

**HAYVANSAL HÜCRE/HÜCRESEL ÜRÜN ÜRETİMİ İÇİN  
SICAKLIK DUYARLI MİKROTAŞIYICILARIN SENTEZİ VE  
KARAKTERİZASYONU**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF  
THERMORESPONSIVE MICROCARRIERS FOR THE  
PRODUCTION OF ANIMAL CELLS/CELLULAR  
PRODUCTS**

**HEDİYE ÖZGEN TİMUÇİN**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim Sınav Yönetmeliğinin


KİMYA MÜHENDİSLİĞİ Anabilim Dalı için Öngördüğü


YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.


2011


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

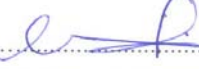
Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :   
Prof. Dr. Zakir RZAYEV

Üye (Danışman) :   
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Üye :   
Prof. Dr. Mehlika PULAT

Üye :   
Prof. Dr. Selma MUTLU

Üye :   
Yrd. Doç. Dr. Ayşe Gönen KARAKEÇİLİ

ONAY

Bu tez ...../...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil DENİZLİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Canum annem Nursel Timuçin'in anısına,*

# HAYVANSAL HÜCRE/HÜCRESEL ÜRÜN ÜRETİMİ İÇİN SICAKLIK DUYARLI MİKROTAŞIYICILARIN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

HEDİYE ÖZGEN TİMUÇİN

ÖZ

Mikrotaşıyıcı-destekli kültürler, memeli hücreleri kullanarak viral aşılar ve biyolojik hücresel ürünlerin üretimi amacıyla van Wezel tarafından geliştirilmiştir. Polimerik mikrotaşıyıcılar süspansiyon ortam koşullarında geniş yüzey alanı sağlayarak hücrelerin büyük miktarlarda üretimine olanak verirler. Çeşitli biyolojik ürünlerin analitik ve endüstriyel boyutta üretimi için geliştirilmiş çok sayıda ticari mikrotaşıyıcı mevcuttur. Mikrotaşıyıcıların doku mühendisliğindeki kullanımı ise sınırlıdır. En yaygın olarak kullanılan mikrotaşıyıcılar dekstran-temelli matrisler (Cytodex®) olup, kıkırdak ve kemikten türetilmiş hücreler de dahil olmak üzere çok sayıda hücrenin yapışma ve üremesini desteklemektedirler. Doygunluğa ulaşmış hücreler mikrotaşıyıcı yüzeyinden proteolitik enzimlerin, örneğin tripsin, yardımıyla kaldırılırlar. Ancak tripsin kullanımı çok sayıda dezavantajı beraberinde getirmektedir.

Çevre sıcaklığındaki değişimlere karşı hacimsel geçişlerle cevap veren sıcaklık-duyarlı hidrojenlerin hücre kültürlerinde hücre-destek malzemesi olarak kullanımları giderek artan bir ilgiye maruz kalmaktadır. Sıcaklık-duyarlı polimerlerde, hücre kültürü sıcaklığındaki değişimlerle hücrelerin yüzeye yapışma davranışlarının incelendiği çok sayıda çalışma mevcuttur. Sıcaklık-kontrollü hücre yapışma/kaldırma çalışmalarında en çok kullanılan polimer poli(N-izopropil akrilamid) (PNIPAAm)'dir. PNIPAAm yüzeye 37°C'de yapışıp üreyen hücreler sıcaklığın PNIPAAm'in "en düşük kritik çözünme sıcaklığı"nın (LCST=32°C) altına düşürülmesiyle, tripsin veya EDTA kullanımına gerek olmaksızın yüzeyden kendiliğinden kaldırılırlar. PNIPAAm-aşılınmış doku kültür kapları (TCPS), hücre-hücre etkileşimlerini ve ekstrasellüler matris etkileşimlerini ortadan kaldırmadan hücrelerin tabaka halinde yüzeyden kaldırılmasına olanak verir. Sıcaklık-duyarlı polimerleri TCPS yüzeyine kaplamak için çok çeşitli yöntemler mevcuttur. Örneğin, elektron demeti polimerizasyonu, kovalent bağlama, plazma yük boşalımı, UV-ışını radyasyonu gibi. Tüm bu yöntemler hücre-tabaka mühendisliği uygulamaları için TCPS yüzeylere uygulanmıştır. Ancak, şu ana kadar hücre ve hücresel ürünlerin büyük ölçekte üretimine yönelik sıcaklık-duyarlı bir mikrotaşıyıcı geliştirilmemiştir.

Yapılan çalışmanın ilk kısmında, yüzeye-bağımlı karakterdeki hayvansal hücrelerin kayma kuvvetlerinin etkisinden korunarak büyük-ölçekli reaktörlerde üretimine ve proteolitik enzim ve şelasyon ajanı kullanılmaksızın yüzeyden kaldırılmalarına olanak sağlamak amacıyla üç tür mikrotaşıyıcı (PNIPAAm-g-PHEMA, PNIPAAm-g-PVA, PNIPAAm-g-dekstran) sentezlenmiştir. Mikrotaşıyıcı sentezi biyoyumluluğu yüksek dekstran doğal polimeri ile poli (hidroksietilmetakrilat) (PHEMA) ve poli(vinilasetat-hidroksi) (PVA) sentetik polimerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık-duyarlılık özelliği, atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) yöntemi kullanılarak, *poli(N-izopropilakrilamid)* (PNIPAAm) ile sağlanmıştır. Sentezlenen mikrotaşıyıcılar, ATR-FTIR, XPS (ESCA), AFM, SEM ve şişme deneyleriyle karakterize edilmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında, sentezlenen mikrot taşıyıcıların hayvansal hücre kültürlerinde kullanılabilirliklerinin belirlenmesi ve optimum özellikleri sağlayan mikrot taşıyıcı seçiminin yapılması amacıyla sentezlenen mikrot taşıyıcılar ile hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk olarak statik kültür ortamlarında çalışılmış, ardından karıştırmalı reaktör kullanılarak dinamik kültür koşulları sağlanmıştır. Statik kültür çalışmaları sonunda PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcılar dışındaki mikrot taşıyıcıların hücre yapışması ve üremesini istenilen düzeyde desteklemediği belirlenmiştir. Bu nedenle dinamik kültür çalışmaları yalnızca PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcılar ile yürütülmüştür. Hücre kültür çalışmalarında farklı morfolojiye sahip 2 tür hücre hattı (L929 fare fibroblast hücreleri ve HS2 insan keratinositleri) kullanılarak, mikrot taşıyıcılara yapışma ve yüzeyden kopma açısından hücre morfolojisinin etkisi karşılaştırılmıştır.

Yapılan hücre kültürü çalışmalarının sonucunda, sentezlenen mikrot taşıyıcılardan PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcıların özellikle dinamik koşullarda hücre üretimi için uygun olduğu ve sıcaklık-duyarlık etkisi ile hücrelerin yüzeyden geri kazanımında kullanılabilecekleri sonucuna varılmıştır. Ayrıca hücre morfolojisinin de üretimi etkileyeceği tespit edilmiştir. Böylelikle gerek doku mühendisliği uygulamaları için yüksek sayıda hücre üretmek, gerekse yüksek kapasitede hücresel ürün üretimini kolaylıkla ve etkin bir biçimde gerçekleştirmek mümkün olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Mikrot taşıyıcı-destekli kültür, atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP), biyoreaktör, hücre kültürü, sıcaklık-duyarlı polimer.

**Danışman:** Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü.

# **SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF THERMORESPONSIVE MICROCARRIERS FOR THE PRODUCTION OF ANIMAL CELLS/CELLULAR PRODUCTS**

**HEDİYE ÖZGEN TİMUÇİN**

## **ABSTRACT**

Microcarrier-facilitated cell cultures was introduced by van Wezel to mass produce viral vaccines and biological cell products using mammalian cells. Polymeric microcarriers offer the advantage of providing a large surface area for monolayer cell growth during propagation in a homogenous suspension culture system. A wide range of commercially available microcarriers has been successfully used for the production of a variety of biological products at the analytical and industrial scales. The use of microcarriers in tissue engineering has only been explored to a limited extent. The most commonly used microcarriers are composed of a dextran matrix (Cytodex®), which facilitates attachment and proliferation of a wide-range of cells, including those derived from cartilage and bone. Cells reached to confluency have been detached from the surface of microcarriers by use of proteolytic enzymes, usually trypsin. However, use of trypsin has a number of drawbacks on the viable cells.

The temperature-sensitive hydrogels which display volume transitions in response to temperature changes in the environment are gaining much attention for their possible use in cell cultures as cell support materials. There are various studies reporting the control of cell-surface adhesion by exploiting cell culture temperature on thermoresponsive polymers. Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) is one of the most extensively used thermoresponsive polymer for temperature-controlled cell attachment/detachment. Cells adhered on PNIPAAm surfaces at 37°C were spontaneously lifted by reducing culture temperature below the lower critical solution temperature (LCST, ~32°C) without any need for trypsin or EDTA. PNIPAAm-grafted tissue culture grade polystyrene dishes were used for the application of cell-sheet engineering in which the cells were harvested from the thermoresponsive surfaces without damaging the extracellular matrix proteins and cell-to-cell connections. A large range of different methods can be used to fabricate insoluble thermoresponsive surfaces, e.g. electron-beam polymerization, covalent attachment, plasma glow discharge, UV-light irradiation. All those methods had been applied for the polymerization of NIPAAm to TCPS (tissue culture polystyrene dish) for producing thermoresponsive surfaces for cell sheet engineering. However, no thermoresponsive microcarrier is available until now for the large-scale production of cells and cellular products.

At the first part of the study conducted, three types of microcarriers (PNIPAAm-g-PHEMA, PNIPAAm-g-PVA, PNIPAAm-g-dextrane) were synthesized to enhance the production of animal cells having surface-adherent character in large scale reactors by preserving them from effects of shear forces and to enhance their removal from the surface without using proteolytic enzyme and chelating agent. Microcarrier synthesis is performed by using a highly biocompatible natural dextran polymer and two synthetic polymers, poly (hydroxyethylmethacrylate)

(PHEMA) and poly (vinylacetate-hydroxy) (PVA). Thermosensitivity is obtained with poly(N-isopropylacrylamide) by using atom transfer radical polymerization (ATRP) method. The microcarriers synthesized are characterized by ATR-FTIR, XPS(ESCA), AFM, SEM and swelling experiments.

In the second part of the study, cell culture studies were performed with the synthesized microcarriers. At first, the static culture environments were applied, and then using a stirred reactor dynamic culture conditions were provided. The static culture studies were shown that, microcarriers except PNIPAAm-g-PHEMA, were not support cell adhesion and growth in the desired level. For this reason, dynamic culture studies were carried out with only the PNIPAAm-g-PHEMA microcarriers. In cell culture studies, two types of cell lines with different morphology (L929 mouse fibroblast cells and human keratinocytes HS2) were used and adhesion characteristics and cell morphology in terms of the effect of the surface characteristics were compared.

As a result of the cell culture studies it was concluded that, PNIPAAm-g-PHEMA microcarriers are suitable for the production of cells especially in dynamic conditions and their thermosensitivity enhance the recovery of cells from the surfaces. In addition, cell morphology was found to affect the cellular production. Thus, to produce a high number of cells for tissue engineering applications and cellular products in high production capacity will be able to perform easily and effectively by the use of PNIPAAm-g-PHEMA microcarriers.

**Keywords:** Microcarrier-supported culture, atom transfer radical polymerization (ATRP), bioreactor; cell culture, thermo-responsive polymer.

**Supervisor:** Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu, Hacettepe University,  
Chemical Engineering Department.

## **TEŞEKKÜR**

*Lisans eğitimimden bu ana kadar desteğini benden esirgemeyen, bilgi birikimiyle yolumu aydınlatan, emeklerini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim değerli hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.*

*Deneyisel çalışmalarımın yürütülmesinde ve tezimin her aşamasında büyük katkıları olan bana güç veren, emeklerini ne yapsam da ödeyemeyeceğim manevi kardeşlerim Anıl Sera Kahraman ve Araş. Gör. Soner Çakmak'a sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.*

*Tez çalışmama yaptığı tüm katkılardan dolayı gülyüzlü ve tatlı arkadaşım Araş. Gör. Işıl Gerçek Beşkardeş'e sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.*

*Çalışmalarım boyunca desteklerini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan özelliklerini ve güzelliklerini kelimelere sığdıramayacağım, dostluğumuzun uzun yıllar devam etmesini dilediğim canım dostlarım; bitanecik Boram'ın tatlı annesi, melek arkadaşım Esra Yılmaz'a, benim güzeller güzeli ve iyi kalpli arkadaşım Tuba Ekincioğlu'na sevgimi ve sonsuz teşekkürlerimi tüm kalbimle sunarım.*

*Tez çalışmama yaptığı katkılardan ötürü Burak Gülaç'a ve Hasret Tolga Şirin'e sevgi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.*

*Çalışmalarım boyunca hiçbir desteği esirgemeyen Şefim ve arkadaşım Kağan Yücel'e sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.*

*Çalışmalarımın her aşamasında dostluklarıyla bana destek olan canım arkadaşlarım Meltem Mete Kılıç ve Petek Özkan'a sevgimi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.*

*Yalnızlığımı hiçbir zaman hissettirmeyen, zor anlarımda hep yanımda olan, beni ailesinden ayırmayan ve çalışmalarımı her zaman destekleyen, dert ortağım, manevi ablam Tülay Genç'e kalbindeki yerim için sevgimi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.*

*Zor zamanlarımda yanımda olan, yanlarında kendimi güvende hissettiğim manevi ailem, Müdürüm Coşkun Demirci; eşi, ablam Özgül Demirci ve Demirci ailesine saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.*

*Duyduğum özlemi kelimelere sığdıramadığım canım annem ve babam, yanımda olmanızı ve kızınız olmanın verdiği gururla ellerinizden öpmeyi o kadar çok isterdim ki... Ama biliyor ve hissediyorum ki her zaman benim yanımdasınız canım annem ve babam, ruhunuz şâd olsun. Bu çalışma senin sayende canım annem, meleğim, canverenim, yol çizenim, ışığım, öğretmenim ve benim her şeyim "Nursişim": " kızın seni çok seviyor ve çok özledi..."*

## İÇİNDEKİLER

ÖZ .....	i
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
KISALTMALAR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvi
<b>1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>5</b>
2.1. Hayvansal Hücre Kültürleri .....	5
2.2. Hücre Kültürünün Tarihçesi .....	7
2.3. Hücre Yapışması .....	8
2.4. Hücrelerin Yüzeyden Kaldırılması.....	12
2.4.1. Enzimatik yolla yüzeyden kaldırma .....	13
2.4.1.1. Proteolitik enzim kullanımı .....	13
2.4.1.1.i. Tripsin.....	13
2.4.1.1.ii. Diğer proteolitik enzimler .....	14
2.4.2. Enzimatik olmayan yolla hücrelerin ayrılması ve yeni metotlar .....	16
2.5. Mikrotaşıyıcılar.....	18
2.5.1. Mikrotaşıyıcıların genel özellikleri.....	18
2.5.1.1. Mikrogözenekli mikrotaşıyıcılar .....	19
2.5.1.2. Makrogözenekli mikrotaşıyıcılar.....	20
2.5.2. Mikrotaşıyıcıların avantajları ve dezavantajları.....	21
2.5.3. Mikrotaşıyıcı kültürlerinde önemli parametreler .....	23
2.5.3.1. Mikrotaşıyıcı konsantrasyonu .....	23
2.5.3.2. Mikrotaşıyıcıların kültür için hazırlanması .....	23
2.5.3.3. Başlangıç hücre sayısı (Initial cell density) .....	24
2.5.3.4. Mikrotaşıyıcı hücre kültürlerine başlangıç.....	24
2.5.3.5. Besiyeri değişimi .....	25

2.5.3.6. Mikrotaşıyıcılardan hücrelerin geri kazanılması .....	26
2.5.4. Mikrotaşıyıcı-destekli kültürlerin uygulamaları .....	27
2.6. Sıcaklık-duyarlı Polimerler ve Hücre Kültüründeki Uygulamaları .....	29
2.7. Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerin Üretimi .....	33
2.7.2. Yüzeğe aşılama yaklaşımı ("grafting to") .....	34
2.7.3. Yüzeyden aşılama yaklaşımı ("grafting from") .....	35
2.7.4. Kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyon mekanizmaları .....	36
2.7.4.1. Atom transfer radikal polimerizasyon tekniği (ATRP) .....	38
2.8. Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerin Karakterizasyonu .....	41
<b>3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....</b>	<b>42</b>
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	42
3.2. Sıcaklık-Duyarlı Mikrotaşıyıcıların Sentezlenmesi .....	43
3.2.1. PNIPAAm-g-PHEMA mikrotaşıyıcıların sentezlenmesi .....	44
3.2.1.1. PHEMA mikrokürelerin sentezi .....	44
3.2.1.2. PHEMA mikrokürelere PNIPAAm'in aşılması .....	45
3.2.2. PNIPAAm-g-dekstran mikrotaşıyıcıların sentezi .....	46
3.2.3. PNIPAAm-g-PVA mikrotaşıyıcıların sentezi .....	46
3.3. Sentezlenen Mikrotaşıyıcıların Karakterizasyon Çalışmaları .....	48
3.3.1. FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance) analizi .....	48
3.3.2. XPS ( X-ray Fotoelektron Spektroskopisi) analizi .....	48
3.3.3. AFM (Atomik Güç Mikroskobu) analizi .....	48
3.3.4. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi .....	48
3.3.5. Şişme deneyleri .....	48
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları .....	49
3.4.1. Statik hücre kültürü çalışmaları .....	49
3.4.1.1. Sentezlenen mikrotaşıyıcıların L929 fibroblast hücreleriyle inkübasyonu .....	49
3.4.1.2. Mikrotaşıyıcı yüzeyindeki L929 fibroblastlarının gözlemlenmesi ...	50
3.4.1.3. Hücrelerin mikrotaşıyıcıların yüzeyinden kaldırılması .....	50
3.4.2. Dinamik hücre kültürü çalışmaları .....	50

3.4.2.1. Mikrotaşıyıcıların HS2 keratinosit hücreleriyle inkübasyonu .....	51
3.4.2.2. Mikrotaşıyıcı yüzeyindeki HS2 keratinosit hücrelerinin gözlemlenmesi .....	52
3.4.2.3. Mikrotaşıyıcı yüzeyindeki HS2 keratinosit hücre canlılığının ve üremesinin belirlenmesi .....	52
3.4.2.4. Hücrelerin mikrotaşıyıcıların yüzeyinden kaldırılması .....	53
<b>4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI .....</b>	<b>54</b>
4.1. Mikroküre Seçimi ve Sentezi.....	54
ATRP yöntemi .....	56
4.2. Sentezlenen Mikrotaşıyıcıların Karakterizasyon Çalışmaları .....	58
4.2.1. PNIPAAm-g-PHEMA mikrotaşıyıcılara ait karakterizasyon çalışmalarının sonuçları.....	58
4.2.1.1. FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance) analizi.....	58
4.2.1.2. XPS (X-ray Fotoelektron Spektroskopisi) analizi .....	60
4.2.1.3. AFM (Atomik Güç Mikroskobu) analizi.....	62
4.2.1.4. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi .....	62
4.2.1.5. Mikrotaşıyıcıların şişme özellikleri.....	63
4.2.2. PNIPAAm-g-dekstran mikrotaşıyıcılara ait karakterizasyon çalışmalarının sonuçları.....	65
4.2.2.1. FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance) analizi.....	65
4.2.2.2. XPS (X-ray Fotoelektron Spektroskopisi) analizi .....	66
4.2.2.3. AFM (Atomik Güç Mikroskobu) Analizi .....	67
4.2.2.4. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi .....	69
4.2.2.5. Mikrotaşıyıcıların şişme özellikleri.....	70
4.2.3. PNIPAAm-g-PVA mikrotaşıyıcılara ait karakterizasyon çalışmalarının sonuçları .....	71
4.2.3.1. FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance) analizi.....	71

4.2.3.2. XPS (X-ray Fotoelektron Spektroskopisi) analizi .....	72
4.2.3.3. AFM (Atomik Güç Mikroskobu) Analizi .....	73
4.2.3.4. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi .....	75
4.2.3.5. Mikrotaşyıcıların şişme özellikleri.....	76
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları .....	77
4.3.1. Hücre seçimi ve karakterizasyonu.....	77
4.3.1.1. L929 fare fibroblast hücrelerinin karakterizasyonu.....	77
4.3.1.2. HS2 keratinositlerin karakterizasyonu.....	79
4.3.2. PHEMA ve PNIPAAm-g-PHEMA mikrotaşyıcılar ile yapılan hücre kültürü çalışmaları .....	80
4.3.2.1. Statik hücre kültürü çalışmaları.....	80
4.3.2.2. Dinamik hücre kültürü çalışmaları.....	83
<b>5.GENEL SONUÇLAR.....</b>	<b>89</b>
<b>6. KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>94</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>100</b>

## KISALTMALAR

ECM	Ekstrasellüler matris
AIBN	2,2'-Azobisizobütronitril
ATRP	Atom transfer radikal polimerizasyonu
PNIPAAm	poli(N-izopropil akrilamid)
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EGTA	Etilen glikol tetra asetik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
PBS	Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffer solution)
PNIPAAm	poli(N-izopropil akrilamid)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
FBS	Fetal sığır serum
MTT	3-[4,5-dimetilthiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür
ESCA (XPS)	X-ışınları spektroskopisi
AFM	Atomik güç mikroskobu
FTIR-ATR	Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TCPS	Tissue Culture Polystyrene

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Hücre kültürünün oluşum süreçleri (Freshney, 2005).....	6
Şekil 2.2.	Hücre yapışmasının 4 fazının şematik olarak gösterimi. ....	9
Şekil 2.3.	Hücre yapışmasının 4 fazının mikroskopik olarak gösterimi.....	10
Şekil 2.4.	Hücrelerin PNIPAAm kaplanmış yüzeyden farklı yöntemler kullanılarak kaldırılması: (a) Sıcaklığın düşürülmesiyle, (b) Mekanik ayırma yolu ile, (c) Proteolitik enzim kullanımıyla.....	18
Şekil 2.5.	(a) Mikrogözenekli mikrot taşıyıcılar, (b) Makrogözenekli mikrot taşıyıcılar. ....	19
Şekil 2.6.	Mikrot taşıyıcı-destekli kültürlerin doku mühendisliği için kullanımı. 29	
Şekil 2.7.	Sıcaklık-duyarlı NIPAAm polimerlerinin çözelti ve yüzey görüntüleri a) NIPAAm yapısı b) NIPAAm polimerinin LCST değerinin altında ve üstündeki görüntüsü c) NIPAAm ile kaplanan yüzeylerdeki su damlasının 10 ve 37°C'deki görüntüleri (Kikuchi, 2005). ....	31
Şekil 2.8.	Polimerik zincirlerle yüzey modifikasyonu a) Yüzeye aşılama yaklaşımı ("grafting to") A; aktive edilmiş substrat yüzeyi, B; polimer zincirleri b) Yüzeyden aşılama yaklaşımı ("grafting from") M; monomer (PNIPAAm), I; başlatıcı.....	36
Şekil 3.1.	(a) ATRP işleminde kullanılan deney düzeneği (b) reaksiyon sonucunda gözlenen renk değişimi.....	46
Şekil 3.2.	Çalışmada kullanılan/sentezlenen mikrokürelerin kimyasal yapısı (a) PHEMA-EGDMA (b) Çapraz-bağlı dekstran (c) Polivinil asetat-hidroksi divinil etilen üre kopolimeri (d) PNIPAAm.....	47
Şekil 4.1.	Mikrot taşıyıcıların PNIPAAm ile kaplanma prosesinin şematik gösterimi. ....	58
Şekil 4.2.	ATR-IR spektrumu (a) PHEMA mikroküreler (b) PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcılar. ....	59
Şekil 4.3.	XPS spektrumu (a) PHEMA mikroküreler (b) PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcılar. ....	61
Şekil 4.4.	Titreşimli (tapping) modda alınan üç boyutlu AFM görüntüleri (a) PHEMA mikroküre yüzeyi (b) PNIPAAm-g-PHEMA mikroküre yüzeyi. ....	62

Şekil 4.5.	Yüzey SEM fotoğrafları (a) PHEMA mikroküreler (b) PNIPAAm ile kaplanmış PHEMA mikrotasıyıcılar (Büyütme x 500) detay fotoğraflar için (Büyütme x 20000)'dir. ....	63
Şekil 4.6.	PHEMA mikrokürelerin PBS tamponundaki (pH=7,4) şişme davranışlarının sıcaklıkla değişimi (Ölçümler 217 µm çapa sahip PHEMA partikül ve 222 µm çapa sahip PNIPAAm-g-PHEMA mikrotasıyıcılar için gerçekleştirilmiştir). ....	64
Şekil 4.7.	ATR-IR spektrumu (a) PNIPAAm-g-dekstran mikrotasıyıcılar (b) Dekstran mikroküreler. ....	65
Şekil 4.8.	XPS spektrumu (a) Dekstran mikroküreler (b) PNIPAAm-g-dekstran mikrotasıyıcılar. ....	66
Şekil 4.9.	Titreşimli (tapping modda) alınan üç boyutlu AFM görüntüleri. Dekstran mikroküre yüzeyleri (a)10 µm, (b) 5 µm, (c) 500 nm. PNIPAAm-g-dekstran mikrotasıyıcı yüzeyleri (d) 10 µm, (e) 5 µm, (f) 500 nm. ....	68
Şekil 4.10.	Yüzey SEM fotoğrafları (a) Dekstran mikroküreler (Büyütme x 150); (b) Dekstran mikroküreler (Büyütme x 511); (c) PNIPAAm ile kaplanmış dekstran mikroküreler (Büyütme x 993); (d) PNIPAAm ile kaplanmış dekstran mikroküreler (Büyütme x 1500). ....	69
Şekil 4.11.	Dekstran mikrokürelerin PBS tamponundaki şişme davranışlarının sıcaklıkla değişimi. ....	70
Şekil 4.12.	ATR-IR spektrumu (a) PVA mikroküreler (b) PNIPAAm-g-PVA mikrotasıyıcılar. ....	71
Şekil 4.13.	XPS spektrumu (a) PVA mikroküreler (b) PNIPAAm-g-PVA mikrotasıyıcılar. ....	72
Şekil 4.14.	Titreşimli (tapping) modda alınan üç boyutlu AFM görüntüleri. PVA mikroküre yüzeyleri (a) 10 µm, (b) 5 µm, (c) 500 nm. PNIPAAm-g-PVA mikrotasıyıcı yüzeyleri (d) 10 µm, (e) 5 µm, (f) 500 nm. ....	74
Şekil 4.15.	Yüzey SEM fotoğrafları (a), (b) PVA mikrotasıyıcılar (c), (d) PNIPAAm ile kaplanmış PVA mikrotasıyıcılar (a) (Büyütme x 200) (b) (Büyütme x 2000) (c) (Büyütme x 1000) (d) (Büyütme x 2000) detay fotoğraflar için (Büyütme x 30000)'dir. ....	75
Şekil 4.16.	PVA mikrokürelerin PBS tamponundaki (pH=7,4) şişme davranışlarının sıcaklıkla değişimi. ....	76

Şekil 4. 17. L929 fare fibroblast hücrelerinin üreme eğrisi (Başlangıç hücre konsantrasyonu: $4 \times 10^4$ hücre/mL'dir). .....	78
Şekil 4.18. L929 fibroblastların mitokondriyal aktivitelerinin MTT deneyleri ile izlenmesi (Başlangıç hücre konsantrasyonu: $4 \times 10^4$ hücre/mL'dir).....	78
Şekil 4.19. L929 fare fibroblastı hücrelerinin Giemsa ile boyanmış görüntüleri (a) Büyütme x 20 (b) Büyütme x 40. ....	79
Şekil 4. 20. HS2 keratinositlerin TCPS yüzey üzerindeki floresan mikroskop görüntüleri (a) 1.gün (b) 2. gün (c) 5. gün (Büyütme x 20).....	79
Şekil 4. 21. HS2 keratonisitlere ait üreme eğrisi.....	80
Şekil 4. 22. L929 fibroblastik hücrelerin PHEMA bazlı mikrot taşıyıcı kültürlerdeki optik görüntüleri (a) PHEMA (5. gün, 20x), (b), (c) PNIPAAm-g-PHEMA (5. gün, 20x), (d) PNIPAAm-g-PHEMA (5. gün, 40x), (e), (f) PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcılar üzerinde kristal viyole ile boyanmış L929 fibroblastların optik mikroskop görüntüsü (e, x20; f, x40). ....	81
Şekil 4.23. Hücre kültürünün 5. gününde L929 fare fibroblastlarının PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcılar üzerindeki SEM görüntüleri (Büyütme x 750). ....	82
Şekil 4.24. Hücre kültürünün 5. gününde L929 fare fibroblastlarının sıcaklık etkisiyle (+4 °C, 15 dk.) PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcıların yüzeyinden ayrılışı (20x).....	82
Şekil 4.25. HS2 keratinositlerin PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcılar üzerindeki SEM görüntüsü (5. gün) (a) (Büyütme x 10000) (b) (Büyütme x 10000) detay fotoğraflard için (Büyütme x 20000)'dir. ....	83
Şekil 4.26. Propidyum iyodür/Aleksa flor ile boyanmış HS2 keratinositlerin (a) PHEMA, (b) PNIPAAm-g-PHEMA (statik), (c), (d), (e) PNIPAAm-g-PHEMA (reaktör) mikrot taşıyıcılar üzerindeki floresan mikroskop görüntüleri. ....	84
Şekil 4.27. MTT testi ile mikrot taşıyıcılar üzerindeki HS2 hücrelerinin canlılıklarının karşılaştırılması. ....	85
Şekil 4.28. HS2 keratinositlerinin PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcılarının yüzeyinden (a) sıcaklığın etkisiyle (+4 °C, 15 dk.) ve (b) tripsinizasyon ile ayrılması. ....	86

- Şekil 4.29. Materyal yüzeyine hücre yapışması veya yüzeyden koparılmasına ait mekanizma ..... 87
- Şekil 4.30. Mikrotaşıyıcıların yüzeyinden (a) sıcaklığın etkisiyle (+4°C, 15 dak.), (b) tripsinizasyon ile ayrılan hücrelerin TCPS yüzeylerdeki optik mikroskop görüntüleri (2. gün)..... 88

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Hücre kültürünün tarihçesi.....	8
Çizelge 2.2.	Ticari olarak üretilen mikrot taşıyıcı türleri ve bunlara ait bazı bilgiler.....	21
Çizelge 2.3.	Sıcaklık-duyarlı polimerlere bazı örnekler.....	30
Çizelge 2.4.	Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin fizikokimyasal karakterizasyonunda kullanılan teknikler. ....	41
Çizelge 4.1.	Sıcaklık-duyarlılık özelliği taşımayan mikrokürelerin temel özellikleri.	56
Çizelge 4.2.	PHEMA mikrot taşıyıcılar için ATR-IR spektrumlarının değerlendirilmesi.....	60
Çizelge 4.3.	PHEMA mikrokürelerin ve PNIPAAm ile kaplanmış PHEMA mikrot taşıyıcıların XPS ile elde edilmiş yüzey atomik bileşimi. ....	61
Çizelge 4.4.	Dekstran mikrokürelerin ve PNIPAAm ile kaplanmış dekstran mikrot taşıyıcıların XPS ile elde edilmiş yüzey atomik bileşimi. ....	67
Çizelge 4.5.	VA-hidroksi ve NIPAAm ile kaplanmış PVA mikrot taşıyıcıların XPS ile elde edilen yüzey atomik bileşimi.....	73
Çizelge 4.6.	Mikrot taşıyıcıların yüzeyinden ayrılan HS2 keratinositlerin TCPS yüzeylerdeki kültürlerinden elde edilen hemositometrik sayım sonuçları (2. gün).....	86

## 1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Hayvansal hücre teknolojisi ile çok sayıda hücre ve hücresel ürün (örneğin aşılar, monoklonal antikolar vb.) endüstriyel boyutta üretilmektedir. Bu üretimlerde hayvansal hücrelerin yüzeye-bağımlı (anchorage-dependent, AD) karakterde oluşları, gözönünde bulundurulması gereken en önemli faktördür. AD hücreler öncelikle katı bir destek malzeme (örneğin Petri kabı) üzerine yapışır ve ardından yüzeyde tek tabaka oluşturacak şekilde ürerler. Dolayısıyla üreme, yüzey alanının büyüklüğüne bağlı olarak artar. Üretim kapasitesinin artırılması, birim hacimdeki yüzey alanının artırılması ile mümkündür. Ancak, hayvansal hücrelerin kayma kuvvetlerine karşı son derece hassas oluşları karıştırmalı biyoreaktörlerdeki üretimlerini de engellemektedir. Bu dezavantajları gidermek amacıyla yüzeye bağımlı hücreler için mikrotaşyıcı-destekli sistemler geliştirilmiştir. Mikrotaşyıcı-destekli kültürler, memeli hücrelerini kullanarak viral aşılar ve biyolojik hücresel ürünlerin üretimi amacıyla ilk olarak van Wezel tarafından geliştirilmiştir (van Wezel, 1967). Mikrotaşyıcılar yaklaşık 100-200 mikron çapında katı küreciklerdir ve genellikle dekstran, selüloz, jelatin gibi doğal bir polimer veya diğer sentetik polimerlerden (polistiren vb.) hazırlanırlar. Hücreler kürelerin yüzeyinde tek tabaka şeklinde ürerler. Yoğunlukları, çoğunlukla kültür ortamında asılı kalmalarını sağlayacak şekildedir ve rijit olmayan yapıları, karışma sırasında hücreye gelecek zararı azaltmaya yardımcı olur. Ticari olarak piyasada çok sayıda mikrotaşyıcı mevcuttur. En yaygın olarak kullanılan mikrotaşyıcılar dekstran-temelli matrisler (Cytodex®) olup, kıkırdak ve kemikten türetilmiş hücreler de dahil olmak üzere çok sayıda hücrenin yapışma ve üremesini desteklemektedirler.

Mikrotaşyıcılar, doku kültür kaplarına, döner şişelere, karıştırmalı kültürlere eklenebilirler ve böylelikle kültür yoğunluğunu artırır ve hatta karıştırmalı kültürlere eklendiğinde nispeten yüksek hücre yoğunlukları elde edilir. Karıştırma hızı ve mikrotaşyıcı yoğunluğu karıştırmalı kültürlerde optimize edilmelidir, çünkü hücreler arasındaki çarpma hücre ölümüne neden olur. Mikrotaşyıcı kültürleri 1000-3000 litreye kadar aşı ve protein ürünlerini üretmekte kullanılmaktadır. Başarılı bir mikrotaşyıcı kültürü için, hücre yapışmasının hızı oldukça önemlidir. Bu nedenle mikrotaşyıcı dizaynında öncelikle mikrotaşyıcıların yük yoğunluğu, hidrofobisite, ıslatılabilirlik, vb. gibi hücre yapışmasındaki etkin faktörler dikkate alınmaktadır.

Mikrotaşıyıcı-destekli kültürler; hücre yapışması, yayılması, çoğalması ve ardından hücrelerin yüzeyden kaldırılması basamaklarını içerir. Dolayısıyla, bir mikrotaşıyıcının hücre kültürlerinde kullanılabilmesi için her şeyden önce hücre yapışmasını destekleyecek yüzey özelliklerine sahip olması gerekmektedir. Hücre yapışması dinamik bir işlemdir. Hücrelerin yapışmasını ve daha sonra yayılmasını sağlar. Yapışmanın oranı yüzey ile hücrelerin başlangıç etkileşimlerine bağlıdır ve yapıştırıcı bağların şekillenmesi ile orantılıdır. Sonuçta hücreler gerçek morfolojilerine ve boyutlarına ulaşırlar ki bu da hücre sayılarına, bağların organizasyonuna ve hücre iskeletinin yapısına bağlıdır. Hücreler negatif yüzey yüküne sahiptirler. Negatif yükün hücrelerin fizyolojik durumuna bağlı olarak yüzeydeki dağılımları değişir. Hücreler negatif yüklü görünmelerine rağmen hem negatif, hem de pozitif yüklü yüzeylerde kültür edilebilirler. Hücrelerin yapışması yüzeyin yük türüne değil, yük yoğunluğuna bağlıdır (Maroudas, 1973). Ayrıca yüzeyin ortalama bir hidrofilisiteye sahip olması gereklidir. Temelde hücrelerin yüzeye yapışması elektrostatik güce bağlıdır. Yapışmadaki etkileşim, ortamda bulunan iyonik etkileşimlerle ya da protein köprüleriyle sağlanmaktadır. Hücre ile yüzey arasındaki bu son etkileşim en etkili olanıdır ve bu proteinler “adezyon molekülü” olarak adlandırılırlar. Yapışma için özel proteinlerdir ve hücrelerde yayılmışlardır. Hücre yüzeyindeki diğer reseptörlerle etkileşime girerler ve yüzey ile yapışmayı sağlarlar. Adezyon molekülleri otuzdan fazla molekül içerir. Bunlardan bazıları kollajen, laminin, fibronektin ve vitronektindir. Bu adezyon molekülleri serumlu kültür ortamlarında bulunurlar ve hücre farklılaşmasını ve çoğalmasını etkilerler. Diğer bir bölümü hücreler tarafından sentezlenir ve ekstraselüler matris dışında yüzey üzerine yığılırlar.

Hücrelerin yüzeyden kaldırılması, yüzeye-bağımlı hücrelerin pasajlanmasında önemli bir işlemdir. Pasajlanması basit bir seyreltme işleminden sonra yapılan süspanse hücrelerden farklı olarak yüzeye-bağımlı hücrelerin yüzeyden kaldırılması ve sonraki kültür işlemleri için hazırlanması gereklidir. Hücre konsantrasyonu ortamın kapasitesini çok fazla aştıysa ya da kültür olması gerektiğinden daha fazla çoğaldıysa yüzeyden kaldırma işlemi yapılmalıdır. Hücrelerin yüzeyden kaldırılması, hücre yapışmasının tersi bir olay değildir. Hücrelerin yüzeyden ayrılması yapışma bağlarının koparılmasını içerir. Hücre adezyonu ve hücrenin yüzeyden koparılması, bazı ajanlarla tersine çevrilebilir.

Sülfhidril bağlayıcı ajanlar ve sitokalazinler hücre adezyonunu engellerler fakat hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlamazlar. Buna rağmen lokal anestezikler ve tripsin gibi diğer maddeler hücre adezyonunu engeller ve hücrelerin ayrılmasına neden olurlar. Yüzeye bağımlı hücreler tripsin ve pronaz gibi proteolitik enzimler, EDTA ve Versen gibi şelasyon ajanları veya şelasyon ajanı ve enzimin bir bileşimi ile ya da sıyırarak yüzeyden uzaklaştırılabilirler. Bir dereceye kadar hücrelere zarar veren bu tekniklerin hepsi de sonuç olarak farklı etkilerle hücrelerin yaşam aralığını daraltır. Lastik bir spatula ile sıyırmak hücrelere en fazla zarar veren yöntemdir. % 0,05-0,5 kadar eklenen şelasyon ajanı ile proteolitik enzimler, hücreler için en yüksek ayrılma verimini sağlar ve hücrelere en az zararı verir.

