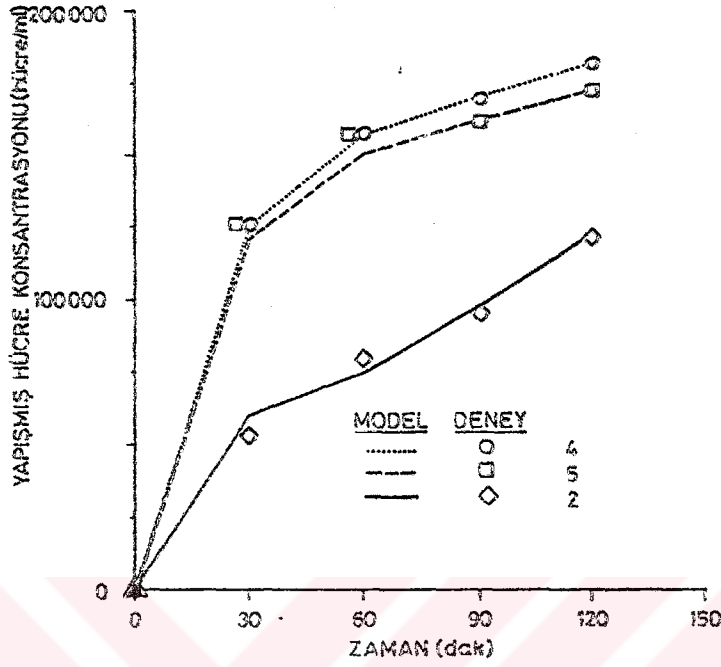
Deneyssel olarak ve model yardımıyla bulunan a değerleri Çizelge 4.17'de karşılaştırılmıştır. Şekil 4.44'de model değerleriyle, deneyssel olarak saptanan değerler karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Grafikten de görüldüğü gibi 2, 4, ve 5 numaralı PS mikrotasıyıcılar için deneyssel değerlerle model değerleri çok iyi bir uyum göstermektedir.

PHEMA ve Cytodex Mikrotasıyıcı-Destekli Kültürde Hücre Yapışması

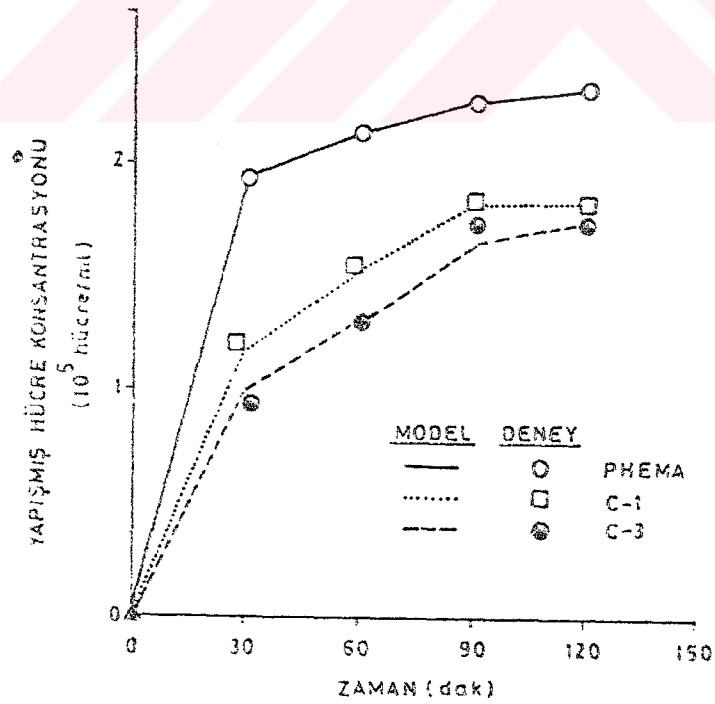
PHEMA ve Cytodex mikrotasıyıcılarla durgun kültür ortamında yürütülen çalışmalarda saptanan hücre yapışma kinetiğine ait veriler de PS mikrotasıyıcı verilerinin değerlendirilmesinde izlenen yöntemle değerlendirilmiş ve saptanan model parametreleri Çizelge 18'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. PHEMA ve Cytodex Mikrotasıyıcılar İçin Model Yapışma Parametreleri.

Mikrotasıyıcı	k (dakika ⁻¹)	r
Cytodex - 1	0.0135	0.98
Cytodex - 3	0.0098	0.98
PHEMA	0.0480	0.99



Şekil 4.44. PS Mikrotasıyıcılar için DeneySEL ve Model Yapışma Değerlerinin Karşılaştırılması.



Şekil 4.45. PHEMA ve Cytodex Mikrotasıyıcılar için DeneySEL ve Model Yapışma Değerlerinin Karşılaştırılması.

Şekil 4.45 'de model yapışma değerleri ile, deneySEL olarak saptanan değerler karşılaştırılmı olarak verilmiştir.

4.3.2. Hücre Üreme Kinetiği

Mikrotasiyıcı-destekli kültür çalışmalarının tümü kesikli sistemlerde gerçekleştirilmiştir. Bölüm 4.1.4. ve 4.2.4'de verilen hücre üreme eğrilerine dikkat edilecek olursa, bu eğrilerin kesikli sistemde mikrobiyal hücrelerin üreme eğrilerine benzer olduğu görülür. Mikrotasiyıcı-destekli kültür sistemlerinde BHK hücre üremesinin, kesikli sistemde mikrobiyal hücre üremesine benzer bir davranış gösterdiği gözönüne alınarak, üstel üremeyi ifade eden "lojistik" denkleğin, mikrobiyal hücre üremesini tanımlayan şekli (Eşitlik 2.7). BHK hücre üremesi için uygun duruma getirilerek kullanılmıştır.

4.3.2.1. Kullanılan Modelin Matematiksel Tanımı

BHK hücre üremesini tanımlamak üzere lojistik denklik aşağıdaki şekliyle kullanılmıştır [96].

$$\frac{dx}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \quad (4.5)$$

Bu eşitlikte; dx/dt : Hücre üreme hızı (hücre sayısı/ml.zaman); μ : Başlangıç özgül üreme hızı (zaman^{-1}); X_{max} : Üreme sonunda ulaşılacak en yüksek hücre konsantrasyonu (hücre sayısı/ml).

Eşitlik 4.1. hücre üremesi için aşağıdaki durumları ifade etmektedir.

• $X \ll X_{max}$ olduğu durum: Bu durum, hücre üremesinin başlangıcını ifade eder ve eşitlikteki (x/x_{max}) terimi ihmal edilebilir düzeyde olup Eşitlik (4.5).

$$(dx / dt) = \mu X \quad (4.6)$$

şekline dönüşür ve yalnızca üstel üremeyi ifade eder.

• Hücre üremesindeki artışla, hücre inhibisyonu önem kazanır ve üreme yavaşlar. Bu durum, Eşitlik (4.5)'deki $(1 - X / X_{max})$ terimiyle ifade edilir.

• X değerinin X_{max} 'a yaklaştığı durum: Bu durumda, $(1 - X / X_{max})$ terimi yaklaşık sıfıra eşit olur ve denklik bu haliyle, hücre üremesinin durduğunu ve sabit üreme bölgesine ulaşıldığını ifade eder.

$$\lim_{X \rightarrow X_{max}} (dx / dt) = 0 \quad (4.7)$$

Eşitlik (4.5) aşağıda verilen sınır koşulları kullanılarak integre edildiğinde;

$$\begin{aligned} t=0 & \quad X = X_0 \\ t=t & \quad X = X(t) \end{aligned}$$

$$X(t) = \frac{X_0 \exp(\mu t)}{1 - (X_0/X_{max}) [1 - \exp(\mu t)]} \quad (4.8)$$

şekline dönüşür.

Yukarıdaki eşitlikte; X_0 : Başlangıç hücre konsantrasyonu (hücre sayısı/ml); $X(t)$: t anında ulaşılan hücre konsantrasyonu (hücre sayısı/ml); t: Zaman (gün).

Eşitlik (4.8), hücre üremesini yalnızca zamanın fonksiyonu olarak ifade etmektedir. X_{max} ve μ değerleri bilindiğinde herhangi bir t zamanında ulaşılabilecek hücre konsantrasyonu Eşitlik 4.8'den hesaplanabilir.

Eşitlik (4.8) yeniden düzenlenirse;

$$\mu t = \ln \left(\frac{X_{max}}{X_0} - 1 \right) + \ln \left(\frac{\bar{X}}{1 - \bar{X}} \right) \quad (4.9)$$

şekline dönüşür.

Burada $\bar{X} = X / X_{max}$ olup, boyutsuz hücre konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır.

Eşitlik (4.9)'da $\ln \left((X_{max} / X_0) - 1 \right)$ terimi sabit, $\ln \left[\bar{X} / (1 - \bar{X}) \right]$ terimi ise değişkendir.

Zamana karşı $\ln \left[\bar{X} / (1 - \bar{X}) \right]$ terimi grafiğe alındığında, elde edilen doğrunun eğiminde μ , ordinatı kesim noktasından da X_0 değeri bulunur.

Çizelge 4. 19. PHEMA Mikrotasıyıcılar için Hücre Üreme Verilerinin Değerlendirilmesi.

Zaman (gün)	X (hücre sayısı/ml)	$\bar{X}$ (X / X _{max})	$\ln (\bar{X} / 1-\bar{X})$
0	6.00×10^5	0.20	- 1.39
1	1.20×10^6	0.40	- 0.41
2	2.45×10^6	0.82	1.52
3	2.85×10^6	0.95	2.94
4	3.00×10^6	-	-

4.3.2.2. Önerilen Modelin Mikrotasıyıcı-Destekli Sistemlerde BHK Hücre Üremesine Uyarlanması

Bölüm 4.3.2.1'de tanımlanan matematiksel model, PHEMA, Cytodex ve PS mikrotasıyıcı-destekli durgun ve süspanse kültür sistemlerindeki hücre üremesini incelemek için uygulanmıştır. Model parametreleri (μ, X) deneysel verilerden elde edilmiş ve simülasyonlarda bu parametreler kullanılmıştır. Böylelikle saptanan model üreme değerleri deneysel değerlerle karşılaştırılmıştır.

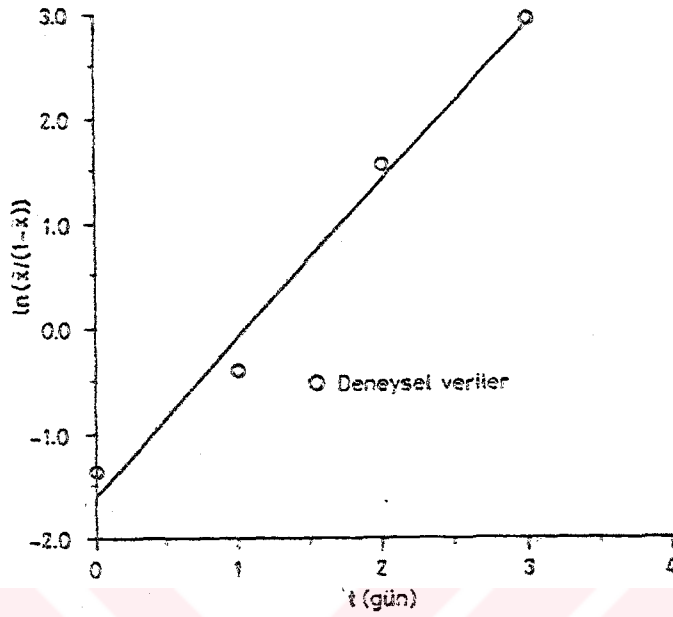
PHEMA ve Cytodex Mikrotasıyıcı-Destekli Süspanse Kültürde Hücre Üremesi

Model parametrelerinin saptanması amacıyla, PHEMA ve Cytodex mikrotasıyıcılarla süspanse kültür koşullarında yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

İzlenen yöntem PHEMA mikrotasıyıcılara ait veriler örnek alınarak açıklanmıştır. Deneysel veriler kullanılarak hazırlanan çizelge aşağıda verilmiştir. (Çizelge 4. 19)

$X_{\max}$ değeri, sabit üreme bölgesindeki ortalama hücre konsantrasyonu olarak alınmıştır ve 3.00×10^6 hücre/ml'ine sahiptir.

Çizelge 4.19 'daki $\ln (\bar{X}/1-\bar{X})$ değerleri zamana karşı grafiğe alınarak Şekil 4. 'de verilen noktalar elde edilmiştir. Bu noktalara en iyi uyum doğru, "Texas Instruments TI 55" hesap makinesinde bulunan "lineer regresyon" programıyla saptanmış, eğiminden μ , ordinatı kesim noktasından da X_0 değeri bulunmuştur.



Şekil 4.46. μ ve X_0 Değerlerinin Saptanmasında Kullanılan $t - \ln(\frac{X_0 - X}{1 - X})$ Grafiği.

Cytodex-1 ve 3 ile süspanse kültür ortamında elde edilen deneysel sonuçlar da aynı yöntemle değerlendirilmiş, bulunan model parametreleri Çizelge 4. 20'de verilmiştir.

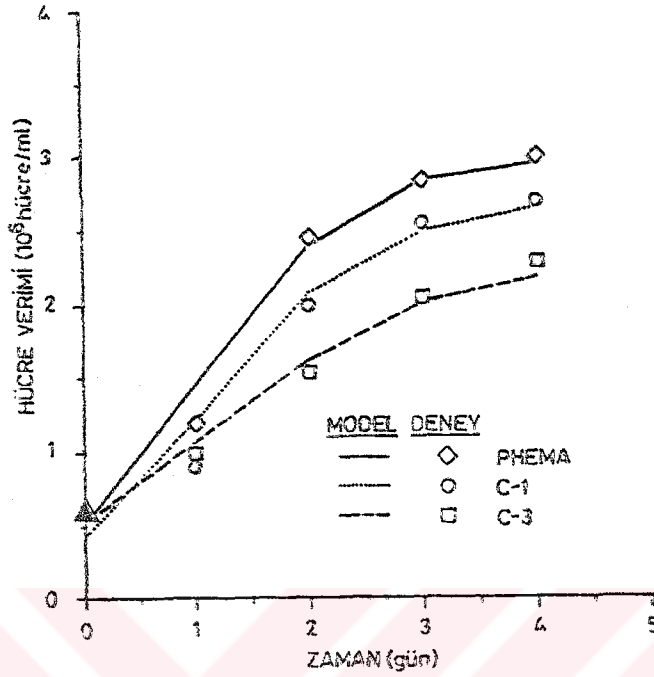
Çizelge 4. 20. Süspanse Kültür için Saptanan Model Üreme Parametreleri.

Mikrotasıyıcı	μ (gün ⁻¹)	X_0 (hücre/ml)	r
Cytodex - 1	1.44	4.4×10^5	0.98
Cytodex - 3	1.04	5.36×10^5	0.99
PHEMA	1.49	5.20×10^5	0.99

Bu şekilde saptanan model parametreleri Eşitlik (4.8)'de yerlerine konularak model üreme değerleri bulunmuştur.

Çizelge 4.21 'de deneysel olarak ve matematiksel model yardımıyla saptanan üreme değerleri karşılaştırılmıştır.

Şekil 4.47'da model değerleriyle, deneysel değerler grafiksel olarak karşılaştırılmıştır. Modelden sapma yalnızca üreme başlangıcında gözlenmiş üremenin sonraki safhalarında model değerleriyle, deneysel değerler arasındaki uyum oldukça iyidir. Başlangıçta görülen

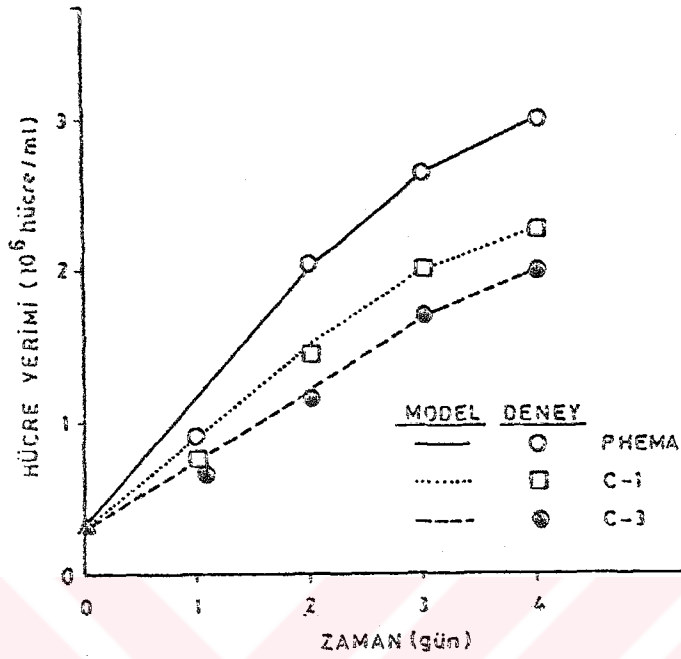


Sekil 4.47. Süspansiyon Kültür için Deneyisel ve Model Üreme Değerlerinin Karşılaştırılması.

Çizelge 4. 21. Süspansiyon Kültür için Deneyisel ve Model Üreme Değerlerinin Karşılaştırılması.

Mikrotaşıyıcı	Yapışan Hücre Sayısı (10 ⁶ hücre/ml)	Zaman (gün)				
		0	1	2	3	4
Cytodex-1	Deneyisel Değer	0.60	0.90	2.00	2.55	2.70
	Model Değer	0.44	1.22	2.10	2.50	2.66
Cytodex-3	Deneyisel Değer	0.60	1.00	1.55	2.05	2.30
	Model Değer	0.54	1.06	1.63	2.01	2.19
PHEMA	Deneyisel Değer	0.60	1.20	2.45	2.85	3.00
	Model Değer	0.52	1.45	2.41	2.84	2.96

sapmanın nedeni, kültür ortamına konulan hücrelerin tamamının mikrotasıyıcı yüzeyine yapışmaması, dolayısıyla gerçek X_0 değerinin, deneyisel verilerde kullanılanlardan daha düşük olmasıdır.



Sekil 4.48. Durgun KÜLTÜRde PHEMA ve Cytodex Mikrotasıyıcılar İçin Deneysel ve Model Üreme Değerlerinin Karşılaştırılması.

Cizelge 4. 22. Durgun KÜLTÜRde PHEMA ve Cytodex Mikrotasıyıcılar İçin Saptanan Model Üreme Parametreleri (Inokülasyon Yoğunluğu: 3×10^5 hücre/ml).

Mikrotasıyıcı	μ (gün ⁻¹)	X_0 (hücre/ml)	r
Cytodex - 1	1.48	2.03×10^5	0.99
Cytodex - 3	1.07	2.38×10^5	0.99
PHEMA *	1.50	2.35×10^5	1.00

PHEMA ve Cytodex Mikrotasıyıcı-Deşekli Durgun KÜLTÜRde Hücre Üremesi

Çalışmanın bu bölümüne ait deneysel veriler de süspanse kültür verilerinin değerlendirilmesinde izlenen yöntemle değerlendirilmiş ve saptanan model parametreleri ve korelasyon katsayıları Cizelge 4.22'de verilmiştir.

Deneysel ve modelden saptanan hücre verim değerleri Şekil 4.48'de karşılaştırılmış ve aralarında süspanse kültürdekilere benzer bir uyum görülmüştür.

Çizelge 4.23. PS-5 Mikrotasıyıcılar için Hücre Üreme Verilerinin Değerlendirilmesi.

t (gün)	t' (gün)	X (hücre sayısı/ml)	$\bar{X}$ (X/X _{max})	ln ($\bar{X} / 1-\bar{X}$)
0	-	2.00 x 10 ⁵	-	-
1	-	1.25 x 10 ⁵	-	-
2	0	1.50 x 10 ⁵	0.13	- 1.90
3	1	3.25 x 10 ⁵	0.29	- 0.90
4	2	6.00 x 10 ⁵	0.53	0.12
5	3	8.88 x 10 ⁵	0.79	1.32
6	4	0.88 x 10 ⁵	0.88	1.99

PS Mikrotasıyıcı-Destekli Durgun Kültürde Hücre Üremesi

PS mikrotasıyıcılarla durgun kültür ortamında gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda elde edilen hücre üreme eğrileri incelendiğinde, eğrilerde, inokülasyon sonrasında hücre üremesinin olmadığı uzun bir "bekleme fazının" yer aldığı görülmektedir. Bu durumda hücre üremesini ifade etmek üzere Eşitlik 4.5. aşağıdaki şekle dönüştürülmüştür.

$$\frac{dX}{dt'} = \mu \times \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \quad (4.10)$$

Burada: t' = t - t_i olarak tanımlanmıştır; t_i: Bekleme fazı süresi'dir (gün)

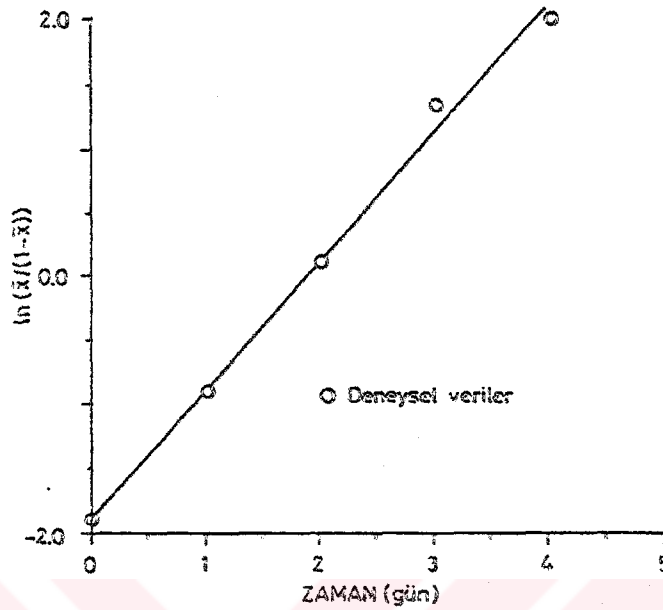
Eşitlik 4.10'un uygun sınır şartlarıyla integre edilmesi sonucu

$$X(t') = \frac{X_0 \exp(\mu t')}{1 - (X_0/X_{max}) [1 - \exp(\mu t')]} \quad (4.11)$$

eşitliği elde edilmiştir.