Proteolitik bir enzim olan tripsinin kullanımından kaynaklanan problemlerin çözümüne yönelik olarak, son yıllarda hücre kültür kaplarının yüzeyine sıcaklık-duyarlı polimerlerin uygulanmasıyla, hücrelerin sıcaklık değişimi ile yüzeyden ayrılması üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Sıcaklığın LCST (lower critical solution temperature-en düşük kritik çözelti sıcaklığı)'nin altına değiştirilmesiyle ortam hidrofobikten hidrofilğe dönüşmekte, böylelikle hücreler hidrofilik yüzeyden ayrılmaktadırlar. Üzerinde en çok çalışma yapılmış sıcaklık-duyarlı polimer poli (N-izopropil akrilamid)'dir (PNIPAAm). PNIPAAm sıcaklığın değişimiyle dikkate değer bir şişme davranışı göstermektedir. Düşük sıcaklıkta, tamamen sulu ve geniş hacimli bir görünüm sergilemekte, fakat 32°C'nin üzerinde hidrasyona uğramakta ve oldukça küçük, sık zincir konformasyonuna sahip olmaktadır. Sıcaklık-duyarlı PNIPAAm yüzeylerle yapılan çalışmalarda hepatosit ve endotel hücrelerin zarar görmeksizin yüzeyden uzaklaştırılmaları mümkün olmuştur (Okano, 1995). Etilen glikol vinil eter (EGVE) ve bütil vinil eter (BVE) ile sentezlenen sıcaklık-duyarlı yapılar kullanılarak yapılan çalışmalarda, sıcaklığın düşürülmesiyle canlı hücrelerin etkin olarak yüzeyden geri kazanımlarının mümkün olacağı sonucuna varılmıştır (Gümüşderelioğlu ve ark., 2003). Ayrıca sıcaklık-duyarlı polimerlere büyüme/yapışma faktörlerinin immobilizasyonu ile hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi konusunda da çalışmalar yapılmıştır. Sıcaklık-duyarlı polimerleri "Tissue Culture Polystyrene" (TCPS-Polistiren doku kültür kabı) yüzeyine takmak için çok çeşitli yöntemler mevcuttur. Örneğin, elektron demeti polimerizasyonu, kovalent bağlama, plazma yük boşalımı, UV-ışını radyasyonu gibi. Tüm bu yöntemler hücre-tabaka mühendisliği uygulamaları için TCPS yüzeylere

uygulanmıştır. Ancak, şu ana kadar hücre ve hücrenel ürünlerin büyük ölçekte üretimine yönelik sıcaklık-duyarlı bir mikrotaşıyıcı geliştirilmemiştir.

Sunulan tez çalışması kapsamında, yüzeye-bağımlı karakterdeki hayvansal hücrelerin, kayma kuvvetlerinin etkisinden korunarak büyük-ölçekli reaktörlerde üretimine ve proteolitik enzim ve şelasyon ajanı kullanılmaksızın yüzeyden kaldırılmalarına olanak sağlayacak mikrotaşıyıcı-destekli sistemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Böylelikle gerek doku mühendisliği uygulamaları için yüksek sayıda hücre üretmek, gerekse yüksek kapasitede hücrenel ürün üretimini kolaylıkla ve etkin bir biçimde gerçekleştirmek mümkün olacaktır. Mikrotaşıyıcı sistemler için, biyouyumluluğu yüksek dekstran doğal polimeri ile poli(hidroksietilmetakrilat) (PHEMA) ve poli(vinilasetat-hidroksi) (PVA) sentetik polimerleri seçilmiştir. Sıcaklık-duyarlılık özelliği, atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) yöntemi kullanılarak, LCST değeri 37°C'nin altında olan *poli(N-izopropilakrilamid)* (PNIPAAm) polimeri ile sağlanmıştır. Çalışma kapsamında, hazırlanan tüm mikrotaşıyıcıların üretim yöntemleri, sentez koşulları, sıcaklık-duyarlılığı, yapısal karakterizasyonları (ATR-FTIR, AFM, SEM ve XPS(ESCA) analizleri) ve hayvansal hücre kültürlerinde kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında optimum özellikleri sağlayan mikrotaşıyıcı seçiminin yapılabileceği öngörülmüştür.

## 2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, sunulan çalışmanın temelini oluşturan konular hakkında genel bir literatür bilgisi verilmiştir. Öncelikle hayvansal hücre kültür teknolojisi, hücre yapışması ve hücrelerin yüzeyden kaldırılması hakkında kısa bilgiler sunulmuştur. Daha sonra, günümüzde hücre kültürü çalışmalarında kullanılmakta olan mikrotarıyıcılardan bahsedilmiştir. Takip eden bölümde sıcaklık-duyarlı polimerler ele alınmıştır. Son olarak ise, çalışmanın temelini oluşturan sıcaklık-duyarlı yüzeylerin üretimi ve karakterizasyonundan söz edilmiş ve sıcaklık-duyarlı polimerlerin hücre kültür teknolojisinde kullanımı hakkında bilgiler sunulmuştur.

### 2.1. Hayvansal Hücre Kültürleri

Hücre, *in vitro* koşullarda dahi beslenme, büyüme, uyarılara cevap verme ve üreme özelliklerine sahip olan organizmanın en küçük yapı taşıdır. İlk olarak 1665'de İngiliz uzman Robert Hooke mikroskopla incelemekte olduğu mantar parçasının yanyana dizili bitişik bölümlerden oluştuğunu görmüş, bu yapı birimlerine "hücre" adını vermiştir.

Memeli hücreleri, yerine getirdikleri işlevlere bağlı olarak değişik morfolojilerde bulunmaktadır. Genel olarak hücreler yassı, oval, yuvarlak, mekik ve iplik tarzında olurlar. Hücreler büyüklük olarak oldukça değişken boyutlarda olabilmelerine karşın ortalama olarak 15-20 µm çapa sahiptirler.

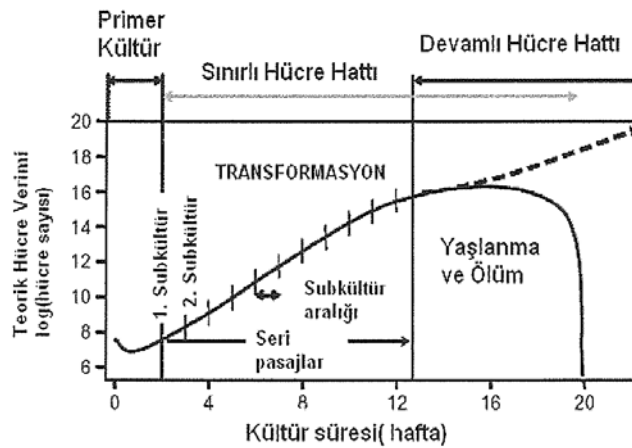
Aynı işlev ve morfolojiye sahip hücreler, hücreler arası matris (ECM=Extracellular matrix) ile bir araya gelip bütünleşerek dokuyu oluştururlar. Belirli iş ve görevler ile değişik dokuların bir araya gelmesi sonucunda "organlar" oluşur. Her bir organı oluşturan doku, bu organa özgü olabileceği gibi, organlar birçok doku türlerini de beraberce taşıyabilirler.

"Hücre kültür teknolojisi", kompleks doku ve organlardan izole edilen hücrelerin yapay besi ortamlarında üretilmesi ve üretilen hücrelerin de *in vitro* koşullarda farklı organizmalar olarak davranması esasına dayanır. Hücre kültürleri, hücrelerin yapısal olarak farklılaşmasına, dejenerasyonuna veya transformasyonuna neden olur. Uygun besi ortamlarının hazırlanmasıyla çok sayıda hücrenin ve hücresel ürünün üretimi mümkün olmaktadır. Hücre kültürü için gerekli olan besi ortamı,

metabolizma için gerekli besinlerin tamamından (karbonhidratlar, aminoasitler, tuzlar, vitaminler, hormonlar ve üreme faktörlerinden) oluşur. Kültür ortamı serumla da desteklenir.

Hücre kültürü ile ilgili teknikler özellikle 1950 ve 1960'lı yıllarda virüslerin memeli hücrelerinde üretilmesi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda gelişme göstermiş ve son yıllarda deneysel kanser araştırmaları ve kök hücre konusunun bilimsel olarak öneminin ortaya konmasıyla popülerlik kazanmıştır.

*Primer hücre kültürü* doğrudan dokudan mekanik ve enzimatik yolla elde edilen *in vitro* hücre kültürleridir. Genellikle heterojen bir yapı gösterirler. Primer kültürler kontaminasyon riski olan kültürlerdir, bu yüzden manipulasyonlarda steriliteye özen gösterilmelidir. Sınırlı bir sürede canlılıklarını korurlar. Primer kültürü yapılan hücrelerin başka bir kültür kabına pasajlanmasıyla *subkültürü* yapılmış olur. *Hücre hattı* terimi ise primer kültürden sonraki ilk subkültürün ardından yapılan tüm subkültürler için kullanılan bir terimdir. *Sınırlı ömürlü hücre hattı* terimi Hayflick limiti (Hayflick, 1961) olarak bilinen ve 30-50 kez bölünme ardından ölmeye başlayan hücre kültürleri için kullanılır. *Devamlı hücre hattı* ise bazı özel teknikler (onkojen genler, viruslar, bazı kimyasallar) kullanılarak ölümsüzleştirilen (immortalize edilen) hücre kültürleri için kullanılan bir terimdir. Ayrıca yukarıdaki yollarla ölümsüzleştirilen hücreler, hücre üreme hızının artırılması amacıyla transformasyon işlemine tabi tutulur (Leo ve ark., 2008; Freshney, 2005; Spier, 2000). Şekil 2.1'de çeşitli hücre kültürü oluşum süreçleri şematik olarak gösterilmiştir.



**Şekil 2.1.** Hücre kültürünün oluşum süreçleri (Freshney, 2005).

## 2.2. Hücre Kültürünün Tarihçesi

Hücre kültür çalışmaları, öncelikle özelleşmiş hücre davranışı ve işlevlerini inceleyebilmek amacıyla başlatılmıştır. 1949 yılında Enders'ın hayvan hücre kültürlerinde çocuk felci (polio) virüsünü üretmesinden sonra modern anlamdaki "hayvansal hücre teknolojisi" gelişmeye başlamıştır. Virüs üretimi için hücre kültürünün kullanılması, düşük maliyet, biyolojik açıdan güvenilirlik, kontrollü, kolay, tekrarlanabilir ve büyük ölçekte üretim gibi çok sayıda avantaj sağlamıştır. Sonraki yıllarda kızamık, kuduz, kabakulak ve kızamıkçık gibi birçok aşı lisansı alınmıştır. Daha sonra, süspanse hücre kültür ortamlarında, yavru hamster böbrek (BHK) hücre hattı kullanılarak başta Şap aşısı olmak üzere veteriner amaçlı aşılar üretilmeye başlanmıştır. Bu tür bir üretimin yaygınlaşmasından sonra, biyoreaktörlerde binlerce litrelik üretim yapılabilmiş, ancak üretilen aşılarda içerisinde tümör yapıcı ajanların ve virüslerin bulunma ihtimali düşünülerek, insanlar üzerinde kullanımının güvenilir olmadığına karar verilmiştir.

Güvenilir ürünlerin üretilmesi için FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) ve WHO (Dünya Sağlık Örgütü) üretim standartlarını belirlemiştir. Hayvan hücre kültürlerinden insanda kullanılacak biyolojik ürünleri elde etme yolundaki önemli gelişmeler şunlardır:

- Yumurta veya diğer canlı organ, doku ya da hayvan yerine primer hücrelerin kullanılması (1954).
- Güvenilir, virüs içermeyen ve kanserojen olmayan insan diploid hücrelerinin (HDC) üretim için kullanılması (1962).
- İnsanda kullanılacak biyolojik ürünlerin, insan kanser hücrelerinden elde edilmesinin kabulü (1980).
- Monoklonal antikörlerin üretimi ve teşhis amaçlı kullanımının yaygınlaşması (1986).

Bu gelişmelerden sonra kanser hücreleri, rekombinant hücreler ve diğer hücre hatlarının yaygın biçimde kullanılmasıyla çok sayıda önemli biyolojik maddenin üretimi gerçekleştirilmiştir ve halen gerçekleştirilmeye de devam edilmektedir. Mikrotaşıyıcı-destekli ve mikrokapsüllenmiş kültür sistemlerinin geliştirilmesiyle, üretim endüstriyel boyuta taşınmıştır.

Hücre kültürleri 1990'lı yıllarda doku mühendisliği ve gen tedavisi alanlarında önem kazanmış ve ayrıca embriyonik kök hücrelerin izolasyon ve kültürlerine yönelik gelişmeler bilim dünyasında ses getirmiştir. Çizelge 2.1'de hücre kültürünün tarihçesi özetlenmiştir.

### Çizelge 2.1. Hücre kültürünün tarihçesi.

1885	ROUX - Embriyonik tavuk hücrelerinin vücut dışarısındaki tuz çözeltisinde canlılıklarını sürdürdüklerini göstermiştir.
1907	HARRISON - Sinir hücrelerinin kültür edilebilirlikleri konusunda çalışmıştır.
1913	CARREL - Hücrelerin aseptik koşullarda tutulan kültür ortamlarında düzenli beslenerek uzun süre yaşadıklarını göstermiştir.
1928	İlk besi ortamı geliştirilmiştir.
1949	Fare ve tavuk embriyoları <i>in vitro</i> kültür ortamına yerleştirilmiştir.
1949	ENDERS - Polio virüsünü hücre kültüründe üretmiştir. Hücre kültürünün ilk önemli uygulamasıdır.
1950	SALK - Döner şişeli kültürlerde polio virüsünü üretmiştir. İnsan ve veterinerlik uygulamaları için viral aşılarda üretilmeye başlanmıştır.
1952	GEY - HELA olarak adlandırılan insan hücre hattını üretmiştir. Rahim ağzı kanserinden türetilen bu hücre hattı sonsuza kadar üreme özelliği kazandırılmış ilk insan hücre hattıdır.
1980	Hayvansal hücreler genetik olarak modifiye edilmiştir. Rekombinant DNA Teknolojisi ile İNSÜLİN, İNTERFERON ve MONOKLONAL ANTİKOR üretimleri gerçekleştirilmiştir.
1985	BÜYÜK ÖLÇEKLİ Hücre Kültürü için teknikler geliştirilmiştir. Bunlar; Mikrotaşıyıcı-destekli kültürler ve Mikrokapsüllenmiş hücre kültürleridir.
1986	MARTIN&EVANS - Fareden pluripotent embriyonik kök hücreleri izole ederek kültürünü yapmışlardır.
1990	DOKU MÜHENDİSLİĞİ ve GEN TEDAVİSİ Hücre kültürleriyle doku ve organ üretimi
1998	THOMSON&GEARHART ve ark. - İnsan embriyonik kök hücrelerini izole etmeyi başarmışlar ve kültürlerini oluşturmuşlardır.

### 2.3. Hücre Yapışması

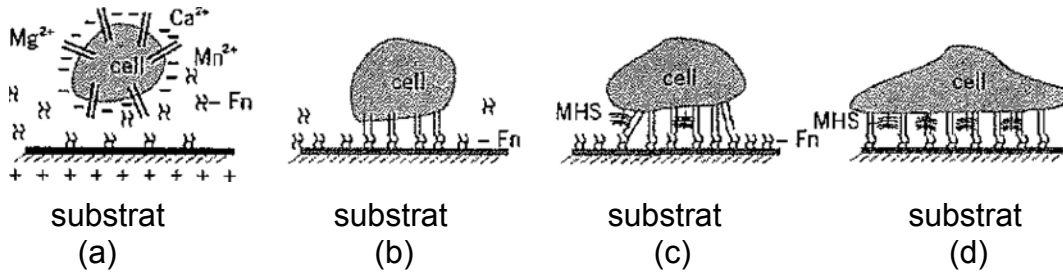
Hayvansal hücreler kültür ortamına ekildiğinde, sırasıyla aşağıdaki olaylar gerçekleşir:

- Substrata yapışma (attachment),
- Yüzeyde yayılma (spreading),
- Üreme (proliferation).

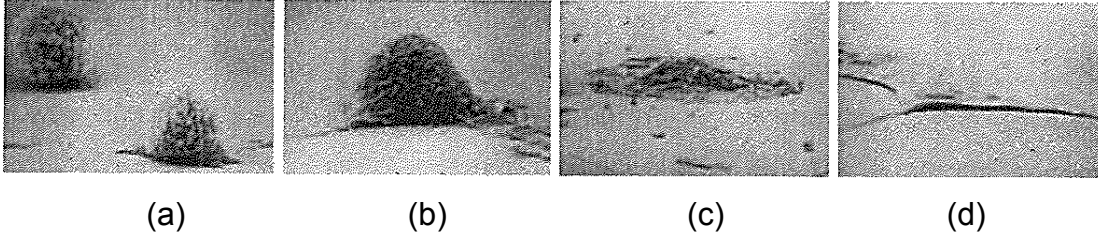
Aşağıda bu aşamaların ilki olan hücre yapışmasına ayrıntılı olarak değinilmiştir. Hücrelerin kültüre edildikleri katı yüzeylere (substrat) yapışmaları monolayer hücre kültürleri ve mikrotasıyıcı kültürler için temel bir kriterdir. Yüzeye-bağımlı hücrelerde hücre bölünmesi ve çoğalması ancak hücrelerin yüzeye yapışmasından sonra gerçekleştiği için yüzey özellikleri ve kültür yöntemleri oldukça önemlidir (Grinnell, 1978).

Hücre yapışması genel olarak 4 farklı aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşamada hücre, substrat yüzeyine gevşek bir şekilde tutunur. İkinci fazda hücreler yüzeye tutundukları kısımdan tutunma yüzeyini genişletecek şekilde düzleşmeye başlarlar. Yüzey alanının genişlemesine ve etkileşim bağlarının kuvvetlenmesine karşın bu safhada hücreler hala küresel haldedirler. Üçüncü ve dördüncü fazlarda hücreler arası bağlantılar da kurularak hücre katı yüzey üzerinde düz bir hale gelir ve yapışma tamamlanır (Lauri ve Truskey, 1993).

Şekil 2.2 ve Şekil 2.3'de hücre yapışmasının tüm aşamaları şematik ve mikroskopik olarak gösterilmiştir. Bu aşamalar: a) yapışma faktörlerinin hücre ve yüzey arasında birikmesi b) hücre ve yüzey arasındaki etkileşimin kurulması, c) yapışma faktörleri yardımıyla hücrelerin yüzeye yapışması ve d) yapışan hücrenin düz bir şekilde yüzeyde yayılmasıdır (Grinnell, 1978).



**Şekil 2.2.** Hücre yapışmasının 4 fazının şematik olarak gösterimi.  
(Fn-fibronektin, MHS- Multivalent heparan sülfat).



**Şekil 2.3.** Hücre yapışmasının 4 fazının mikroskopik olarak gösterimi.

Hücre yapışmasının başlangıcında iki değerlikli katyonlar ve glikoproteinler "substrat" olarak adlandırılan katı yüzeye adsorbe olmaya başlar. Tutunma faktörleri olan fibronektin ve vitronektin normal koşullarda kültür ortamına katılan serumdan köken alırken, MHS (Multivalent heparan sülfat) ise hücreler tarafından sentezlenmektedir. Hücrelerin yüzeyde yapışmaları için substrat yüzeyinin hidrofilik özellikte olması istenir. Ayrıca, hemen hemen bütün memeli hücrelerinin yüzeyi negatif elektrik yüküne sahip olduğundan hücre tutunması için substratın uygun bir elektriksel yük taşıması gerekmektedir. Bu yük dağılımı negatif veya pozitif olabilmektedir (Grinnell, 1978; Borysenko ve Woods, 1979; Horng ve McLimans, 1975; van Wezel, 1976).

Substratlara örnek olarak farklı polaritede yük taşıyan cam, negatif olarak yüklenmiş plastikler ve pozitif yüklü mikrot taşıyıcılar (Cytodex 1) verilebilir. Memeli hücreleri yukarıda bahsedilen bütün yüzeylerde tutunma ve yapışma gösterdiği için hücre yapışmasında temel faktörün yükün polaritesinden çok yük yoğunluğu olduğu söylenebilir (Maroudas, 1975; Hirtenstein ve ark., 1980).

Hücrelerin yüzeye yapışabilmeleri için kültür ortamında bulunan iki faktör önemlidir. Bu iki faktörden birincisi  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  gibi iki değerlikli katyonlar, diğeri ise yapışmada rol oynayan proteinlerdir (Grinnell, 1978). Çoğu memeli hücresi çok düşük miktarda fibronektin salgılayabildiği için kültür ortamının dışarıdan serum ile desteklenmesi gerekmektedir (Grinnell ve ark., 1977; Hughes ve ark., 1979). Ancak diploid fibroblastlar gibi bazı hücre türleri yeterli miktarda fibronektin salgılayabildikleri için dışarıdan serum desteğine ihtiyaç duymamaktadırlar (Grinnell ve Feld, 1980).

Hücre kültürü çalışmalarında hücre inokulasyonundan önce substrat yüzeyini serum taşıyan besiyeri ortamı ile etkileşime bırakmak genel bir yaklaşımdır.

Böylece bazı yapışma faktörlerinin yüzey ile etkileşimi ve yüzeye adsorbe olmaları sağlanmaktadır. Bu amaçla 2-3 ug fibronectin/mL veya %10 fetal buzağı serumu ilave edilmiş besiyeri kültürden önce substrat yüzeyine eklenerek fibronectinin dakikalar içerisinde kültür yüzeyine adsorbe olduğu gösterilmiştir. Ayrıca serumsuz çalışılan kültürlerde kültür başlangıcında 1-50 ug/mL fibronectin ilavesi ile hücre yapışması için uygun bir ortam sağlanabilmektedir.

Mikrotaşıyıcı kültürlerinde yapışma mekanizması monolayer hücrelerle benzer özellik göstermektedir. Ancak mikrotaşıyıcıların süspansiyon olarak tutuldukları biyoreaktörlerde veya dolgulu yataklı reaktörlerde yapılan çalışmalarda hücrelerin taşıyıcı yüzeyine tutunmalarını sağlayabilmek için kültür başlangıcında 6-12 saat kadar karıştırma hızının mümkün olduğunca düşük olarak tutulması gerekmektedir (Aslankaraoğlu, 2002).

Normal ve transforme hücre hatları arasında küçük farklılıklar olmasına karşın genel olarak yapışma olayı aşağıdaki şekilde gerçekleşmektedir. Hücre dışı matris (Extracellular matrix, ECM) bileşenleri olan; tip I ve tip IV kollajen, fibronectin, vitronektin, laminin, kondronektin, trombospondin, heparan sülfat ve kondroitin sülfat yapışma olayında önemli roller üstlenmekle birlikte tutunma olayında asıl rol hücre zarında bulunan integrin reseptörleri ile fibronectin ve vitronektin proteinleri arasındaki etkileşim üstlenmektedir. Hücreler integrin reseptörleri vasıtasıyla sırasıyla bu proteinlere bağlanırken  $Ca^{+2}$  and  $Mg^{+2}$  iyonları kofaktör olarak rol oynamaktadır. BHK-21 hücreleri yüzeye yapışabilmeleri için yüzeyde adsorbe olmuş minimum  $15 \text{ ng/cm}^2$  fibronektine ihtiyaç duyarlar (GE Healthcare, 2005).

Hücreler birçok materyale karşı yapışma özelliği gösterebilmektedir. Bunlar; cam, çeşitli plastikler, 316 paslanmaz çelik, dekstran, kollajen ve polilisin kaplı yüzeyler olabilmektedir. Borosilikat yapıdaki cam normal olarak negatif yüklü iken NaOH veya 1 mM Mg asetat ile yıkama sonucunda yüzey yapışma için uygun hale gelebilmektedir.

Hücre kültüründe kullanılan plastikler polistiren, polietilenterafitalat, polikarbonat, vb. malzemeden olabilirken bu tür malzemelerin ıslanabilirliklerinin artırılması için oksidasyon, güçlü asitlerle muamele, yüksek voltaj ve UV ışınları gibi yöntemler

kullanılmaktadır. Yüzey yüklerinin arttırılması amacıyla ise yüksek enerjili elektron bombardımanına maruz bırakılmaktadırlar (GE Healthcare, 2005).

#### **2.4. Hücrelerin Yüzeyden Kaldırılması**

Hücrelerin yüzeyden kaldırılması yüzeye-bağımlı hücrelerin pasajlanmasında önemli bir işlemdir. Pasajlanması basit bir seyreltme işleminden sonra yapılan süspanse hücrelerden farklı olarak yüzeye-bağımlı hücrelerin yüzeyden kaldırılması ve sonraki kültür işlemleri için hazırlanması gereklidir. Hücre konsantrasyonu ortamın kapasitesini çok fazla aştıysa ya da kültür olması gerektiğinden daha fazla çoğaldıysa yüzeyden kaldırma işlemi yapılmalıdır.

Hücrelerin yüzeyden kaldırılması (detachment) hücre yapışmasının (attachment) tersi bir olay değildir. Hücre yapışması dinamik bir işlemdir. Hücrelerin yapışmasını ve daha sonra yayılmasını sağlar. Yapışmanın oranı yüzey ile hücrelerin başlangıç etkileşimlerine bağlıdır ve yapıştırıcı bağların şekillenmesi ile orantılıdır. Sonuçta hücreler gerçek morfolojilerine ve boyutlarına ulaşırlar ki bu da hücre sayılarına, bağların organizasyonuna ve hücre iskeletinin yapısına bağlıdır. Hücrelerin yüzeyden ayrılması yapışma bağlarının koparılmasını içerir. Hücre yapışması ve hücrenin yüzeyden koparılması, bazı ajanlarla tersine çevrilebilir. Sülfhidril bağlayıcı ajanlar ve sitokalazinler hücre yapışmasını engellerler fakat hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlamazlar. Buna rağmen lokal anestetikler ve tripsin gibi diğer maddeler hücre yapışmasını engeller ve hücrelerin yüzeyden kopmasına neden olurlar.

Substrat yüzeyinde hücreler üreyerek tek bir tabaka oluşturduktan sonra yüzeyden uzaklaştırılmalıdırlar. Hücrelerin yüzeyden koparılması için değişik metotlar kullanılmaktadır. Bunlar;

- Enzimatik yolla yüzeyden kaldırma

Proteolitik enzimlerin kullanımı

Diğer enzimlerin kullanımı

ve

- Enzimatik olmayan yollarla yüzeyden kaldırma  
Şelasyon ajanları (EDTA, Versen, vb.) kullanarak yüzeyden koparma  
Mekanik ayırma (lastik spatula ile)  
Sıcaklık-duyarlı substratların kullanımı  
olarak sıralanabilir.

## **2.4.1. Enzimatik yolla yüzeyden kaldırma**

### **2.4.1.1. Proteolitik enzim kullanımı**

Uygulamalar açısından en çok tercih edilen yüzeyden kaldırma yöntemi olup, hücreler arasındaki matrisin ve hücre-hücre etkileşimlerinin protein yapısını parçalayan enzimlerle (proteolitik enzim) ortadan kaldırılması esasına dayanmaktadır. Bu amaçla kullanılan çeşitli proteolitik enzimler aşağıda açıklanmıştır.

#### **2.4.1.1.i. Tripsin**

Temelde birçok proteolitik enzim hücre ayrıştırılması için kullanılır. Ama çoğunlukla tripsin tercih edilir. Tripsinin uygulandıktan sonra serumla kolayca inaktive edilebilmesi kullanımını artıran bir nedendir.

Tripsin bir serin proteazıdır ve lizin ve arjinin arasındaki peptid bağlarını koparır. Tripsin, EDTA uygulanması gibi mitoz sırasında hücreleri çevreler. Hücreler belli bir zaman çevrildikten sonra, hücre substrat yapışması uzun hücrelerde distal uçta kalır. Bu çevrenme işlemi sırasında adezyon bölgelerinin pozisyonu ve yoğunluğu sabittir. Hücrelerin substrattan ayrılması tripsinin hücre yüzeyine integrasyonu ile olur. Devamında tripsinli hücrelerin mekanik yer değiştirmesi meydana gelir.

Tripsinizasyon çok miktarda glikopeptit, hiyaluronik asit ve sülfatlı glikozaminoglikanların ortamda oluşmasına ve önemli miktarda (%39) siyalik asit açığa çıkmasına neden olmaktadır. Genelde hücrelerin tripsinle uzun süre etkileşimi hücreleri zarara uğratır. Hücre yüzey zararlarının yanı sıra tripsin hücre içi zararlara da yol açar (poliribozomların parçalanması gibi).

HeLa ve CBM17 fare böbrek hücrelerinde yapılan tripsinin yaptığı hücrel değişimleri anlaşılmış ve işaretli tripsinle yapılan incelemelerde tripsini sitoplazmada, çekirdekte ve çekirdekçikte gözlemlemiştir. Fakat bu değişimler tersine çevrilebilir (düzeltilebilir). Hücre ayrılmasından birgün sonra bile hücrelerde tripsin varlığına rastlanmıştır. Tripsinin potansiyel hücre zararlarını azaltmak için tripsinizasyon sırasında sıcaklığın azaltılması önerilmiştir. 15°C'nin altında bir sıcaklıkta tripsinin etkisinin azaldığı gösterilmiştir.

Tripsin, genellikle %0,01 den %0,50'lik konsantrasyonlara kadar fosfat tampon çözeltisi (PBS) içinde kullanılır. Genellikle %0,25 konsantrasyonda ve 5-15 dakikalık inkübasyonlar şeklinde uygulanır. Tripsin/EDTA birlikte kullanıldığı durumlarda, EDTA konsantrasyonu %0,02 düzeyinde olmasına rağmen tripsin konsantrasyonu aynıdır. Bu karışım iki bileşenin de avantajlarını içerdiğinden uygun bir karışımdır. Ayırma işlemi tripsinle yapılırken pH kritik bir noktadır ve 7,4 ile 8 arasında olmalıdır.

Tripsinin zarar verme etkisi, uygulama zamanının kısa olması ile ve hızlı bir inaktivasyon ile azaltılabilir. Bu da genellikle serum eklenmesiyle olur. Serumsuz ortamlar kullanıldığında eliminasyon tripsin inhibitörüyle gerçekleştirilir. Bunlar soya fasulyesi, pankreatik tripsin inhibitörü ve ovomukoid'tir. Ayrıca hızlı bir yıkama ile tripsin elimine edilebilir.

#### **2.4.1.ii. Diğer proteolitik enzimler**

Temelde, dispase I ve II, pronaz ve papain gibi proteolitik enzimler de hücreleri yüzeyden kaldırmak için kullanılırlar. Bu enzimlerin avantajı hayvansal kaynaklı olmayışları ve serum varlığında kullanılabilmeledir. Dezavantajları ise, serumla inaktive edilememeleri ve hücre ayrılmasından sonra yıkamanın gerekli olmasıdır.

#### **Dispaz:**

Dispaz *Bacillus polymyxa*'dan elde edilen güçlü bir proteazdır.  $Ca^{+2}$  varlığında ve diğer birçok metal iyonları varlığında aktiftir. İnhibisyonu ise EDTA gibi şelasyon ajanlarıyla gerçekleşir. Dispaz, amino endopeptidaz olarak sınıflandırılır. Nonpolar aminoasitlerin N-terminali bölgelerinden peptit bağlarını hidroliz eder. Tripsin ve EDTA ile kıyaslanırsa, dispase çevrelediği hücrelerde geçirgenlikte geçici bir artışa

neden olur. Dispaz varlığında hücreler canlı olup gelişimlerini sürdürmektedirler. Hücre ayrışmasında tripsinin ve dispaz'ın karşılaştırılmasında, dispaz'ın tripsinden daha etkili bir şekilde hücreleri kopardığı kaydedilmiştir.

Kullanılan dispaz derişimleri farklılık gösterir. Bazı araştırmacılar 500 U/mL kullanırken, diğerleri PBS içinde dispaz/EDTA karışımını kullanmışlardır (4U/mL-%0,02). İnkübasyon süreleri sırasıyla 40 ve 10 dakikadır.

### **Kollajenaz:**

Bakteriyal kollajenazlar birçok enzimin karışımıdır. Prolin içeren peptitleri hidroliz ederler (kollajen ve jelatin gibi). Fosfat tamponunda kararlı değildirler ve kalsiyum iyonuna ihtiyaç gösterirler. Bu yüzden EDTA ile birlikte kullanılmaz. Bu enzim, hücreleri ekstraselüler matristen, kollajenden ve jelatinden ayırmak için kullanılır. Yapılan çalışmalarda yüzeyden ayrılma oranının ekstraselüler matrisin içeriğine ve pasajdaki hücre sayısına bağlı olduğu gösterilmiştir. Kollajenaz tripsinden daha az etkili ve daha yavaş olarak hücreleri ayırır. Son pasaj hücreleri, çoğunlukla erken pasaj hücrelerinden daha hızlı olarak ayrıştırılır.

### **Akutaz:**

Akutaz, proteolitik ve kollajenolitik enzimlerin karışımıdır. Omurgasız hayvanlardan elde edilmiştir. Plastik kaplardan hücreleri ayırmak için tripsin yerine kullanılan rutin bir enzimdir. Bu enzim karışımı tripsinden daha zararsızdır. Tripsinden farklı olarak özel nötralizasyon aşamalarına gerek yoktur.

### **Pronaz:**

Birçok grup, pronaz E'yi hayvan hücrelerinin subkültürasyonu için kullanır. İnsan, diploid fibroblast hücreleri % 0,05'lik pronaz ile % 0,25'lik tripsin uygulamasından daha etkili bir şekilde ayrılabilmiştir. 37°C de 15 dakika muamele ile %90 etkilidir. EDTA ve tripsin ile karşılaştırıldığında pronaz E çevrelediği hücrelerde geçici bir geçirgenlik oluşturur. Serumda anti pronaz etkisi yoktur. Bu yüzden pronaz aktivitesinin durdurulması için yıkamak gereklidir.

Papain ve elastaz gibi diğer enzimler de hücreleri yüzeyden ayırmak için kullanılır.

## 2.4.2. Enzimatik olmayan yolla hücrelerin ayrılması ve yeni metotlar

Yüzeye-bağımlı hücreleri yüzeyden ayırmak için EDTA ve EGTA yalnız başlarına ya da tripsin ile birlikte uygulanırlar. EDTA,  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarını tutucu bir ajandır, EGTA ise  $Ca^{+2}$  iyonlarını tutan bir ajandır.  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarının ortamdaki eksikliği veya uzaklaştırılması birçok hücrenin yüzeyden ayrılmasına neden olur. Bu ajanlar çok sık olarak ayırma işleminde kullanılır. Hücre geçirgenliğinin ve yüzey glikoproteinlerinin korunmasında EGTA, EDTA'dan daha hassastır.

EDTA ve EGTA'nın mekanizması tripsinden farklıdır. Çünkü bunlar proteolitik aktivite göstermezler ama buna rağmen bazı benzerlikler içerirler. EDTA ve EGTA temel etkilerini hücre iskeleti üzerine gösterirler. EDTA varlığında hücreler zayıf bir şekilde çevrelenir ve hücre membranında tripsinizasyondan daha yüksek bir geçirgenlik oluşur.

Tripsin ile EDTA ya da EGTA kıyaslanırsa, ayrılan hücrelerin hücre yüzey karakterlerinin farklı olduğu görülür. EGTA, hücreleri küresel olarak ayırır. Tripsinizasyondan farklı olarak hücreler yüzeylerindeki glikokaliksi kaybetmezler.

Genelde normal hücrelerde EDTA kullanımı daha zordur ve daha fazla hücre kaybına neden olur. Ek olarak sürekli kültürlerde şelasyon ajanlarının divalent katyonları tutması, geniş parçalar halinde hücrelerin yüzeyden ayrılmasına neden olur. Bundan dolayı şelasyon ajanları tripsinle birlikte kullanılır. Hücrelerin yüzeye tekrar tutunması için EDTA ve EGTA'nın şelasyon etkisini ortadan kaldırmak gereklidir.

Hücrelerin yüzeyden ayrılması sırasında, yüzey proteinlerinin korunması açısından sonikasyon iyi bir yöntemdir. Kültürlerin 10-50 saniye süre ile sonikatörde tutulması tripsin uygulamasıyla aynı etkiyi yaratır. Sonikasyon uygulamasından sonra hücrelerin %86'sı başarılı bir şekilde tekrar yapışırken, tripsinden sonra %80'i yapışabilmektedir. Ek bir avantaj da, pasajlamadaki hızdır. Pasajlama sonikasyonda 4 dakika iken tripsinde 16 dakikadır. Tripsinizasyon santrifüj ve yıkama işlemleri gerektirir. Birçok hücrede tripsin/EDTA agregasyona neden olurken, ultrasonikasyonun böyle bir etkisi yoktur. Uygulaması 43 kHz'te 60-90 saniyedir.

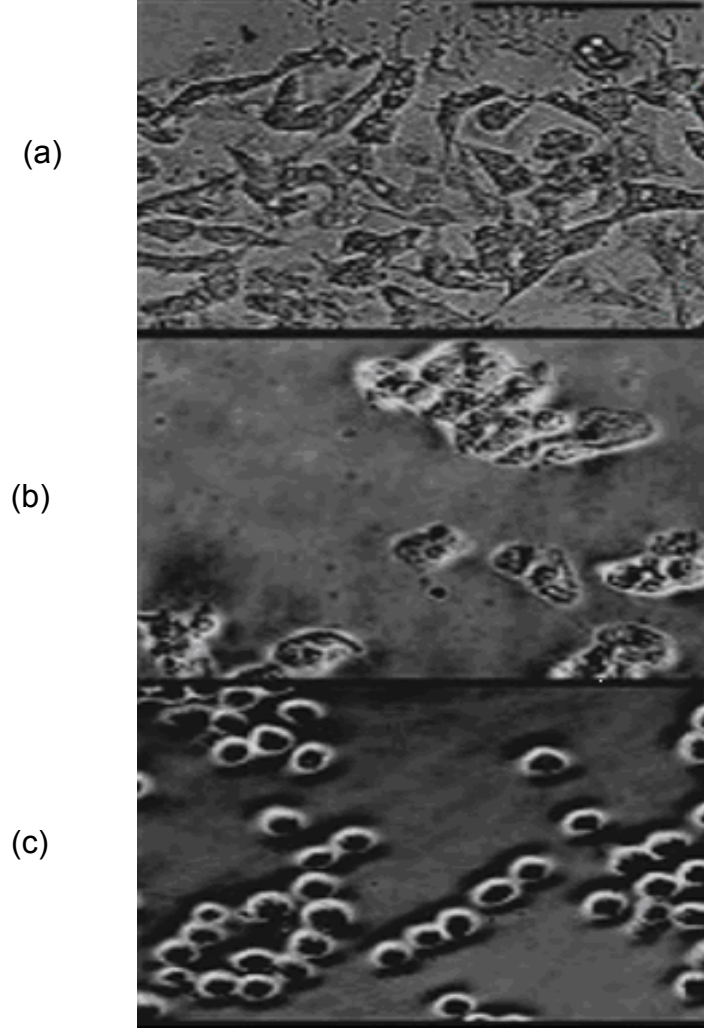
Hücreleri yüzeyden ayırma miktarı kültürdeki hücre yoğunluğundan da etkilenir. Petri kabını tam kaplamamış hücrelerin yüzeyden ayrılması, Petri kabını tam kaplamış hücrelerden daha kısa sürer.

Lidokain lokal bir anesteziktir ve bağıl olarak toksik değildir. Tek tabakalı yapışan hücrelerde yapışmanın inhibisyonunda tersinir bir etkiye sahiptir. Lidokain ve diğer anesteziklerin etkisi hücre iskeleti seviyesindedir. %0,05 konsantrasyonda kullanımıyla insan kan monositleri yüzeyden kolaylıkla koparılabilir. Dört değişik metot karşılaştırılır; (düşük sıcaklık, EDTA, lidokain ve tripsin) lidokain diğerlerine oranla hücrelerin kendilerini daha kolay toplamalarını sağlamıştır.

Enzimatik olmayan koparma metotlarından bir diğeri, sıcaklığa duyarlı polimer yüzeylerin kullanımudur. Poli[N-izopropil akrilamid] (PNIPAAm) hayvan hücre kültürleri için yüzey olarak kullanılır. Bu polimerin özelliği düşük sıcaklıklarda tamamiyle hidrate olması ve hacimce genişlemiş bir şekil almasıdır. 32°C'nin üstünde dehidrate olur ve molekül sıkı bir hal alır. Bu yüzden sadece hidrofobik karakterden hidrofilik karaktere döndüğü düşük sıcaklıklarda şişme etkisiyle hücrelerin yüzeyden ayrılması mekanik olarak kolayca gerçekleşir. Yöntemin tek dezavantajı/avantajı hücrelerin bir tabaka şeklinde yüzeyden ayrılmasıdır. Sıcaklığa-duyarlı polimerlerin kullanılması hücrelerin yüzeyden ayrılırken zarara uğramasını engeller. Küçük ölçekli kültürlerde kullanılmasının en önemli nedeni budur.

Bir başka metot ise, hücreleri spatül benzeri bir aletle yüzeyden kazımdır. Ama bu metot hücrelere zarar verebilir. Yüzeyle-bağımlı hücreler mitoz sırasında küresel bir hal almalarına rağmen yüzeyle yapışık haldedir. Hücrelerin küresel hale gelmesi temas yüzeyini azaltır. Bu esnada mekanik parçalamayla hücreler diğer hücrelerden ayrılır. Bu, mitotik seçme tekniğinin temelidir.

Son olarak kullanılan teknik, hücreleri sıvı azlığı stresiyle yüzeyden ayırmaktır. Sıvı azlığı stresi hücrelerin gelişme oranını, metabolizmalarını, şekillerini ve genetik ifadelerini değiştirir. Bu etkiler istenmez fakat reaktör kültürler içindeki uygun olmayan şartlarda ortaya çıkar. Şekil 2.4'te hücrelerin yüzeyden ayrılması için kullanılan farklı yöntemler gösterilmiştir.



**Şekil 2.4.** Hücrelerin PNIPAAm kaplanmış yüzeyden farklı yöntemler kullanılarak kaldırılması: (a) Sıcaklığın düşürülmesiyle, (b) Mekanik ayırma ile, (c) Proteolitik enzim kullanımıyla.

## 2.5. Mikrotaşıyıcılar

Mikrotaşıyıcılar selüloz, dekstran, cam, kollajen, jelatin ve poliester gibi biyouyumlu polimerlerden gözeneksiz veya makro gözenekli yapılarda sentezlenen küçük partiküllerdir. Hücre yapışması ve büyümesi için uyumlu bir yüzeye sahip olup genellikle küresel şekilli olarak dizayn edilirler.

### 2.5.1. Mikrotaşıyıcıların genel özellikleri

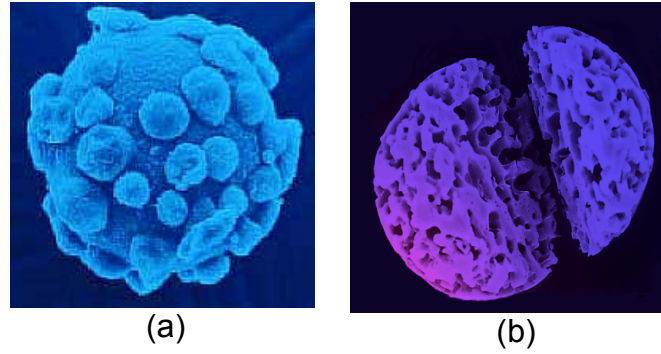
Yüzeye-bağımlı hücrelerin hafif karıştırma ile süspansiyon halinde tutulan küçük kürecikler üzerinde üretilmeleri fikri ilk olarak 1967'de iyon değişim kromatografi çalışmalarında kullanılan N,N-dietyl-aminoetilamin (DEAE)-Sephadex G50™ (GE

Healthcare) jel küreciklerinin van Wezel tarafından kullanılmaya başlamasıyla ortaya atılmıştır (van Wezel, 1967). Araştırmacı birkaç yıl sonra bu yolla üretmiş olduğu hücre kültürlerinden inaktif çocuk felci aşısı üretimini gerçekleştirerek büyük bir aşama kaydetmiştir.

Günümüzde çok çeşitli materyallerden yapılmış oldukça fazla sayıda mikrot taşıyıcı olup bunlar özellikle virus üretimi, rekombinant proteinler, monoklonal antikolar ve gen terapi vektörlerinin üretiminde 6.000 L hacime kadar ulaşan reaktörlerde (Cytodex™ mikrot taşıyıcılarında Vero hücreleri kullanılarak grip aşısı üretimi) kullanıma girmiştir.

Mikrot taşıyıcı çalışmalarındaki ikinci önemli dönüm noktası, kullanılan büyük gözenekli küreciklerin içerisinde hücrelerin mekanik etkilerden uzak şekilde daha yüksek verimle üretilmeleri çalışmalarına başlanmış olmasıdır (Nilsson ve ark., 1986).

Mikrot taşıyıcıların hemen hemen hepsi gözenekli yapıda olmalarına karşın bu gözeneklerin çaplarına göre mikrogözenekli (microporous) ve makrogözenekli (macroporous) mikrot taşıyıcılar olarak ikiye ayırmak mümkündür. Şekil 2.5'de mikro ve makrogözenekli taşıyıcıların görüntüleri yer almaktadır.



**Şekil 2.5.** (a) Mikrogözenekli mikrot taşıyıcılar, (b) Makrogözenekli mikrot taşıyıcılar.

#### **2.5.1.1. Mikrogözenekli mikrot taşıyıcılar**

Bazı araştırmacılar tarafından gözeneksiz olarak da tabir edilebilen bu taşıyıcıların gözenek çapı çok küçüktür. Hücrelerin bu gözeneklerden içeriye girmesi mümkün olmadığından taşıyıcının dış yüzeyinde tek tabaka oluşturacak şekilde tutunarak

üreyebilirler. Bu tür taşıyıcılarda hücre üremesi için gerekli yüzey alanı taşıyıcının dış yüzey alanı ile sınırlıdır. Bu durum kültür süresince taşıyıcıların birbirlerine çarpmalarından kaynaklanan mekanik zararlara yol açmaktadır.

Çoğu mikrogözenekli taşıyıcının çapı 90-300 µm arasında değişmekte olup, yoğunlukları 1,02-1,04 g/cm<sup>3</sup>tür. Yoğunlukları genel olarak besiyerinin yoğunluğundan biraz yüksek bir değerdir. Böylelikle bu taşıyıcıların düşük karışım hızlarında dahi besiyeri içerisinde homojen bir şekilde dağılımları sağlanmış olmaktadır. Ayrıca, bu taşıyıcıların çaplarının büyük olması karıştırmanın durdurulması durumunda taşıyıcıların çökmesine neden olmaktadır. Bu durum rekombinant proteinler gibi hücre üretilen ürünlerin hücre kaybı olmaksızın besiyeri ile birlikte kültür ortamından alınmasına yardımcı olmaktadır.

### **2.5.1.2. Makrogözenekli mikrot taşıyıcılar**

Makrogözenekli taşıyıcılar genellikle 0,4-5,0 mm çapında olup gözenek büyüklükleri 10-400 µm aralığında değişken bir yapı gösterirler. Hücreler bu gözeneklerden kolaylıkla taşıyıcının iç kısımlarına girerek oralarda tutunup üç boyutlu (3D) şekilde çoğalabilmektedir.

Bu tür taşıyıcılar hücrelerin doğal ortamlarına çok benzer üç boyutlu ortamlarda üretilmeleri ve yüksek hücre sayısına ulaşabilmek amacıyla geliştirilmiştir. Hücrelerin üç boyutlu ortamda üretilmeleri bazı büyüme faktörlerini kendi kendine üretmelerine yardımcı olarak serum gereksiniminin azalmasına ve hatta serumsuz besiyeri kullanımına izin vermektedir. Bu yolla üretilen hücrelerin metabolizmik faaliyetlerinin daha düzenli olduğu, mikrogözenekli taşıyıcılara göre daha dayanıklı oldukları, daha uzun süre kültür edilebildikleri ve düşük mekanik hasarlardan dolayı daha az hücre kaybı yaşandığı bildirilmektedir. Bu tür taşıyıcılar için en büyük problem özellikle büyük ölçek çalışmalarında homojen çevrenin sağlanma zorluğu ve besin maddeleri ve oksijenin taşıyıcı içindeki kütle transferi kısıtlamalarıdır (Rupp, 1985). Ayrıca gerek hücre sayımı ve gerekse hücre pasajı için tripsin ile muamele edilen taşıyıcılarda mevcut hücrelerin önemli bir kısmının geri kazanımı mümkün değildir. Çizelge 2.2'de günümüzde ticari olarak üretilen birçok mikrot taşıyıcı türü ve bunlara ait bazı bilgiler sunulmuştur.

**Çizelge 2.2.** Ticari olarak üretilen mikrot taşıyıcı türleri ve bunlara ait bazı bilgiler.

Taşıyıcı ismi	Firma	Yapısı	Yoğunluk (g/cm <sup>3</sup> )	Çap (µm)
<b>DEAE Dekstran</b>				
Cytodex 1	Amersham Pharmacia	DEAE-dekstran	1,03	160-230
Cytodex 2	Amersham Pharmacia	DEAE-dekstran	1,04	115-200
Microdex	Dextran Products	DEAE-dekstran	1,03	150
Dormacell	JRH Biosciences	DEAE-dekstran	1,05	140
<b>Plastik</b>				
Acrobeads	Galil	Kaplanmış	1,04	150
Biosilon	Nalge Nunc	İşlenmiş polistiren	1,05	160-300
Biocarriers	Biorad	Poliakrilamid/DM	1,04	120-180
Bioplas	Whatman. Cellon Lux	Polistiren işlenmiş	1,04	150-210
Cytospheres	JRH Biosciences	Polistiren	1,03	160-230
BioSPEX PlastiSPEX		Polistiren	1,04	90-210
Rapidcell P	ICN	Polistiren	1,02-1,03	90-210
Bionoc	Cesco	PET	1,04	Fiber
<b>FIBRACEL</b>	New Brunswick Sci.	PET	1,04	Fiber
<b>Jelatin</b>				
Ventregel	Ventrex (Bayer)	Jelatin	1,03	150-250
Cytodex 3	Amersham Pharmacia	Jelatin-dekstran	1,04	130-210
Cultisphere-G	Sigma	Jelatin	N/A	120-180
Cultisphere-GL	Sigma	Jelatin	N/A	150-330
Cultisphere-S	Sigma	Jelatin	N/A	120-180
<b>Glass</b>				
Bioglas	Whatman, Cellon	Cam-plastik kaplı	1,03	150-210
BioSPEX GlasSPEX	JRH Biosciences	Cam-polistiren	1,02	90-210
Rapidcell G	ICN	Cam	1,02-1,03	90-210
Ventreglas	Ventrex (Bayer)	Cam	1,03	90-210
Glass	Sigma			95-210
<b>Selüloz</b>				
DE-52/53	Whatman	DEAE-Selüloz	1,03	Fiber
<b>Kollajen/kollajen kaplı</b>				
BioSPEX	JRH Biosciences	Kollajenpolistiren	1,02-1,03	90-210
Cytodex 3	Amersham Pharmacia	kaplı Kollajen	1,04	130-210
Rapidcell C	ICN	Kollajen kaplı	1,02	90-210
Biospheres	Whatman, Cellon	Kollajen kaplı	1,02	150-210

### 2.5.2. Mikrot taşıyıcıların avantajları ve dezavantajları

Mikrot taşıyıcılı hücre kültürü sistemlerinin, monolayer ve süspanse hücre kültürü sistemlerine göre farklı avantaj ve dezavantajları vardır (Reuveny, 1990):

Avantajları,

- Oldukça yüksek "yüzey alanı/hacim oranı" sağlarlar. Mikrotaşıyıcılar karıştırmalı biyoreaktörlerde, akışkan yataklı veya dolgulu yataklı biyoreaktörlerde kullanıldığında hücre verimi  $2 \times 10^8$  hücre/mL'ye kadar ulaşabilmektedir (Groot, 1995).
- Yukarıda bildirilen nedenle birim yüzey alanına düşen maliyet monolayer sistemlere göre daha azdır.
- Mikrotaşıyıcı kültürlerinde besiyeri en etkin biçimde kullanılmış olur.
- Monolayer sistemler gibi fazla işgücü istemez ve yer sıkıntısı yaratmaz.
- Homojen karışımli taşıyıcılı kültürlerde kültür koşulları kolaylıkla izlenebilir.
- Makrogözenekli taşıyıcılar hücreler için üç boyutlu bir mikroçevre oluşturarak hücre sayısının ve kalitesinin artmasını sağlar.
- Özellikle perfüzyon sistemlerin kullanıldığı durumlarda hücrelerin besiyeri içeriğindeki eksiklikler veya toksin birikimlerinden etkilenmesi minimum düzeye indirilmiş olur.
- Hücrelerin hücre sel ürünlerden basit bir sedimentasyon ile uzaklaştırılması mümkündür.
- Hücreler süspanse kültürle nazaran karıştırma ve havalandırma gibi mekanik etkilerden daha az etkilenirler.
- Kültür süresini uzatmak mümkündür.
- Besiyeri değişimi oldukça kolaydır.
- Hücre kültür sistemlerinde kontaminasyon riski manipülasyon sayısı ile orantılıdır. Ne kadar çok manipülasyon yapılırsa kontaminasyon riski o kadar artar. Mikrotaşıyıcılı sistemlerde hücreler zaten çok geniş yüzey alanlarında kültüre edildikleri için pasajlanmalarına gerek duyulmaz, bu da kontaminasyon riskini azaltır.
- Tripsin gibi enzimatik yollar kullanılmaksızın direk etkileşim metoduyla hücre pasajı yapmak mümkündür.

Dezavantajları,

- Hücrelerin mikrotarıyıcılardan geri kazanımı zor olmaktadır. Bu yüzden ürünün hücre olduğu çalışmalarda mikrotarıyıcılarla çalışmak zordur.
- Diğer süspanse sistemlerde sorun olan zayıf oksijen transferi mikrotarıyıcılı sistemlerde de sorun olabilmektedir.

### **2.5.3. Mikrotarıyıcı kültürlerinde önemli parametreler**

Mikrotarıyıcı kültürlerinin yüksek verimlilikle çalıştırılabilmesi için aşağıda belirtilen noktalara dikkat edilmesi gerekmektedir.

#### **2.5.3.1. Mikrotarıyıcı konsantrasyonu**

Mikrotarıyıcı kültürlerinde hücre verimi doğrudan büyüme için gerekli yüzey alanı ile ilişkili olduğundan taşıyıcı konsantrasyonu oldukça önemlidir. Mikrotarıyıcı kültürlerinde son hücre sayısı başlangıç hücre sayısının genellikle 10 katına yakındır. Eğer besin maddesi, oksijen ve pH'dan kaynaklanan kısıtlamalar yoksa uygun miktarda taşıyıcı kullanılarak  $5-10 \times 10^6$  hücre/mL gibi hücre sayılarına ulaşmak mümkündür.

Genel olarak taşıyıcı miktarı, kullanılan taşıyıcının türüne, besiyerine ve kullanılacak olan hücrenin doygunluk yoğunluğuna (saturation density) ( $10^5$  hücre/cm<sup>2</sup>) göre değişmekle birlikte 5-50 g taşıyıcı/L'lik konsantrasyon rutin uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Burada bilinmesi gereken nokta kullanılacak olan taşıyıcının birim ağırlığının sahip olduğu yüzey alanıdır. Eğer taşıyıcı kullanımda daha önceden yeterli tecrübeye sahip olunmamışsa bu konuda üretici firmanın kullanılacak hücre üzerinde elde etmiş olduğu referanslardan yararlanılmalıdır.

#### **2.5.3.2. Mikrotarıyıcıların kültür için hazırlanması**

Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce taşıyıcıların üretiminden kaynaklanan toksik atıkların uzaklaştırılması amacıyla fosfat tamponu (PBS) ile yıkanması gerekmektedir. Bu işlem aynı zamanda küresel şekilli bazı mikrotarıyıcılarda su varlığında gerçekleştirilen şişme olayına yardımcı olur.

Ayrıca NWPF gibi polimerik taşıyıcılar da yüzeyin hidrofilitésinin artırılarak hücre tutunmasının sağlanması amacıyla bir dizi modifikasyon işlemlerinden geçirilir (Aslankaraoğlu, 2006).

Uygun miktarda tartılan ve modifikasyonları yapılan mikrotasıyıcılar reaktör içerisine yerleştirildikten sonra küçük hacimli reaktörler genellikle otoklavda, büyük hacimli reaktörler ise kapalı sistem buhar ile steril edilirler.

Yine hücreler reaktör içerisine alınmadan önce aktif olarak üreme fazında bulunan kültürlerden toplanan besi ortamı (conditional medium) steril bir şekilde reaktör içerisine alınarak taşıyıcıların 12-24 saat bu ortamla etkileşimi sağlanır. Bu yöntem hücre çoğalması esnasında besi ortamında bol miktarda bulunduğuna inanılan fibronektin gibi yapışma faktörlerinin ve bazı mitojenik ajanların taşıyıcı yüzeyinde tutulması amacıyla gerçekleştirilir.

#### **2.5.3.3. Başlangıç hücre sayısı (Initial cell density)**

Mikrotasıyıcı kültürlerinde başlangıç hücre sayısı, hücrenin karakteristik özelliklerine ve besi yeri bileşimine bağlı olarak değişmekle birlikte genellikle  $1-10 \times 10^5$  hücre/mL reaktör hacmi veya  $1-10 \times 10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> taşıyıcı yüzeyi alanı arasında değişmektedir. Yüksek hücre sayısı ile kültüre başlanması kültür süresinin kısılmasına neden olur. Bu durumda kullanılan taşıyıcı miktarı ve besin maddeleri kısıtlamaları da mutlaka göz önüne alınarak hücre kültürünün sonlandırılması veya pasajlama yapılması gerekir. Aksi takdirde hücreler yapıştıkları yüzeyden ayrılarak besi ortamında yüzmeye başlarlar.

#### **2.5.3.4. Mikrotasıyıcı hücre kültürlerine başlangıç**

Hücrelerin besiyerine alınmadan önce besi ortamının optimum hücre kültürü koşullarında hazır olarak bulundurulması gerekir. Bu amaçla kullanılacak besiyerinin sıcaklık, pH ve ozmolarite yönünden hazır bulundurulması sağlanır. Yeni hazırlanan besiyeri içeriğinde O<sub>2</sub> miktarı genellikle hücreler için yeterli düzeyde olduğundan ilave bir işleme gerek yoktur.

Hücreler genellikle çalışma hacminin üçte biri kadar bir hacimde reaktör içerisine alınırlar. Böylelikle hücrelerin taşıyıcılarla etkin bir şekilde teması sağlanmaya çalışılır. Bu aşamada karıştırma hızını mümkün olduğunca düşük

tutmak (çalışma hızının dörtte biri) tutunan hücrelerin yüzeyden ayrılmasına yol açmaması açısından önemlidir. Yine düşük hızda karıştırma taşıyıcıların süspansiyon halinde tutulacağı reaktörlerde homojenliği sağlamış olur. 2-8 saat sonra reaktör hacmi çalışma hacmine getirilerek uygun karıştırma hızında kültüre başlanmış olur.

Aşılama yapılacak hücrelerin logaritmik üreme fazında bulunan ve %70-80 doygunluk gösteren hücrelerden temin edilmesi oldukça önemlidir. Tamamen doygunluğa ulaşmış kültürlerde hücrelerin büyük bir kısmı hücre döngüsünün G0 fazında olacağından bu hücreler ile yapılan kültürlerde bekleme fazının 24 saate kadar uzayabileceği bildirilmektedir.

Karıştırma hızı karıştırıcının türü ile doğrudan ilgili olup genellikle 20-100 rpm aralığında homojen çevrenin sağlanması için yeterli düzeydedir. Genellikle taşıyıcıların süspansiyon halinde kalmalarına yetecek minimum hız uygundur. Kültür esnasında sağlanan havalandırma işleminin de karıştırma üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır.

#### **2.5.3.5. Besiyeri değişimi**

Mikrotaşıyıcı kültürlerinde hücre döngüsünü bozmadan besiyeri değişimi yapmak oldukça önemli bir konudur. Besiyeri değişiminin, hücre üremesi nedeniyle azalan esansiyel besin maddelerinin yerine konulması, hücre canlılığı ve üremesini inhibe edebilecek toksik metabolitlerin uzaklaştırılması ve kolay pH kontrolü gibi önemli avantajları bulunmaktadır.

Besiyeri değişiminin sıklığı ve miktarı hücre türü, hücre sayısı ve besiyerinin bileşimi gibi faktörlere bağlı olarak değişir. Hızla bölünen ve yüksek sayıya ulaşan hücre kültürlerinde, besin maddesi kıtlığı, pH düşmesi ve laktat, amonyak gibi inhibitör maddelerinin birikiminden dolayı değişim aralığı azaltılabilir.

Besiyeri değişimlerinde taze olarak kullanılacak besiyerinin sıcaklık, pH ve oksijen gibi önemli parametreler yönünden dengelenerek reaktör içerisine alınması gerekir.

Özellikle büyük hacim biyoreaktörlerde besiyeri değişiminin aralıklarla yapılması yerine optimizasyonu yapılmış bir şekilde sürekli besleme ile sağlanması daha pratik ve etkili bir yöntem iken laboratuvar ölçekli çalışmalarda belirli aralıklarla besiyeri değişimi daha kolay ve güvenlidir.

İlk besiyeri değişimi (özellikle düşük sayıda hücre ile başlanan kültürlerde) genellikle 48 saatlik bir inkübasyondan sonra gerçekleştirilirken sonraki değişimler hücrelerin üreme durumlarına göre 24 saat veya daha sık aralıklarla yapılabilmektedir. Ayrıca besiyeri değişim oranının en fazla %50-60 civarında tutulması aktif olarak üreme durumundaki hücrelerden salgılanan ortamda bol miktarda bulunan mitojen faktörlerin de azaltılmamasını sağlar.

Toksik metabolit oluşumunun inhibe edici seviyeye ulaşmadığı ve pH kontrolünün kolay olarak sağlandığı kültürlerde azalan besin maddelerinin taze besiyeri içinde sunumu yerine saf karışım olarak reaktör içine dışarıdan katılması da mümkündür. Böylelikle reaktör içi besiyeri bileşimi fazla değiştirilmemiş ve serum bileşenleri gibi tükenmemiş halde bulunan besin maddelerinin kullanımının sağlanmasıyla da oldukça önemli bir ekonomik kazanç elde edilmiş olur.

#### **2.5.3.6. Mikrotaşıyıcılardan hücrelerin geri kazanılması**

Geleneksel hücre kültürü sistemlerinde "tissue culture polystyrene (TCPS)" olarak adlandırılan Petri kaplarından hücrelerin kaldırılması Bölüm 2.4'de de ayrıntılı olarak açıklandığı gibi  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarının EDTA ile tutulması ve tripsinle hücre bağları ve ekstraselüler matrisin parçalanmasıyla gerçekleşir. Rutin hücre kültüründe önce  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  içermeyen PBS ile yıkama ve daha sonrasında 2-3 dakikalık tripsinle  $37^{\circ}C$ 'de muamele hücrelerin tümünün kaldırılması için yeterlidir. Değişik tipteki hücrelerin yüzeylere tutunma kuvvetleri farklıdır, bu yüzden her hücre için aynı yöntem geçerli değildir. Mikrotaşıyıcılardan hücrelerin geri kazanılması standart hücre kültür Petri kaplarından daha zordur.

Hücrelerin mikrotaşıyıcılardan kaldırılabilmesi için farklı yöntemler mevcuttur. Önemli olan hücrelere en az hasar veren yöntemin seçilmesidir. Standart hücre kültüründeki tripsinizasyon işlemi mikrotaşıyıcılı sistemde birkaç değişikliğe

uğrar. Mikrotasıyıcılar tripsinizasyondan önce hücre matris bağlarının zayıflatılması için  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  içermeyen %0,2 EDTA'lı PBS ile yıkanır. Alkalın pH değerlerinde hücreler daha zayıf tutunurlar. Bu yüzden yıkama çözeltisi olarak kullanılan EDTA'lı PBS'in pH'sı 7,6-8 değerlerine yükseltilir.

Hücrenin materyalle olan etkileşimine bağlı olarak yıkama işlemi iki kere yapılabilir. Yıkamalarla ortamdaki serum iyice uzaklaştırıldıktan sonra tripsin uygulanır ve 15 dakika boyunca hücreler  $37^{\circ}C$ 'de çalkalanarak inkübe edilir. Tripsinizasyon işleminde pH oldukça kritiktir. Hücrelerin geri kazanılabilmesi için kullanılan çözeltilerin pH değerlerinin 7,4 ile 8 arasında olmasına dikkat edilmelidir (Giard, 1984). Hücreleri enzimlerle olabildiğince kısa bir süre inkübe etmek gerekir; bu yüzden bazı hassas hücreler için  $+4^{\circ}C$ 'de yavaş bir tripsinizasyon işlemi önerilmektedir (Ham, 1980).

Tripsin substrata özgül bir proteaz olmadığı için hücre-matris bağlarını kırarken, hücrelerin yüzey moleküllerinin bir kısmını da ortadan kaldırmaktadır (Anghileri, 1976 ve Canavan, 2005). Eğer hücrenin membran bütünlüğü ve karakteri yapılan çalışma için önemli ise farklı bir yöntem tercih edilmelidir. Cytodex-3 gibi kollajen bazlı mikrotasıyıcılar ve kollajenaz enziminin bir arada kullanımı hücrelerin yüksek oranda geri kazanımı ile sonuçlanmıştır. Kollajene özgül olan kollajenaz enzimi böyle bir sistemde hücre membran proteinleri yerine materyalin kendisini yıkarak hücreleri materyalden ayırır. Hepatositlerle yapılan bir çalışmada, bu yöntemle 10 dakika içinde hücrelerin hepsi kaldırılabilmiştir (Sirica, 1979).

Tripsin ve kollejenaza alternatif olarak farklı proteazlar kullanılabilir.

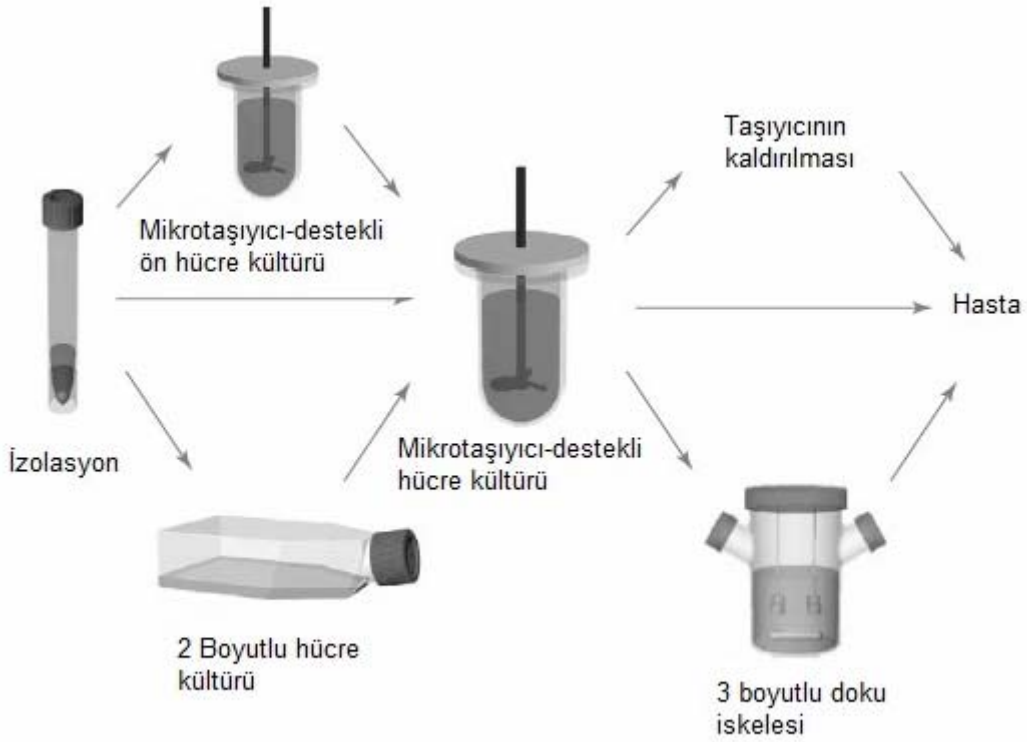
#### **2.5.4. Mikrotasıyıcı-destekli kültürlerin uygulamaları**

Günümüzde mikrotasıyıcı-destekli kültürler, 1000-3000 litreye kadar aşı ve protein ürünlerini üretmekte kullanılmaktadır (Malda ve ark., 2003). Mikrotasıyıcılar doku kültür kaplarına, döner şişelere, karıştırılmalı kültürlere eklenerek kültür yoğunluğunu artırır ve hatta karıştırılmalı kültürlere eklendiğinde yüksek hücre yoğunlukları elde edilir.

Ayrıca, mikrotaşıyıcı-destekli kültürler "doku mühendisliği"nde de uygulama alanına sahiptirler.

Doku mühendisliğinde, insan vücudundaki hasarlı bölgenin tedavi edilmesinde kullanılmak üzere uygun fenotipte ve yeterli sayıda hücre üretebilmek çok önemlidir. Birçok memeli hücresi yüzeye-bağımlı (anchorage-dependent, AD) hücrelerdir ve bu tip hücreler canlılıklarını devam ettirebilmek ve üreyebilmek için katı bir yüzeye ihtiyaç duyarlar. AD hücreler öncelikle katı bir destek malzeme (örneğin Petri kabı) üzerine yapışır ve ardından yüzeyde tek tabaka oluşturacak şekilde ürerler. Dolayısıyla üreme yüzey alanının büyüklüğüne bağlı olarak artar. AD hücrelerin hücre kültürü çalışmaları için mikrotaşıyıcılar geniş avantajlar sunar. Bugün pek çok farklı mikrotaşıyıcı araştırmalarda ve endüstriyel ölçekli hücre kültürü sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrotaşıyıcılı kültürlerde hücreler küçük kürelerin üzerinde tek tabaka halinde ya da kürelerin içindeki gözeneklerde çok tabaka halinde hafif bir karıştırma ile ürerler. Mikrotaşıyıcılar geniş yüzey alanlarında hücrelerin orijinal fenotiplerini koruyarak çoğalmalarını sağladığından, pek çok hücrenin üretimi için eşsiz bir kolaylık sağlamaktadırlar. Örneğin, kondrositlerin mikrotaşıyıcılarda ilk kültürü Freed ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada hücreler canlı olarak mikrotaşıyıcıların üzerinde dört aydan fazla kültüre edilmiş ve katlanma sürelerinin statik kültüre kıyasla daha kısa olduğu gösterilmiştir (Freed, 1993). Yapılan çalışmalar mikrotaşıyıcıların orijinal doku özelliklerinin korunmasında kondrositleri desteklediğini ortaya koymuştur. İnsan eklem ve nazal kıkırdak dokusundan geliştirilen ve Petri yüzeylerinde kollajen tip I sentezleyen kondrositlerin mikrotaşıyıcılı sistemde hiyalin kıkırdak özelliklerini geri kazandığı görülmüştür (Fronzoza, 1996 ve Bouchet, 2000). Hong ve arkadaşları (2005) ise, polilaktik asit (PLA) mikrotaşıyıcılar (180-280 µm) hazırlamış ve bu mikrotaşıyıcıları kollajen ile kaplamıştır. Mikrotaşıyıcılar üzerinde kondrosit kültürü yapılmış ve hücre yapışması, çoğalması ve yayılmasının başarıyla sağlandığı görülmüştür (Hong, 2005). Şekil 2.6'da doku mühendisliği için mikrotaşıyıcı-destekli kültür sistemlerinin kullanımı şematize edilmiştir. Şekilde gösterildiği gibi, hastanın sağlıklı doku bölgesinden izole edilen az sayıdaki hücre, tedavi için gerekli miktara ulaştırılana kadar mikrotaşıyıcı-destekli kültürlerde aşamalı olarak çoğaltılır. Hücreler hastaya ya

doğrudan enjeksiyon yoluyla verilir ya da doku iskelesine ekilip *in-vitro* veya *in-vivo* koşullarda doku oluşumunu desteklemeleri beklenir.



**Şekil 2.6.** Mikrotaşıyıcı-destekli kültürlerin doku mühendisliği için kullanımı.

## 2.6. Sıcaklık-duyarlı Polimerler ve Hücre Kültüründeki Uygulamaları

"Uyarı-cevap polimerleri" terimi, dış ortamdan gelen küçük fiziksel ya da kimyasal uyarılar karşısında büyük ve keskin fiziksel ya da kimyasal değişimler gösteren çapraz-bağlı veya yüzeye-kaplanmış çözünebilen polimer sistemleri için kullanılmaktadır. Bu polimerler, "akıllı polimerler" olarak da adlandırılır (Hoffman, 1995).

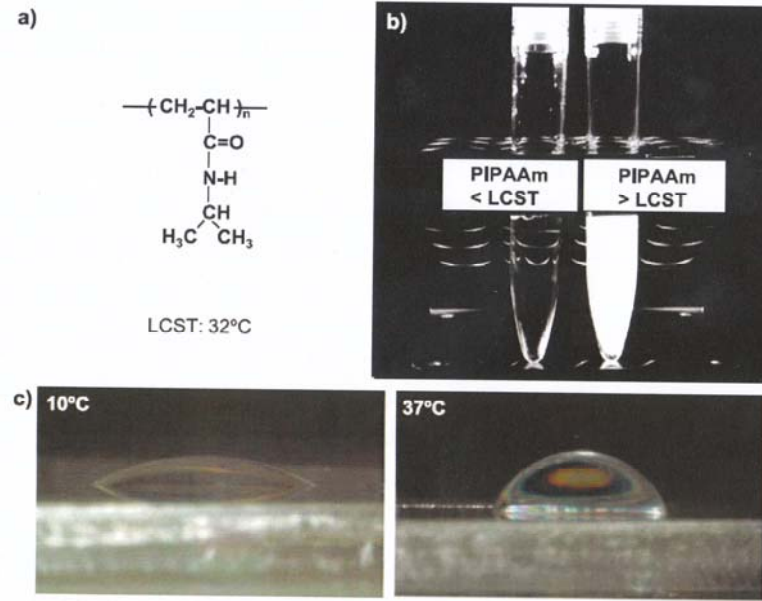
Uyarı-cevap polimerleri arasında üzerinde en çok çalışmanın yürütüldüğü grup "sıcaklık duyarlı polimerler" dir. Sıcaklık-duyarlı polimerler sulu çözeltilerinde düşük kritik sıcaklığı (LCST) gösterirler, fakat bu sıcaklığın altında yüksek miktarda şişerler ya da çapraz-bağlı değilse çözünürler. LCST, polimer-su ve polimer-polimer arasındaki çekim kuvvetlerindeki denge olarak tanımlanır. Polimer-polimer arasındaki çekim kuvvetlerindeki artış LCST'yi azaltırken; polimer-su arasındaki çekim kuvvetlerindeki artış LCST'yi yükseltir (Brun-Graepi ve ark., 2010). Çizelge

2.3'de sıcaklık-duyarlı polimerlerin bir listesi verilmiştir. Bu polimerlerin ortak özelliği, her birinin hidrofilik ve hidrofobik grupları arasında bir dengenin varlığıdır. Eğer sıcaklık-duyarlı polimerin bağıl hidrofilik içeriği artırılır ya da azaltılırsa bu durum LCST'yi de artırır ya da azaltılır ve bunun yanı sıra katı polimer substratına fiziksel olarak adsorplanma eğilimini de aynı şekilde değiştirir.

**Çizelge 2.3.** Sıcaklık-duyarlı polimerlere bazı örnekler.

<b>Eter grupları içeren polimerler</b>
Poli(etilen oksit)(PEO) Poli (EO\PO)kopolimerleri PEO-PPO-PEO blok termopolimerleri Alkil-PEO blok kopolimerleri Poli (vinil metil eter) Poli (vinil eter-butil eter)kopolimerleri
<b>Alkol grupları içeren polimerler</b>
Hidroksipropil akrilat Hidroksipropil metilselüloz Hidroksipropil selüloz Metilselüloz Poli(vinil alkol) ve türevleri
<b>Süstitue amid grupları içeren polimerler</b>
Poli(N-akrilamid) Poli(N-akriloil piperidin) Poli(N-akriloil piperidin) Poli(akriloil-L-amino asit ester) Poli (etil oksazolin)
<b>Diğer polimerler</b>
Poli(metakrilik asit)

Üzerinde en çok çalışma yapılmış sıcaklık-duyarlı polimer, PNIPAAm'dir. PNIPAAm, sıcaklığın değişimiyle dikkate değer bir şişme davranışı göstermektedir. Düşük sıcaklıkta tamamen sulu ve geniş hacimli bir görünüm sergilemekte, fakat LCST'nin (32°C'nin) üzerinde dehidrasyona uğramakta ve oldukça küçük, sık zincir konformasyonuna sahip olmaktadır. Bu sıcaklığın altında da polimer zincirleri genişleşerek, suda çözünür. PNIPAAm'nin sıcaklık değişimine karşı gösterdiği bu davranış tersinirdir (Şekil 2.7).