Çizelge 4.23'de 5 numarayla tanımlanan PS mikrotasıyıcıya ait hücre üreme verileri örnek alınarak yapılan değerlendirme aşağıda açıklanmıştır.

Deneyisel veriler kullanılarak Çizelge 4.23 hazırlanmıştır.



Şekil 4.49. μ ve X_0 Değerlerinin Saptanmasında Kullanılan $t' - \ln(\bar{X}/(1-\bar{X}))$ Grafiği.

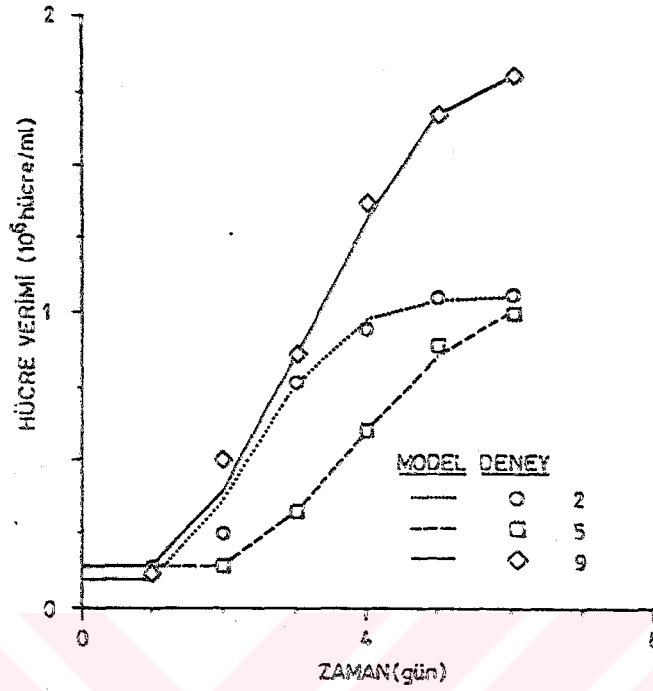
t' değeri 2 gün, $X_{\max}$ ise, sabit üreme bölgesindeki ortalama hücre konsantrasyonu olarak alınmıştır ve 1.13×10^5 hücre/ml değerine sahiptir. Çizelge 4.23'deki $\ln(\bar{X}/(1-\bar{X}))$ değerleri, zamana karşı grafiğe alınarak Şekil 4.49'da verilen doğru elde edilmiştir.

Çizelge 4.23'de yer alan tüm PS mikrotasarıyıcıları ait kültür çalışmalarının sonuçları aynı şekilde değerlendirilmiş ve bunlar arasından örnek olarak seçilen 2, 5 ve 9 numaralı mikrotasarıyıcılar için bulunan değerler Çizelge 4.24'de verilmiştir.

Çizelge 4.24. PS Mikrotasarıyıcılar için Saptanan Model Üreme Parametreleri.

Mikrotasarıyıcı	μ (gün)	X_0 (hücre/ml)	r
PS - 2	1.62	9.80×10^4	0.99
PS - 5	1.00	1.50×10^5	0.99
PS - 9	1.62	1.46×10^5	1.00

μ ve X_0 değerleri, Eşitlik 4.11'de verilenlere konularak $X(t)$ değerleri saptanmıştır. Çizelge 4.25'de deneysel olarak ve matematiksel model yardımıyla saptanan üreme değerleri karşılaştırılmıştır.



Sekil 4.50. PS Mikrotasıyıcı-Destekli Kültür İçin Deneysel ve Model Üreme Değerlerinin Karşılaştırılması.

Çizelge 4.25. PS Mikrotasıyıcı-Destekli Kültürü İçin Deneysel ve Model Üreme Değerlerinin Karşılaştırılması.

Mikrotasıyıcı	Yapışan Hücre Sayısı (10 ⁵ hücre/ml)	Zaman (gün)							
		0	1	2	3	4	5	6	
PS - 2	Deneysel Değer	3.00	1.50	2.50	7.63	9.50	10.5	10.6	
	Model Değer	0.98	0.98	3.61	7.65	9.85	10.4	10.6	
PS - 5	Deneysel Değer	3.00	1.25	1.50	3.25	6.00	8.88	10.0	
	Model Değer	1.50	1.50	1.50	3.31	5.99	8.53	10.1	
PS - 9	Deneysel Değer	3.00	1.17	5.00	8.67	13.7	16.7	18.0	
	Model Değer	1.46	1.46	3.92	8.51	13.5	16.7	18.0	

Sekil 4.50'de model değerleriyle deneysel değerlerin grafiksel karşılaştırması verilmiştir.

4.4. SAP VİRÜSÜ ÜRETİMİ

Orijini aynı olmasına rağmen farklı kültür koşullarında üretilmiş hücrelerin bazı özelliklerinin zaman içerisinde farklılaştığı saptanmıştır [137]. Değişen bu özellikler arasında, cam yüzeyine yapışma oranı, karyotip, transformasyon indeksi ve virüse duyarlılık sayılabilir. Bu arada farklı sap virüsü suslarının duyarlı BHK 21 hücrelerine farklı miktarlarda adsorbe oldukları, önceleri duyarlı olan hücrelerin virüse duyarlılıklarını zaman içerisinde kaybetmelerinin hücrelerin pasaj seviyesi ile mutlaka ilişkili olmadığı, transformasyon ile virüse duyarlılık arasında bir ilişkinin mevcut olduğu ve orta derecede transforme olmuş hücrelerin de virüse duyarlılıklarının azalabileceği bildirilmiştir [138-140]. Ayrıca, hücrenin ürettiği substrat türü ve özellikleri de hücre transformasyonuna neden olarak, virüse olan duyarlılığı azaltmakta ya da tamamen ortadan kaldırmaktadır [140].

Bu bilgilerin ışığı altında, araştırma kapsamında geliştirilen PHEMA mikrotasiyıcılarda üreyen BHK hücrelerinin transforme olup olmadıklarının kısmen belirlenebilmesi için sap virüsüne duyarlılıkları incelenmiştir. Çalışmalar, A₂₂/Mahmatlı sap virüs suslarıyla ve durgun kültür ortamında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, pozitif kontrol amacıyla kullanılan petri kaplarındaki tek tabaka hücre kültürleriyle karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve aşağıda tartışılmıştır.

4.4.1. VİRÜS SUSU ve ÇALIŞMA KOŞULLARININ SECİMİ

Çalışmalarda, Sap Enstitüsü Seroloji Laboratuvarınca 1975 yılında Ankara'nın Mahmatlı köyünden izole edilen ve Pirbright Laboratuvarınca A₂₂ alt tipi olarak tanımlanan ASIA.1 tipi sap virüs susu kullanılmıştır. Bu virüsün şimdiye kadar sığırlar üzerinde 40. pasajı yapılmıştır. Bu pasajlardan en iyi enfektif titre veren 28. sığır pasajı çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir.

Virüsün üremesi, ortam pH ve sıcaklığıyla yakından ilgilidir. Bu nedenle, çalışmalar virüs üretimi için Sap Enstitüsü'nde daha önce yapılmış çalışmalarda belirlenmiş optimum koşullarda gerçekleştirilmiştir. Bulunan optimum değerler pH 7.2 ve sıcaklık 36°C'dir.

Sap virüsünün kültür süresi, virüs tiplerine ve üretilen virüsün tohum veya aşı virüsü olarak kullanımına göre değişir. Tohum olarak kullanılacak virüslerin toplanma süresi enfektif titrelerinin en yüksek olduğu 18-24 saatler arasındadır. Aşı hazırlamak amacıyla

Üretilen virüslerin antijenik titresi önemli olduğundan kültür süresi 24 saat ya da daha uzundur. Genel olarak virüsün 24-48 saat içinde hücreleri enfekte etmesi beklenir. Bu süre, hücrelerin % 80-90'ının ölümü için geçen süredir. Bu nedenle yapılan çalışmada da virüs kültür süresi 48 saat olarak belirlenmiştir.

4.4.2. Virüs Kültür Çalışmaları

Virüs inokülasyonu Bölüm 3.4.2'de anlatılan şekilde gerçekleştirildikten sonra, virüsün hücreleri enfekte ederek üremesi, inokülasyonu izleyen 48 saat süresince, 6'şar saat arayla alınan örneklerin antijenite (AT) ve enfektivite titreleri (IT) saptanarak incelenmiştir. Virüs üremesi hücre ölümüyle beraber yürüdüğünden, kültür süresi boyunca sürdürülen mikroskopik gözlemlerle, petri kaplarının ve mikrotasarıyıcıların yüzeyinde oluşan hücre ölümü izlenmiştir.