**Şekil 2.7.** Sıcaklık-duyarlı NIPAAm polimerlerinin çözelti ve yüzey görüntüleri a) NIPAAm yapısı b) NIPAAm polimerinin LCST değerinin altında ve üstündeki görüntüsü c) NIPAAm ile kaplanan yüzeylerdeki su damlasının 10 ve 37°C'deki görüntüleri (Kikuchi, 2005).

PNIPAAm'ye ait farklı LCST değerleri elde etmek amacıyla, PNIPAAm üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda PNIPAAm'ye ait LCST değerinin sübstitute gruplar ve bu grupların molekül ağırlığından etkilendiği görülmüştür (Brun-Graeppe ve ark., 2010).

Farklı LCST değerleri elde etmek amacıyla yapılan bir diğer çalışma da; tuzların, çözücülerin ve yüzey-aktif maddelerin PNIPAAm'nin LCST değeri üzerinde etkilerinin incelenmesidir (Zhang ve ark., 2005). Zhang ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada P(NIPAAm)'ye tuz ilavesinin LCST'yi artırdığı gözlemlenmiştir. Eeckman ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada da LCST'nin yüzey-aktif maddeye ait hidrofobik zincir uzunluğu ve konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği gözlemlenmiştir.

Bir başka çalışmada da Tao ve arkadaşları (2005) tarafından yapılmış olup, bu çalışmada çözücü etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak, PNIPAAm'nin su ve metanol karışımı içerisinde ani bir hacim değişikliği gösterdiği görülmüştür. Bunun nedeni, su ve metanol moleküllerinin polimer zinciri üzerinde hidrojen bağı oluşturmasıdır. Fakat PNIPAAm çözücü varlığında ani bir hacim değişikliği gösterse de biyolojik uygulamalar için çözücü kullanımı tercih edilen bir yöntem olmamıştır.

Sıcaklık-duyarlı polimerler, üzerinde kültüre olan hücrelerin enzim kullanmadan, sadece sıcaklığın düşürülmesiyle bir tabaka halinde yüzeyden kaldırılabilmesine olanak sağlarlar (Silva, 2007). Hasarlı doku ve organların tedavisi için hücre katmanlarının geliştikleri yüzeyden kaldırılabilmelerinde sıcaklık-duyarlı polimerler eşsiz bir kolaylıktır. Literatürde "cell sheet engineering" olarak geçen bu teknoloji hücre kültürü ortamında geliştirilen üç boyutlu doku benzeri yapıların enzimatik reaksiyonlarla ortadan kaldırılmasının yaratacağı harabiyetin önüne geçerek dokuların sağlıklı bir şekilde elde edilmesine olanak sağladığı için oldukça önemlidir (Okano ve ark., 2005).

Konfluent hücre tabakalarının enzim kullanılmadan sıcaklığın değiştirilmesiyle kaldırılması ilk defa Takezawa ve arkadaşları (1990) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada fibroblast tabakaları PNIPAAm ve kollajen karışımı yüzeylerden kaldırılmıştır. Bu çalışma ile paralel olarak yürütülen bir diğer çalışmada Petri kabı yüzeyine kovalent olarak bağlanan PNIPAAm polimerinin üzerinde enzimatik uygulamalara hassas olan hepatositler kültüre edilmiş ve sıcaklık değişimiyle yüzeyden başarıyla kaldırabilmişlerdir (Takezawa, 1990).

Sıcaklığa bağlı olarak hücrelerin yüzeyden kalkmasının aktif hücre metabolik faaliyetlerle düzenlendiği düşünülmektedir. Hücrelerin sıcaklık-duyarlı yüzeylerden ayrılmasının ATP sentezi inhibitörleri, sodyum azid ve tirozin kinaz inhibitörü genistein ile baskılandığı tespit edilmiştir (Okano,1995). Aktin filaman sabitleyici phalloidin ve onun depolimerize formu Cytochalasin D kullanımı da hücre ayrışmasını durdurmaktadır (Yamato, 1999). Sıcaklık-duyarlı yüzeylerden ayrılan hücrelerin sinyal mekanizmaları ile hücre iskeletini yeniden yapılandırdığı düşünülmektedir.

Farklı metabolik aktivitelerden dolayı değişik fenotipteki hücrelerin ayrılma için gereken optimum sıcaklık değerleri başkadır. Farklı hücre tiplerinin değişik hücrelerarası matris bileşenleri sentezlemesinden dolayı sıcaklık-duyarlı yüzeylere adsorbe olan proteinlerin bileşimi hücre tipine göre farklılık gösterebilir (Silva, 2007).

Sıcaklık-duyarlı polimerlerle ilgili literatürde son yıllarda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. PNIPAAm sadece biyomühendislik değil, kontrollü ilaç salımı

(Kurisawa, 2000) ve yeni tip kromatografik matrislerin geliştirilmesi (Kanazawa, 1996) gibi farklı biyomedikal uygulamalarda denenmektedir. PNIPAAm polimerleri kromatografi matrislerinde steroid hormonların (Kanazawa, 1996), polipeptid ve proteinlerin (Kanazawa, 1997); nükleotidlerin (Ayano, 2006) ayrıştırılmasına olanak sağlamaktadır.

## **2.7. Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerin Üretimi**

Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin üretiminde kullanılan üç yöntem;

- Radyasyonla indüklenmiş aşı polimerizasyonu
- Yüzeğe aşılama yaklaşımı ("grafting to")
- Yüzeyden aşılama yaklaşımı ("grafting from")

olup, aşağıda sırasıyla açıklanmaktadır.

### **2.7.1. Radyasyonla indüklenmiş aşı polimerizasyonu**

Radyasyonla indüklenmiş aşılama metotları biyomalzemelerin yüzey modifikasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Stannett, 1990). Aşılama metodu üç grupta incelenebilir. Bunlar:

- Ön-ışınlama metodu,
- Peroksit metodu ve
- Karşılıklı radyasyon aşılama metodu

olarak sıralanabilirler.

Radyasyon tesirli aşılama metodunda UV ışınlaması, elektron demeti (EB-Electron Beam), plazma aktivasyon ve plazma polimerizasyonu gibi farklı tipte birçok reaksiyon kullanılmaktadır.

Morra ve Cassinelli (1997), fotoduyarlayıcı olarak benzofenon varlığında UV ışınlaması yöntemiyle, polistiren Petri kapları üzerine PNIPAAm'nin fotopolimerizasyonu ve fotoaşılmasını gerçekleştirmişlerdir. 2-propanol ve % 0,1 benzofenon içeren çözeltideki ağırlıkça % 5-40 oranında bulunan NIPAAm Petri kaplarına dökülerek 5-30 dakika arasında 365 nm'de UV ışınına tutulmuştur. Greft

edilmiş PNIPAAm'nin varlığı X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) yöntemiyle tespit edilmiştir.

EB radyasyonu yönteminde ise, polistiren doku kültürü (TCPS) kabının yüzeyine düzgün olarak dağıtılan NIPAAm polimerize edilmektedir. Farklı tipteki hücreler EB radyasyonu yöntemiyle PNIPAAm aşıl原因arak hidrofobik özellik kazandırılan TCPS yüzeyine 37°C'de yapıştırılmış ve çoğaltılmıştır. Ancak aynı hücre tipleri yüzeye 20°C'de yüzeye yapışma göstermez (Nagase ve ark., 2009). Hidrofobik NIPAAm-aşılı TCPS üzerindeki hücreler kültür sıcaklığı 20°C'ye düşürüldüğünde yüzeyin hidrofilik özellik göstermesinden dolayı serbest hale gelir. EB radyasyonu yöntemi, pahalı bir yöntem olmasına karşın geniş bir skalada sıcaklık-duyarlı TCPS'lerin üretimini kolaylaştırmaktadır. PNIPAAm greft edilerek hazırlanan TCPS'ler Nunc firması tarafından satışa sunulmuştur (Nagase ve ark., 2009).

Pan ve arkadaşları 2001'de plazma polimerizasyon yöntemiyle PNIPAAm'yi aşıl原因mışlardır. Bu çalışmanın spektroskopik verileri monomerin yüzeyde kaldığını göstermiştir. 29°C'deki faz geçişi Atomik Güç Mikroskobu (AFM) kullanılarak ölçülmüştür. Plazma polimerizasyonu yöntemi herhangi bir substrat üzerinde sıcaklık-duyarlı kaplamaların üretilmesi için basamak rolü oynamaktadır ancak yapılan çalışmalar sonucunda bu metodun gerçekleştirilmesinin zorluğundan ötürü büyük ölçekli üretim açısından uygun olmadığı da düşünülmüştür (Nagase ve ark., 2009).

### **2.7.2. Yüzeye aşıl原因 yaklaşımı ("grafting to")**

Yüzeye aşıl原因a metodu; çevresel değişimlere (uyarılara) duyarlı polimerlerle yüzey modifikasyonunda oldukça sık kullanılan bir metottur (Şekil 2.8 a). Yüzeye aşıl原因a metodu iki aşamada gerçekleştirilmektedir:

- Fonksiyonel gruplara sahip polimerlerin hazırlanması
- Bu şekilde hazırlanan polimerin yüzeyle reaksiyona girerek yüzeyi kaplamasının sağlanması

Yüzeye aşıl原因a metodu, polimerizasyon koşullarındaki düzenlemelerle aşıl原因acak polimerin molekül ağırlığının kontrol edilebilmesinden dolayı tercih edilen bir

yöntemdir. Buna rağmen polimer greftin yoğunluğu yüzey fonksiyonel grupların sterik olarak sınırlı reaktivitesinden ötürü düşüktür.

Takei ve arkadaşları (1993 ve 1994) bu yöntemi kullanarak; NIPAAm bazlı polimerler üretmiştir. Bu polimerler; poli [IPAAm-ko-akrilik asit (AAC)] kopolimeri ve fonksiyonel karboksil uç grubu içeren PIPAAm'dir. Fonksiyonel karboksil uç grubu içeren PNIPAAm; NIPAAm'nin 3-merkaptopropiyonik asit (MPA) ile telomerizasyonu ile N,N dimetilformamid (DMF) içerisindeki [N,N-azobis (isobütironitril)]'in (AIBN) başlatıcı olarak kullanımıyla hazırlanmıştır. Poli (IPAAm-ko-akrilik asit (AAC) ise, NIPAAm'in AAC ile başlatıcı olarak DMF içinde AIBN kullanılarak radikal kopolimerizasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Karboksil grup içeren bu polimerler; cam substratın amino grupları ile reaksiyona girmişlerdir. İki şekilde de oluşturulan PNIPAAm aşılama yüzeylerinin sıcaklık-duyarlılık değişimleri dinamik yüzey temas açılarının ölçümüyle belirlenmiştir (Takei ve ark., 1994).

Kanazawa ve arkadaşları (1996) ise, aynı yaklaşımla, kromatografik analizlerde sıcaklık-duyarlı sabit faz ihtiyacını karşılamak amacıyla silika üzerine PIPAAm aşılama yapmışlardır.

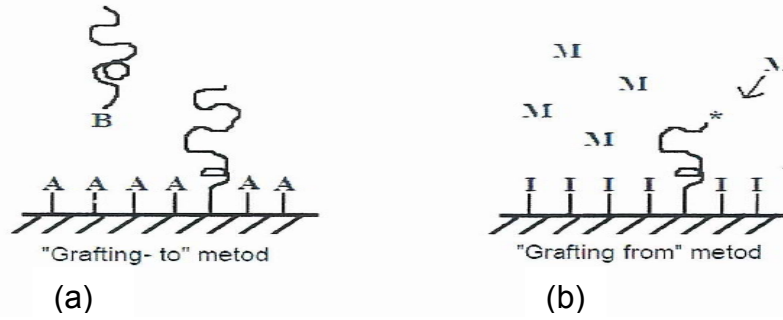
### **2.7.3. Yüzeyden aşılama yaklaşımı ("grafting from")**

Yüzeyden aşılama metodu yüzeyleri polimerle modifiye etmede kullanılan diğer bir metottur (Şekil 2.8 b). Bu metotta, başlatıcı yüzeye immobilize edilir, aktif türler yüzey üzerinde oluştuktan sonra monomerlerin yüzeyden bulk faza doğru polimerleşme işlemi başlar. Bu yöntem yüzeye greftleme metoduyla karşılaştırıldığında, daha fazla miktarda polimerin yüzeye kaplandığı belirlenmiştir.

Yakushiji ve arkadaşları (1998 ve 1999) bu metodu kullanarak NIPAAm ile modifiye edilmiş yüzeyleri hazırlamışlardır. Öncelikle cam yüzey amin gruplarına sahip olması için 3-aminopropil trietoksilan kullanılarak silanlanmıştır. Daha sonra azo başlatıcıları yüzeye immobilize edilmiştir. Bu şekilde, cam yüzeydeki amin grupları ile başlatıcıdaki karboksil gruplarının etkileşimi sonucu amid bağları oluşmuştur. Polimerizasyondaki monomer NIPAAm, çapraz bağlayıcı ise N,N-metilenbisakrilamidir. Radikal polimerizasyon işlemi sonucunda yüzeyde çapraz bağlı PNIPAAm hidrojel katmanlar oluşmuştur.

Oluşan yüzey, kromatografide analitle güçlü bir etkileşim gösterdiğinden Yakushiji ve arkadaşları tarafından durgun faz olarak kullanılmıştır. Kidoaki ve arkadaşları (2001) NIPAAm'nin ditiyokarbamat türevli cam substrat üzerine fotogreft polimerizasyon yöntemiyle kaplanması konusunda bir çalışma yürütmüşlerdir. Ditiokarbomaten türevli cam yüzey, yüzeyin klorometilasyonu ve bunu takip eden sodyum N,N-dietil ditiyokarbomat ile ditiyokarbamilasyonu ile hazırlanmıştır.

Oda sıcaklığında NIPAAm varlığında başlatıcı immobilize edilmiş yüzeylerin UV ışınına maruz bırakılmasıyla polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Mikroskopik seviyede NIPAAm greft edilmiş yüzeyin sıcaklık-duyarlılık geçişini karakterize etmek için, 25°C ve 40°C'de NIPAAm greft edilmiş yüzeyin verileriyle bir güç-uzaklık eğrisi oluşturulur. Ölçümler AFM ile gerçekleştirilir. Güç-uzaklık eğrisinde, 40°C'deki itme oranının 25°C'deki itme oranına göre; 1/10'dan 1/20'ye düşmesi kaplamanın kalınlığındaki değişimi göstermiştir (Nagase ve ark., 2009).



**Şekil 2.8.** Polimerik zincirlerle yüzey modifikasyonu a) Yüzeye aşılama yaklaşımı ("grafting to") A; aktive edilmiş substrat yüzeyi, B; polimer zincirleri b) Yüzeyden aşılama yaklaşımı ("grafting from") M; monomer (PNIPAAm), I; başlatıcı.

#### 2.7.4. Kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyon mekanizmaları

Kompleks ve kontrollü mimariye sahip makromoleküllerin sentezi üzerine yapılan çalışmalar, son yıllarda polimer biliminde giderek artan bir öneme sahiptir (Hadjichristidis, 2001). Polimerdeki dallanmış yapı, malzemenin fiziksel özelliğini ve işlenebilirliğini etkileyen önemli bir yapısal etkidir. Dallanmış yapıdaki polimerler yüksek segment yoğunluklarından dolayı doğrusal polimerlerle karşılaştırıldıklarında çok daha sıkı bir yapıdadırlar bu da malzemenin kristalin, mekanik ve viskoelastik özelliklerini etkileyen bir faktördür. Kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyon iyi tanımlanmış kompleks makromoleküler yapıların sentezi

için oldukça basit ve etkili bir yöntemdir (Matyjaszewski, 1998). Kontrollü mimari denilince, molekül ağırlığı kontrolü, uç grup kontrolü, blok kopolimer oluşturabilme yeteneği ve yaşayan karakter akla gelmektedir. Atom transfer radikal polimerizasyon (ATRP) üzerinde en çok çalışılan kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyon yöntemidir.

Yaşayan polimerizasyon reaksiyonları olarak da bilinen kontrollü radikal polimerizasyonu mekanizmaları, polimer zinciri molekülünün kontrollü büyümesini sağlayan ve istenilen molekül ağırlığını elde etmeye yarayan farklı polimerizasyon mekanizmalarından oluşur. Bir nevi katılma polimerizasyon mekanizmasına sahip olan yaşayan polimerizasyon reaksiyonlarında büyüyen polimer zincirinin sonlanma adımı ortadan kaldırılmıştır. Bu reaksiyonlarda, sonlanma ve başlama basamakları dış etmenlerle kontrollü bir şekilde yapılır. Bu sayede polimerin molekül ağırlığı ve polimer zincirlerinin zincir sonu grupları kontrol edilir. Zincir sonuna eklenebilecek farklı fonksiyonellikte gruplar ile polimerin fiziksel özellikleri uyumlanabilir.

Sonlanma ve zincir transferi reaksiyonlarının olmadığı yaşayan polimerizasyon mekanizmalarında polimer zincirinin büyüme hızı sabittir ve reaksiyon sonunda elde edilen polimer moleküllerinin zincir büyüklükleri birbirine çok yakındır; yani monodisperse yakın molekül ağırlığı dağılımı vardır.

Kontrollü radikal polimerizasyonlarının yaşayan polimerizasyon olmaları için gerekli kurallar;

- bütün monomerler tükenene kadar polimerizasyon reaksiyonun devam etmesi ve
- molekül ağırlığının polimer dönüşümü ile doğrusal bir ilişki içinde olmasıdır.

Konrollü radikal polimerizasyon reaksiyonları;

- monodisperse yakın dar bir molekül ağırlığı dağılımı elde edilmesi,
- zincir sonunda fonksiyonel gruplara sahip polimerler elde edilmesi,
- polimer moleküler mimari yapısının kontrol edilmesi (*blok kopolimerler*),

nedenleriyle son yıllarda tercih edilen polimerleşme mekanizmalarıdır.

Bu tür polimerizasyon reaksiyonlarının kullanımı özellikle blok kopolimerlerin sentezinde yaygındır. Reaksiyonun istenilen adımında farklı monomerler eklenerek di- ya da tri- blok kopolimerler de elde edilebilmektedir (Matyjaszewski, 1998).

#### **2.7.4.1. Atom transfer radikal polimerizasyon tekniği (ATRP)**

Yaşayan/kontrollü radikal polimerleşme mekanizmalarının bir örneği olan atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP), ilk kez Swamoto ve Matyjaszewski (1995) tarafından 1995 yılında geliştirilerek uygulanmıştır. ATRP kendinden önceki kontrollü radikal polimerleşmesi metotlarından (anyonik, katyonik ve KSRP gibi), karmaşık polimer yapıların üretimine izin vermesi ile ayrılır. Kullanılan özel metal katalizör bileşikler sayesinde farklı monomerler büyüyen polimer zincirine eklenerek, yeni kopolimerler elde edilebilir. Ayrıca ATRP sıcaklık gibi reaksiyon parametrelerinin kontrolü ile kolayca durdurulup yeniden başlatılabilir. ATRP'den önce ortaya çıkan kontrollü polimerizasyon yöntemlerinde her türlü monomer kullanılamamasına karşı, ATRP mekanizması ile geniş bir monomer grubu polimerizasyon için kullanılabilir (Braunecker, 2006).

#### **ATRP'de kullanılan bileşenler:**

ATRP mekanizmasında kullanılan monomerler çok çeşitlidir. Örnek olarak, stiren, akrilatlar, metakrilatlar, asetonitril, metakrilamit, 4-vinil piridin, dimetil (1-etoksikarbonil) vinil fosfat, 2-akrilamido-2-metil-N-propan sulfonik asit ve metakrilik asit monomerleri verilebilir. Bu monomerler kullanılarak doğrusal polimerler elde edilebileceği gibi çok çeşitli blok kopolimerleri de sentezlemek mümkündür.

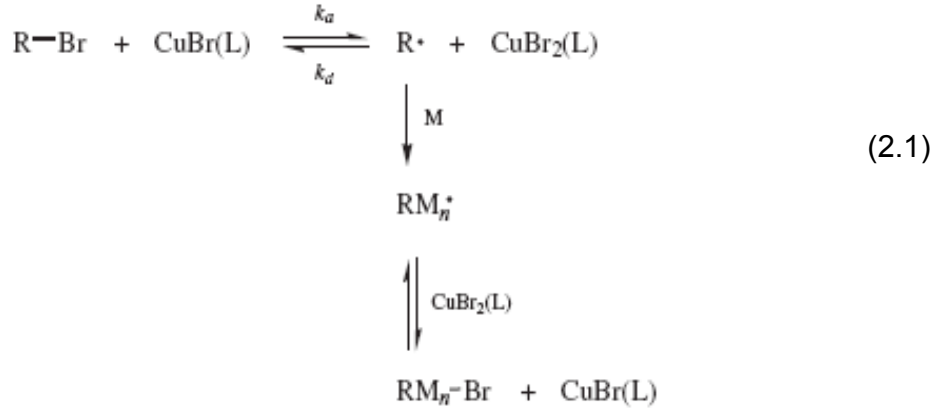
Reaksiyonda önemli bir yere sahip olan ligand seçimi ise, tepkimenin dengede gitmesini sağlaması açısından önemlidir. Ligand molekülün bağlanması tersinirdir, yani moleküllerin arasındaki birleşme ve ayrışma arasında bir denge vardır. Ligandın bağlanma eğilimine ya da gücüne "*afinite*" denir.

ATRP mekanizmasında kullanılan monomer, ve istenen reaktiviteye göre birçok farklı ligand kullanılabilir. En çok kullanılanları ise  $\text{PMe}_6\text{TREN}$  [Tris(2-dimetilaminoetil)amin] ve TPMA (tris[(2-piridil)metil]amin)'dir; çünkü bu ligandlar ile yüksek bağlanma ve ayrışma hızlarına bağlı olarak yüksek reaksiyon hızı elde

edilir. Başlatıcı olarak alkil bromür gibi organik halidler kullanılabilir. Katalizör seçimi ise kontrollü büyüme için çok önemlidir. Kontrollü ve düzenli büyüyen polimer zinciri ve düşük molekül ağırlığı dağılımı (polidispersite), ATRP mekanizması sırasında kullanılan metal bazlı katalizör sayesinde elde edilir. Metal bazlı katalizör, aktif büyüyen polimer zinciri ile durağan polimer bileşiği arasında bir denge kurulmasını sağlar. Böylece yan reaksiyonların oluşmasını ve istenmeyen sonlanmayı engeller; dolayısıyla molekül ağırlığının kontrol edilmesine imkan verir. Uyumlu olması ve verimliliği sebebiyle bakır içeren katalizörlerin kullanımı yaygındır.

ATRP reaksiyonunda yer alan alkil halojenür, tersinir bir redoks tepkimesine girer. Tepkime CuBr (Bakır bromür) gibi bir geçiş metali tarafından katalizlenir. Reaksiyon, aktivasyon ve deaktivasyon basamaklarının ardı ardına tekrarlanması ile gerçekleşir ve reaksiyonun başarısı reaksiyonun sürekli olarak "denge"nin deaktivasyon tarafına doğru itilmesine bağlıdır. Bu şekilde durağan polimer zincirlerinin oranı, aktif zincirlere oranla çok daha yüksek olur ve kontrollü büyüme sağlanır (Matyjaszewski, 1996).

Reaksiyonun basamakları Eşitlik 2.1.'de gösterilmiştir.



Eşitlikte L, bipyridin gibi bir ligandı temsil etmektedir. Kullanılan ligand bakır bromür ile bir kompleks oluşturarak bakır bromürün organik reaksiyon sisteminde çözünür hale gelmesine yardım etmektedir. Başlatıcı üzerindeki elektronun katalizöre transferiyle ortamda bir radikal oluşur. Polimerizasyon bu radikal üzerinden gerçekleşir. Ortamda oluşan CuBr<sub>2</sub>, radikal oluşumunu ve buna bağlı olarak zincir büyümesini sınırlandırmaktadır (O'dian, 2004).

Reaksiyonda oluşan radikal konsantrasyonu ( $[R\cdot]$ ), reaksiyonun hız sabitlerine ( $K=k_a/k_d$ ), başlatıcı konsantrasyonuna ( $[I]$ ) ve Cu konsantrasyonuna bağlıdır (Eşitlik 2.2).

$$[R\cdot] = \frac{K [I] [Cu^+]}{[Cu^{2+}]} \quad (2.2)$$

Reaksiyonun hızı ( $R_p$ ) ise başlangıçtaki monomer konsantrasyonu ile oluşan radikal konsantrasyonuna bağlı olarak değişir (Eşitlik 2.3).

$$R_p = \frac{k_p K [M] [I] [Cu^+]}{[Cu^{2+}]} \quad (2.3)$$

ATRP reaksiyonunda RBr aktivasyonu hızlı bir şekilde gerçekleşir ve oluşan radikal konsantrasyonu devamlı düşük seviyede tutulduğundan polimer zincirlerinin boyu sınırlandırılır. Bu iki parametre sayesinde molekül ağırlığı dağılımı dar polimerler elde edilebilir.

Polimerizasyon derecesinin belirlenmesinde etkili olan parametreler, başlangıçtaki monomer ( $[M]_0$ ) ve başlatıcı konsantrasyonu ( $[I]_0$ ) ile ortamda reaksiyona katılmadan kalan monomer konsantrasyonudur ( $[M]$ ).

$$\bar{X}_n = \frac{[M]_0 - [M]}{[I]_0} = \frac{p[M]_0}{[I]_0} \quad (2.4)$$

Kullanılan geçiş metallerinin oksidasyon düzeyleri, elektron verici moleküller ve oluşacak radikalik grupların türü, reaksiyon ortamına eklenecek çözücünün türü ve reaksiyon sıcaklığı, reaksiyonu etkileyen parametreler arasında sayılabilir. (Braunecker, 2006).

Atomik transfer radikal polimerizasyonu avantajları nedeniyle, özellikle malzeme yüzeylerinin modifikasyonunda; yazıcı boya pigmentlerinin düzenli dağılması,

kozmetik, kendi kendini temizleyen cam yüzeyler için üretilen yüzey kaplamaları, kontrollü ilaç dağılımı (*drug delivery*), kardiyovasküler stentlerin kaplanması, hasarlı kemiklerin iyileşmesi için destek madde sentezi, biyobozunur plastik sentezi, optoelektronik ve otomotiv endüstrisi gibi birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadır (Hu, 2006).

## 2.8. Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerin Karakterizasyonu

Sıcaklık-duyarlılık kazandırılan yüzeylerin özelliklerini greft yoğunluğu, greft kalınlığı ve kimyasal bileşim gibi faktörler etkiler. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin karakterizasyonu çok önemlidir. Bu yüzeylerin fizikokimyasal karakterizasyonunda kullanılan teknikler Çizelge 2.4'de verilmiştir.

**Çizelge 2.4.** Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin fizikokimyasal karakterizasyonunda kullanılan teknikler.

<b>Fizikokimyasal Karakterizasyon Teknikleri</b>	<b>Veri</b>
<b>X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS veya ESCA)</b>	Kimyasal ve elementel yüzey karakterizasyonu
<b>Frekans Jenerasyonu (SFG) &amp; Titreşim Spektroskopisi</b>	Dış yüzeyin kimyasal karakterizasyonu
<b>Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) + ATR (attenuated total reflection ünitesi)</b>	Greft edilmiş polimerin yüzeydeki miktarı
<b>Dinamik ve Statik Işık Saçılımı Yöntemi</b>	Polimer konformasyonu
<b>Dinamik Reoloji</b>	LCST & Reolojik özellikler
<b>Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)</b>	Polimer kaplamanın kalınlığı Topoloji Sıcaklık değişimiyle yüzeyde görülen değişiklikler
<b>Yüzey Temas Açısının Ölçümü</b>	Yüzeyin ıslanabilirliği

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarla ilgili bilgi sunulmuştur. İlk bölümde; araştırmalarda kullanılan sıcaklık-duyarlı polimerik mikrot taşıyıcıların sentez yöntemleri belirtilmiştir; ikinci bölümde sentezlenen mikrot taşıyıcıların karakterizasyon çalışmalarına yönelik olarak yapılan ATR-FTIR, AFM, SEM ve XPS (ESCA) analizleri açıklanmıştır; takip eden bölümde bu mikrot taşıyıcıların sıcaklık-duyarlılığının belirlenmesi için yapılan şişme deneyleri anlatılmıştır. Son kısımda ise üretilen mikrot taşıyıcıların doku mühendisliği alanındaki kullanım potansiyelini belirlemek üzere statik ve dinamik koşullarda yürütülen hücre kültür çalışmaları açıklanmıştır. Bu amaçla; MTT testi uygulanmış, kristal viyole ve floresan boyamaları yapılmış, ışık mikroskobu, floresan mikroskobu ve SEM kullanılarak hücre yapışması, üremesi ve hücrelerin yüzeyden kaldırılması incelenmiştir.

#### 3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışması kapsamında mikrot taşıyıcı olarak yüzeyi modifiye edilen PHEMA mikroküreler süspansiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Dekstran (Sephadex G50) mikroküreler Aldrich (Almanya) firmasından; vinil asetat-hidroksi (VA-hidroksi) mikroküreler ise Riedel De Hæn'den (50-150 µm, BIOSYNTH®) satın alınmıştır. PHEMA mikrokürelerin sentezinde kullanılan 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) Aldrich'ten (ABD), etilenglikol dimetakrilat (EGDMA), dimetil sülfoksit (DMSO) ve 2,2'azobis (2-metilpropionitrile) (AIBN) Merck'ten (Almanya); magnezyum oksit (MgO) ise BDH'den (İngiltere) temin edilmiştir. Sıcaklık-duyarlı mikrot taşıyıcıların sentezinde kullanılan N-izopropilakrilamid (NIPAAm) monomeri Aldrich (ABD) firmasından satın alınmıştır. Trietilamin (TEA) (%99), 2-bromopropionil bromür (%97) ve metanol (CHROMASOLV®) Sigma'dan (St. Louis, MO, ABD) temin edilmiştir. Bakır(I) bromür (%98) (CuBr) Acros Organics'ten (USA), bipiridin (2,2'-dipridil, >%99) Aldrich (USA) firmasından satın alınmıştır. Hidroklorik asit (%37) ve aseton Merck (Almanya) firmasından, etanol (%96) ise Aklar Kimya (Türkiye) firmasından temin edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda Barnsted EasyPURE™ sisteminden elde edilen ultra saf su kullanılmıştır. Yukarıda belirtilen tüm kimyasallar alındığı şekliyle kullanılmıştır.

Hücre kültür çalışmaları kapsamında iki ayrı çalışma yürütülmüştür. İlk grupta yer alan statik hücre kültürü çalışmalarında; yüzeye-bağımlı L929 fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Hücreler, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğü'ne ait Hücre ve Virüs Bankası'ndan (HÜKÜK) alınmıştır (Hücre Kültürü Koleksiyonu 92123004). Çalışmalarda Nunc (Almanya) firmasından satın alınan 24-gözlü polistiren hücre kültürü kapları (TCPS) kullanılmıştır. *Dulbecco's Modified Eagles' Medium* (DMEM), fetal sığır serum (FBS), tripsin-EDTA (%0,01 tripsin/10 mM EDTA) Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Modified Eagles' Medium Alpha Modification ( $\alpha$ -MEM) Sigma (USA) firmasından satın alınmıştır. Hücre üremesinin takibinde kullanılan 3-[4,5-dimetilthiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Sigma (Almanya) ve izopropanol Aklar Kimya (Türkiye) firmasından elde edilmiştir. Floresan boyama öncesi yapılan fiksasyon işleminde kullanılan gluteraldehit çözeltisi Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Fiksasyon işlemi sonrası hücrelerin membran geçirgenliğinin artırılmasında kullanılan Triton-X, Acros Organics (USA) firmasından; boyama öncesinde hücrelerin flamentöz aktinlerinin (F-aktin) hazırlanmasında kullanılan sığır serum albümini (BSA) ise Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücreleri boyamada kullanılan kristal viyole BDH (İngiltere), floresan propidyum iyodür/Alexa Fluor® 488 Phalloidin ise Invitrogen (USA) firmasından temin edilmiştir.

İkinci grup çalışmada ise karıştırmalı reaktörde (Belco, USA) dinamik kültür koşulları oluşturulmuş ve hücre olarak Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nden (Prof. Dr. İsmet Gürhan DELİLOĞLU) temin edilen HS2 insan keratinositleri kullanılmıştır. Bu çalışmada kültür ortamı olarak %10 serum (FBS) ve %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin) içeren DMEM F12 Sigma (USA) kullanılmıştır. Fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH: 7,4) hazırlamak için Sigma (Almanya) firmasından temin edilen tabletler kullanılmıştır.

### **3.2. Sıcaklık-Duyarlı Mikrotayııcıların Sentezlenmesi**

Tez kapsamında üç çeşit mikrotayııcı sentezlenmiştir:

- Yüzeyine PNIPAAm aşılınmış PHEMA mikrotayııcılar:

PNIPAAm-g-PHEMA [poli(hidroksietilmetakrilat)] mikrotayııcılar olarak adlandırılmışlardır.

- Yüzeyine PNIPAAm aşılantmış dekstran (Sephadex) mikrotasıyıcılar:

PNIPAAm-g- dekstran mikrotasıyıcılar olarak adlandırılmışlardır.

- Yüzeyine PNIPAAm aşılantmış vinil asetat-hidroksi (VA-hidroksi) mikrotasıyıcılar:

PNIPAAm-g-PVA mikrotasıyıcılar olarak adlandırılmışlardır.

Bölüm 3.2.1, 3.2.2 ve 3.2.3'de bu mikrotasıyıcıların sentezine yönelik olarak yapılan çalışmalara ayrıntılı olarak yer verilmiştir.

### **3.2.1. PNIPAAm-g-PHEMA mikrotasıyıcıların sentezlenmesi**

PNIPAAm-g-PHEMA mikrotasıyıcılar iki aşamalı bir prosesle sentezlenmiştir. Birinci aşamada süspansiyon polimerizasyonu yöntemiyle PHEMA mikroküreler sentezlenmiştir. İkinci basamakta ise bu mikrokürelerin yüzeyine ATRP yöntemiyle PNIPAAm polimeri aşılantmıştır.

#### **3.2.1.1. PHEMA mikrokürelerin sentezi**

Çalışma kapsamında yüzeyi modifiye edilen PHEMA mikroküreler, HEMA monomeri ile EGDMA monomerinin çapraz bağlanma/kopolimerizasyon reaksiyonu sonucu hazırlanmıştır. Yöntem, Kiremitçi (1992) tarafından geliştirilen süspansiyon polimerizasyonudur. Polimerizasyon sistemi 500 mL hacimde Pyrex camdan yapılmış üç-boyunlu laboratuvar tipi bir reaktör ve proses kontrol elemanlarından oluşmaktadır. Karıştırma işlemi, reaktör tabanından 1,5 cm yüksekliğe yerleştirilen bıçak tipi karıştırıcı taşıyan bir mekanik karıştırıcı (Heidolph, Almanya) ile sağlanmıştır. Karıştırıcı, reaktörün ortadaki boyun kısmından, sızdırmazlık sağlanacak şekilde yerleştirilmiştir. Reaktördeki boyunların birinden azot gazı beslemesi yapılırken diğerinden de monomer beslemesi yapılmıştır. Isıtma işlemi, sabit sıcaklık banyosu ile gerçekleştirilmiştir.

HEMA monomerinin süspansiyon polimerizasyonunda aşağıdaki işlem sırası izlenmiştir:

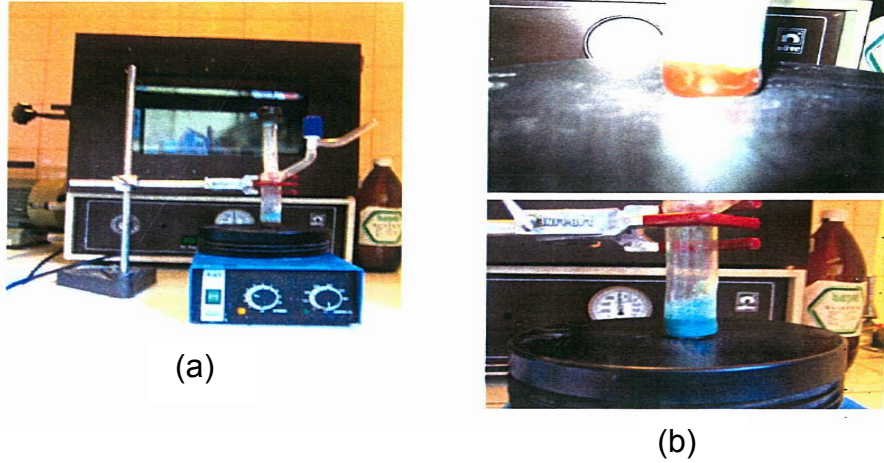
- Monomer dağıtma ortamı olarak kullanılacak doygun MgO çözeltisi hazırlanır ve polimerizasyon reaktöründe 1 saat boyunca 70°C'de ve 380 rpm hızda karıştırılır.
- Uygun miktarda başlatıcı AIBN (0,0015 mol AIBN/mol HEMA) HEMA monomeri içerisinde çözüldükten sonra, çapraz bağlayıcı, EGDMA (0,215 mol EGDM/mol HEMA) ilave edilerek hazırlanan karışım reaktöre boşaltılır.
- Karıştırma hızı istenilen değere (380 rpm) getirilir.
- Polimerizasyon süresince uygun ısıtma programı uygulanır. Bu amaçla, ilk üç saat 70°C'de, sonraki bir saatte ise 90°C'de çalışılmıştır.
- Reaksiyon süresi sonunda polimerizasyon ortamı karıştırılarak soğutulur.
- Ortama %37'lik HCl çözeltisi ilave edilerek MgO'in çözünmesi sağlanır.
- Polimerizasyon sonucu oluşan partiküller filtrasyon ile ortamdan ayrılır, sırasıyla saf su ve seyreltik HCl ile yıkandıktan sonra, tekrar saf su ile yıkanır. Bir gün süre ile oda sıcaklığında, daha sonra da 40°C'de ve 150 mmHg basınçlı vakum desikatöründe üç gün süre ile kurutulur.

Bu işlemler sonucunda yüksek derecede çapraz-bağlı PHEMA mikrokürelere elde edilmiştir.

### **3.2.1.2. PHEMA mikrokürelere PNIPAAm'in aşılması**

PHEMA mikrokürelere PNIPAAm'in aşılması iki basamakta gerçekleştirilmiştir. a) Bromlama işlemi, b) ATRP reaksiyonu. İşlemler öncesinde PHEMA mikrokürelere 80°C'de bir saat süresince kurutulmuştur. Daha sonra bu mikrokürelere (0,2 g) 1,38 mmol trietilamin (TEA) içeren 2 mL DMSO içerisinde süspansiyon haline getirilmişlerdir. Bir saat süresince bu çözelti içerisinde karıştırılan mikroküre süspansiyonuna ATRP başlatıcısı olarak kullanılan 2-bromopropionil bromür (0,93 mmol) 0°C'de damla damla eklenmiş ve karıştırma işlemi oda sıcaklığında bir saat daha devam ettirilmiştir. Bu şekilde tamamlanan "bromlama" işlemi sonucunda PHEMA mikrokürelere yüzeyine Br atomları bağlanmıştır. Bromlama işleminin ardından mikrokürelere DMSO ve metanol ile 5'er kez

yıkanmışlar ve 2 mL saf su içerisinde dağıtılarak, ATRP reaksiyonunun gerçekleştirileceği 25 mL hacmindeki Schlenk tüpüne aktarılmışlardır. Schlenk tüpüne ayrıca NIPAAm monomeri (4,5 mmol), katalizör olarak kullanılan bakır bromür (0,4 mmol) ve katalizörün stabilizasyonunu sağlayan 2,2'-dipridil (0,8 mmol) ilave edilmiştir. Son olarak 8 mL degaze edilmiş saf su eklendikten sonra azot atmosferi altında 10 dakika süreyle vakum uygulanmıştır. Reaksiyon, oda sıcaklığında 24 saat boyunca devam ettirilmiştir. Bromlanmış PHEMA mikrokürelerin ATRP reaksiyonu, karışımın rengi kahverengiden yeşile döndüğünde sonlandırılmıştır. Reaksiyon sonrası mikroküreler sırasıyla metanol ve suyla 5'er kez yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Şekil 3.1'de kullanılan deney düzeneği ve ATRP reaksiyonu tamamlandığında gözlenen renk değişimi görülmektedir.



**Şekil 3.1.** (a) ATRP işleminde kullanılan deney düzeneği (b) reaksiyon sonucunda gözlenen renk değişimi.

### 3.2.2. PNIPAAm-g-dekstran mikrot taşıyıcıların sentezi

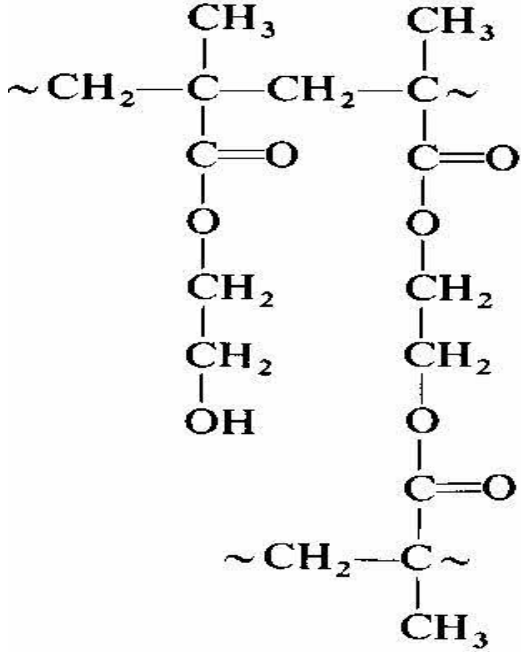
Sephadex® ticari adıyla bilinen dekstran mikrokürelerin sıcaklık-duyarlı hale getirilmesi için yüzeylerine PNIPAAm'in aşılması işlemi PHEMA mikrokürelere uygulanan ATRP tekniğiyle gerçekleştirilmiştir. Uygulanan protokoldeki tek farklılık DMSO hacminin iki katına çıkartılmasıdır.

### 3.2.3. PNIPAAm-g-PVA mikrot taşıyıcıların sentezi

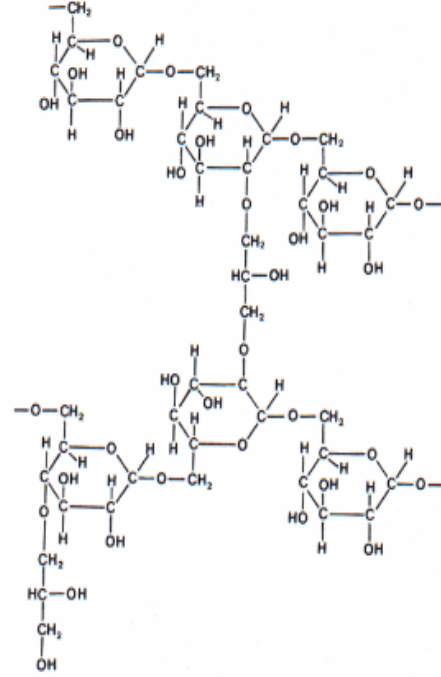
Ticari olarak temin edilen poli (vinil asetat-hidroksi) mikroküreler, vinil asetat ve divinil etilen üre kopolimeridir. Bu mikrokürelerin yüzeyine de Bölüm 3.2.1.2'de açıklanan ATRP yöntemiyle PNIPAAm zincirleri aşılmiştir.

Şekil 3.2'de çalışma kapsamında kullanılan/sentezlenen mikrokürelerin ve PNIPAAm'in kimyasal yapıları verilmiştir.

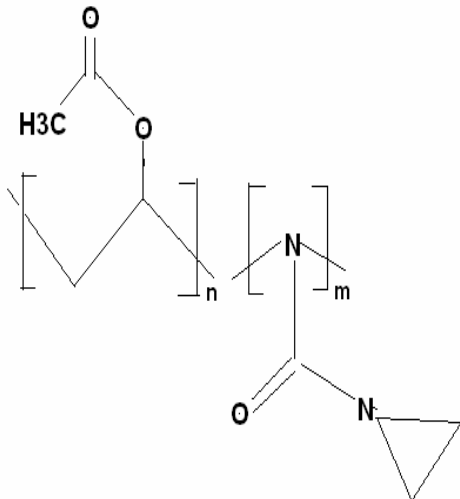
a)



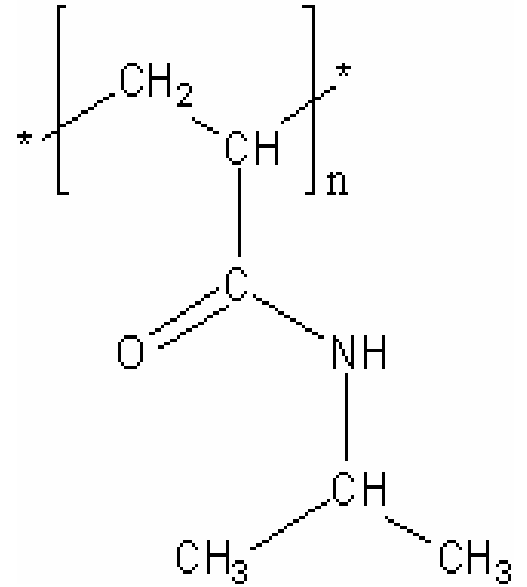
b)



c)



d)



**Şekil 3.2.** Çalışmada kullanılan/sentezlenen mikrokürelerin kimyasal yapısı (a) PHEMA-EGDMA (b) Çapraz-bağlı dekstran (c) Polivinil asetat-hidroksi divinil etilen üre kopolimeri (d) PNIPAAm.

### **3.3. Sentezlenen Mikrotaşıyıcıların Karakterizasyon Çalışmaları**

#### **3.3.1. FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance) analizi**

Sentezlenen tüm mikrotaşıyıcıların kimyasal yapısı FTIR-ATR analizi ile belirlenmiştir. Örnekler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra analize tabi tutulmuştur. FTIR-8101 (ATR) (Shimadzu, Japonya) ile 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında çalışılmıştır.

#### **3.3.2. XPS ( X-ray Fotoelektron Spektroskopisi) analizi**

Sentezlenen tüm mikrotaşıyıcıların yüzey atomik bileşimi XPS analizi ile belirlenmiştir. Örnekler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra SPECS ESCA (Berlin, Almanya) ile analize tabi tutulmuştur. Bağlanma enerjileri, 284,5 eV bağlanma enerjisine sahip C-C bağı referans alınarak ifade edilmiştir.

#### **3.3.3. AFM (Atomik Güç Mikroskobu) analizi**

Sentezlenen tüm mikrotaşıyıcıların yüzey topografisi atomik güç mikroskobu ile belirlenmiştir. AFM (Nanomagnetics, UK) ile "tapping-titreşimli" modda çalışılmıştır. Analiz sonuçları değerlendirilerek, mikrotaşıyıcıların yüzeylerinin pürüzlülük ve ortalama yükseklik değerleri saptanmıştır.

#### **3.3.4. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi**

Sentezlenen mikrotaşıyıcıların ortalama boyu, boy dağılımı ve yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu ile belirlenmiştir (SEM, Zeiss Evo 50, Almanya). Su içerisinde süspansiyon haline getirilen PHEMA, dekstran ve VA-hidroksi mikroküreler ile PNIPAAm-g-PHEMA, PNIPAAm-g-dekstran ve PNIPAAm-g-PVA mikrotaşıyıcılar cam yüzeylere damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme yapılmadan önce kurutulan örnekler, vakum altında altın ile kaplanmıştır.

#### **3.3.5. Şişme deneyleri**

Sentezlenen mikrotaşıyıcıların sıcaklığa bağlı olarak gösterdiği boyut değişiminin belirlenmesi amacıyla yapılan şişme deneyleri, +4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarda

PBS ortamında (pH=7,4) gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, Olympus IX71 (Japonya) inverted mikroskop kullanılmış olup, partiküller Olympus C-4000 dijital kamera ile görüntülenmiştir. Bu görüntülerden "ImageJ for Microscopy" (Image Processing and Analysis in Java) programı ile en az 200 partikülün +4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarda ortalama çapları hesaplanarak mikrokürelerin sıcaklıkla boyut değişimi belirlenmiştir.

### **3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları**

Sentezlenen mikrotarıyıcıların kültür ortamında hücrelerle etkileşimlerini incelemek amacıyla iki ayrı çalışma yürütülmüştür. İlk çalışmada 24-gözlü hücre kültür kaplarında statik kültür koşulları oluşturulmuş ve yüzeye-bağımlı L929 fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. İkinci çalışmada ise karıştırmalı reaktörde (Belco, USA) dinamik kültür koşulları oluşturulmuş ve HS2 insan keratinositleri kullanılmıştır.

Hücreler 37±0,5°C' de hacimce %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) muhafaza edilmiştir. Tüm hücre kültürü çalışmaları Laminar Akış Kabininde (Bioair, Type II Laminar Flow Cabinet, İtalya) yürütülmüştür.

#### **3.4.1. Statik hücre kültürü çalışmaları**

##### **3.4.1.1. Sentezlenen mikrotarıyıcıların L929 fibroblast hücreleriyle inkübasyonu**

Hücre kültür çalışmalarında öncelikle L929 fare fibroblast hücreleri tek tabakalı kültürlerde istenilen sayıya ulaşana kadar çoğaltılmıştır. Bu amaçla %10 (v/v) FBS içeren DMEM besi ortamı kullanılmıştır.

Mikrotarıyıcı-destekli kültür öncesi tüm mikrotarıyıcıların, 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra mikrotarıyıcılar ikişer kez PBS ve serum içermeyen hücre kültür ortamı ile yıkanmıştır ve Parafilm kaplı 24-gözlü hücre kültür kaplarına (Nunc, Almanya) alınarak, L929 fibroblast hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Her bir göze 1 mL besi ortamı konulmuş ve hücre yoğunluğu 5x10<sup>4</sup> hücre/mL, mikrotarıyıcı konsantrasyonu ise 10 mg/mL olarak belirlenmiştir. 24 saat sonunda daha iyi

gözlem yapabilmek amacıyla mikrotaşyıcılar Parafilm kaplanmamış 24-gözlü hücre kültür kaplarına aktarılmıştır.

#### **3.4.1.2. Mikrotaşyıcı yüzeyindeki L929 fibroblastlarının gözlemlenmesi**

Hücre kültürü süresince mikrotaşyıcılar inverted mikroskop ile (Olympus IX71, Japan) incelenmiş ve mikroskoba bağlı dijital kamera (Olympus C-4000, Japan) ile fotoğrafları çekilmiştir. Ayrıca kristal viyole ile boyama yapılarak mikrotaşyıcı yüzeyindeki hücre morfolojilerinin daha iyi gözlenmesi sağlanmıştır. Kristal viyole ile boyama prosedüründe öncelikle hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve PBS ile iki kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 500 µL aseton-metanol karışımı (1:1) ile hücreler +4°C'de 20 dakika bekletilmiş ve fiksasyon işlemi uygulanmıştır. Yüzeye sabitlenen hücreler %5'lik (w/v) kristal viyole çözeltisinde (%20'lik metanol içerisinde hazırlanmıştır) oda sıcaklığında bekletilmiştir. 30 dakika sonunda boya su ile uzaklaştırılarak görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Optik mikroskop ile incelemenin dışında kültürün 5. gününde mikrotaşyıcıların SEM görüntüleri alınmıştır. Örnekler üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile 3 kez yıkama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler %2,5'lik gluteraldehitte 30 dakika bekletilmiştir. PBS ile bir dizi yıkama işleminden sonra, belli konsantrasyonlarda etanol (% 30, 50, 70, 90 ve 100) serileri kullanılarak yapıdaki su uzaklaştırılmıştır. Bu işlemlerden sonra, örnekler üzerine heksametildisilazan damlatılmış ve 5 dakika sonra ortamdan uzaklaştırılmıştır. Havada kurutulan örnekler altın ile kaplanarak taramalı elektron mikroskopunda (SEM, Zeiss Evo 50, Almanya) incelenmiştir.

#### **3.4.1.3. Hücrelerin mikrotaşyıcıların yüzeyinden kaldırılması**

Hücrelerin yüzeyden kaldırılması işleminde öncelikle mikrotaşyıcıların üzerindeki kültür ortamı, +4°C'de bekleyen serumsuz kültür ortamı ile değiştirilmiştir. Örnekler +4°C'ye kaldırılmış ve 15 dakika sonunda optik mikroskop altında hücrelerin mikrotaşyıcıların yüzeyinden ayrılışı gözlemlenerek fotoğrafları çekilmiştir.

#### **3.4.2. Dinamik hücre kültürü çalışmaları**

Statik kültür çalışmaları sonunda PNIPAAm-g-PHEMA mikrotaşyıcılar dışındaki mikrotaşyıcıların hücre yapışması ve üremesini istenilen düzeyde desteklemediği

belirlenmiştir. Bu nedenle dinamik kültür çalışmaları yalnızca PNIPAAm-g-PHEMA mikrotarıyıcılar ile yürütülmüştür.

### 3.4.2.1. Mikrotarıyıcıların HS2 keratinosit hücreleriyle inkübasyonu

Öncelikle HS2 insan keratinosit hücreleri tek tabakalı kültürde (flasklarda) istenilen sayıya ulaşana kadar çoğaltılmıştır. Besi ortamı olarak %10 (v/v) FBS ile desteklenmiş DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagles' medium-F12) kullanılmıştır. Ortalama %1 oranında penicilin-streptomycin ilave edilmiştir. Hücreler 37°C'de, nemli CO<sub>2</sub> (%5) atmosferinde kültür edilmiş ve kültür kabının yüzeyinden %0,01 tripsin/10 mM EDTA ile kaldırılmış, santrifüjlenmiş ve mikrotarıyıcı kültürlerinde kullanıma hazır hale gelmiştir.

Dinamik hücre kültürü çalışmalarında 100 mL'lik karıştırmalı reaktör (Spinner flask, Belco) ve hücre hattı olarak HS2 insan keratinositleri kullanılmıştır. Öncelikle, Bölüm 3.4.1'de belirtildiği şekilde, mikrotarıyıcılar statik koşullarda HS2 keratinosit hücreleri ile inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda mikrotarıyıcılar reaktör içerisine alınmıştır. Reaktör içerisine 50 mL kültür ortamı (DMEM-F12, %10 FBS, antibiyotik) ve 0,5 g mikrotarıyıcı konulmuştur. Karıştırma hızı olarak 50 rpm seçilmiştir. Reaktör CO<sub>2</sub> etüvü içerisine yerleştirilmiş ve iki yanındaki vidalı kapaklar gevşetilerek hava giriş-çıkışı sağlanmıştır. Belirlenen zamanlarda, pipet yardımı ile reaktör içerisinden örnekler alınmış ve statik kültür ile karşılaştırmalı olarak analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2'de dinamik kültürün yürütüldüğü reaktör sistemi gösterilmiştir.



**Şekil 3.3.** Dinamik kültür çalışmalarının yürütüldüğü karıştırmalı reaktör (spinner flask) sistemi.

### **3.4.2.2. Mikrotayııcı yüzeyindeki HS2 keratinosit hücrelerinin gözlemlenmesi**

HS2 keratinosit hücreleri ile inkübe edilmiş PNIPAAm-g-PHEMA mikrotayııcıların SEM ile görüntülenmesi Bölüm 3.1.4.3'de belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir ve hücrelerin mikrotayııcı yüzeyi üzerindeki morfolojileri belirlenmiştir.

Statik ve dinamik kültür koşullarında, hücrelerin mikrotayııcılar üzerindeki dağılımlarını karşılaştırmak amacıyla floresan boyama yapılmıştır. Bu amaçla örnekler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve PBS ile 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler % 2,5 (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile 10 dakika muamele edilerek fiksasyon işlemi yapılmıştır. Fiksasyon işleminden sonra % 0,1 Triton X-100 (PBS içerisinde) ile 5 dakika muamele sonucunda hücre membran geçirgenliği artırılmıştır. Hücrelerin filamentöz aktinleri (F-aktin), BSA/PBS çözeltisi içerisinde hazırlanmış % 2,5'lik (v/v) Alexa Fluor® 488 Phalloidin ile 20 dakika, hücre çekirdeği ise 10 µg/mL propidyum iyodür (Sigma, ABD) ile 5 dakika muamele edilerek boyanmıştır. Örnekler floresan mikroskobu (Olympus, ABD) kullanılarak görüntülenmiştir.

### **3.4.2.3. Mikrotayııcı yüzeyindeki HS2 keratinosit hücre canlılığının ve üremesinin belirlenmesi**

HS2 keratinosit hücrelerinin mikrotayııcı yüzeyindeki mitokondriyal aktivitelerini belirlemek amacıyla MTT testi uygulanmıştır. MTT testini uygularken öncelikle örnekler üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Daha sonra üzerlerine 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi (2,5 mg/mL PBS) ilave edilmiştir. Hücreler bu şekilde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 3 saat inkübe edildikten sonra üzerlerindeki ortam uzaklaştırılmış ve 400 µL izopropanol (100 mL izopropanol içerisine 0,1-0,2 mL HCl) çözeltisi konulmuştur. Son olarak her bir örnekten 200 µL alınarak 570 nm'de UV spektrofotometre (Labomed Double Beam UV-Visible Spektrofotometre, ABD) ile absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu test sırasında MTT çözeltisi canlı hücrelerin mitokondrilerinde formazan kristallerine dönüştürülür. Formazan kristalleri izopropanol içerisinde çözdürülür ve absorbans değerlerine bakılır. Böylece formazan kristallerinin yoğunluğuna bağlı olarak hücre canlılığı hakkında bilgi edinilir. Elde edilen değerler % hücre canlılığı olarak grafiğe geçirilmiştir.

#### **3.4.2.4. Hücrelerin mikrotarıyıcıların yüzeyinden kaldırılması**

HS2 keratinosit hücrelerinin mikrotarıyıcıların yüzeyinden sıcaklığın etkisiyle kaldırılmaları Bölüm 3.4.1.3'de açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca %0,01 tripsin/10 mM EDTA kullanılarak hücrelerin mikrotarıyıcı yüzeyinden enzimatik olarak ayrılması da gerçekleştirilmiştir. Yüzeyden ayrılan hücreler optik mikroskop altında incelenmiştir. Daha sonra bu hücrelerin TCPS yüzeylerde kültürlerine devam edilmiştir. 48 saat sonunda hücreler tripsinizasyonla yüzeyden kaldırılarak hemositometrik olarak sayılmıştır. Böylece başlangıçtaki hücre sayısına bağılı olarak, uygulanan yüzeyden kaldırma yöntemlerinin verimleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca TCPS yüzeyler üzerindeki hücreler optik mikroskopla görüntülenmiş ve başlangıçtaki morfolojik yapılarını koruyup korumadıkları kontrol edilmiştir.

## 4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI

Bu bölümde hayvansal hücre kültür teknolojisinin çeşitli aşamalarında kullanılmak üzere hazırlanan sıcaklık-duyarlı mikrot taşıyıcıların sentezi, karakterizasyonu, sıcaklık-duyarlılıklarının saptanması ve son olarak da hayvansal hücre kültürlerinde kullanılabilirliklerine yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları sunulmuş ve bulgular üzerinde tartışılmıştır.

### 4.1. Mikroküre Seçimi ve Sentezi

Günümüzde kanser hücreleri, rekombinant hücreler ve diğer hücre hatlarının yaygın biçimde kullanılmasıyla çok sayıda önemli biyolojik maddenin hücre kültür sistemlerinde üretimi gerçekleştirilmiştir ve halen gerçekleştirilmeye de devam edilmektedir. Mikrot taşıyıcı-destekli ve mikrokapsüllenmiş kültür sistemlerinin geliştirilmesiyle üretim endüstriyel boyuta taşınmıştır. Şu ana kadar yürütülmüş büyük-ölçekli çalışmalarda en çok kullanılan mikrot taşıyıcı, dekstran-bazlı Cytodex-1'dir ve kültür sonrası hücreler taşıyıcı yüzeyinden tripsinizasyon işlemiyle kaldırılmaktadır.

Hücrelerin üretildikleri substrat yüzeyinden geri kazanımları, pasajlama ve karakterizasyon için oldukça önemli bir işlemdir. Bu işlem için en yaygın olarak kullanılan teknik, proteolitik enzimler yardımıyla hücrelerin yüzeyden ayrılmasıdır. Fakat bu işlemin uygulanması sırasında hücre membranındaki proteinlerin önemli bir bölümü hidrolize uğramakta ve hücreler zarar görmektedir. Bu yöntemin dezavantajlarının giderilmesi için proteolitik aktivite göstermeyen şelasyon ajanları (EDTA/EGTA) kullanılmıştır. Tripsin/EDTA varlığında yapılan çalışmalarda hücrelerin kümeleşmiş olarak yüzeyden ayrıldıkları, sonikasyon işlemi sırasında yine zarar gördükleri tespit edilmiştir (San Antonio, 1992). Hücrelerin yüzeyden uzaklaştırılmasında en az kullanılan ve hücrelere en fazla zarar veren yöntem ise mekanik yöntemdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda sıcaklık-duyarlı yapıların hücre kültürlerinde etkin olarak kullanılabileceği yolunda olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Sıcaklık-duyarlı PNIPAAm yüzeylerle yapılan çalışmalarda hepatosit ve endotel hücrelerin zarar görmeksizin yüzeyden uzaklaştırılmaları mümkün olmuştur (Okano, 1995). Etilen glikol vinil eter (EGVE) ve butil vinil eter (BVE) ile sentezlenen sıcaklık-duyarlı yapılar kullanılarak grubumuz tarafından yapılan çalışmalarda, sıcaklığın

düşürülmesiyle canlı hücrelerin etkin olarak yüzeyden geri kazanımlarının mümkün olacağı sonucuna varılmıştır (Gümüşderelioğlu ve ark., 2003).

Okano ve grubu tarafından geliştirilen "hücre tabaka mühendisliği" yaklaşımıyla, PNIPAAm kaplı sıcaklık-duyarlı Petri kaplarından hücrelerin tabaka şeklinde kaldırılabilmesi, kompleks doku ve organların eldesi için gelecek vaat etmektedir (Okano, 2005). Tüm bu çalışmalara rağmen halen yüksek kapasitede hücre üretimine olanak sağlayacak sıcaklık-duyarlı bir mikrot taşıyıcı geliştirilememiştir.

Yapılan tez çalışması kapsamında, sıcaklık etkisiyle yüzeyinde üremiş hücrelerin kolaylıkla ve yüksek verimde geri kazanılabileceği, farklı yığın ve yüzey özelliklerine sahip mikrot taşıyıcıların geliştirilmesi ve kullanılabilirliklerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Çalışma kapsamında, mikrot taşıyıcı olarak biyoyumluluğu yüksek dekstran doğal polimeri ile poli (hidroksietilmetakrilat) (PHEMA) ve poli [(vinilasetat)-hidroksi] (PVA) (vinil asetat ve divinil etilen üre kopolimeri) sentetik polimerleri seçilmiştir.

Dekstran, biyoyumluluk özelliği sayesinde mikrot taşıyıcı olarak Pharmacia firması tarafından Cytodex® ticari ismiyle üretilmektedir. Biyoyumlu ve doğal bir polimer olması nedeniyle dekstran ile biyomühendislik alanında birçok araştırma yürütülmektedir (Kim ve ark., 2003).

PHEMA toksik ve kanserojen olmayan yapısı ve biyoyumluluk özelliği sayesinde biyoteknoloji ve biyomühendislik alanında geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir. Kontakt lenslerde, ilaç salım sistemlerinde, implantlarda ve doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu özelliklerine rağmen PHEMA, yapısında bulunan OH grupları nedeniyle, yüzeye-bağımlı hücrelerin yüzeye yapışması ve yüzey üzerinde üremesi yönünden engel teşkil eder. Bu sorunu çözebilmek için, PHEMA'ya kimyasal ya da biyolojik metodları uygulayarak yüzey modifikasyonu yapmak gerekir. Yüzey modifikasyonu yapılan PHEMA biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir. Başarılı bir mikrot taşıyıcıda, hücre yapışmasının hızı oldukça önemlidir. Bu nedenle mikrot taşıyıcı dizaynında, mikrot taşıyıcıların yüzey özellikleri örneğin, yük yoğunluğu, hidrofobisite, ıslatılabilirlik, vb. gibi hücre yapışmasındaki etkin faktörler dikkate alınmalıdır.

Yüzeyinde pozitif yüklü dimetil amino etil metakrilat (DMAEMA) gruplarına sahip PHEMA mikrotasıyıcılar Kiremitçi (1992) tarafından yapılan çalışmalar kapsamında geliştirilmiş ve Şap virusu üretiminde kullanılabilirliği gösterilmiştir (Kiremitçi ve ark., 1992).

Vinil asetat ve divinil etilen üre kopolimeri ise birçok biyomedikal çalışmada enzim immobilizasyonu amacıyla kullanılmıştır (Jianguo ve ark., 2001).

Seçilen mikrotasıyıcıların yüzeyine ATRP yöntemi ile PNIPAAm kaplanarak sıcaklık-duyarlılık özelliği kazandırılmıştır. Çalışmada, klasik yöntemlere nazaran polimerizasyonun gerçekleşmesinde yüksek kontrol olanağı sağladığından dolayı ATRP yöntemi seçilmiştir.

PNIPAAm ile kaplama öncesindeki mikrokürelerin temel özellikleri Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

**Çizelge 4.1.** Sıcaklık-duyarlılık özelliği taşımayan mikrokürelerin temel özellikleri.

Adı*	Mikroküre Yapısı	Boyut (kuru halde) ( $\mu\text{m}$ )	Yoğunluğu (g/mL)
<b>PHEMA</b>	Çapraz-bağlı P(HEMA-EGDMA)	217 $\pm$ 70	1,05
<b>Sephadex G50</b>	Çapraz-bağlı dekstran	118 $\pm$ 25	1,03
<b>Biosynth</b>	Vinil asetat ve divinil eitlen üre kopolimeri	80 $\pm$ 12	1,02

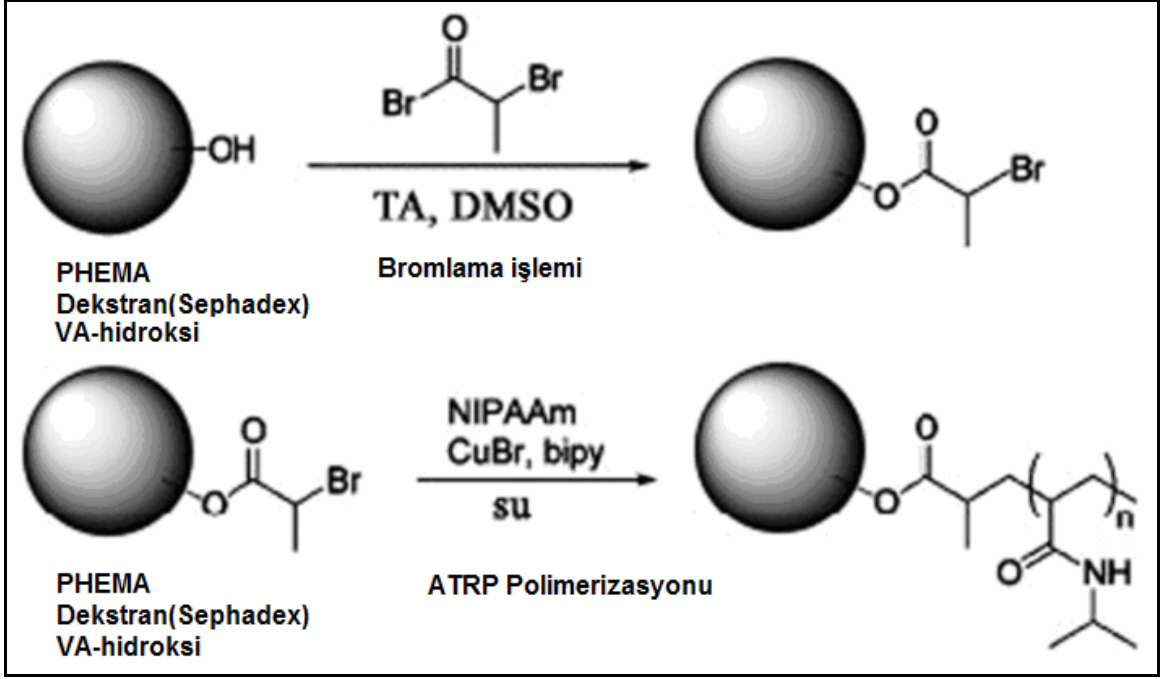
\*Tüm mikroküreler yüzeylerinde fonksiyonel OH<sup>-</sup> gruplarını taşımaktadır.

### **ATRP yöntemi**

Yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin elde edilmesinde en önemli proseslerden biri olan serbest radikal polimerizasyonunda zincir transfer ve sonlama reaksiyonları kontrolsüz bir biçimde gerçekleşmektedir. Son zamanlarda iyi tanımlanmış, düşük polidispersiteye sahip polimerlerin sentezinde kontrollüyaşayan polimerizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle, serbest radikal polimerizasyon, kontrollü yaşayan sisteme çevrilerek yeni polimerik malzemelerin geliştirilmesine olanak sağlanmıştır. Yaşayan polimerizasyonlar zincir büyüme polimerizasyonlarıdır ve tersinir olmayan zincir transfer ve sonlanma reaksiyonlarının yokluğunda

gerçekleşirler. Başlangıç monomer/başlatıcı oranı değiştirilerek sonuç polimerin ortalama molekül ağırlığı ayarlanabilir ve dar bir molekül ağırlığı aralığına sahip olması sağlanabilir. Bu yaklaşıma dayanan yöntemlerin içerisinde en büyük ilgiyi çeken ATRP tekniği olup birçok araştırmaya konu olmuştur. Organik kimya literatüründe alkil halojenürlerin metal amin kompleksi katalizli olefinlere katılma reaksiyonu (atom transfer radikal; Khrasch Reaksiyonu) üzerine temellendirilen ATRP; geçiş metal kompleksinin redoks reaksiyonu ile organik halojenürlerin tersinir aktivasyonu ve deaktivasyon aşamalarını içerir (Matyjaszewski, 1996). ATRP tekniği özellikle biyomalzemelerin yüzey modifikasyonunda kolay ve kullanılabilir bir metot olarak benimsenmiştir (Kim, 2003). Yüzeye polimer zincirlerinin takılması iki şekilde gerçekleşebilir. "Grafting to" denilen birinci yöntemde polimer zincirleri başka bir yerde sentezlenir. Sentezlenen polimer zincirleri fonksiyonel uçlarından reaktif bir yüzeye kimyasal reaksiyonlarla takılır. "Grafting from" denilen yöntemde ise başlatıcı yüzeye immobilize edilir. Böylece polimer zincirlerinin yüzeyde oluşması sağlanır (Matrab, 2006).

Yapılan yüzey modifikasyonu çalışmalarında dikkat edilmesi gereken bazı önemli noktalar vardır. Öncelikle polimerizasyon yüzeyde gerçekleşirken, yığın (bulk) yapıda herhangi bir değişiklik meydana gelmemelidir. Ayrıca, sistem serbest polimerik zincir oluşumunu minimize etmelidir. Sunulan çalışmada, seçilen mikrokürelerin yüzeyine PNIPAAm zincirlerin "grafting from" yöntemiyle takılması ve böylelikle yüzeyin sıcaklık-duyarlı polimer ile kaplanması sağlanmıştır. ATRP'de reaksiyon başlatıcısı yüzeyde oluşturulduğu için PNIPAAm zincirler oluşurken yığın yapı değişikliğe uğramamıştır. Aynı zamanda reaksiyonun yüzeye bağımlı olması serbest zincir oluşumunu da engellemektedir. Seçilen polimerizasyon ortamı metal-ligand kompleksinin halojenür grubu aktive etmesine izin vermelidir. Bu bilgi ışığında, polimerizasyon su/metanol ortamında yürütülmüş ve reaksiyonun başıyla gerçekleştiği görülmüştür. Reaksiyon sonunda eş boy dağılımına sahip polimerik zincirlerin elde edilmesi amaçlanmaktadır. ATRP'de aktivasyon ve deaktivasyon reaksiyonları hızlı bir şekilde ve beraber yürüdüğünden zincir boylan kontrol edilebilmektedir (Min, 2001).



**Şekil 4.1.** Mikrotaşıyıcıların PNIPAAm ile kaplanma prosesinin şematik gösterimi.

Şekil 4.1'de yüzeyinde hidroksil grubuna sahip PHEMA, dekstran ve PVA mikrotaşıyıcıların sıcaklık-duyarlı hale getirilmek üzere PNIPAAm ile kaplanması şematik olarak gösterilmiştir. İlk basamak olan bromlama işlemini takiben ATRP polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ön denemeler sonucunda optimum koşullar saptanarak işlemler gerçekleştirilmiş ve karakterizasyon işlemleri bu koşullarda sentezlenmiş mikrotaşıyıcılar ile yürütülmüştür.

## 4.2. Sentezlenen Mikrotaşıyıcıların Karakterizasyon Çalışmaları

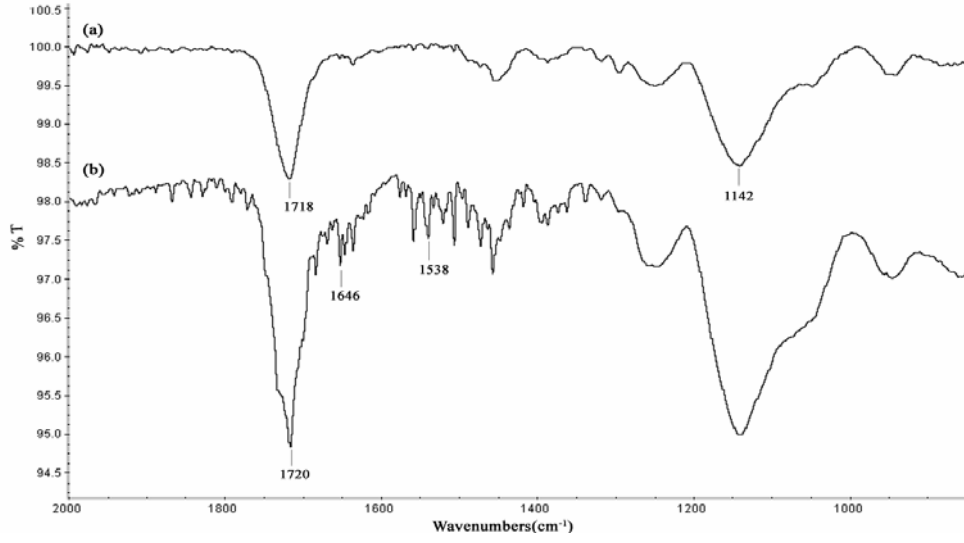
### 4.2.1. PNIPAAm-g-PHEMA mikrotaşıyıcılara ait karakterizasyon çalışmalarının sonuçları

PNIPAAm-g-PHEMA mikrotaşıyıcılara ait karakterizasyon çalışmalarının sonuçları aşağıda sırasıyla verilmiştir.

#### 4.2.1.1. FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance) analizi

Çalışma kapsamında sentezlenen PNIPAAm-g-PHEMA mikrotaşıyıcıların kimyasal yapısı ATR-IR spektrumlarıyla incelenmiştir. Şekil 4.2 (a) ve (b)'de

PHEMA ve PNIPAAm ile kaplanmış PHEMA mikrokürelere ait spektrumlar 2000-600  $\text{cm}^{-1}$  aralığında karşılaştırılmalı olarak sunulmuştur.



**Şekil 4.2.** ATR-IR spektrumu (a) PHEMA mikrokürelere (b) PNIPAAm-g-PHEMA mikrotaşyıcılar.

Bu spektrumlar değerlendirildiğinde (Çizelge 4.2) her iki yapıda da temel piklerin varlığı görülmektedir. Şekil 4.2 (a)'da  $1718 \text{ cm}^{-1}$ 'de  $-\text{C}=\text{O}$  gerilmesine ait bir pik görülmektedir.  $1142 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülen pik ise  $-\text{C}-\text{O}$  gerilmesine ait piktir. Bu pik ester grubunun ( $\text{COO}^-$ ) varlığını göstermektedir. Şekil 4.2 (b)'de; bromlama işlemi ve ATRP reaksiyonundan sonra,  $1720 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülen pikin şiddeti bromlama işleminde kullanılan 2-bromopropionil bromür varlığı nedeniyle artmıştır.  $1538 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülen pik Amid I bandına ait,  $1646 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülen pik ise Amid II bandına ait olup, PNIPAAm'in yapısından kaynaklanmaktadır. PNIPAAm ile kaplanmamış PHEMA mikrotaşyıcıların spektrumunda (Şekil 4.2 a) Amid I ve Amid II bandları yer almamaktadır. ATR-IR spektrumu PHEMA mikrotaşyıcıların yüzeyinin PNIPAAm ile başarılı bir şekilde kaplandığını göstermektedir.