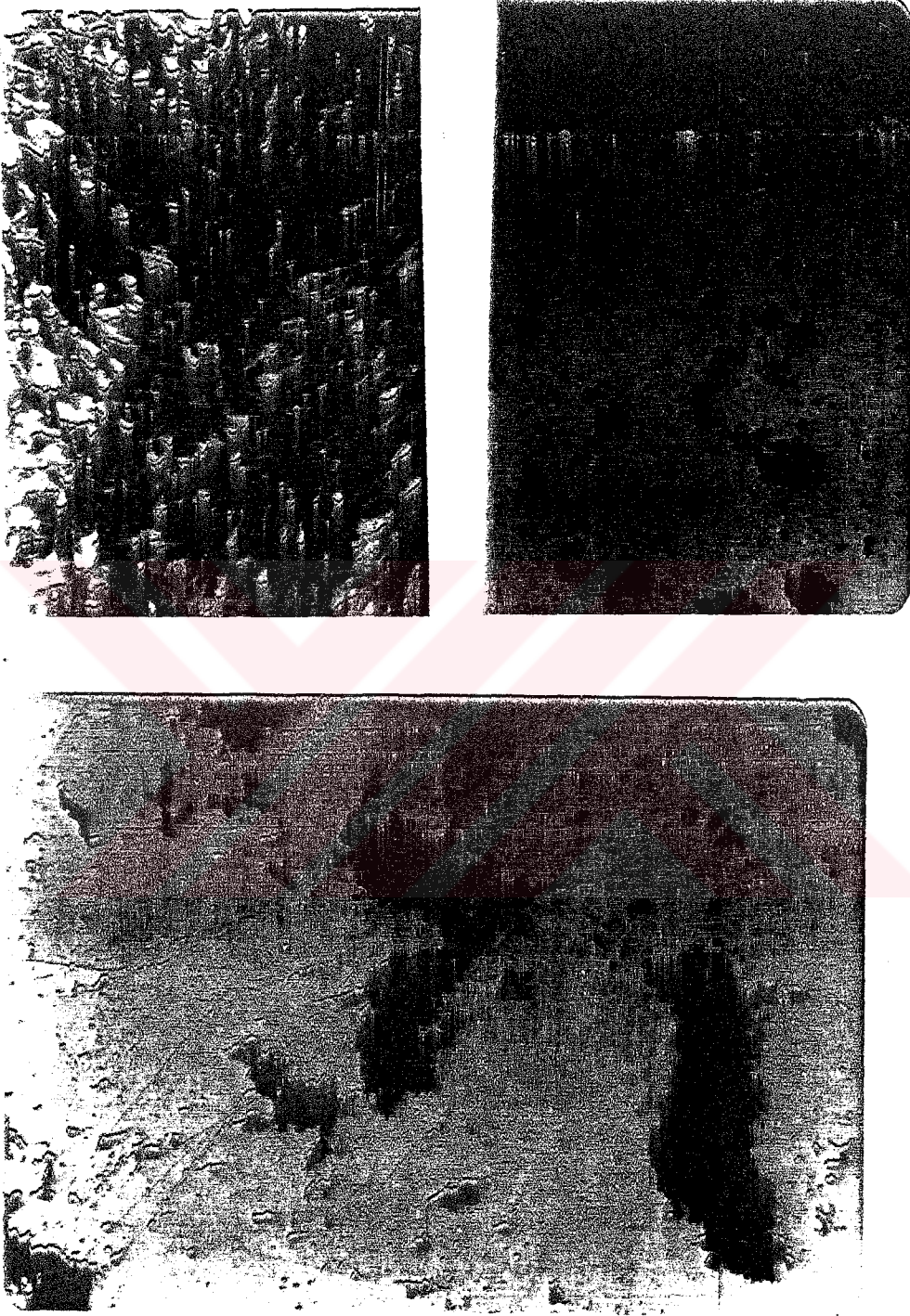
Sekil 4.51'de petri kabında gerçekleştirilen tek tabaka hücre kültüründe üremenin tamamlandığı durum görülmektedir. Daha sonra bu kültüre virüs inoküle edilmiştir. Virüs bulunduğu ortamdaki hücreler üzerinde üreyerek hücre ölümüne neden olmakta ve hücre ölümünün gerçekleştiği kısımlarda plak adı verilen sitopatojenik odaklar ya da boşluklar meydana getirmektedir. Bu odaklara "plak oluşum birimi" (pfu) adı da verilir. Sekil 4.51 b'de petri kabındaki virüs kültürünün 36'ncı saatinde bu tür plakların varlığı görülmektedir. Sekil 4.51 c'de aynı saha büyütülerek incelenmiştir.

36 saat sonunda ortamdaki hücreler tamamen ölmüş ve hücre kümeleri halinde yüzeyde birikmiştir.

Sekil 4.52'de ise durgun ortamdaki mikrotasarıyıcı-destekli kültürde virüs inokülasyonu sonrasındaki durum gösterilmiştir. Fotoğraflardan da görüleceği gibi, 36. saatte mikrotasarıyıcı yüzeyinde üremiş tüm hücreler virüsle enfekte olarak ölmüştür. Sekil 4.52 b'de ölü hücre kümeleri ve oluşan plaklar daha açık olarak görülmektedir.

Sekil 4.53'de çalışmada kullanılan A22 virüsünün petri kabındaki tek tabaka kültürde üreme eğrileri verilmiştir. Virüs üremesi, enfektif ve antijenik titrelerle belirlendiğinden, zamana karşı IT ve AT değerleri grafiğe alınarak söz konusu eğriler elde edilmiştir.

Eğrilerden görüleceği gibi A22 virüsünün 18-20. saatlerde enfektif, 24-30. saatlerde antijenik titreleri yükselmektedir. PHEMA mikrotasarıyıcı-destekli sistemde de aynı davranış gözlenmiştir. IT ve AT değerlerinin hesaplanma yöntemi EK-E'de verilmiştir.

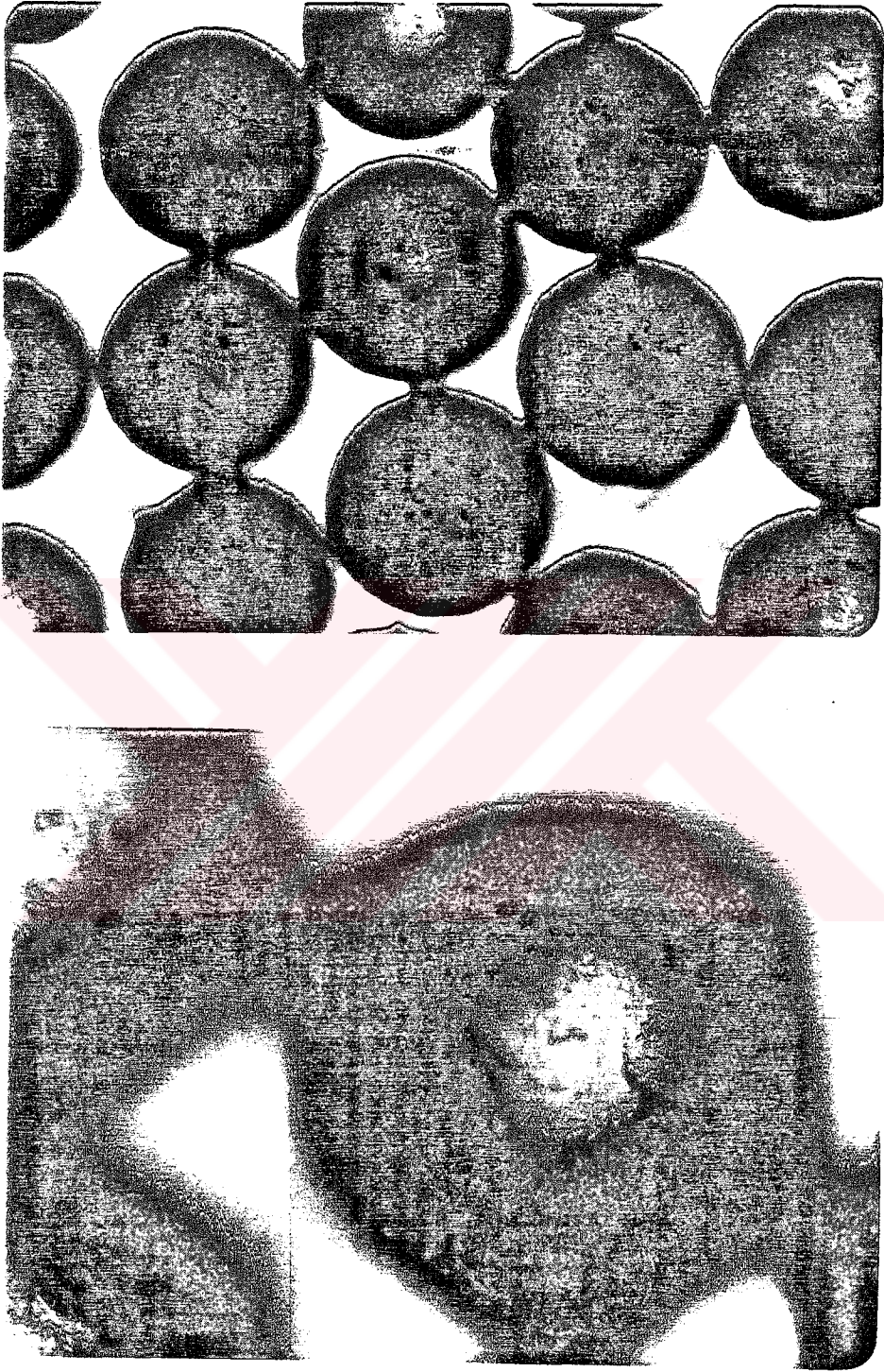


Şekil 4.51. Petri Kabındaki Tek Tabaka Kültürde Hücrelerin Virüs Tarafından Enfekte Edilmesi

a) Hücre kültürü

b) Virüs kültürü (36. saat)

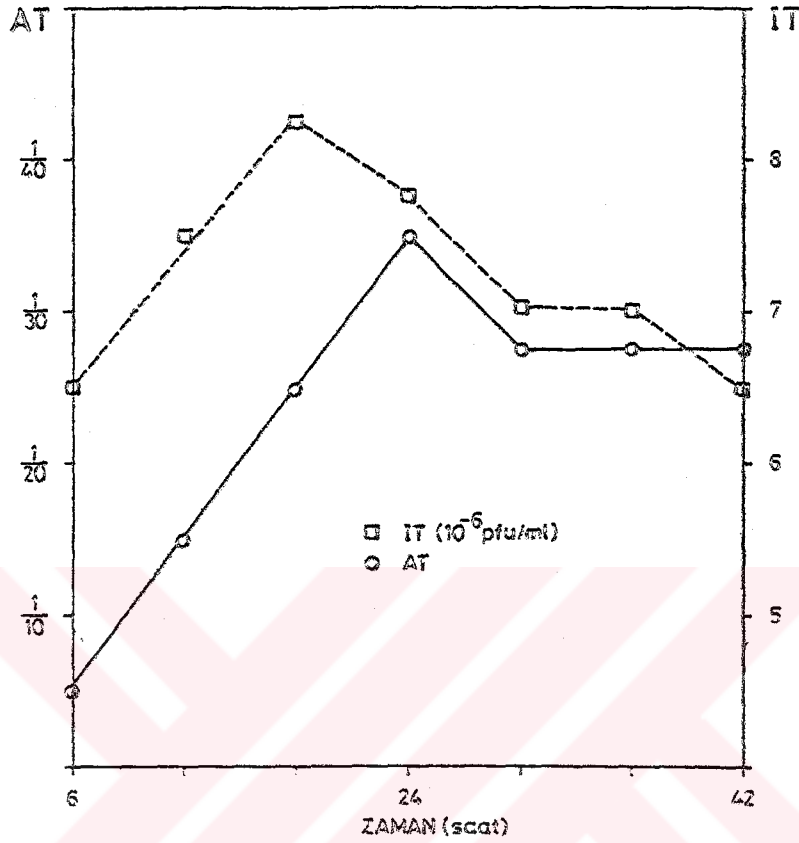
c) Virüs kültürü (36. saat)



Şekil 4.52. PHEMA Mikrotasiyıcı-Destekli Durgun Kültürde Hücrelerin Virüs Tarafından Enfekte Edilmesi

a) Virüs kültürü (36. saat)

b) Virüs kültürü (36. saat)



Şekil 4.53. Petri Kabındaki Tek Tabaka Kültürde A22 Virüsü Üreme Eğrileri.

Cizelge 4.26'da PHEMA mikrotasıyıcılarla ve mikrotasıyıcı kullanılmadan hazırlanan kültürlerde yapılan virüs duyarlılık testlerinin ortalama sonuçları verilmiştir.

Cizelge 4.26. Virüs Duyarlılık Testlerinin Sonuçları.

Sistem	IT (pfu/ml)	AT				
		1/1	1/2	1/3	1/4	1/8
PHEMA-Destekli	10 ^{-6.60}	4	4	4	3	2
Tek Tabaka Kültür	10 ^{-6.95}	4	4	4	4	3

Bir hücrenin virüse duyarlı olduğu, o virüs ile 10⁻⁶ pfu/ml ya da daha yüksek titre vermesi ile anlaşılar. Bu çalışmada PHEMA mikrotasıyıcı-destekli sistemde üretilen hücreler de A22

virüs tipine karşı bu değeri vermiş olduğundan virüse karşı duyarlı oldukları, başka bir deyişle, PHEMA matriksin hücre transformasyonuna neden olmadığı açıkça söylenebilir.



5. SONUCLAR

Cok sayıda biyolojik maddenin(viral asilar, interferon, plazminojen aktivatorleri, vb.) üretiminde kullanılan klasik hücre kültür tekniklerinin sahip olduğu dezavantajların ortadan kaldırılması için önerilen ve son yıllarda teknolojik boyutlarda uygulamaya geçen yöntemlerin en önemlisi sayılan " mikrotasiyıcı-destekli hücre kültür sistemleri " ile ilgili olarak yapılan bu çalışma, söz konusu sistemlerde kullanılmak üzere polimerik yapıda yeni mikrotasiyıcıların hazırlanmasını amaçlamıştır. Bu amaca uygun olarak iki farklı polimerik matriks seçilmiş ve hazırlanacak olan bu yeni matrikslerin kullanımıyla ticari olarak mevcut tasiyıcıların sahip olduğu dezavantajların ortadan kaldırılması planlanmıştır. Hazırlanan mikrotasiyıcılar, hidrofilik karakterli PHEMA ve hidrofobik yapıdaki PS' den oluşmuştur. Mikrotasiyıcıların uygunluğu, süspansiyon ve durgun kültür ortamlarında BHK hücreleri ile yapılan çalışmalar sonucunda saptanmıştır. Çalışmada ulaşılan önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- PHEMA mikrotasiyıcılar, HEMA monomeri ile EGDMA monomerinin MgO-Su ortamında süspansiyon kopolimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Tarafımızdan modifiye edilerek kullanılan bu yöntemde partikül boy ve boy dağılımını etkileyen en önemli parametrelerin dağıtma ortamı bileşimi, monomer/dağıtma ortamı oranı ve reaktör tasarımı, ki burada da karıştırıcı türü ve hızı, olduğu saptanmış ve koşullar uygun şekilde ayarlanarak dar boy dağılım aralığına sahip, 120-200 µ capında, seffaf, düzgün küresel partiküller elde edilmiştir.

- HEMA-EGDMA çapraz bağlanma/kopolimerizasyon reaksiyonu serbest radikal mekanizmasıyla gerçekleşmektedir. Bu mekanizmayı etkileyen parametrelerin çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, başlatıcı konsantrasyonu ve sıcaklık olduğu saptanarak polimerizasyonun en yüksek verimle gerçekleştirilmesini sağlayacak optimum değerler bulunmuştur.

- PHEMA partikülleri yüzey ve yığın özellikleri yapıya değişik oranlarda ilave edilen MMA ve DMAEMA monomerleri ile ayarlanmıştır.

- PS partikül yüzeylerinin çeşitli alkilamin monomerleri ile(TEA, EDA, ALAM) modifiye edilmesinde kullanılan plazma polimerizasyon tekniğinin yüzey modifikasyonu açısından etkin bir yöntem olduğu saptanmıştır.

• Polimerizasyon işlemi, monomer türüne, plazma reaksiyon süresi ve plazma gücüne karşı duyarlıdır. Bu koşullar değiştirilerek farklı yüzey özelliklerine sahip PS mikrotasiyıcılar elde edilmiştir. Plazma gücü ve süresinin artışıyla partikül yüzeyinde yer alan N miktarı artmaktadır. Ayrıca EDA plazmasıyla diğer iki plazmaya göre daha yüksek N konsantrasyonlarına ulaşılmıştır.

• BHK hücreleriyle durgun kültür ortamında yapılan çalışmalar sonucunda , bu hücreler için optimum çalışma aralığı sıcaklık 33-38°C, pH 7.2-7.6 olarak saptanmıştır.

Hücre kültür çalışmalarıyla mikrotasiyıcı-destekli sistemlerde hücre yapışma ve üreme teknikleri incelenmiş ve şu sonuçlar bulunmuştur.

• PHEMA yüzeyler hücre yapışması ve üremesini desteklememiştir. Bu yüzeylerde hücre yapışması ve üremesi MMA ve DMAEMA gruplarının yapıya katılmasıyla gerçekleşmiştir.

• Durgun kültür koşullarında yapılan çalışmalar sonucunda 0.13 mol MMA/mol HEMA: 0.15 mol DMAEMA/mol HEMA bileşimine sahip PHEMA mikrotasiyıcılar hücre yapışması ve üremesi açısından en uygun yüzeyler olarak seçilmiştir.

• PHEMA yüzeylerde hücre yapışması ilk 30 dakikada hızlı olmak üzere 2 saatte gerçekleşmiş, hücre üremesi ise 4 günde tamamlanmıştır.

• PHEMA mikrotasiyıcı-destekli durgun kültür çalışmaları için optimum mikrotasiyıcı konsantrasyonu 10 g/l, optimum inokülasyon yoğunluğu 3×10^5 hücre/ml olarak saptanmıştır.

• PHEMA mikrotasiyıcıları hücre verim değerinde değişme olmaksızın ikinci kez kullanılabilecekleri ve mikrotasiyıcıdan-mikrotasiyıcıya hücre transferinin gerçekleşebileceği gösterilmiştir.

• Süspansiyon kültür reaktörlerinde yapılan çalışmalarda karıştırma hızı 60 rpm olarak belirlenmiş ve PHEMA mikrotasiyıcılar kullanıldığı durumda en yüksek hücre verimi elde edilmiştir.

• PS mikrotasiyıcılarla yapılan çalışmalarda BHK hücrelerinin yapışma kinetiğinin, yüzey modifikasyonunda kullanılan alkilamin türüne bağlı olduğu gösterilmiştir. Plazma gücü ve süresi aynı kaldığında primer aminler (EDA, ALAM) ve özellikle EDA tersiyer amine (TEA) göre hücre yapışması için daha etkindir.

- Modifiye edilmemiş PS yüzeylerde hücre yapışması üremesi olmamıştır.
- Plazma reaksiyon süresinin ve gücünün artışı özellikle TEA yüzeylerde hücre yapışmasını belirgin bir biçimde arttırmıştır.
- TEA ile modifiye edilmiş yüzeylerde hücre üremesi daha yüksek değerlere ulaşmıştır. 10 dakikada ve 10 Watt'da modifiye edilmiş yüzey en uygun özelliklere sahiptir.
- PS mikrotasıyıcılar da yapışma ilk 2 saatde tamamlanmasına rağmen üreme 6 günde tamamlanmıştır.
- Hücre yayılması ve üremesi açısından 37-74 μ partikül çapı yetersiz kalmıştır.
- Mikrotasıyıcı-destekli sistemlerde hücre yapışması ve üremesi iki farklı davranış olduğu düşünülerek türetilen matematiksel modellerle başlangıç özgül üreme ve yapışma hızları saptanmıştır. Her iki kültür koşulunda ve tüm mikrotasıyıcılar (PS, PHEMA, Cytodex) için model değerleri ile deneysel veriler arasında oldukça iyi bir uyum görülmüş ve bu tür sistemlerde modellerin kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.
- PHEMA mikrotasıyıcı-destekli kültürlerde üretilen BHK hücrelerinin A22 tipi sap virüsüne duyarlı oldukları saptanmıştır.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, çalışmada geliştirilen her iki polimerizasyon yönteminin de istenilen özelliklerde mikrotasıyıcıların hazırlanması için uygun olduğu ve hazırlanan mikrotasıyıcıların "yüzeye bağımlı" hücrelerin üretim kapasitelerinin arttırılması amacıyla ticari örneklerle alternatif olarak kullanılacakları sonucuna ulaşılmıştır.

DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ

1. Earle, W. R., Schilling, E. L., Shannon, J. E., J. Nat. Cancer Inst., 12, 179, 1951.
2. Naugent, H., Preaud, J. M., Rouchouse, J., Favre, H., Dubouciard, C., Dev. Biol. Standard, 34, 33, 1977.
3. Johnston, M. D., Christaffinis, G., Ball, G. D., Fantes, K. H., Finter, N., Dev. Biol. Standard, 42, 169, 1979.
4. Ng, J. J. Y., Crespi, C. L., Thilly, W. G., Anal. Biochem., 109, 231, 1980.
5. McKeehan, W. L., McKeehan, K. A., and Ham, R. G., in Requirement of Vertebrate Cells in Vitro, Waymouth, C., Ham, R. G., and Chapple, P. G., eds., Cambridge University Press, Cambridge.
6. Rembaum, A., Senyei, A. E., and Rajaraman, R., J. Biomed. Mat. Res. Symp. 8, 101, 1977.
7. Monthony, J. F., Schwartz, N. D., Hollis, D. F., and Poiestri, G. D., U. S. patent, 4, 237, 218, 1980.
8. Panina, G. F., in Animal Cell Biotechnology, Spier, R. E., and Griffith, J. B., eds., Academic Press, London, 1985.
9. House, W., Shearer, M., Maroudas, N. G., Exp. Cell. Res., 71, 293, 1972.
10. Weiss, R. E., Schleicher, J. B., Biotech. Bioeng., 100, 601, 1968.
11. Wohler, W., Rudiger, H. W., Passarge, E., Exp. Cell. Res., 74, 571, 1972.
12. van Wezel, A. L., Nature, 64, 1967.
13. Montegnon, B., Vincent-Falquet, J. C., Fanget, B., Develop. Biol. Standard, 55, 37, 1984.
14. Pharmacia Fine Chemicals Technical Booklet Series, Microcarrier Cell Culture, Principle and Methods, Sweden, 1981.
15. Ham, R. G., McKeehan, W. L., in Methods in Enzymology, Jakoby, W. B., and Pastan, J. H., eds., Academic Press, New York, 58, 44, 1979.
16. Litwin, J., Dev. Biol. Stand., 42, 37, 1979.
17. Eagle, H., Science, 130, 432, 1959.
18. Grinnell, F., Milam, M., Sirere, P. A., Arch. Biochem. Biophys., 153, 193, 1972.
19. Grinnell, F., Int. Rev. Cytol., 53, 65, 1978.
20. Maroudas, N. G., J. Theor. Biol., 49, 417, 1975.
21. Baier, R. E., Bull. N. Y. Acad. Med., 2, 48, 257, 1972.
22. Vioman, L., Bull. N. Y. Acad. Med., 2, 48, 302, 1972.
23. Folkman, J., and Marcona, A., Nature, 273, 345, 1978.