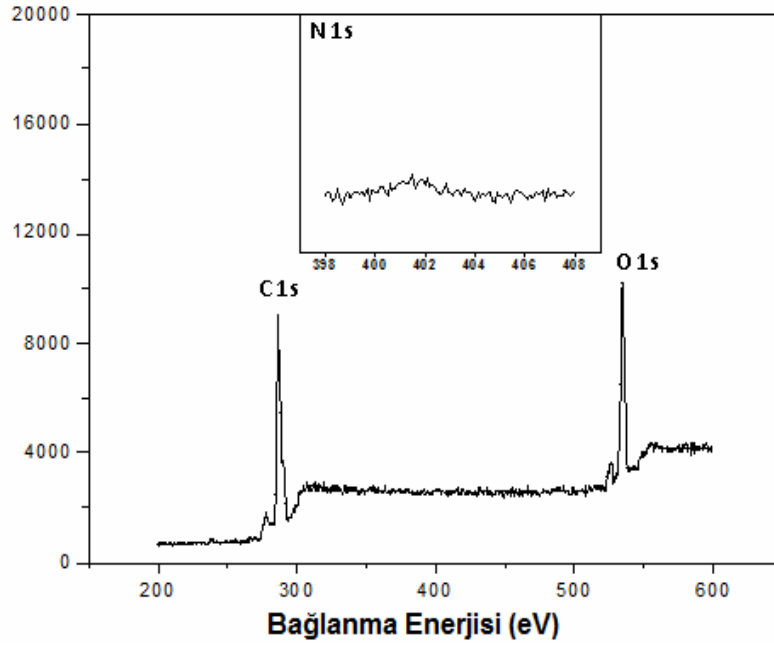
**Çizelge 4.2.** PHEMA mikrotarıyıcılar için ATR-IR spektrumlarının değerlendirilmesi.

Dalga boyu (cm <sup>-1</sup> )	Açıklama
<b>PHEMA</b> 1718 1142	-C=O gerilmesi -C-O gerilmesi
<b>PHEMA-g-NIPAAm</b> 1720 1646 1538	-C=O gerilmesi Amid I Amid II

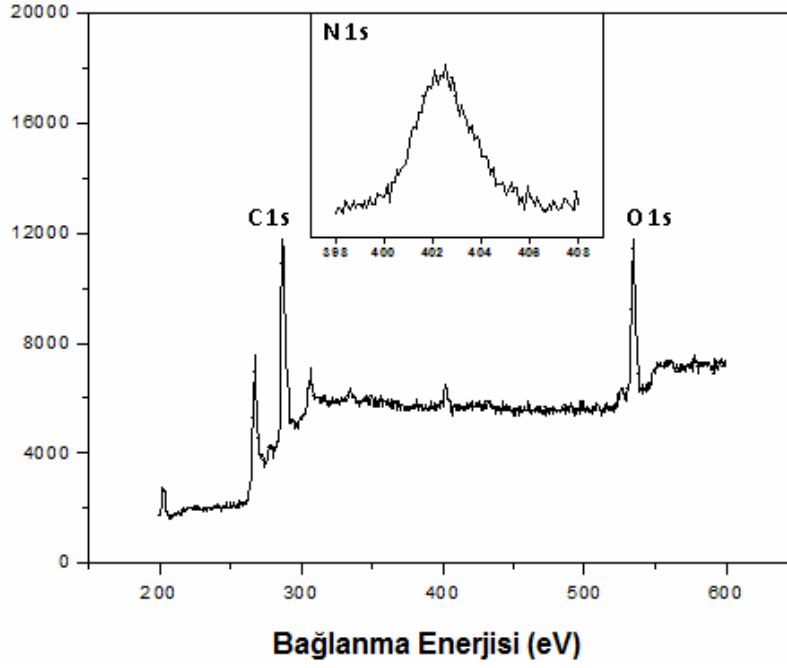
#### 4.2.1.2. XPS (X-ray Fotoelektron Spektroskopisi) analizi

PHEMA ve PNIPAAm ile kaplanmış PHEMA mikrotarıyıcıların yüzey atomik bileşimi XPS tekniği ile belirlenmiştir. Şekil 4.3 (a)'da PHEMA mikrotarıyıcıların, Şekil 4.3 (b)'de ise PNIPAAm ile kaplanmış PHEMA mikrotarıyıcıların XPS spektrumu verilmiştir.

(a)



(b)



**Şekil 4.3.** XPS spektrumu (a) PHEMA mikroküreler (b) PNIPAAm-g-PHEMA mikrotasıyıcılar.

Bu spektrumlar (Şekil 4.3 a ve b) değerlendirildiğinde, 286,8 eV'da C 1s spektrumu ve 534,8 eV'da O 1s spektrumu görülmektedir. PNIPAAm ile kaplama yapıldıktan sonra Şekil 4.3 (b)'de 402,8 eV'da N 1s spektrumu elde edilmiştir. Elde edilen N 1s spektrumu PNIPAAm'deki NH-C=O yapısından kaynaklanmaktadır. Analiz sonucunda elde edilen PHEMA ve PNIPAAm ile kaplanmış PHEMA mikrotasıyıcıların yüzey atomik bileşimi Çizelge 4.3'de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** PHEMA mikrokürelerin ve PNIPAAm ile kaplanmış PHEMA mikrotasıyıcıların XPS ile elde edilmiş yüzey atomik bileşimi.

Mikrotasıyıcı	Atom Oranı (%)				
	C	O	N	N/C	O/C
PHEMA	69,7	29,8	0,5	0,0073	0,427
PNIPAAm-g-PHEMA	68,4	26,9	4,8	0,0700	0,393

PHEMA mikrokürelere ait XPS spektrumundan elde edilen % 0,5 N içeriğinin PHEMA'nın süspansiyon polimerizasyonunda kullanılan AIBN'den kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. PHEMA mikrotasıyıcılardaki O/C oranı 0,427 olarak hesaplanmıştır. Bu değer, Kiremitçi ve arkadaşlarının (1992) yaptığı çalışmada bulunduğu 0,437 değeri ile uyumludur. PNIPAAm ile kaplanan PHEMA mikrotasıyıcılardaki O/C oranı ise 0,393 olarak elde edilmiştir. XPS analizi

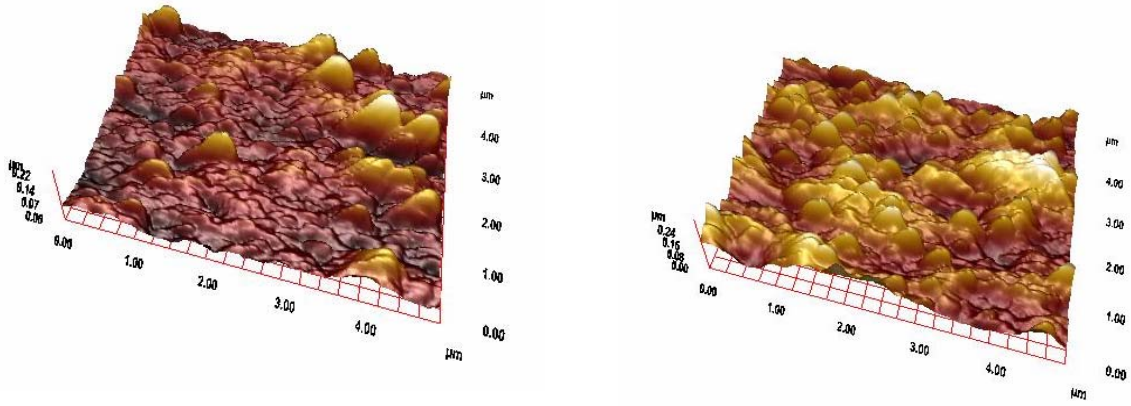
sonucunda; PHEMA-g-NIPAAm bileşimindeki O/C oranının düşmesi ve yapıya % 4,8 oranında azotun katılması PHEMA'nın PNIPAAm ile başarılı bir şekilde kaplandığını göstermektedir.

#### 4.2.1.3. AFM (Atomik Güç Mikroskobu) analizi

Sentezlenen PHEMA ve PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcıların yüzey topografisi AFM ile incelenmiştir. PHEMA ve PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcıların AFM kullanılarak yapılan yüzey taramasında farklı yüzey topografileri ve pürüzlülük değerleri elde edilmiştir. Şekil 4.4'de verilen üç boyutlu AFM görüntüleri PNIPAAm ile kaplanma sonrası yüzeydeki farklılığı açıkça ortaya koymaktadır.

a)

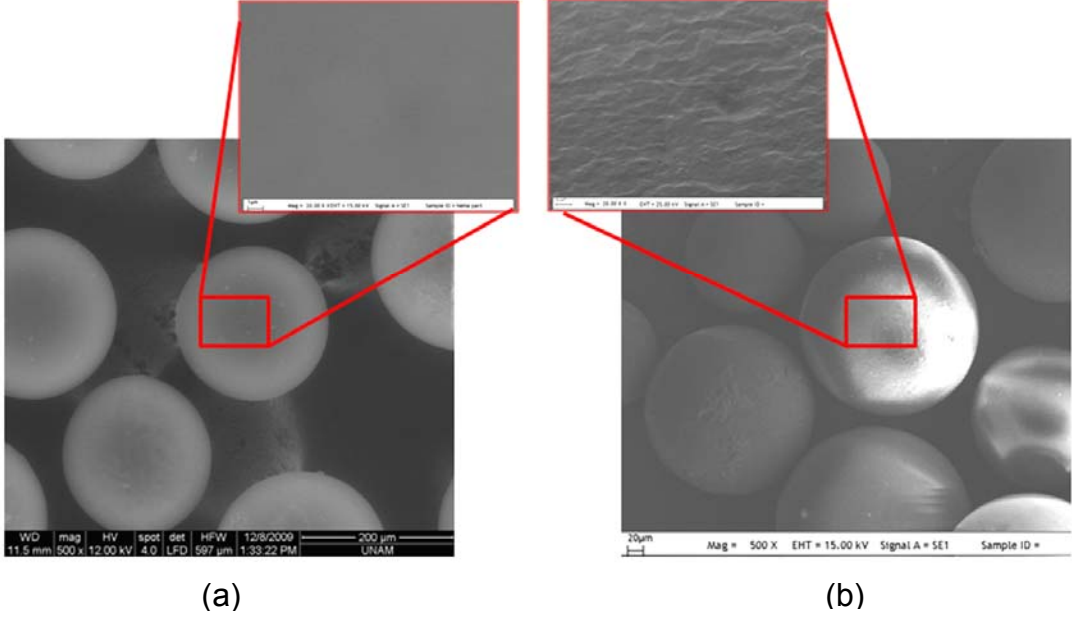
b)



**Şekil 4.4.** Titreşimli (tapping) modda alınan üç boyutlu AFM görüntüleri (a) PHEMA mikroküre yüzeyi (b) PNIPAAm-g-PHEMA mikroküre yüzeyi.

#### 4.2.1.4. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

PHEMA ve PHEMA-g-PNIPAAm mikrot taşıyıcıların morfolojisi ve yüzey özellikleri SEM fotoğrafları kullanılarak değerlendirilmiştir. Mikrot taşıyıcıların küresel morfolojisi ve yüzey özellikleri Şekil 4.5'de gösterilmektedir. ATR-IR, XPS ve AFM analizlerinin yanında SEM görüntüleri de ATRP yöntemi ile yüzeyin PNIPAAm ile kaplanması işleminin başarılı olduğunu göstermektedir.

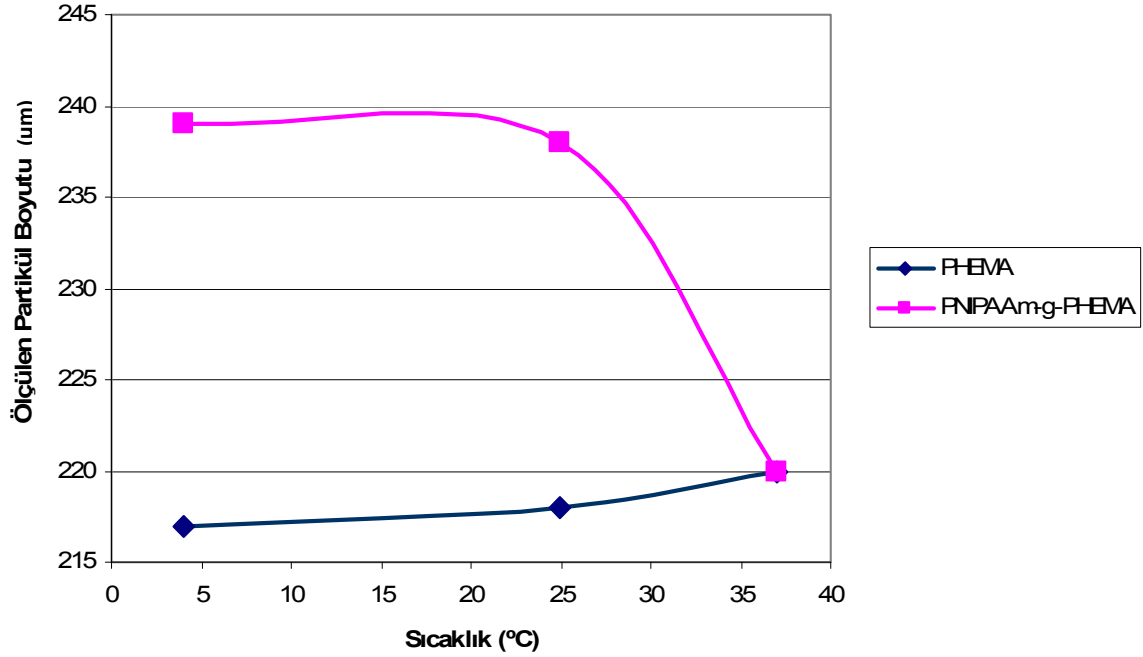


**Şekil 4.5.** Yüzey SEM fotoğrafları (a) PHEMA mikroküreler (b) PNIPAAm ile kaplanmış PHEMA mikrotasıyıcılar (Büyütme x 500) detay fotoğraflar için (Büyütme x 20000)'dir.

Şekil 4.5 (a)'da PHEMA mikrokürelerin modifiye edilmemiş yüzey görüntüsü yer almakta olup, bu mikrokürelerin PNIPAAm ile kaplandıktan sonra yüzey morfolojisindeki değişim Şekil 4.5 (b)'de gösterilmiştir. PHEMA mikrokürelerin yüzeyi düz ve pürüzsüz iken ATRP tekniği ile kaplama sonrasında mikrokürelerin yüzeyinde belirgin biçimde pürüzler oluşmuş ve bu pürüzler yüzeyde homojen bir dağılım göstermiştir.

#### 4.2.1.5. Mikrotasıyıcıların şişme özellikleri

PNIPAAm ile kaplanmış PHEMA mikrotasıyıcıların, PBS ortamında 37°C'den 25°C'ye ve 37°C'den 4°C'ye yapılan sıcaklık değişimiyle göstermiş olduğu şişme davranışı optik mikroskopla incelenmiştir. Bu ortamın seçilmesinin nedeni fizyolojik pH'ya yakın olmasıdır (pH=7,4). Ortalama çap değerine sahip tek bir partikülün şişme ortamındaki optik fotoğrafları üzerinden yapılan değerlendirmeler sonucunda sıcaklığa bağlı olarak partikül çapındaki değişimler belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.6'da grafiksel olarak verilmiştir.



**Şekil 4.6.** PHEMA mikrokürelerin PBS tamponundaki (pH=7,4) şişme davranışlarının sıcaklıkla değişimi (Ölçümler 217 µm çapa sahip PHEMA partikül ve 222 µm çapa sahip PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcılar için gerçekleştirilmiştir).

4°C'de PNIPAAm ile kaplı mikrot taşıyıcıların ortalama çapı 238 µm iken, sıcaklık 37°C'ye çıkartıldığında mikrot taşıyıcıların ortalama çapı 220 µm'ye düşmüştür. Bu beklenen ve hedeflenen bir durum olup, nedeni şu şekilde açıklanabilir: PNIPAAm'in LCST değeri 32°C'dir (Heskins, 1968). PNIPAAm bu sıcaklığın altında hidrofilik özellik gösterir ve bünyesine su alarak şişer. 32°C'nin üstünde ise hidrojen bağları kırılır ve komşu polimer zincirlerinin isopropil grupları arasında hidrofobik etkileşimler meydana gelir. Bu durumda su yapıdan uzaklaşır. Buna bağlı olarak şişmiş yapının yerini katı bir morfoloji alır.

Yapılan çalışmada sıcaklık değişimiyle PNIPAAm ile kaplanmamış PHEMA mikrot taşıyıcıların boyutlarında, sıcaklık-duyarlılık özelliği taşımadıklarından dolayı belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir.

Ayrıca yaklaşık 200 kadar partikülün optik fotoğraflarından kuru haldeki PHEMA mikrokürelerin ve PNIPAAm ile kaplanmış mikrot taşıyıcıların çapı da hesaplanmış olup, 25°C'de kuru PHEMA mikrot taşıyıcıların ortalama çapı 217 µm; yüzeyi NIPAAm ile kaplanmış mikrot taşıyıcıların çapı ise 222 µm olarak hesaplanmıştır. İki

mikrotaşıyıcının ortalama çapları arasındaki 5 µm'lik fark yapıdaki PNIPAAm kaplamanın varlığını göstermiştir.

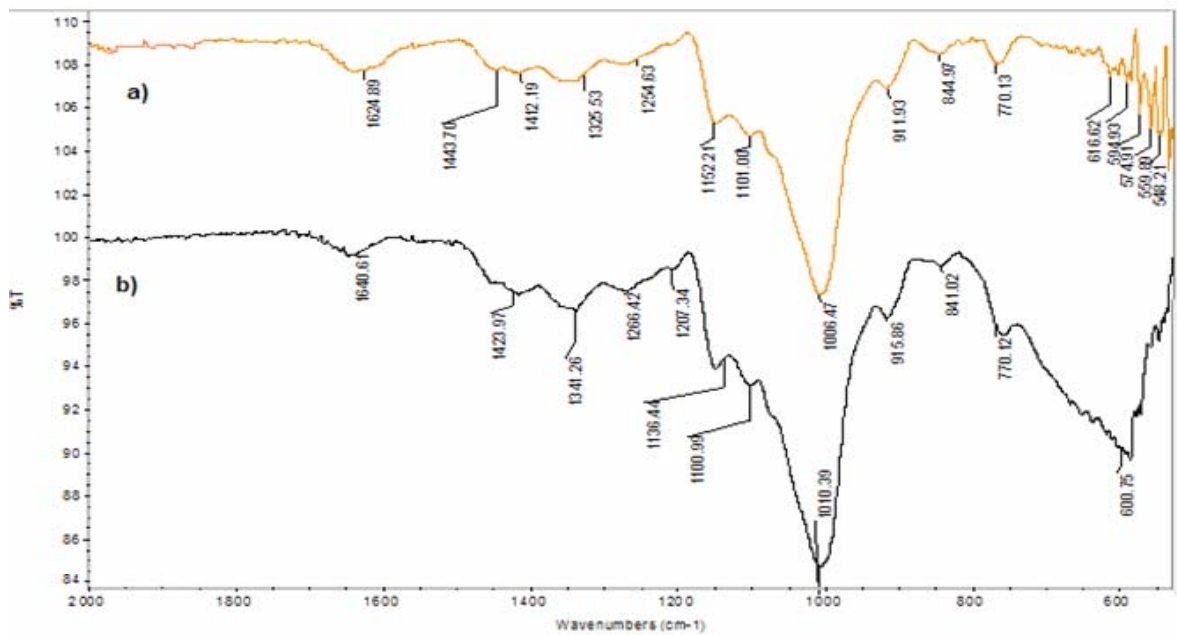
PHEMA ve PHEMA-g-PNIPAAm mikrotaşıyıcılara ait şişme deneyi verileri literatürde daha önce yapılan benzer çalışmalardaki şişme özellikleri verileri ile karşılaştırıldığında sonuçların benzerlik teşkil ettiği görülmektedir (Kim ve ark., 2003).

#### 4.2.2. PNIPAAm-g-dekstran mikrotaşıyıcılara ait karakterizasyon çalışmalarının sonuçları

PNIPAAm-g-dekstran mikrotaşıyıcılara ait karakterizasyon çalışmalarının sonuçları aşağıda sırasıyla verilmiştir.

##### 4.2.2.1. FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance) analizi

Çalışma kapsamında sentezlenen PNIPAAm-g-dekstran mikrotaşıyıcıların kimyasal yapısı ATR-IR spektrumlarıyla incelenmiştir. Şekil 4.7'de dekstran ve PNIPAAm ile kaplanmış dekstran mikrotaşıyıcılara ait spektrumlar 4000-400 cm<sup>-1</sup> aralığında karşılaştırılmalı olarak sunulmuştur.

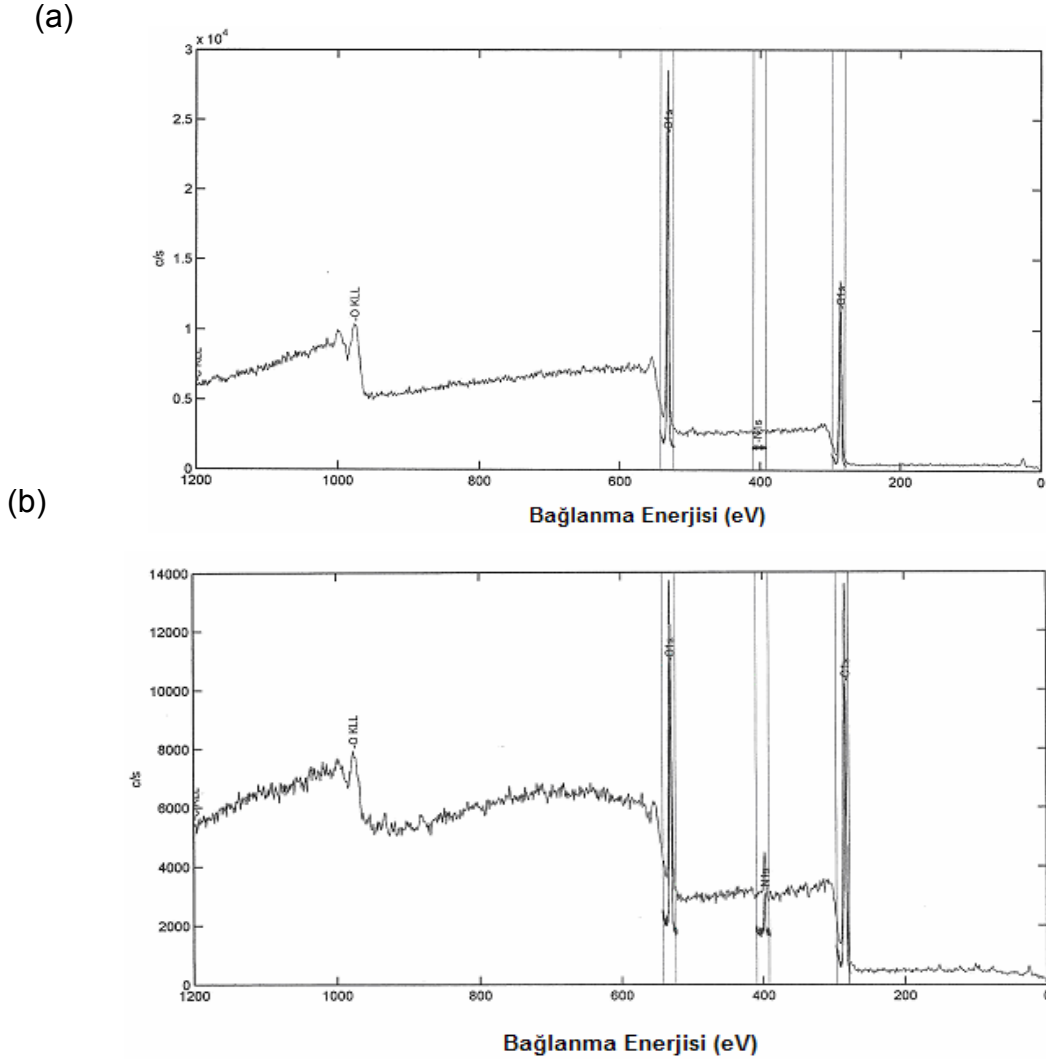


**Şekil 4.7.** ATR-IR spektrumu (a) PNIPAAm-g-dekstran mikrotaşıyıcılar (b) Dekstran mikroküreler.

Bu spektrumlar değerlendirildiğinde her iki spektrumda da temel piklerin aynı olduğu görülmektedir. Şekil 4.7 (a)'da  $1440\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen  $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$  grubundan kaynaklanan C-N gerilme titreşimi ATRP reaksiyonundan sonra PNIPAAm yapısını destekleyen en karakteristik piktir. PNIPAAm ile kaplanmamış dekstran mikrotarıyıcıların spektrumunda (Şekil 4.7 b) bu pik görülmemektedir. ATR-IR spektrumu dekstran mikrotarıyıcıların yüzeyinin PNIPAAm ile başarılı bir şekilde kaplandığını göstermektedir.

#### 4.2.2.2. XPS (X-ray Fotoelektron Spektroskopisi) analizi

Dekstran ve PNIPAAm ile kaplanmış dekstran mikrotarıyıcıların yüzey atomik bileşimi XPS tekniği ile belirlenmiştir. Şekil 4.8 (a)'da dekstran, Şekil 4.8 (b)'de ise PNIPAAm ile kaplanmış dekstran mikrotarıyıcıların XPS spektrumu verilmiştir.



**Şekil 4.8.** XPS spektrumu (a) Dekstran mikroküreler (b) PNIPAAm-g-dekstran mikrotarıyıcılar.

Şekil 4.8 (a) ve Şekil 4.8 (b)'deki spektrumlar, C 1s, N 1s ve O 1 s piklerinin varlığını ve şiddetini karşılaştırmalı olarak göstermektedir. Analiz sonucunda elde edilen dekstran ve PNIPAAm ile kaplanmış dekstran mikrotasıyıcıların yüzey atomik bileşimi Çizelge 4.4'de verilmektedir.

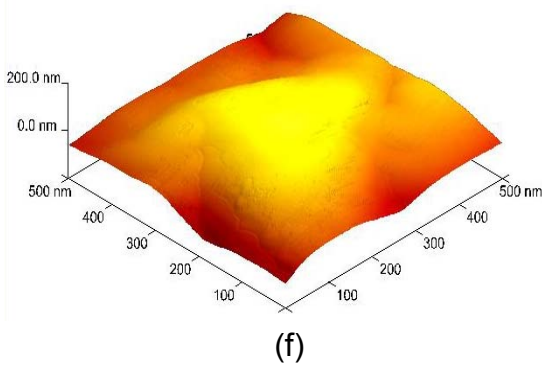
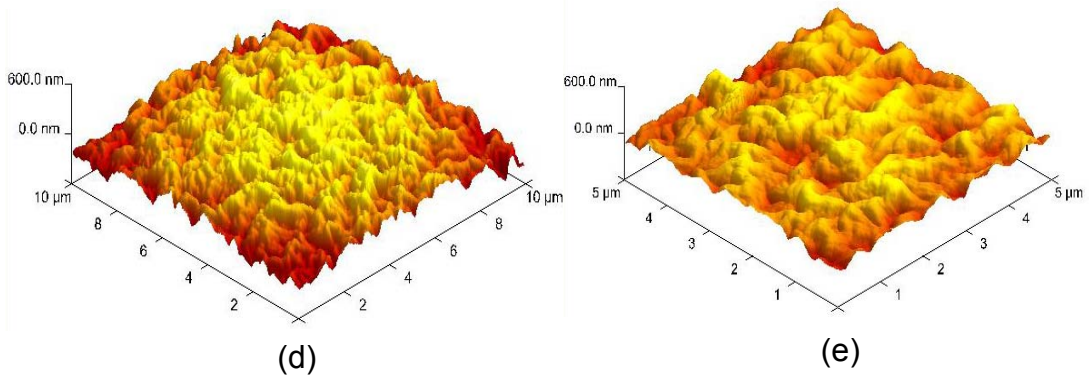
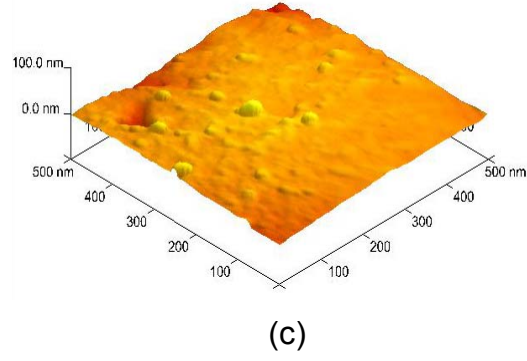
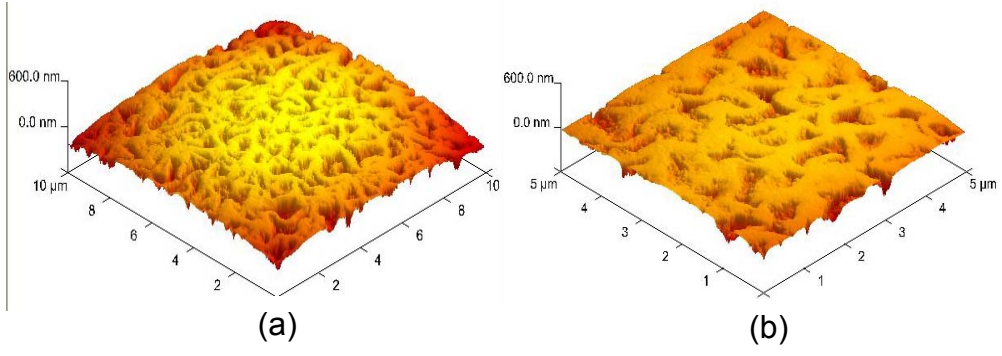
**Çizelge 4.4.** Dekstran mikrokürelerin ve PNIPAAm ile kaplanmış dekstran mikrotasıyıcıların XPS ile elde edilmiş yüzey atomik bileşimi.

Mikrotasıyıcı	Atom Oranı (%)				
	C	O	N	N/C	O/C
Dekstran	56,8	43,2	<0,1	-	0,76
PNIPAAm-g-dekstran	71,1	23,0	5,8	0,082	0,32

PNIPAAm ile kaplanmış dekstran mikrotasıyıcıların yapısındaki % 5,8 oranındaki azot varlığı yapıdaki PNIPAAm kaplamanın varlığına işaret etmektedir. Dekstranın yapısında azot bulunmamaktadır. Dekstran mikrokürelerdeki O/C oranı 0,76 olarak hesaplanmıştır. PNIPAAm ile kaplanan dekstran mikrotasıyıcılardaki O/C oranı ise 0,32 olarak elde edilmiştir. XPS analizi sonucunda; PHEMA-g-dekstran bileşimindeki O/C oranının düşmesi ve yapıya azot içeriğinin eklenmesi dekstranın PNIPAAm ile başarılı bir şekilde kaplandığını göstermektedir.

#### 4.2.2.3. AFM (Atomik Güç Mikroskobu) Analizi

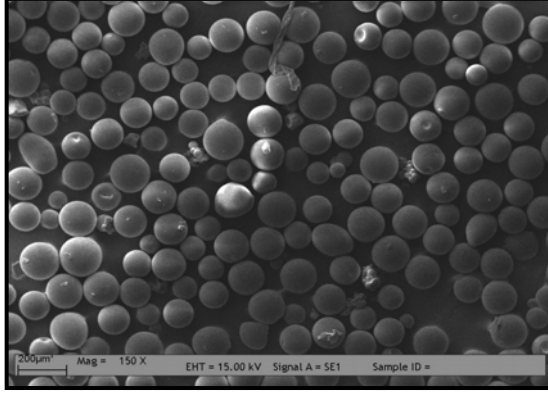
Dekstran mikrokürelerin ve sentezlenen PNIPAAm-g-dekstran mikrotasıyıcıların yüzey topografisi AFM ile incelenmiştir. Yüzey taramasında her 2 yapıya ait farklı yüzey topografileri ve pürüzlülük değerleri elde edilmiştir. Şekil 4.9'da verilen üç boyutlu AFM görüntüleri PNIPAAm ile kaplanma sonrası yüzeydeki farklılığı açıkça ortaya koymaktadır.



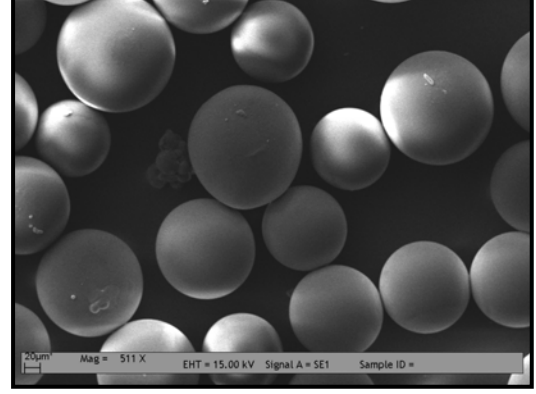
**Şekil 4.9.** Titreşimli (tapping modda) alınan üç boyutlu AFM görüntüleri. Dekstran mikroküre yüzeyleri (a)10  $\mu\text{m}$ , (b) 5  $\mu\text{m}$ , (c) 500 nm. PNIPAAm-g-dekstran mikrotasıyıcı yüzeyleri (d) 10  $\mu\text{m}$ , (e) 5  $\mu\text{m}$ , (f) 500 nm.

#### 4.2.2.4. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

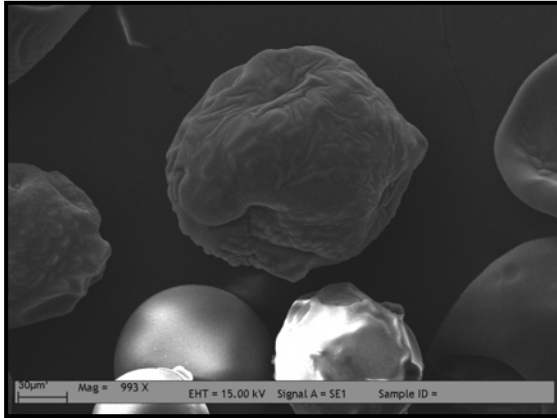
Dekstran ve PNIPAAm-g-dekstran mikrotayııcıların morfolojisi ve yüzey özellikleri SEM fotoğrafları kullanılarak incelenmiştir. Mikrotayııcıların küresel morfolojisi, boy/boy dağılımı ve yüzey özellikleri Şekil 4.10'da gösterilmektedir.



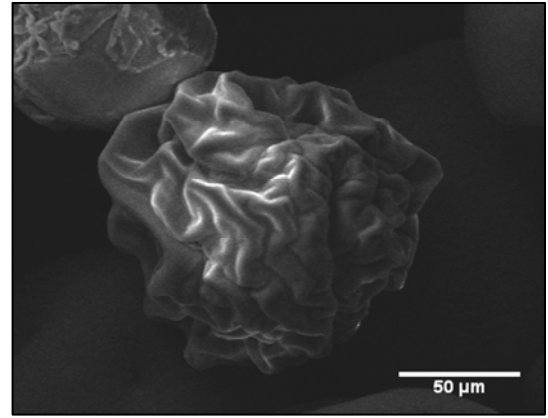
(a)



(b)



(c)



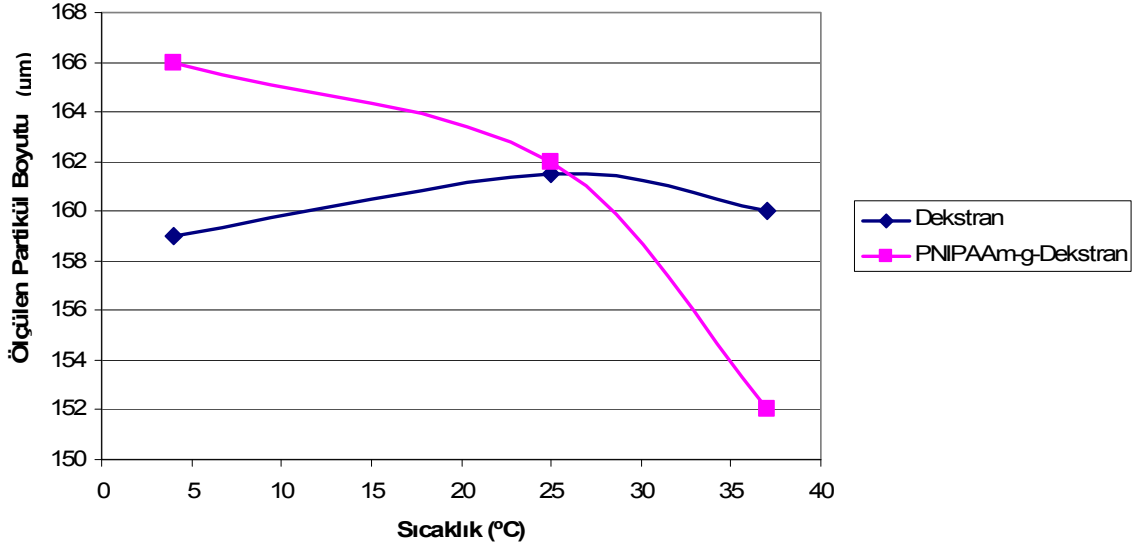
(d)

**Şekil 4.10.** Yüzey SEM fotoğrafları (a) Dekstran mikroküreler (Büyütme x 150); (b) Dekstran mikroküreler (Büyütme x 511); (c) PNIPAAm ile kaplanmış dekstran mikroküreler (Büyütme x 993); (d) PNIPAAm ile kaplanmış dekstran mikroküreler (Büyütme x 1500).

Kuru halde rijit ve düzgün küresel morfolojiye sahip dekstran mikroküreler (Şekil 4.10 a ve b), yüksek şişme/büzüşme özelliklerine bağlı olarak ATRP reaksiyonu sırasında morfolojik açıdan değişime uğramakta ve oldukça farklı bir yapı sergilemektedirler (Şekil 4.10 c ve d).

#### 4.2.2.5. Mikrotasıyıcıların şişme özellikleri

PNIPAAm ile kaplanmış dekstran mikrokürelerin PBS tamponu içinde 37°C'den 25°C'ye ve 37°C'den 4°C'ye yapılan sıcaklık değişimiyle göstermiş olduğu şişme davranışı optik mikroskopla gözlemlenmiştir. Kürelerin ortalama çapları, optik fotoğraflar üzerinden en az 200 kürenin çapları sayılarak belirlenmiştir. Dekstran mikrokürelerin şişme davranışlarının sıcaklıkla değişimi Şekil 4.11'de verilmiştir.