24. Margolis, L. B., Dvyatkovitskaya, E., and Bergelson, L. D., *Exp. Cell. Res.*, 111, 494, 1978.
25. Maroudes, N. G., *J. Theor. Biol.*, 79, 101, 1979.
26. Hay, E. D., in *Cell Biology of the Extracellular Matrix*, May, E. D., ed., Plenum Press, New York, 1981.
27. May, E. D., *J. Cell Biol.*, 91, 205, 1981.
28. Grinnell, F., *Methods Enzymol.*, 82, 499, 1982.
29. *European Pharmacopoeia* (Council of Europe eds), France, 11, 65, 1971.
30. Houdkamp, J., Costar Europe Ltd., 1982.
31. Amstein, C. F., and Hartman, P. A., *J. Clin. Microbiol.*, 2, 46, 1975.
32. Munder, P. G., Modolell, M., and Wallach, D. F. H., *FEBS Lett.*, 15, 191, 1971.
33. Spier, R. E., *Adv. Biochem. Eng.*, 14, 119, 1980.
34. Whittle, W. L., Kruse, P. F., in *Tissue Culture Methods and Applications*, Kruse, P. F., Patterson, M. K., eds., Academic Press, New York, 1973.
35. Girard, H. C., Sütcü, M., Erdem, H., Gürhan, İ., *Biotech. Bioeng.*, 22, 477, 1980.
36. Knazek, P. A., Gullino, P. H., Kohler, P. O., Dedrick, R. L., *Science*, 178, 65, 1972.
37. Jensen, M. D., *Biotech. Bioeng.*, 23, 2703, 1981.
38. Feder, J., Talbert, W. R., *Sci. Am.* 248m 36, 1983.
39. Lim, F., Sun, A. M., *Science*, 210, 908, 1980.
40. van Wezel, A. L., *Develop. Biol. Stand.*, 37, 143, 1977.
41. Spier, R. E., Whiteside, J. P., *Biotech. Bioeng.*, 18, 659, 1969.
42. van Wezel, A. L., in *Tissue Culture, Methods and Applications*, Kruse, P. F., Patterson, M. K., eds., Academic Press, New York, 1973.
43. Levine, D. W., Wang, D. I. C., Thilly, W. G., in *Cell Culture and its Applications*, Acton, R. T., Lynn, J. D., eds., Academic Press, New York, 1977.
44. Levine, D. W., Thilly, W. G., Wang, D. I. C., *Develop. Biol. Stand.*, 42, 159, 1979.
45. Levine, D. W., Wang, D. I. C., Thilly, W. G., *Biotech. Bioeng.*, 21, 821, 1979.
46. Hirtenstein, M., Clark, J., Lindgren, G., Yretblad, P., *Develop. Biol. Stand.*, 46, 109, 1980.
47. Reuveny, S., Mizrahi, A., Kotler, M., Freeman, A., *Biotech. Bioeng.*, 25, 469, 1983.
48. Butler, M., Imamura, T., Thomas, J., Thilly, W. G., *J. Cell. Sci.*, 61, 351, 1983.
49. Griffiths, B., Thornton, B., McEntee, I., *Eur. J. Cell Biol.*, 22, 606, 1980.
50. Bone, A. J. and Swenne, I., *In Vitro*, 18, 141, 1982.
51. Crespi, C. L. and Thilly, W. G., *Mutation Res.*, 106, 123, 1982.

52. Shahan, A., Reuveny, S., Amir, A., Kotler, M. and Mizrahi, A., *J. Neurosci. Res.*, 9, 339, 1983.
53. David, A., Segard, E., Brown, G., Berneman, A., Horodiceanu, F., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 369, 61, 1981.
54. Nilsson, K., Mosbach, K., *FEBS Lett.*, 118, 145, 1980.
55. Obrenowitch, A., Sene, C., Maintier, C., Boschetti, E., *Biol. Cell.*, 45, 28, 1982.
56. Reuveny, S., Corlett, R., Mizrahi, A., Freeman, A., Kotler, M., *Proc. Biotech.*, 84, 1984.
57. Varani, J., Dame, M., Beals, T. F., Wess, J. A., *Biotech. Bioeng.*, 25, 1359, 1983.
58. Fairman, K., Jacobson, B. S., *Tissue Cell.*, 15, 167, 1983.
59. Lazar, A., Silberstein, L., Margel, S., Mizrahi, A., *Develop. Biol. Stand.*, in press.
60. Reuveny, S., Mizrahi, A., Kotler, M., Freeman, A., *Biotech. Bioeng.*, 25, 2969, 1983.
61. Clark, J., Gebb, C., Hirtenstein, M. D., *Develop. Biol. Stand.*, 50, 81, 1982.
62. Gebb, C., Clark, J. M., Hirtenstein, M. D., Lindgren, G., Lindskog, U., Lundgren, B., *Develop. Biol. Stand.*, 50, 93, 1982.
63. Pharmacia Fine Chemicals Technical Booklet Series, Microcarrier Cell Culture: Technical Notes, Uppsala, Sweden, 1981.
64. Sundquist, K. G., Wagner, L., *Immunology*, 41, 883, 1980.
65. Horst, J., Kern, M., Ulmer, E., *Eur. J. Cell. Biol.*, 22, 599, 1980.
66. Zavainyi, M. A., Grochev, V. P., Denisova, T. N., Popva, V. L., *Vopr. Virusol.*, 5, 583, 1980.
67. Duda, I., *Cryo Lett.*, 3, 67, 1982.
68. Lai, C. S., Hopwood, L. E., Swartz, H. H., *Exp. Cell. Res.*, 130, 437, 1980.
69. Imamura, T., Crespi, C. C., Thilly, W. G., *Anal. Biochem.*, 125, 353, 1982.
70. Billig, D., Clark, J. M., Ewell, A. J., Carter, C. M., Gebb, C., *Develop. Biol. Stand.*, 55, 67, 1975.
71. Mered, B., Albrecht, P., Hopps, H. C., *In Vitro*, 16, 859, 1980.
72. Morandi, M., Valeri, A., *Biotech. Lett.*, 4, 465, 1982.
73. Fleischaker, R. J., Sinskey, A. J., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 12, 193, 1981.
74. Giard, D. J., Thilly, W. G., Wang, D. I. C., *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 668, 1979.
75. Maigner, B., *Develop. Biol. Stand.*, 42, 141, 1979.
76. Griffiths, B., Thornton, B., McEntee, I., *Develop. Biol. Stand.*, 50, 103, 1982.
77. Reuveny, S., Silberstein, L., Shahan, A., Freeman, E., Mizrahi, A., *Develop. Biol. Stand.*, 50, 115, 1982.

78. Fiorentini, D., Mizrahi, A., *Develop. Biol. Stand.*, 61, 110, 1984.
79. Manousas, M., Torchio, C., Stephens, R., *In Vitro*, 15, 507, 1980.
80. Föhring, B., Tjia, S. T., Sauer, G., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 164, 122, 1980.
81. Bergman, R., Ströman, L., *Develop. Biol. Stand.*, 55, 77, 1984.
82. van Wezel, A. L., van der Velden-de-Groot, *Develop. Biol. Stand.*, 46, 151, 1980.
83. van Wezel, A. L., van Steenis, G., Hannik, C. A., *Develop. Biol. Stand.*, 41, 159, 1978.
84. Crespi, C. M., Thilly, W. G., *Mutation Res.*, 106, 123, 1982.
85. Michel, P., Colette, D., *J. Cell. Biol.*, 83, 302A, 1979.
86. Bloch-Olszewska, Z., Shurska, Z., *Interferon Memoranda*, Nov., 1979.
87. Prestidge, R. L., Sandlin, G. M., Koopman, W. J., *J. Immunol. Meth.*, 46, 197, 1981.
88. Scott, R. W., Eaton, D. L., Baker, J. B., *J. Cell. Biol.*, 95, 121A, 1982.
89. Griffiths, B., Atkinson, T., Riley, P. A., *Develop. Biol. Stand.*, 55, 31, 1984.
90. Hu, W. S., Meier, J., Wang, D. I. C., *Biotech. Bioeng.*, 27, 585, 1985.
91. Thayer, P. S., in *Tissue Culture Methods and Applications*. P. F. Kruse, M. K. Patterson, eds., Academic Press, New York, 1973.
92. Knezek, R. A., Gullino, P. M., Koller, P. D., *Science*, 178, 65, 1972.
93. Lyderson, B. K., Pugh, G. G., Paris, M. S., Noll, L. A., *Biotechnology*, 3, 63, 1985.
94. Pirt, S. J., *Proc. R. Soc. London. Ser. B*, 163, 224, 1965.
95. Monod, J. C., *Ann. Rev. Bacteriol.*, 3, 371, 1949.
96. Bailey, J. E., Ollis, D. F., in *Biochemical Engineering Fundamentals*, Mc Graw Hill, 1977.
97. Weiss, R. M., Ollis, D. F., *Biotech. Bioeng.*, 22, 859, 1980.
98. Klimek, J., Ollis, D. F., *Biotech. Bioeng.*, 22, 2321, 1980.
99. Nazlıoğlu, M., Örun, H., *Sap Enstitüsü 1967-1969 Çalışmaları*, 15, 1969.
100. Joubert, L., Mackowiak, C., *Édit. Ford. Merieux*, 1, 174, 1968.
101. Cooper, P. D., Agai, V. I., Brown, F., *Intervirology*, 10, 165, 1978.
102. Yalies, H., Carree, H., *Acad. Sci.*, 174, 1498, 1922.
103. Capstick, P. B., Telling, R. C., Chapman, W. G., *Nature*, 195, 4847, 1163, 1962.
104. Marpherson, I. A., Stoker, M., *Virology*, 16, 147, 1962.
105. Stoker, M., Marpherson, I. A., *Nature (London)*, 203, 1355, 1964.
106. Mowat, G. M., Champen, W. G., *Nature (London)*, 196, 253, 1962.
107. Altgelt, K. H., in *Advances in Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 7, 3, 1968.
108. Langer, R. S., Peppas, N. A., *Biomaterials*, 2, 201, 1981.

109. Sherwood, T. K., Pigford, R. L., Wilke, C. R., *Mass Transfer*, McGraw Hill, New York, 1975.
110. Roseman, T., Mansdorf, S. Z., *Controlled Release Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York, 1983.
111. Mueller, K. F., Heiber, S., Flankl, W., U. S. Patent, 4, 224, 472, 1978.
112. Kalai, J., Gumargalieva, K., Adamyan, A., *Biomaterials*, 7, 188, 1986.
113. Robert, C. C. R., Buri, P. A., Peppas, N. A., *J. Appl. Polym. Sci.*, 30, 301, 1985.
114. Wichterle, O., Lim, D., *Nature*, 185, 117, 1960.
115. Weisz, P. B., *J. Phys. Chem.*, 59, 464, 1955.
116. Stuart, M., *Nature*, 199, 59, 1963.
117. Westwood, A. R., *Eur. Polym. J.*, 7, 363, 1971.
118. Gombatz, W. R., Piskin, E., Kiremitci, M., Hoffman, A. S., *Biomat. Artif. Cell. Artif. Org.* 1988 (baskıda)
119. Klebe, R. J., Bentley, K. L., Schoen, R. C., *J. Cellular Physiology*, 109, 481, 1981.
120. Folkman, J., Moscona, A., *Nature*, 273, 345, 1978.
121. Civerchio-Perez, L., Faris, B., et. al., *Proc. Nation. Acad. Sci.*, 77, 2064, 1980.
122. Lydon, H. J., Minett, T. W., Tighe, B. J., *Biomaterials*, 6, 396, 1985.
123. van Wachem, P. B., Hogt, A. H., Beugeling, T., Feijen, J., Bantjes, A., Dalmers, J. P., van Aken, W. G., *Biomaterials*, 8, 323, 1987.
124. Ratner, B. D., Weatherstby, P. K., Hoffman, A. S., Scharpen, L. H., *J. Appl. Poly. Sci.*, 22, 643, 1978.
125. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., *J. Appl. Poly. Sci.*, 18, 3183, 1974.
126. Capstick, P. B., Telling, R. C., Chapman, W. G., Stewart, D. L., *Nature*, 195, 1163, 1962.
127. Matsuda, T., Litt, M., *Modification and Characterization of Polystyrene Surfaces Used for Cell Culture*, In *Biomedical Applications of Polymers*, 1985.
128. Curtis, A. S. G., Forrester, J. V., McInnes, C., Lawrie, F., *J. Cell. Biol.*, 97, 1500, 1983.
129. Smitt, L., Hill, J., Kim, S. W., Andrade, J. D., *ACS Polym. Preprints*, 16, 187, 1975.
130. Ramsey, W. S., Hertl, W., Nowland, E. D., *In Vitro*, 20, 802, 1984.
131. Nilsson, K., Mosbach, K., *Develop. Biol. Standard.*, 46, 125, 1980.
132. Gombatz, W. R., Hoffman, A. S., *CRC Critical Reviews in Biocompatibility*, 4, 1, 1987.
133. Yasuda, H., Gazieki, M., *Biomaterials*, 3, 68, 1982.
134. Hoffman, A. S., *Adv. Pol. Sci.*, 57, 141, 1984.

135. Yasuda, H., Bumgarner, M. O., Marsh, H. C., Morosoff, N., J. Polym. Sci. Polym. Chem. ed. 14, 195, 1976.
136. Clark, D. T., Adv. in Polym. Sci., 24, 125, 1976.
137. Clarke, J. B., Spier, R. E., Arch. of Virology, 63, 1, 1980.
138. Bax, B., Bachrach, H. L., Virology, 104, 42, 1980.
139. Clarke, J. B., Acta Virol., 27, 534, 1983.
140. Green, M., Virology, 183, 234, 1985.



EK-A

HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN ORTAMLARIN BİLEŞİMİ

Hücre kültür çalışmaları DME ortamıyla yapılmıştır. Ayrıca ödenemelerde, Eagle MEM ortamı da kullanılmıştır. Çizege A1 ve A2'de, bu ortamların kimyasal bileşimi verilmiştir.

Çizege A1. Eagle MEM Ortamı.

Bileşen	Miktar	Bileşen	Miktar
<u>L-Amino asitler</u>		<u>Vitaminler</u>	
Arginine	0.6	Choline	8.3
Cystine	0.1	Folik asit	2.3
Glutamine	2.0	Inositol	11.0
Histidine	0.2	Nikotinamid	8.2
Isoleucine	0.4	Pantothenate	4.6
Lisin	0.4	Pyridoksal	6.0
Methionine	0.1	Riboflavin	0.27
Phenylalanine	0.2	Thioamine	3.0
Threonine	0.4	<u>İnorganik Tuzlar</u>	
Tryptophen	0.05	NaCl	116.0
Tirosin	0.2	KCl	5.4
Valine	0.4	CaCl ₂	1.8
Leucine	0.4	MgCl ₂ .6H ₂ O	1.0
<u>Karbon Kaynağı</u>		NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1.1
Glukoz	5.5	NaHCO ₃	23.8

* Vitaminler dışındaki tüm bileşenler milimolar, vitaminler mikromolar olarak verilmiştir.

Çizelge A2. DME Oranları.

Bileşen	Miktar	Bileşen	Miktar
<u>L-Amino asitler</u>		<u>Vitaminler</u>	
LArginine	0.4	Choline	29.0
Cystine	0.4	Folik asit	9.1
Glutamine	4.0	Inositol	39.0
Histidine	0.2	Nikotinamid	33.2
Isoleucine	0.8	Pantothenate	17.0
Lisin	0.8	Pyridoksal	20.0
Methionine	0.2	Riboflavin	1.1
Fenilalanin	0.4	Thiamine	1.2
Threonine	0.8	<u>İnorganik Tuzlar</u>	
Tryptophan	0.08	Ca ⁺⁺	1.8
Tirosin	0.4	Mg ⁺⁺	0.8
Valine	0.8	K ⁺	5.4
Leucine	0.8	Na ⁺	160.0
Glisin	0.4	Cl ⁻	120.0
Serine	0.4	NO ₃ ⁻	0.0007
<u>Karbon Kaynağı</u>		SO ₄ ⁻²	0.9
Glukoz	5.5	PO ₄ ⁻³	0.0002

* Vitaminler dışındaki tüm bileşenler milimolar, vitaminler mikromolar olarak verilmiştir.

Cizelge A3. Fetal Calf Serum (FCS) Bileşimi.

Bileşenler	Birim	Miktar
Protein	% g	1.68 - 5.30
Hemoglobin	% mg	10 - 110
Laktat dehidrojenaz	IU	900 - 3320
Gama globulin	% mg	0 - 470
Yağlar	% mg	140 - 440
Kolestrol	% mg	20 - 90
Serbest yağ asitleri	mEq/lt	0.1 - 0.6
Ürik asit	mg/dl	2.71 - 11.8
Büyüme hormonları	mg/dl	4.1 - 167
İnsülin	mU/ml	0.5 - 13.7
Estron	pg/ml	11 - 71
Serbest kortizol	ng/ml	4 - 34

EK-B

HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN ORTAM VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Çizelge B.1 Glasgow MEM Ortamı.

Glasgow Toz Ortam (GIBCO, ABD)	10.00 g
Triptoz Fosfat	10.00 ml
1 M Tris	2.50 ml
NaHCO ₃	0.40 ml
Antibiyotik	0.40 ml
HCl (1M)	0.15 ml

İki kez destillenmiş su ile 100 ml'ye tamamlanır

Çizelge B.2. DME Ortamı.

DME Toz Ortam (GIBCO, ABD)	10.00 g
Triptoz Fosfat	10.00 ml
1 M Tris	2.50 ml
NaHCO ₃	0.40 ml
Antibiyotik	0.40 ml
HCl (1M)	0.15 ml

Çizelge B. 3. VM₃ Ortamı (5 kez konsantre).

NaCl	40.0 gr
KCl	1.5 gr
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.2 gr
MgCl ₂ .6H ₂ O	1.0 gr
Glukoz	9.0 gr
Laktalbumin hidrolizat	25.0gr
Fenol kırmızısı	1 ml
Penisilin	1 x 10 ⁶ Unite
Streptomisin	599 mg
Distile su	1 lt

Karışım süzildükten sonra steril edilir.

Çizelge B.4. Tylose Örtme Ortamı.

Tylose MH / MHS Toz Ortam (Farwerke Hoechst, Batı Almanya)	
VM ₃ (5 kez konsantre)	40.0 ml
1 Mol Tris (pH: 7.4)	10.0 ml
1 Mol Tris	1.6 ml
Antibiyotik	0.8 ml
Steril Tylose Toz Ortam	1.57 gr

İki kez distillenmiş su ile 200 ml'ye tamamlanır.

Çizelge B. 5. PBS (Fosfat Tampon) Çözeltisi.

NaCl	8.00 gr
KCl	0.20 gr
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	2.37 gr
KH ₂ PO ₄	0.20 gr
CaCl ₂	0.10 gr
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.10 gr
Distile su	1.00 ml

Çizelge B. 6. Trypan Blue Çözeltisi (% 0.5'lik)

Trypan Blue	0.5 gr
NaCl	100.0 ml

Çizelge B. 7. Tripsin Çözeltisi (% 1'lik).

Tripsin	10.0 gr
Distile su	1000 ml

Bir gece + 4°C'de eritilir, süzülür, dondurulur.

EK-C

HÜCRE SAYIM YÖNTEMİ

Hücre sayımının amacı, kültür ortamında bulunan hücrelerin sağlıklı olup olmadıklarının belirlenerek hücre veriminin saptanmasıdır.

Çalışmada hücre sayımı hemositometreyle ve aşağıda verilen yöntem izlenerek yapılmıştır.

Sayımı yapılacak hücre çözeltisinden bir test tüpüne 0.9 ml konulur, üzerine % 0.5'lik trypan blue çözeltisinden 0.1 ml ilave edilerek, oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir. Bu bekleme, ölü hücrelerin veya ölmek üzere olanların boya almalarını sağlamak içindir. Bu süre içinde ölü hücreler boyanarak koyu mavi veya mavimsi renkte görünürler, sağlıklı ve canlı hücreler, süre ne kadar uzun olursa olsun boya almazlar, görünüşleri parlak ve düzgündür.

Sayım için boyanmış hücre karışımından bir damla alınarak, hemositometrede lam ve lamel arasına konur, mikroskopta ($0.4 \times 10:400$ kez büyütülerek) hücrelerin sayımları yapılır. Ölü ve canlı hücreler ayrı ayrı sayılır. Sayma işlemi, ya bütün kareler veya üç büyük kare sayılarak yapılır. Çıkan sayım değeri, sayılmış kare sayısına bölünür. 9 büyük kare sayılmışsa 3'e bölünür, çıkan sayı 10^{-4} ile carpılır ve 1 ml'deki hücre miktarı bulunmuş olur.

EK-D

HÜCRELERİN MİKROSKOPİK İNCELEMESİ

Hücre yapısına, yayılma ve üremesi mikroskopla rutin olarak incelenir. Kültür ortamından alınan örnek lam üzerinde mikroskop tablasına yerleştirilir ve uygun büyütmelerde inceleme yapılır. Kültür ortamından alınan örneğin kalıcı olması istenildiğinde, sabitleştirme işlemi uygulanır. Hücreler gerektiğinde uygun boyalarla (kristal viyole, Giemsa, Hematoksilin, vb.) boyanarak daha iyi bir inceleme yapılabilir. Sabitleştirme ve boyama işlemleri, aşağıda açıklanmıştır.