**Şekil 4.11.** Dekstran mikrokürelerin PBS tamponundaki şişme davranışlarının sıcaklıkla değişimi.

Kuru haldeyken 118 µm ortalama çapa sahip olan mikroküreler, PBS içerisine alındıklarında yapılarındaki suyu seven hidroksil gruplarının (-OH) suyla etkileşimi sonucunda ortalama çapları 162 µm'ye çıkmıştır. Küre içeren PBS ortamının sıcaklığı sırasıyla 37°C'den 25°C'ye ve 37°C'den 4°C'ye düşürüldüğünde, dekstran kürelerin yapılarında sıcaklığa karşı duyarlı gruplar bulunmadığından ortalama çaplarında belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. PNIPAAm kaplanmış dekstran mikrotasıyıcılarda ise PNIPAAm'ın içerdiği aminopropil grupları nedeniyle mikrotasıyıcılar ortamdaki suyu yapılarına alarak şişmektedirler. Bu sıcaklığın üstündeyse yapıdaki metil grupları baskın hale geçerek mikrotasıyıcıları hidrofobikleşmekte ve mikrotasıyıcıların büzüşmelerine neden olmaktadır. Dolayısıyla PNIPAAm kaplı dekstran mikrokürelerin ortalama çapları 37°C'de 152 µm iken, sıcaklık 25°C ve 4°C'ye düşürüldüğünde ise kürelerin ortalama çapları sırasıyla 162 µm ve 166 µm'ye çıkmıştır. Yapılan sıcaklığa bağlı şişme deneyleri

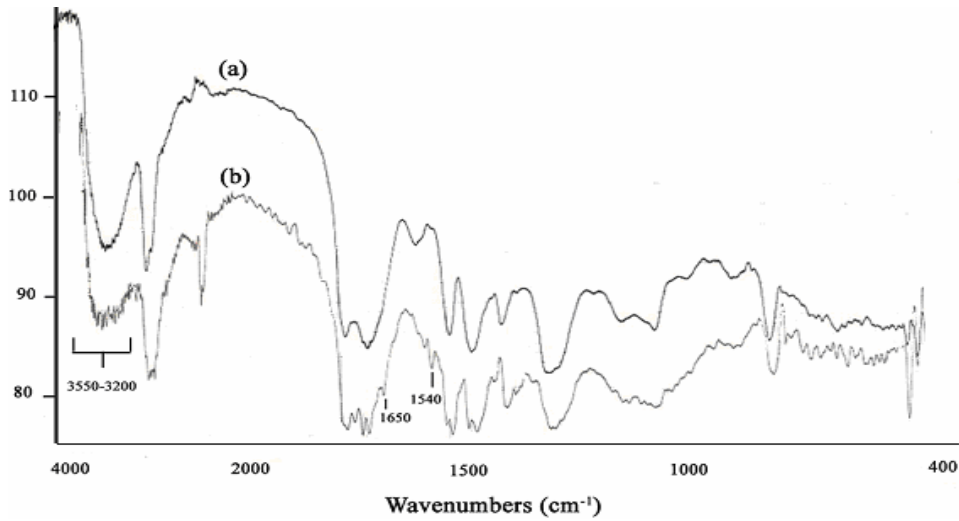
sonucunda bu ortalama çap değişiminin sıcaklık 25°C'den 37°C'ye çıkarıldığında tekrar 152  m'ye düştüğünü ve neticede faz değişiminin tersinir olduğu gözlemlenmiştir.

### 4.2.3. PNIPAAm-g-PVA mikrotaşyıcılara ait karakterizasyon çalışmalarının sonuçları

PNIPAAm-g-PVA mikrotaşyıcılara ait karakterizasyon çalışmalarının sonuçları aşağıda sırasıyla verilmiştir.

#### 4.2.3.1. FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance) analizi

Çalışma kapsamında sentezlenen PNIPAAm-g-PVA mikrotaşyıcıların kimyasal yapısı ATR-IR spektrumlarıyla incelenmiştir. şekil 4.12'de VA-hidroksi ve PNIPAAm ile kaplanmış VA-hidroksi mikrokürelere ait spektrumlar 4000-400 cm<sup>-1</sup> aralığında karşılaştırılmalı olarak sunulmuştur.



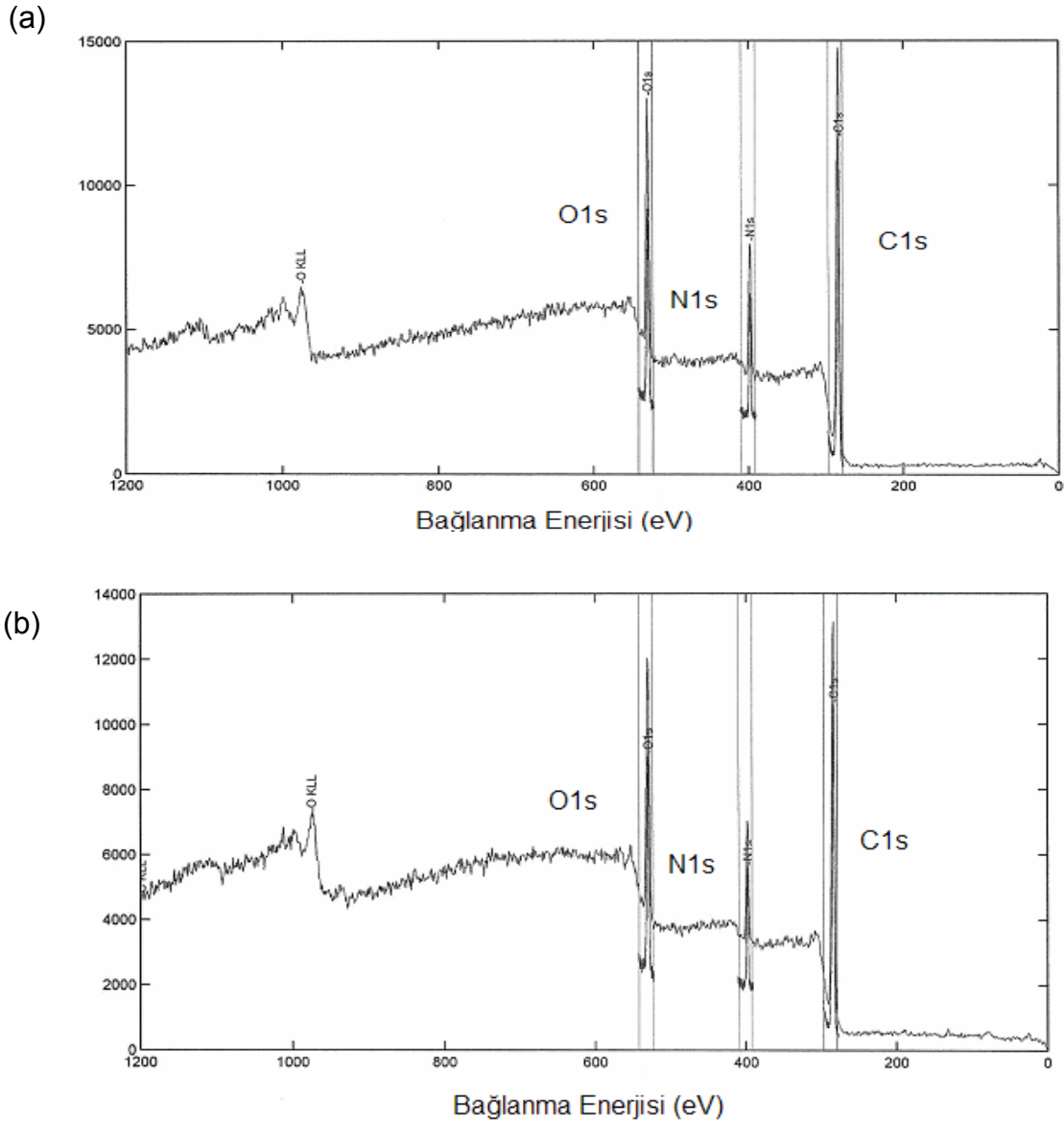
**şekil 4.12.** ATR-IR spektrumu (a) PVA mikrokürelere (b) PNIPAAm-g-PVA mikrotaşyıcılar.

Spektrumda (şekil 4.12) 3200 ile 3550 cm<sup>-1</sup> arasında görülen geniş absorpsiyon bandı, VA-hidroksi mikrokürelere yapısında bulunan hidroksil (-OH) gruplarındaki intermoleküler ve intramoleküler hidrojen bağlarından kaynaklanmaktadır. PNIPAAm ile kaplamadan sonra elde edilen ATR-FTIR spektrumunda (şekil 4.12 b), hidroksil (-OH) gruplarına bağlı olarak yukarıda bahsedilen dalga boyu

aralığındaki pikin şiddetinde belirgin bir azalmanın gözlemlenmesi,  $1540\text{ cm}^{-1}$  ve  $1650\text{ cm}^{-1}$  dalga boylarında görülen yeni amid I ve amid II pikleri, VA-hidroksi mikroküreler üzerinde bulunan hidroksil grupları üzerinden PNIPAAm'ın ATRP ile başarılı bir şekilde yüzeye kaplandığını kanıtlamaktadır.

#### 4.2.3.2. XPS (X-ray Fotoelektron Spektroskopisi) analizi

VA-hidroksi ve PNIPAAm ile kaplanmış VA-hidroksi mikrotayıyıcıların yüzey atomik bileşimi XPS tekniği ile belirlenmiştir. Şekil 4.13 (a)'da VA-hidroksi mikrokürelerin, Şekil 4.13 (b)'de ise PNIPAAm ile kaplanmış VA-hidroksi mikrotayıyıcıların XPS spektrumu verilmiştir.



**Şekil 4.13.** XPS spektrumu (a) PVA mikroküreler (b) PNIPAAm-g-PVA mikrotayıyıcılar.

Şekil 4.13 (a) ve Şekil 4.13 (b)'deki spektrumlardaki C1s, N1s ve O1s piklerinin varlığı ve pik şiddetlerindeki değişimler karşılaştırıldığında yüzeydeki PNIPAAm kaplamanın varlığı kanıtlanmaktadır. Analiz sonucunda elde edilen yüzey atomik bileşimleri Çizelge 4.5'de verilmektedir.

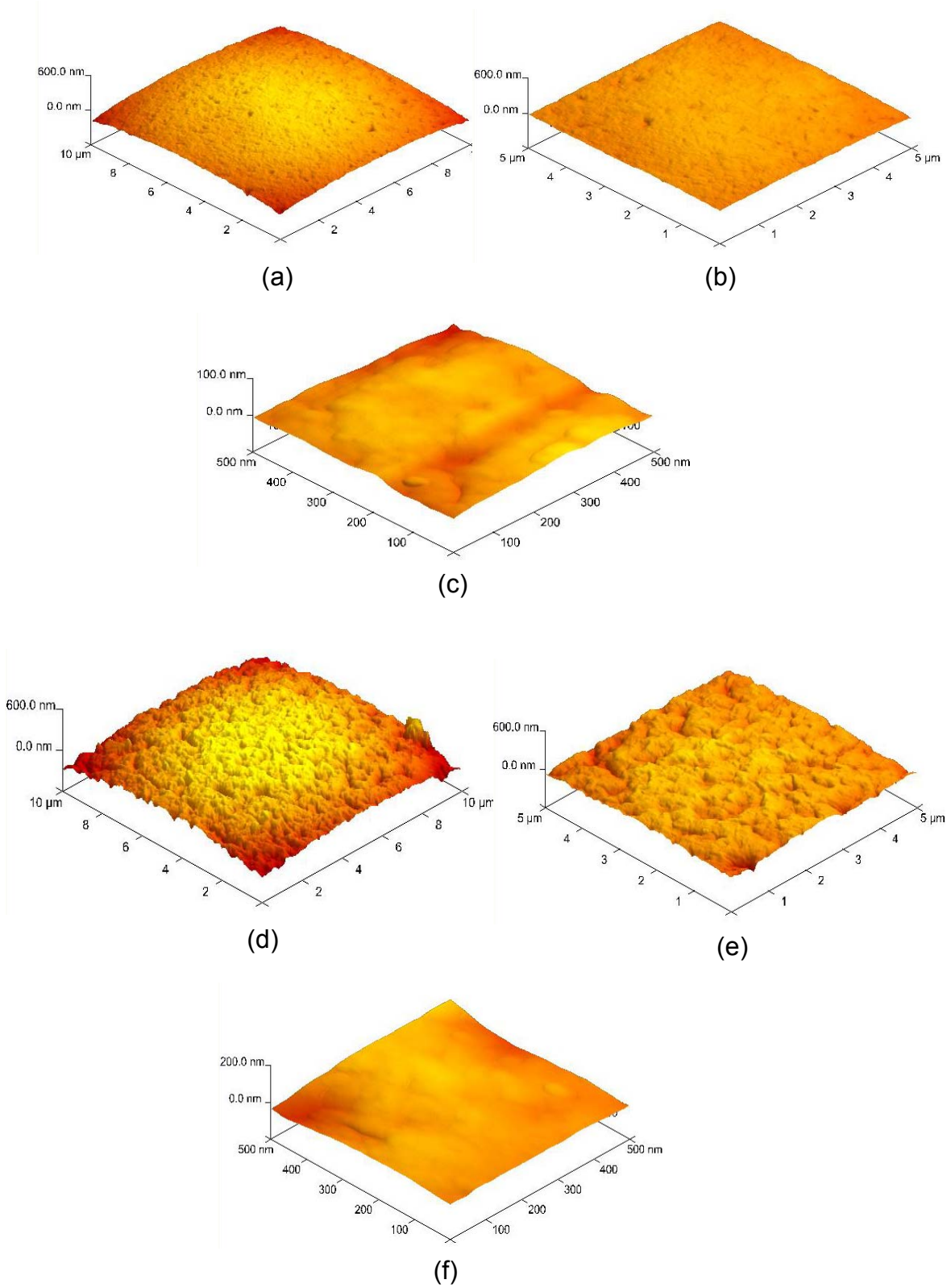
**Çizelge 4.5.** VA-hidroksi ve NIPAAm ile kaplanmış PVA mikrot taşıyıcıların XPS ile elde edilen yüzey atomik bileşimi.

Mikrot taşıyıcı	Atom Oranı (%)				
	C	O	N	N/C	O/C
PVA	68,8	18,8	12,4	0,18	0,27
PNIPAAm-g-PVA	67,9	21,2	10,9	0,16	0,31

VA-hidroksi mikroküreler, vinil asetat-divinil etilen üre kopolimeri yapısında olduklarından, ürenin varlığından kaynaklanan yüksek azot içeriğine (% 12,4) sahiptirler. Yüzeyin PNIPAAm ile kaplanması sonucunda, yüzeydeki azot oranındaki azalma (% 10,9 değeri) kaplamanın gerçekleştiğinin kanıtıdır.

#### 4.2.3.3. AFM (Atomik Güç Mikroskobu) Analizi

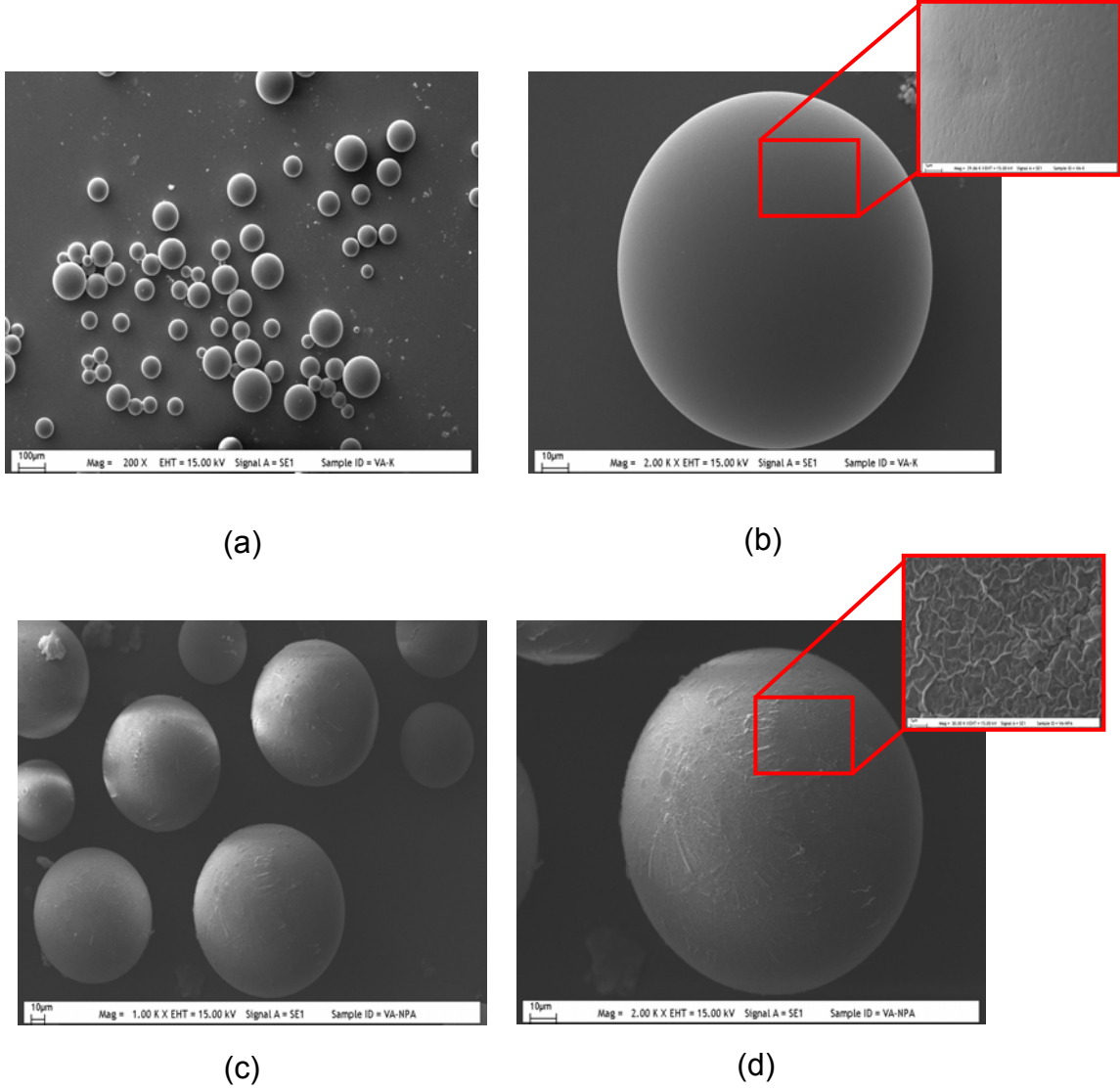
VA-hidroksi ve sentezlenen PNIPAAm-g-PVA mikrot taşıyıcıların yüzey topografisi atomik güç mikroskobu ile belirlenmiştir. Şekil 4.13'de verilen üç boyutlu AFM görüntüleri PNIPAAm ile kaplanma sonrası yüzeyde meydana gelen topografik farklılığı açıkça ortaya koymaktadır.



**Şekil 4.14.** Titreşimli (tapping) modda alınan üç boyutlu AFM görüntüleri. PVA mikroküre yüzeyleri (a) 10 μm, (b) 5 μm, (c) 500 nm. PNIPAAm-g-PVA mikrotasıyıcı yüzeyleri (d) 10 μm, (e) 5 μm, (f) 500 nm.

#### 4.2.3.4. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

PVA ve PNIPAAm-g-PVA mikrotarıyıcıların morfolojisi ve yüzey özellikleri SEM fotoğrafları kullanılarak incelenmiştir. Mikrotarıyıcıların küresel morfolojisi ve yüzey özellikleri Şekil 4.15'de gösterilmektedir.



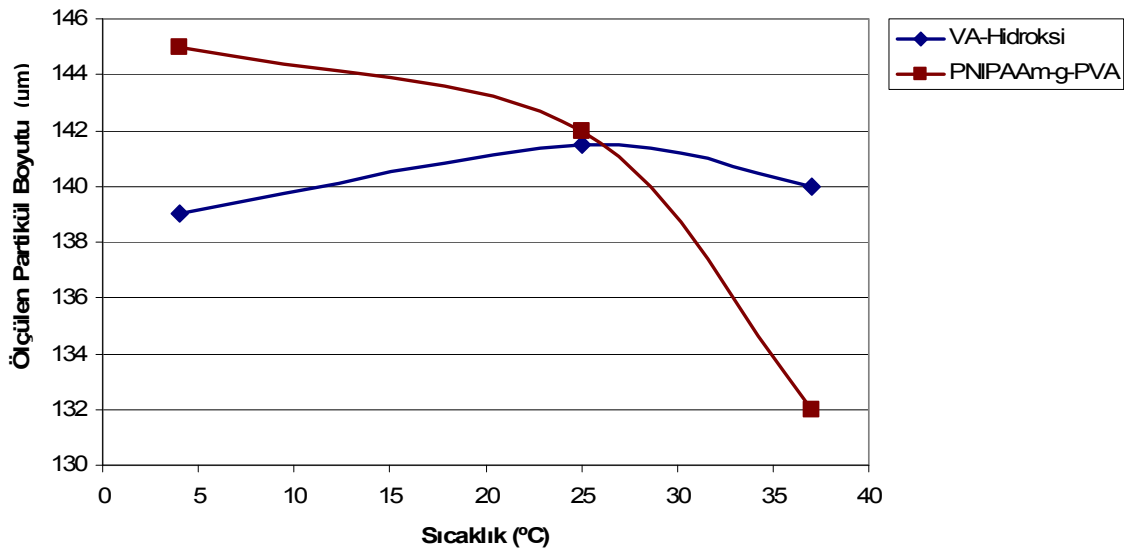
**Şekil 4.15.** Yüzey SEM fotoğrafları (a), (b) PVA mikrotarıyıcılar (c), (d) PNIPAAm ile kaplanmış PVA mikrotarıyıcılar (a) (Büyütme x 200) (b) (Büyütme x 2000) (c) (Büyütme x 1000) (d) (Büyütme x 2000) detay fotoğraflar için (Büyütme x 30000)'dir.

Şekil 4.15 (b)'de görülen VA-hidroksi mikrokürelerin yüzeyi pürüzsüz ve düz iken, Şekil 4.15 (d)'de görülen ATRP ile PNIPAAm kaplanmış mikrokürelerin yüzeyinde pürüzlü yapılar oluşmuş ve bu pürüzler yüzeyde homojen bir dağılım göstermiştir.

SEM fotoğrafları, ATRP ile PNIPAAm'ın VA-hidroksi yüzeylere kaplandığını göstermektedir.

#### 4.2.3.5. Mikrotasıyıcıların şişme özellikleri

PNIPAAm ile kaplanmış VA-hidroksi mikrokürelerin PBS tamponu içinde 37°C'den 25°C'ye ve 37°C'den 4°C'ye yapılan sıcaklık değişimiyle göstermiş olduğu şişme davranışı optik mikroskopla gözlemlenmiştir. Kürelerin ortalama çapları, optik fotoğraflar üzerinden en az 200 kürenin çapları sayılarak belirlenmiştir. VA-hidroksi mikrokürelerin şişme davranışlarının sıcaklıkla değişimi Şekil 4.16'da verilmiştir.



**Şekil 4.16.** PVA mikrokürelerin PBS tamponundaki (pH=7,4) şişme davranışlarının sıcaklıkla değişimi.

Kuru haldeyken 80 µm olan mikroküreler, PBS içerisine alındıklarında yapılarındaki suyu seven hidroksil gruplarının (-OH) suyla etkileşimi sonucunda ortalama çapları 141 µm'ye çıkmıştır. Küre içeren PBS ortamının sıcaklığı sırasıyla 37°C'den 25°C'ye ve 37°C'den 4°C'ye düşürüldüğünde, VA-hidroksi kürelerin yapılarında sıcaklığa karşı duyarlı gruplar bulunmadığından ortalama çaplarında belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. PNIPAAm kaplanmış VA-hidroksi mikrotasıyıcılarda ise PNIPAAm'ın içerdiği aminopropil grupları nedeniyle mikrotasıyıcılar ortamdaki suyu yapılarına alarak şişmektedirler. Bu sıcaklığın üstündeyse yapıdaki metil grupları baskın hale geçerek mikrotasıyıcıları hidrofobikleşmekte ve mikrotasıyıcıların büzüşmelerine neden olmaktadır. Dolayısıyla PNIPAAm ile kaplı VA-hidroksi mikrokürelerin ortalama çapları 37°C'de 132 µm iken, sıcaklık 25°C ve 4°C'ye düşürüldüğünde ise kürelerin çapları

sırasıyla 142  $\mu\text{m}$  ve 145  $\mu\text{m}$ 'ye çıkmıştır. Yapılan sıcaklığa bağlı şişme deneyleri sonucunda bu ortalama  $\text{çap}$  değişiminin sıcaklık 25°C'den 37°C'ye çıkartıldığında tekrar 132  $\mu\text{m}$ 'ye düştüğünü ve neticede faz değişiminin tersinir olduğu gözlemlenmiştir.

### **4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları**

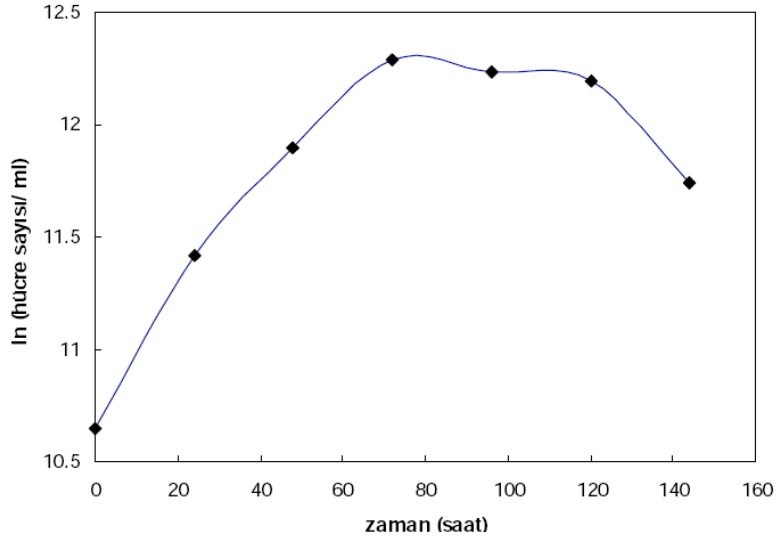
Sentezlenen mikrotasıyıcılar ile yapılan hücre kültürü çalışmaları iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak statik kültür koşullarında çalışılmış, daha sonra yapılan çalışmada ise statik kültürün yanı sıra karıştırmalı reaktör kullanılarak dinamik kültür koşulları da sağlanmıştır.

#### **4.3.1. Hücre seçimi ve karakterizasyonu**

Hücre kültür çalışmaları farklı morfolojiye sahip 2 tür hücre hattı ile gerçekleştirilmiştir. Fibroblastik ve epitel morfolojilere sahip bu 2 hücre hattının kullanılmasıyla, mikrotasıyıcılara yapışma ve yüzeyden kopma açısından hücre morfolojisinin etkisinin karşılaştırılması da mümkün olmuştur.

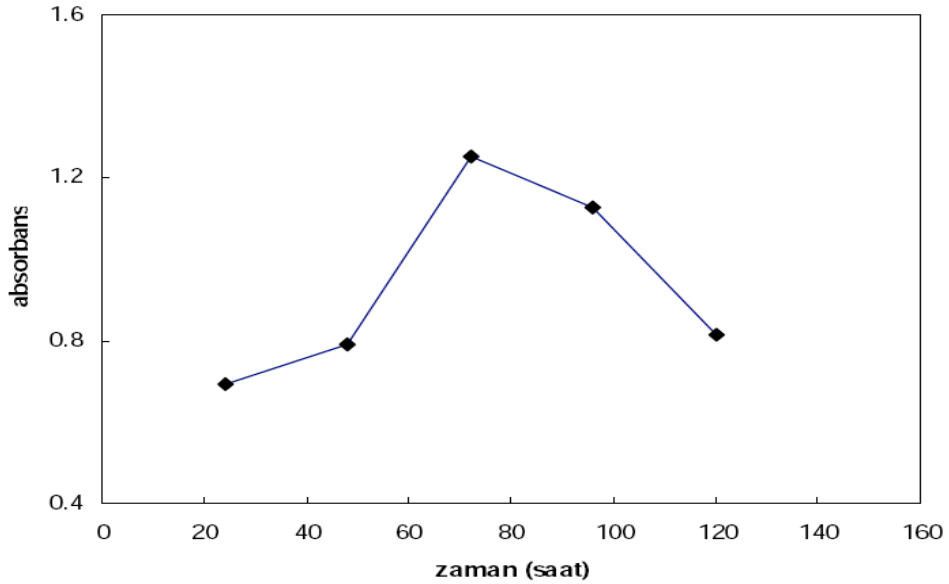
##### **4.3.1.1. L929 fare fibroblast hücrelerinin karakterizasyonu**

L929 fare fibroblast hücreleri hemositometrik yöntemle sayılmış ve elde edilen veriler kullanılarak hücrelerin özgül üreme hızı ve ikilenme süresi hesaplanmıştır. Şekil 4.17'de L929 fare fibroblastlar için üreme eğrisi sunulmaktadır. Gecikme fazının gözlenmediği üreme sürecinde, üstel üremenin 72. saate kadar devam ettiği, 72. saatten sonra hücre üremesinin durgun faza geçtiği görülmüştür. Bu eğri kullanılarak hesaplanan özgül üreme hızı 0,02  $\text{sa}^{-1}$  ve ikilenme süresi 32 sa olarak bulunmuştur.



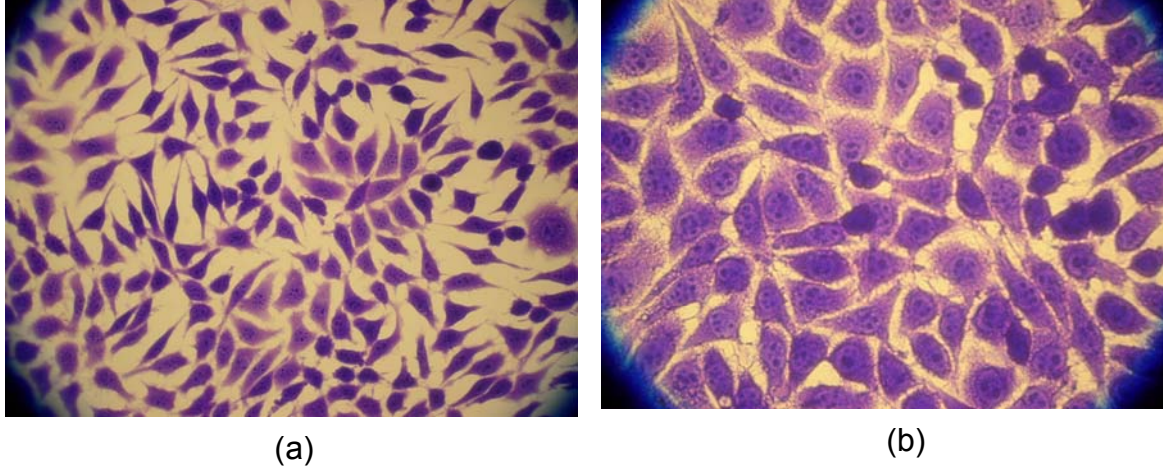
**Şekil 4. 17.** L929 fare fibroblast hücrelerinin üreme eğrisi (Başlangıç hücre konsantrasyonu:  $4 \times 10^4$  hücre/mL'dir).

Hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri ise MTT analizi ile belirlenmiştir. Şekil 4.18'de açıkça görüldüğü gibi, 72. saate kadar L929 fare fibroblast hücrelerinin mitokondriyal aktivitelerini sürdürdükleri bulunmuştur. 72. saatten sonra hücrelerin üreme aktivitesinin düştüğü ve durgun fazı takiben 120. saatte ölüm fazına geçtikleri görülmüştür.



**Şekil 4.18.** L929 fibroblastların mitokondriyal aktivitelerinin MTT deneyleri ile izlenmesi (Başlangıç hücre konsantrasyonu:  $4 \times 10^4$  hücre/mL'dir).

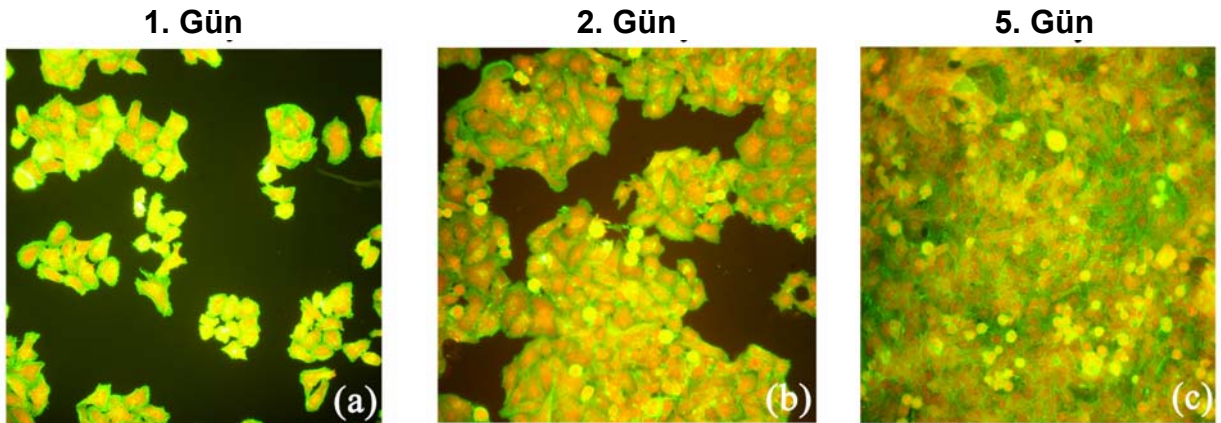
Hücrelerin durgun kültür ortamındaki morfolojileri ise Giemsa ile boyamanın ardından optik mikroskop ile incelenerek görüntülenmiştir. Şekil 4.19'da tipik fibroblastik görüntüye ait optik fotoğraflar yer almıştır.



**Şekil 4.19.** L929 fare fibroblastı hücrelerinin Giemsa ile boyanmış görüntüleri (a) Büyütme x 20 (b) Büyütme x 40.

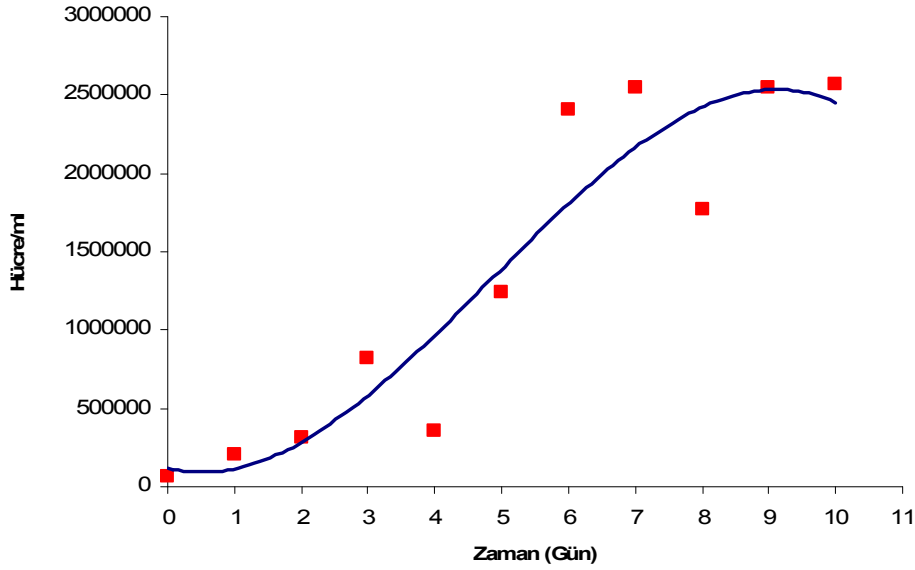
#### 4.3.1.2. HS2 keratinositlerin karakterizasyonu

Epitel morfolojiye sahip, insan sağlıklı deri biyopsisinden hazırlanan HS2 hücre hattının durgun kültürdeki floresan boyama sonrası çekilmiş görüntüleri Şekil 4.20'de verilmiştir. Kırmızı kısımlar hücre çekirdeğini, yeşiller ise aktin filamentlerini göstermektedir. Fotoğraflardan hücrelerin tipik epitel hücre karakteristiği olan “kaldırım taşı” şeklinde bir yapılanma sergiledikleri görülmektedir. Kültürün ilerleyen günlerinde yüzeydeki hücrelerin sayılarının arttığı ve 5. günde kültür kabının yüzeyinin hücrelerce tamamen kaplandığı görülmektedir.



**Şekil 4. 20.** HS2 keratinositlerin TCPS yüzey üzerindeki floresan mikroskop görüntüleri (a) 1.gün (b) 2. gün (c) 5. gün (Büyütme x 20).

Şekil 4.21'de hemositometrik sayım sonucu elde edilen hücre üreme eğrisi görülmektedir. Üreme eğrisinden özgül üreme hızı  $0,299 \text{ gün}^{-1}$  ve ikilenme süresi 55 sa olarak hesaplanmıştır.

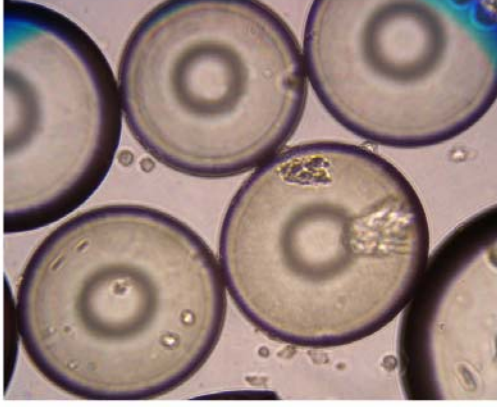


Şekil 4. 21. HS2 keratonisitlere ait üreme eğrisi.

#### 4.3.2. PHEMA ve PNIPAAm-g-PHEMA mikrotasıyıcılar ile yapılan hücre kültürü çalışmaları

##### 4.3.2.1. Statik hücre kültürü çalışmaları

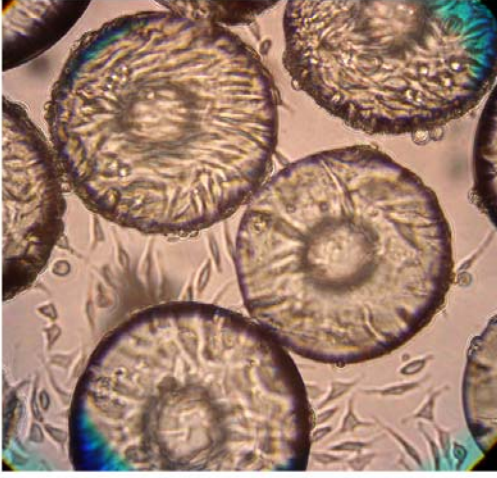
PHEMA ve PNIPAAm-g-PHEMA mikrotasıyıcılar ile yapılan statik hücre kültürü çalışmalarında L929 fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. PHEMA, biyoyumlu özelliğinin yanısıra oldukça hidrofilik bir polimerdir. Hidrofilik polimerlerde yüzeyde bir su tabakası olduğundan proteinlerin yüzeye absorblanması engellenmektedir. Bu nedenle bu tip yüzeylerde hücre yapışması etkin bir şekilde sağlanamamaktadır. Optik mikroskop altında yapılan incelemelerde, beklenildiği gibi, PHEMA mikrotasıyıcılara hücrelerin yapışmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.22 a). Ancak yüzeyin PNIPAAm ile kaplanması ile yüzeyin yükü (amin gruplarından kaynaklanan) ve ıslatılabilirliği değiştirilmiş ve bu yüzeylerde etkin bir şekilde hücre yapışmasının gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.22 b ve c). Hücrelerin mikrotasıyıcı yüzeyinin tamamını kaplamış olması (Şekil 4.22 d), kaplamanın homojen olduğunu kanıtlamaktadır. Hücre morfolojisini daha iyi görmek amacıyla kristal viyole boyanması gerçekleştirilmiş ve hücrelerin mikrotasıyıcı yüzeyinde de fibroblastik morfolojilerini korudukları belirlenmiştir (Şekil 4.22).