Sabitleştirme İşlemi: Sabitleştirme işlemiyle, hücreler yapısal değişikliğe uğramaksızın, uzun süre muhafaza edilebilirler. En çok kullanılan sabitleştiriciler metanol ve etanol'dür, ancak en iyi sonuca glutaraldehit ile ulaşılmaktadır. İşlem şu şekildedir. Hacimce % 2-5'lik glutaraldehit çözeltisi (PBS içinde) hazırlanır ve sabitleştirilecek hücreler + 4°C'da bir gece boyunca bu çözelti içerisinde bekletilir. Daha sonra çözelti uzaklaştırılır.

Boyama İşlemi: Yapılan çalışmada hücreler kristal viyole ile boyandıktan sonra mikroskopik inceleme gerçekleştirilmiştir. İşlem şu şekildedir. 1 ml kültür örneği, vasatı uzaklaştırıldıktan sonra % 0.1 oranında kristal viyole içeren 1 ml 0.1 M sitrik asit çözeltisine ilave edilir, 37°C sıcaklıktaki etüvde 1 saat bekletildikten sonra çözelti uzaklaştırılır ve örnek PBS ile iki kez yıkanır, yıkama çözeltileri uzaklaştırılır.

EK-E

SAP VİRÜSÜ DUYARLILIK TESTLERİ

Yapılan çalışmada, hücre kültür sistemlerinde üretilen BHK-21 hücrelerinin sap virüsüne duyarlılığı antijenite ve enfektivite testleriyle saptanmıştır. Virüslerin antijenik titreleri (AT), yarı-kantitatif komplement fiksasyon testi (CFT) ile, enfektif titreleri (IT) de plak test metoduyla tayin edilmiştir. Aşağıda, bu 2 yöntem açıklanmıştır.

Komplement Fiksasyon Yöntemi: Komplement fiksasyon testi, sap laboratuvarlarında rutin olarak kullanılmaktadır. Sap hastalığı çalışmalarında bu test⁺ aşağıdaki durumlarda uygulanır.

- Bilinmeyen virüs örneklerinin immünoojik tip tayini ve aşı üretiminde kullanılan virüs ve çalışılan süşun kontrolü
- Birden fazla immünoojik tipten tek virüs tipinin veya karışımının ortaya çıkarılması
 - Sap hastalığı ile karıştırılabilen benzeri hastalıkların ayırt edilmesi
 - Virüsün immünoojik karakteri (ait tip) üzerinde daha fazla bilgi edinilmesi
 - Virüsün enfektif titresinin ölçülmesi

Komplement fiksasyon testi iki aşamalı bir test olup iki antikorla ihtiyaç vardır. Bunlardan birincisi, testte antijen olarak kullanılan mikroorganizmaya karşı özel olarak immünize edilmiş hayvan serumundaki antikor'dur. Diğeri ise tavşandan elde edilen hemolizin (hemolitik antikor)'dır. Yöntem, hayvan serumunda bulunan komplement'in yardımı ile bu antikorların spesifik antijenlerini aglütine etmesi esasına dayanır.

Komplement fiksasyon testinde ya bilinen serumlarla süpheli antijen ya da bilinen antijenlerle süpheli serum karşı karşıya getirilir, fakat genellikle bilinen serumlarla süpheli antijen kontrol edilmektedir. Komplement fiksasyon testinde asıl olan, antijen olarak kullanılan virüsün, tipi ve titresi belli hiper immün serumlarla karşılaştırmak suretiyle tipinin tayinidir. Antijenle antikor birleşirken titreye göre konmuş olan komplementi harcar, bu reaksiyon 37°C'de su banyosunda 30 dakikada tamamlanır. Bu süre sonunda ortama ilave edilen hemolitik sistem komplement harcadığı için erimeyecek ve dibe çökecektir. Eğer antijen antikorun karşıtı değilse veya antijen olarak kullanılan maddede virüs yoksa, su banyosunda 37°C'de 30 dakika tutulduğunda komplement harcanmadığından bu kez komplement yardımı ile hemolizin koyun kanını eritecek ve kırmızı renk görülecektir.

Bu olay şu şekilde de açıklanabilir. Hiper immün serumun ilgisiz olduğu virüsü tutan Cytophor ve komplemanı tutan Complementophor adlı iki kolu vardır. Kullanılan antijen serumun karsiti ise Cytophor kol tarafından tutulur, diğer kol da komplemanı tutar. Antijen serumun karsiti değilse ya da kullanılan antijende virüs yoksa tutuşma olmayacak ve kompleman açıkta kalacaktır. Bu olay gözle izlenemeyeceğinden, hemoliz olayından faydalanılarak gözle görülür duruma getirilir. Bu amaçla ortama hemolitik sistem ilave edilir. Yöntemde, hemoliz derecesi 0'dan % 100'e kadar, % 25 oranındaki artışlarla değerlendirilir ve 4+, 3+, 2+, 1+, 0 işaretleriyle ifade edilir. (4+) hiç hemoliz olmadığı, yani komplemanın tamamen harcandığını, (0) tam hemolizi, yani komplemanın harcanmadığını, gösterir.

Test kısaca CH100 ya da H100 kompleman fiksasyon testi olarak adlandırıldığı gibi, spektrofotometrik olarak % 50 hemolize göre standartlaştırılırsa (CH50) testi olarak ifade edilir.

Testin uygulanışı şu şekildedir.

Virüsün 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/60'lık seyreltik çözeltileri hazırlanır. Bu çözeltilerin her birinden farklı tüplere 0.25 ml'lik numune konulur. Titresine göre komplemandan her tüpe 0.25 ml ilave edilir ve tüpler 37°C'de 30 dakika su banyosunda bekletildikten sonra hemolitik sistemden bütün tüplere 0.50 ml konularak aynı işlem tekrarlanır, ve hemoliz dereceleri okunarak test tamamlanır.

Plak Test: Bu yöntemde virüs, hücreler üzerine tesbit edilerek etrafa yayılması önlenir ve virüsün bulunduğu yerdeki hücreler üzerinde üreyerek meydana getirdiği plaklar incelenir. Bir plağın bir enfektif birimden oluştuğu düşünülerek plakların sayılmasıyla pfu değeri saptanır. Bu değer, virüsün enfektif titresi (IT) olarak değerlendirilir.

Virüsün titresi ölen veya enfekte olan hücrelerin yüzdesine göre tayin edilir. Enfektiviteyi ifade etmek için ID50 (%50 enfektif doz) terimi kullanılır.

Virüsün enfektivite titrelerinin hesaplanmasında Reed-Muench yöntemi yaygın olarak kullanılır.

Reed-Muench formülü aşağıda verilmiştir.

$$\text{Log (orantısal uzaklık) OU} = \frac{\% 50\text{'nin üstündeki ölüm} - 50}{\% 50\text{'nin üstündeki ölüm} - \% 50\text{'nin altındaki ölüm}}$$

Bu formülün uygulanması aşağıda bir örnekle açıklanmıştır.

Virüsün 10^{-1} 'den başlayarak 10^{-7} ye kadar on katlı seyreltik çözeltilerinin hazırlandığı ve her çözelti için 5'er test tüpü hücre kültürü kullanılarak 10^{-4} değerinden başlayarak inokülasyonlar yapıldığı durum ele alınsın. Reed ve Muench yöntemine göre negatif ve pozitif tüpler ayrı ayrı sayılırlar. Pozitif olanlar yani ölümler yüksek konsantrasyondan düşüğe, negatifler yani canlılar da ters yönde sayılırlar. Sonuç olarak Çizelge E.1'de verilen değerlerin septandığı düşünölsün.

Çizelge E1. Enfektif Titrasyon Hesabı.

Seyrelme	Tüp Sayısı	Ölen	Canlı	Kümülatif Değerler			% Değerler	
				Ölü	Canlı	Ölüm Oranı	Ölü	Canlı
10^{-4}	5	5	0	16	0	16/16	100.0	00.0
10^{-5}	5	5	0	11	0	11/11	100.0	00.0
10^{-6}	5	4	1	6	1	6/7	85.2	14.8
10^{-7}	5	2	3	2	4	2/6	33.2	66.8

Bu çizelgeden de göröldüğü gibi % 50 enfektif nokta 10^{-6} ile 10^{-7} arasına rastlamaktadır. Bu değerler Reed-Muench formülüne uygulandığında;

$$OU = \frac{85.2 - 50}{85.2 - 33.2} = 0.67$$

Bu değer seyrelme katsayısının logaritması ile çarpılır. $0.67 \times \log 10 = 0.67$ 'dir. Bulunan sayı % 50'nin üzerindeki ölüm görölen seyreltiklik değerinin logaritmasına katılır. 10^{-6} 'nın logaritması $6 + 0.67 \text{ ID}_{50} = 6.67$ 'dir.

EK-F

ORTAY YÖNTEMİ İLE KÖK TAYİNİ

```

10 PRINT "ORTAY YÖNTEMİ İLE KÖK TAYİNİ"
20 PRINT "=====
30 PRINT
40 PRINT
50 REM KOKLERİ BULUNADAK DENKLEM POLİNOM SEKLİNDE OLACIĞIDIR GİRİ
60 REM LOGARİTMİK VEYA TRİGONOMETRİK TERİMLERLE İDEREBİLİR.
70 DEF FNY(X)=(((300000!-X)/300000!)/((247000!-X)/247000!))-EXP(-.823774
80 KONTROL=0
90 PRINT "GERÇEK KÖK DEĞERİNE DAHA KÜÇÜK OLAN BAŞLANGIÇ DEĞERİNE DAHA"
100 PRINT "KÜÇÜK OLAN BAŞLANGIÇ DEĞERİNDEN YAKLAŞIYORSUNUZ.İLK GERÇEK"
110 PRINT "KÖK DEĞERİNİZİ SEÇİN VE YAZIN."
120 INPUT X
130 PRINT "İTERASYON SİRASINDA DEĞERİN HER ADIMDA NE KADAR ARTTIĞINI"
140 PRINT "İSTİYORSUNUZ"
150 INPUT H
160 PRINT "GERÇEK KÖK DEĞERİMLE KABUL EDEBİLECEĞİNİZ HATA NEDİR"
170 INPUT HATA
180 PRINT "  X", "  H", " F(X)", "F(X+H)"
190 LPRINT "=====", "===== ", "===== ", "===== "
200 LET A=FNY(X)
210 LET B=FNY(X+H)
220 LPRINT X,H,A,B
230 IF A*B<0 THEN      290
240 X=X+H
250 H=H
260 IF KONTROL=0      GOTO 230
270 H=H/2
280 GOTO 230
290 IF H<HATA/10      GOTO 330
300 LPRINT
310 LPRINT
320 LPRINT "TELEFON NUMARASI 211 211 211"
330 STOP
340 END

```