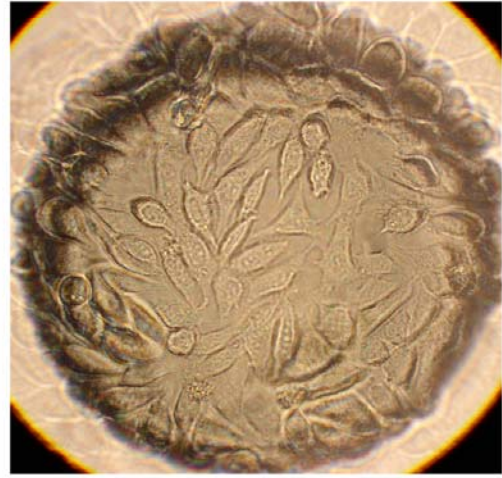
(a)



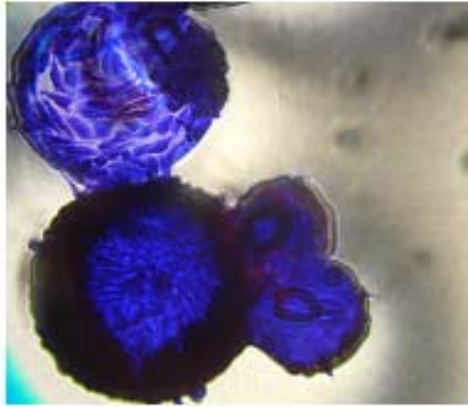
(b)



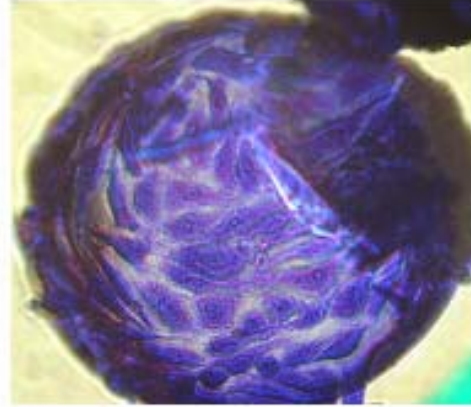
(c)



(d)



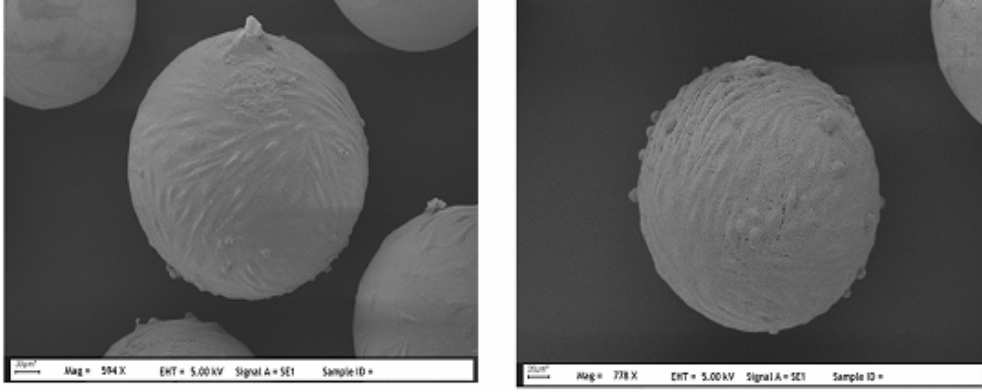
(e)



(f)

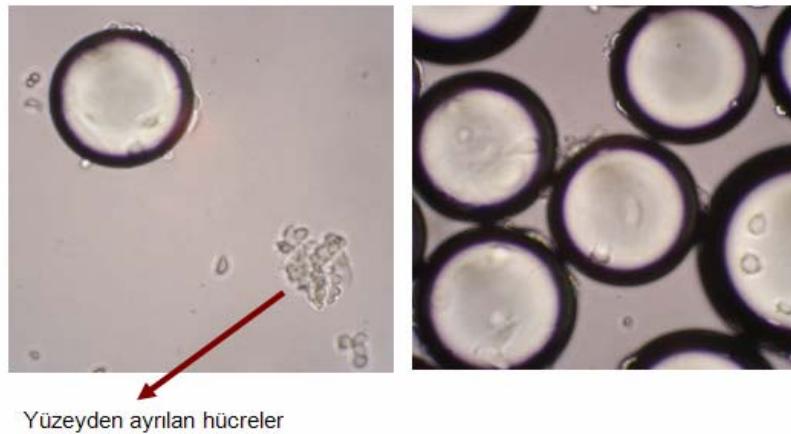
**Şekil 4. 22.** L929 fibroblastik hücrelerin PHEMA bazlı mikrot taşıyıcı kültürlerdeki optik görüntüleri (a) PHEMA (5. gün, 20x), (b), (c) PNIPAAm-g-PHEMA (5. gün, 20x), (d) PNIPAAm-g-PHEMA (5. gün, 40x), (e), (f) PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcılar üzerinde kristal viyole ile boyanmış L929 fibroblastların optik mikroskop görüntüsü (e, x20; f, x40).

Şekil 4.23'de L929 fibroblastlar ile inkübe edilmiş PNIPAAm-g-PHEMA mikrotarıyıcıların SEM görüntüleri verilmiştir. SEM fotoğrafları da, mikrotarıyıcı kültürlerde hücrelerin morfolojisinin korunarak, yüksek kapasitede hücre üretimi sağlandığını göstermektedir.



**Şekil 4.23.** Hücre kültürünün 5. gününde L929 fare fibroblastlarının PNIPAAm-g-PHEMA mikrotarıyıcılar üzerindeki SEM görüntüleri (Büyütme x 750).

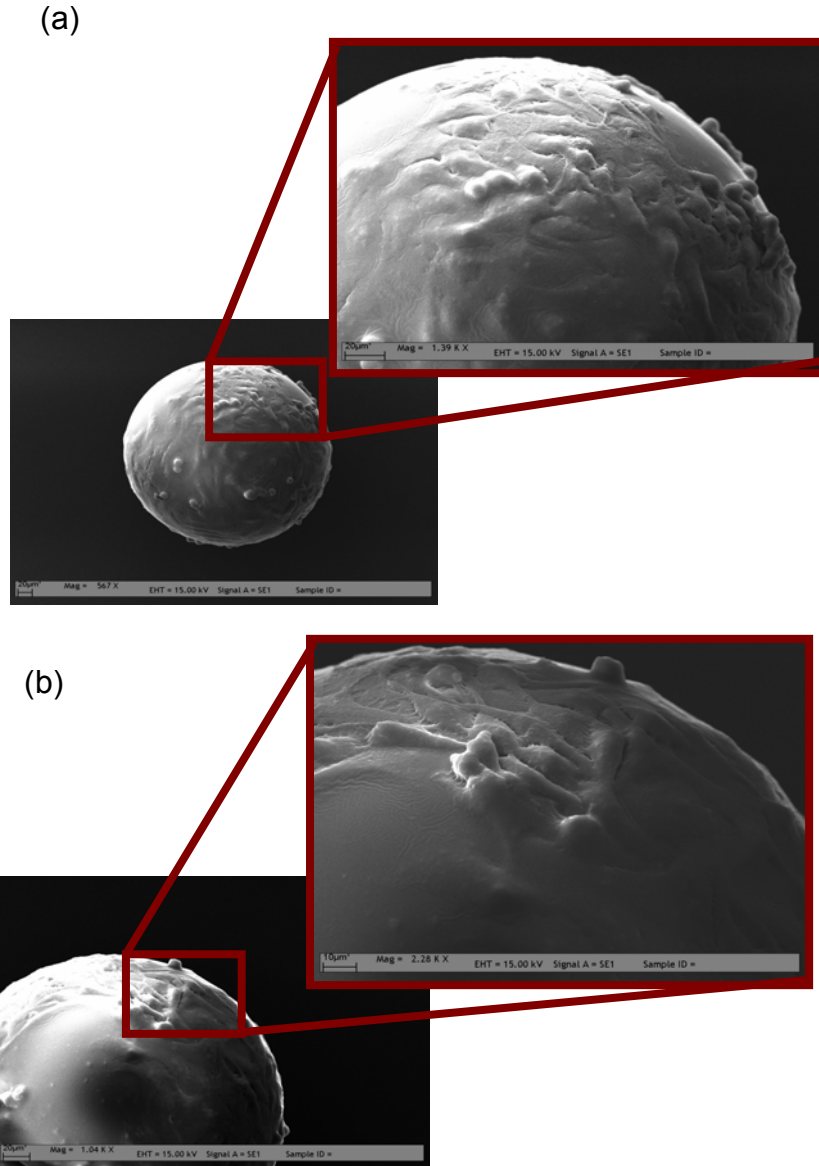
Hücreleri PNIPAAm-g-PHEMA mikrotarıyıcıların yüzeyinden ayırma çalışmalarında mikrotarıyıcıların sıcaklık-duyarlılık özellikleri kullanılmıştır. 37°C'de PNIPAAm, yapısındaki izopropil gruplarının etkileşimi nedeniyle hidrofobik özellik göstermiş ve hücre yapışmasına izin vermiştir. Hücreler mikrotarıyıcı yüzeyinde doymunluğa (confluency) ulaştığında mikrotarıyıcılar +4°C'de bekleyen serumsuz besi ortamı içerisine alınmış ve +4°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Hücrelerin mikrotarıyıcıların yüzeyinden ayrılışları optik mikroskop altında incelenmiştir (Şekil 4.24).



**Şekil 4.24.** Hücre kültürünün 5. gününde L929 fare fibroblastlarının sıcaklık etkisiyle (+4 °C, 15 dk.) PNIPAAm-g-PHEMA mikrotarıyıcıların yüzeyinden ayrılışı (20x).

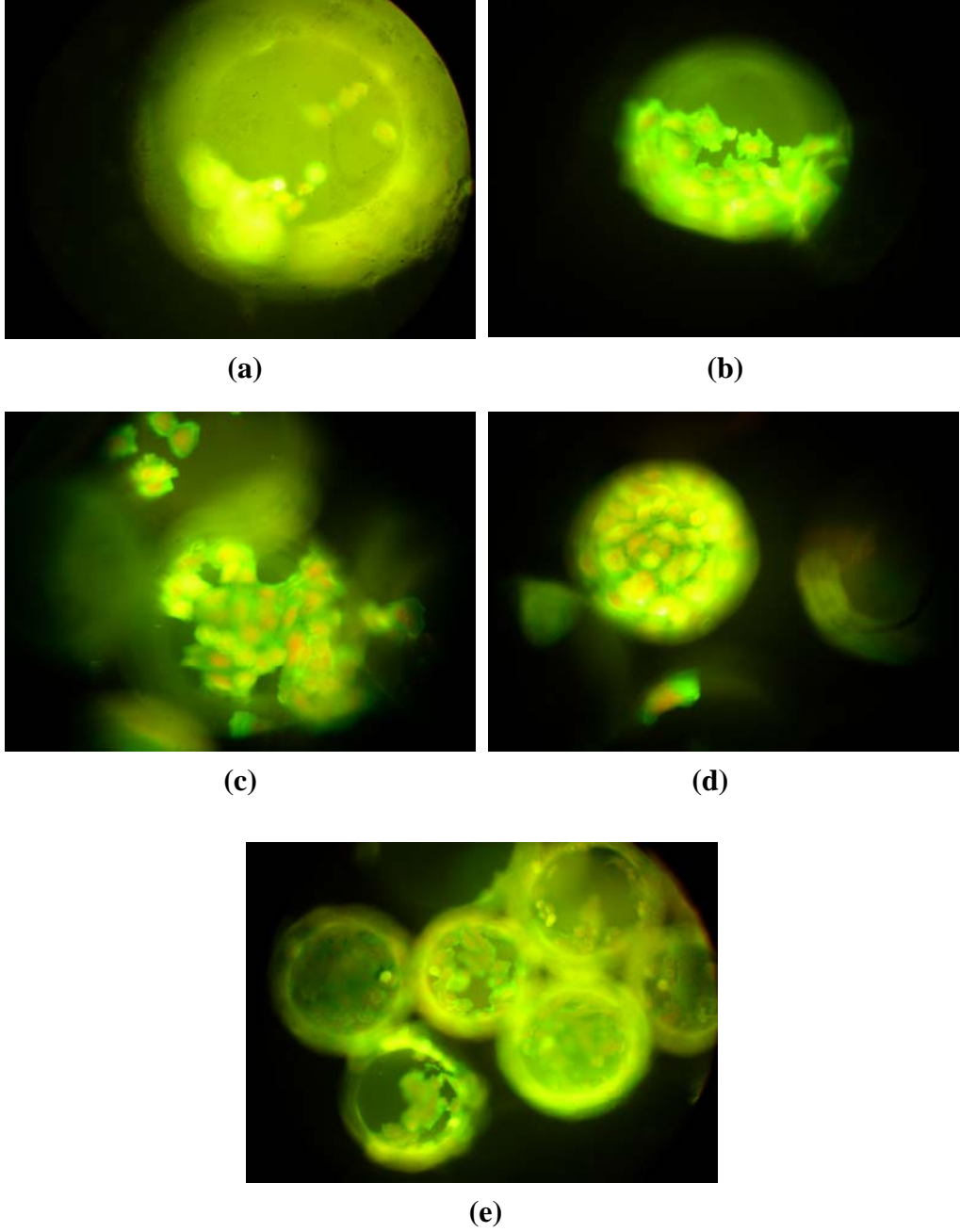
#### 4.3.2.2. Dinamik hücre kültürü çalışmaları

PHEMA ve PNIPAAm-g-PHEMA mikrotarıyıcılar ile yapılan dinamik hücre kültürü çalışlarında epitel morfolojideki HS2 keratinositleri kullanılmıştır. Dinamik hücre kültürü koşulları karıştırmalı reaktör kullanılarak sağlanmıştır. Öncelikle HS2 keratinositlerin PNIPAAm-g-PHEMA mikrotarıyıcılar üzerindeki morfolojisi SEM ile incelenmiştir. Hücrelerin mikrotarıyıcı yüzeyine yapışıp yayıldıkları ve karakteristik morfolojilerini sergiledikleri belirlenmiştir (şekil 4.25).



**şekil 4.25.** HS2 keratinositlerin PNIPAAm-g-PHEMA mikrotarıyıcılar üzerindeki SEM görüntüsü (5. gün) (a) (Büyütme x 10000) (b) (Büyütme x 10000) detay fotoğraflar için (Büyütme x 20000)'dir.

Reaktör içerisinden alınan örnekler floresan boyalar ile boyanmış, hücrelerin morfolojileri ve mikrotaşyıcılar yüzeyindeki dağılımları floresan mikroskopunda incelenmiştir (Şekil 4.26).

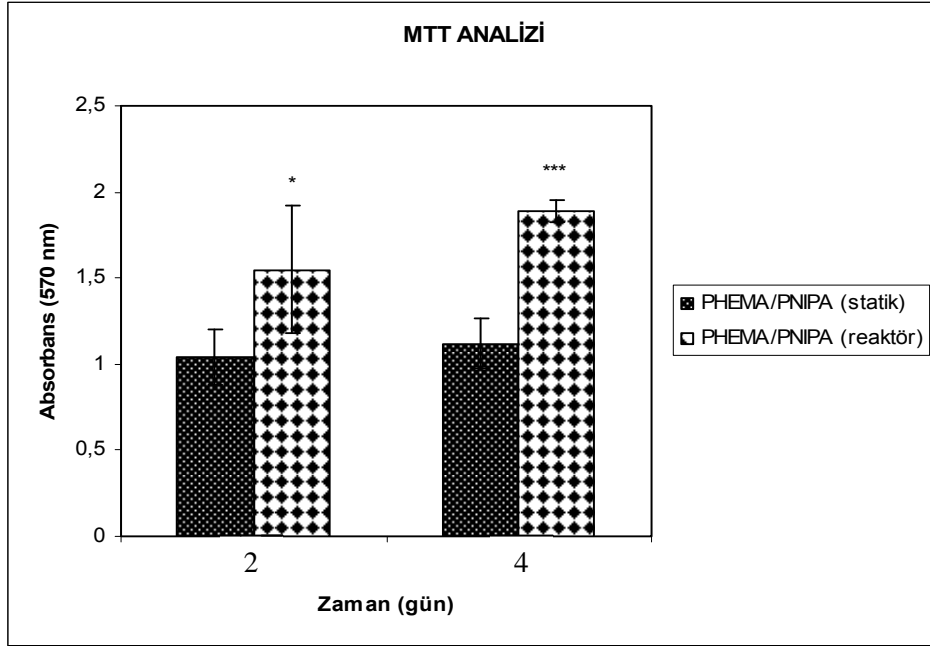


**Şekil 4.26.** Propidyum iyodür/Aleksa flor ile boyanmış HS2 keratinositlerin (a) PHEMA, (b) PNIPAAm-g-PHEMA (statik), (c), (d), (e) PNIPAAm-g-PHEMA (reaktör) mikrotaşyıcılar üzerindeki floresan mikroskop görüntüleri.

Propidyum iyodür/Alexa Fluor 488 phalloidin kullanılarak gerçekleştirilen ikili boyamada hücre çekirdeği kırmızı, hücre iskeleti ise yeşil boyanmıştır. Kontrol

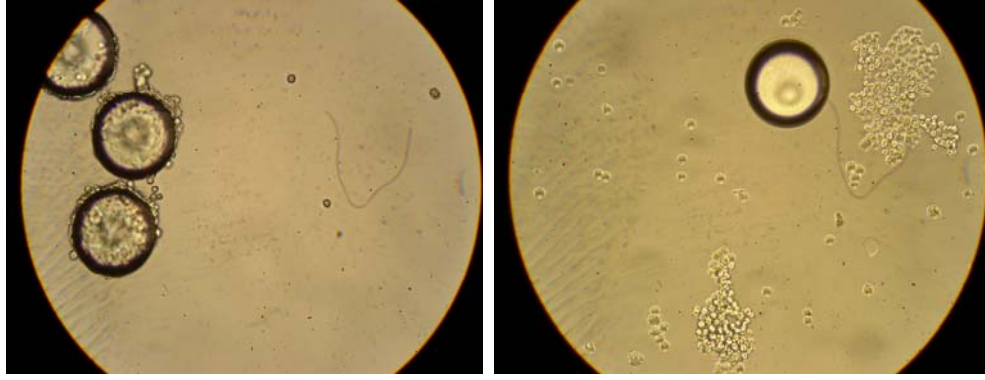
grubu olarak statik kültür koşullarında tutulan mikrotarıyıcılar kullanılmıştır. Şekil 4.26'da da görüldüğü üzere L929 hücrelerinden farklı olarak HS2 hücrelerinin az sayıda da olsa PHEMA mikrotarıyıcıların da yüzeyine yapışmış oldukları görülmektedir. Reaktör içerisinde alınan örneklerin yüzeyinde, statik örneklere oranla, hücrelerin çok daha yoğun olduğu görülmektedir. Bu durumun dinamik koşulların 3-boyutlu hücre büyümesine izin vermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Mikrotarıyıcı yüzeyindeki hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir. Şekil 4.27'de verilen grafiğe göre, en yüksek hücre canlılığı reaktör içerisindeki mikrotarıyıcılarda görülmüştür. Elde edilen sonuçların floresan görüntülerini desteklediği belirlenmiştir.



**Şekil 4.27.** MTT testi ile mikrotarıyıcılar üzerindeki HS2 hücrelerinin canlılıklarının karşılaştırılması.

Hücrelerin PNIPAAm-g-PHEMA mikrotarıyıcıların yüzeyinden ayrılmasında öncelikle mikrotarıyıcıların sıcaklık-duyarlık özellikleri kullanılmış ve L929 fibroblast hücreleri ile yapılan çalışmadaki yöntem izlenmiştir. Ayrıca tripsinizasyon yöntemi de kullanılmış ve her iki yöntem karşılaştırılmıştır. Şekil 4.28'de hücrelerin mikrotarıyıcı yüzeyinden ayrılışları optik olarak görüntülenmiştir.



(a)

(b)

**Şekil 4.28.** HS2 keratinositlerinin PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcılarının yüzeyinden (a) sıcaklığın etkisiyle (+4 °C, 15 dk.) ve (b) tripsinizasyon ile ayrılması.

Her iki yöntemde de elde edilen hücreler TCPS yüzeylere ekilmiş ve 48 sa sonunda hemositometrik olarak sayılmışlardır. Sıcaklık-duyarlı etki ile hücre yüzey etkileşimleri koparken, hücre-hücre etkileşimleri büyük oranda korunmaktadır. Ancak tripsin, proteolitik etkisiyle her iki etkileşimi de bozduğundan, hücreler daha etkin bir şekilde yüzeyden ayrılmışlardır. Çizelge 4.6'da mikrot taşıyıcıların yüzeyinden ayrılan HS2 keratinositlerin TCPS yüzeylerdeki kültürlerinden elde edilen hemositometrik sayım sonuçları (2. gün) verilmiştir.

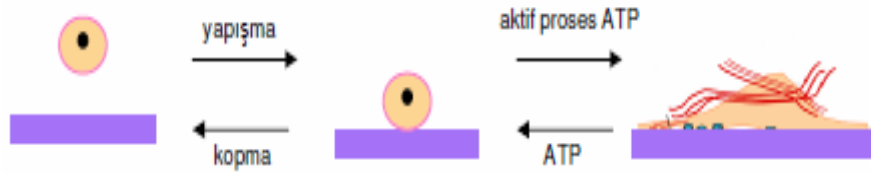
**Çizelge 4.6.** Mikrot taşıyıcıların yüzeyinden ayrılan HS2 keratinositlerin TCPS yüzeylerdeki kültürlerinden elde edilen hemositometrik sayım sonuçları (2. gün).

Mikrot taşıyıcı	+4 °C, 15 dak. (hücre/mL)	Tripsinizasyon (hücre/mL)
PNIPAAm-g-PHEMA (statik)	$5,0 \times 10^4$	$4,4 \times 10^6$
PNIPAAm-g-PHEMA (reaktör)	$8,0 \times 10^4$	$7,7 \times 10^6$

Ulaşılan sonuçların ve gözlemlerin ışığında hücrelerin yüzeyden koparılması ile ilgili olarak şu yorum yapılabilir. Hücredeki şekilsel değişim, metabolitik enerjinin harcanması sonucu gerçekleşmektedir. Polimerin hidrasyon derecesinin değişmesi hücrelerin koparılması için önemli bir başlangıç uyarısı oluşturarak, koparılmayı indüklemektedir.

Bir materyal yüzeyine hücre yapışması iki basamaklı bir proses olarak düşünülebilir. İlk basamak, hücre membranı ile materyal yüzeyi arasındaki fizikokimyasal etkileşimlerin kompleks kombinasyonu ile kontrol edilmektedir.

Fizikokimyasal etkileşimler hidrofobik, kulombik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri olabilir ve bu proses de "pasif yapışma" olarak adlandırılır. Yapışan hücreler küresel formda olup, membranları ile tutundukları materyal arasındaki arayüzeyi kararlı hale getirmek üzere metabolik enerjilerini harcayarak yüzeye yayılmaya başlarlar ve fibroblastik morfolojiye ulaşırlar (Şekil 4.29). Yüzeyden koparılma da aynı mekanizmayla, ancak ters yönde gerçekleşmektedir.

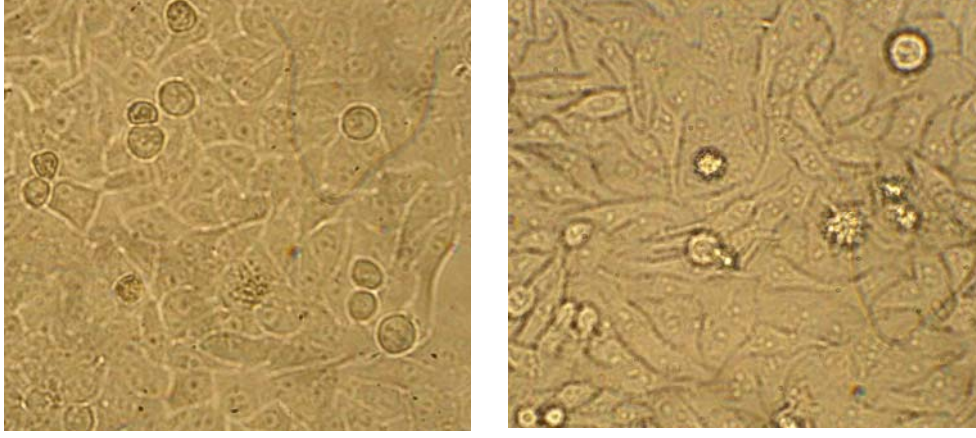


**Şekil 4.29.** Materyal yüzeyine hücre yapışması veya yüzeyden koparılmasına ait mekanizma

Hücrelerin üzerinde üredikleri polimerin hidrasyon derecesinin değişmesi hücrelerin yüzeyden koparılması için önemli bir indükleyici etki olmuştur. Sentezlenen hidrojelin hidrofilitésinin azalan sıcaklık ile artması hücrelerin yüzeyden kopması için bir uyarı oluştursa da, sıcaklığın düşmesiyle hücresel metabolizmada meydana gelen düşüş nedeniyle koparılan hücre yüzdesi daha düşük olmuştur.

Sıcaklık-değişimi tripsinizasyon kadar yüksek verim sağlamsa da, yöntemlerin hücrelere verdiği zarar dikkate alındığında, önerilen yöntemin önemi belirginleşmektedir.

Mikrotaşıyıcıların yüzeyinden ayrılan ve TCPS yüzeylerde kültürlerine devam edilen HS2 keratinosit hücreleri ayrıca optik mikroskop altında incelenmiş ve hücrelerin morfolojilerini devam ettirdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.30).



(a)

(b)

**Şekil 4.30.** Mikrotaşıyıcıların yüzeyinden (a) sıcaklığın etkisiyle (+4°C, 15 dak.), (b) tripsinizasyon ile ayrılan hücrelerin TCPS yüzeylerdeki optik mikroskop görüntüleri (2. gün).

Hücre kültür çalışmalarıyla elde edilen bu sonuçlar, PNIPAAm-g-PHEMA mikrotaşıyıcıların özellikle dinamik koşullarda hücre üretimi için uygun olduğunu ve sıcaklık etkisiyle hücrelerin yüzeyden kaldırılabilindiklerini göstermiştir. Ayrıca hücre morfolojisinin de üretimi etkileyeceği sonucuna varılmıştır.

## 5.GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamında hayvansal hücre kültür teknolojisinin çeşitli aşamalarında kullanılmak üzere sıcaklık-duyarlı mikrot taşıyıcıların sentezi, karakterizasyonu, sıcaklık-duyarlılıklarının saptanması ve hayvansal hücre kültür sistemlerinde kullanılabilirliklerine yönelik bulguların elde edilmesine çalışılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- Çalışmanın ilk kısmında, yüzeyine PNIPAAm aşılınmış PHEMA [PNIPAAm-g-PHEMA {poli(hidroksietilmetakrilat)}] mikrot taşıyıcılar, yüzeyine PNIPAAm aşılınmış dekstran (Sephadex) [PNIPAAm-g-dekstran] mikrot taşıyıcılar ve yüzeyine PNIPAAm aşılınmış vinil asetat-hidroksi (VA-hidroksi) [PNIPAAm-g-PVA] mikrot taşıyıcılar sentezlenmiştir.
- PNIPAAm-g-PHEMA, mikrot taşıyıcılar iki aşamalı bir prosesle sentezlenmiştir. Birinci aşamada süspansiyon polimerizasyonu yöntemiyle PHEMA mikroküreler sentezlenmiştir. İkinci basamakta ise bu mikrokürelerin yüzeyine ATRP yöntemiyle PNIPAAm polimeri aşılınmıştır.
- FTIR-ATR analizlerinden elde edilen sonuçlarda, yüzeyi PNIPAAm ile kaplanarak modifiye edilmiş PHEMA mikrot taşıyıcılarda PNIPAAm'in yapısından kaynaklanan Amid I ve Amid II bandlarının varlığı saptanmıştır. Bromlama işlemi ve ATRP reaksiyonundan sonra  $1720\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen pikin şiddetinin bromlama işleminde kullanılan 2-bromoizobütrilbromür varlığı nedeniyle arttığı görülmüştür.
- XPS analizinde PHEMA mikrokürelere ait spektrumdan elde edilen yüzey atomik bileşimi değerleri, PNIPAAm ile kaplanan PHEMA mikrot taşıyıcıların yüzey atomik bileşimi değerleri ile karşılaştırıldığında yapıya %4,8 oranında azotun katılması PHEMA mikrokürelerin PNIPAAm ile başarılı bir şekilde kaplandığını göstermiştir.
- SEM ve AFM analiz sonuçları, PNIPAAm ile kaplama sonrası, mikrot taşıyıcıların yüzey topografilerinin ve pürüzlülüklerinin önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir.

- Şişme deneylerinden elde edilen sonuçlarda, ortam sıcaklığı 4°C'den 37°C'ye çıkartıldığında PHEMA mikrot taşıyıcıların ortalama çaplarında herhangi bir değişim gözlemlenmezken, PNIPAAm kaplı mikrokürelerin ortalama çapı 238 µm'den 220 µm'ye düşmüştür. PHEMA-g-PNIPAAm mikrokürelerin sıcaklığa bağlı olarak şişme-büzüşme özelliği göstermesi, PNIPAAm'ın PHEMA mikrot taşıyıcılar üzerine başarılı bir şekilde kaplandığını göstermiştir.
- Ticari olarak temin edilen dekstran (Sephadex G50) mikrokürelerin yüzeyine ATRP yöntemiyle PNIPAAm polimeri aşıl原因arak, PNIPAAm-g-dekstran mikrot taşıyıcılar sentezlenmiştir.
- FTIR-ATR analizlerinden elde edilen sonuçlarda, yüzeyi PNIPAAm ile kaplanarak modifiye edilmiş dekstran mikrot taşıyıcıların spektrumunda 1440 cm<sup>-1</sup>'de -N-C=O grubundan kaynaklanan C-N gerilme titreşimine ait PNIPAAm'ın yapısını destekleyen karakteristik pik görülmüştür.
- XPS analizlerinden elde edilen sonuçlarda, dekstran mikrokürelere ait spektrumdan elde edilen yüzey atomik bileşimi değerleri, PNIPAAm ile kaplanan dekstran mikrot taşıyıcıların yüzey atomik bileşimi değerleri ile karşılaştırıldığında yapıya %5,8 oranında azotun katılması dekstran mikrokürelerin PNIPAAm ile başarılı bir şekilde kaplandığını göstermiştir.
- SEM ve AFM analizlerinden elde edilen sonuçlarda, dekstran ve PNIPAAm ile kaplanarak yüzeyi modifiye edilmiş dekstran mikrot taşıyıcılar için farklı yüzey topografileri ve pürüzlülük değerleri elde edilmiştir. Dekstran mikrokürelerin yüksek şişme/büzüşme özelliklerinden dolayı, ATRP tekniği ile kaplama sonrasında morfolojik açıdan değişime uğrayarak farklı bir yapı sergiledikleri görülmüştür.
- Şişme deneylerinden elde edilen sonuçlarda, ortam sıcaklığı 4°C'den 37°C'ye çıkartıldığında dekstran mikrot taşıyıcıların ortalama çaplarında herhangi bir değişim gözlemlenmezken, PNIPAAm kaplı mikrokürelerin ortalama çapı 166 µm'den 152 µm'ye düşmüştür. PHEMA-g-dekstran mikrokürelerin sıcaklığa bağlı olarak şişme-büzüşme özelliği göstermesi,

PNIPAAm'ın dekstran mikrotasıyıcılar üzerine başarılı bir şekilde kaplandığını göstermiştir.

- Ticari olarak temin edilen poli (vinil asetat-hidroksi) mikrokürelerin yüzeyine ATRP yöntemiyle PNIPAAm polimeri aşlanarak, PNIPAAm-g-PVA mikrotasıyıcılar sentezlenmiştir.
- FTR-ATR analizlerinden elde edilen sonuçlarda, yüzeyi PNIPAAm ile kaplanarak modifiye edilmiş VA-hidroksi mikrotasıyıcılarda  $1540\text{ cm}^{-1}$  ve  $1650\text{ cm}^{-1}$ 'de dalga boylarında görülen Amid I ve Amid II bandlarının varlığı PVA mikroküreler üzerinde bulunan hidroksil grupları üzerinden PNIPAAm'ın ATRP ile yüzeye kaplandığını göstermiştir.
- XPS analizlerinden elde edilen sonuçlarda, VA-hidroksi ve PNIPAAm ile kaplanarak yüzeyi modifiye edilmiş VA-hidroksi mikrokürelere ait spektrumlardaki C1s, N1s ve O1s piklerinin varlığı ve pik şiddetlerindeki değişimler karşılaştırılarak, kaplamadaki PNIPAAm varlığı kanıtlanmıştır.
- SEM ve AFM analizlerinden elde edilen sonuçlarda, VA-hidroksi ve PNIPAAm ile kaplanarak yüzeyi modifiye edilmiş VA-hidroksi mikrotasıyıcılar için farklı yüzey topografileri ve pürüzlülük değerleri elde edilmiştir.
- Şişme deneylerinden elde edilen sonuçlarda, ortam sıcaklığı  $4^{\circ}\text{C}$ 'den  $37^{\circ}\text{C}$ 'ye çıkartıldığında PVA mikrotasıyıcıların ortalama çaplarında herhangi bir değişim gözlemlenmezken, PNIPAAm kaplı mikrokürelerin ortalama çapı  $145\text{ }\mu\text{m}$ 'den  $132\text{ }\mu\text{m}$ 'ye düşmüştür. PHEMA-g-PVA mikrokürelerin sıcaklığa bağlı olarak şişme-büzüşme özelliği göstermesi, PNIPAAm'ın PVA mikrotasıyıcılar üzerine başarılı bir şekilde kaplandığını göstermiştir.
- Çalışmanın ikinci kısmında, sentezlenen mikrotasıyıcılar ile statik ve dinamik hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Statik kültür çalışmaları sonunda PNIPAAm-g-PHEMA mikrotasıyıcılar dışındaki mikrotasıyıcıların hücre yapışması ve üremesini istenilen düzeyde desteklemediği

belirlenmiştir. Bu nedenle dinamik kültür çalışmaları yalnızca PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcılar ile yürütülmüştür.

- Hücre kültür çalışmalarında farklı morfolojiye sahip 2 tür hücre hattı ( L929 fare fibroblast hücreleri ve HS2 insan keratinositleri) kullanılarak, mikrot taşıyıcılara yapışma ve yüzeyden kopma açısından hücre morfolojisinin etkisi karşılaştırılmıştır.
- L929 fare fibroblast hücreleri için üreme eğrisi oluşturulmuş; bu eğriden özgül üreme hızı  $0,02 \text{ sa}^{-1}$  ve ikilenme süresi 32 sa olarak bulunmuştur.
- HS2 insan keratinositleri için üreme eğrisi oluşturulmuş; bu eğriden özgül üreme hızı  $0,299 \text{ gün}^{-1}$  ve ikilenme süresi 55 sa olarak bulunmuştur.
- PHEMA ve PNIPAAm-g-PHEMA ile L929 fare fibroblast hücreleri kullanılarak yapılan statik hücre kültürü çalışmalarında, optik mikroskop ile yapılan incelemelerde PHEMA mikrot taşıyıcılara hücrelerin yapışmadığı, PNIPAAm ile kaplı mikrot taşıyıcılarda ise etkin bir şekilde hücre yapışmasının gerçekleştiği görülmüştür.
- Hücre morfolojisini daha iyi görmek amacıyla kristal viyole boyanması gerçekleştirilmiş ve hücrelerin mikrot taşıyıcı yüzeyinde de fibroblastik morfolojilerini korudukları belirlenmiştir.
- SEM analizlerinden elde edilen görüntülerde, L929 fibroblastlar ile inkübe edilmiş PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcı kültürlerde hücre morfolojisinin korunarak, yüksek kapasitede hücre üretimi sağlandığı görülmüştür.
- Hücreleri mikrot taşıyıcıların yüzeyinden ayırma çalışmaları PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcıların sıcaklık-duyarlık özellikleri kullanılarak yapılmıştır. Hücrelerin mikrot taşıyıcıların yüzeyinden ayrılışları optik mikroskop ile incelenmiştir.
- PHEMA ve PNIPAAm-g-PHEMA mikrot taşıyıcılar ile yapılan dinamik hücre kültürü çalışmaları karıştırmalı reaktörde epitel morfolojideki HS2 insan keratinositleri kullanılarak yürütülmüştür.

- SEM analizinden elde edilen görüntülerde, PNIPAAm-g-PHEMA mikrotasıyıcılar üzerinde üremiş olan HS2 insan keratinositlerin morfolojisi izlenmiştir.
- PNIPAAm-g-PHEMA mikrotasıyıcıların yüzeyindeki hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir. MTT testi sonuçlarına göre, en yüksek hücre canlılığı reaktör içerisindeki mikrotasıyıcılarda görülmüştür. Testle elde edilen sonuçlar, floresan görüntülerini desteklemiştir.
- Hücreleri mikrotasıyıcıların yüzeyinden ayırma çalışmaları PNIPAAm-g-PHEMA mikrotasıyıcıların sıcaklık-duyarlık özellikleri kullanılarak gerçekleştirilmiş, ayrıca tripsinizasyon yöntemi kullanılarak her iki yöntem karşılaştırılmıştır.
- Sıcaklık-duyarlı etki ile hücre yüzey etkileşimleri koparken, hücre-hücre etkileşimlerinin büyük oranda korunduğu görülmüştür. Tripsin, proteolitik etkisiyle her iki etkileşimi de bozduğundan, hücrelerin mikrotasıyıcıların yüzeyinden daha etkin bir şekilde ayrıldığı saptanmıştır.
- Mikrotasıyıcıların yüzeyinden ayrılan hücrelerin kültürleri TCPS yüzeylerde devam ettirilmiş, optik mikroskop ile elde edilen görüntülerde hücrelerin morfolojilerini devam ettirdikleri belirlenmiştir.

Sunulan tez çalışması kapsamında sentezlenen mikrotasıyıcılardan PNIPAAm-g-PHEMA mikrotasıyıcıların özellikle dinamik koşullarda hücre üretimi için uygun olduğu ve sıcaklık-duyarlık etkisi ile hücrelerin yüzeyden geri kazanımında kullanılabilecekleri sonucuna varılmıştır. Ayrıca hücre morfolojisinin de üretimi etkileyeceği tespit edilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akiyama, Y., Kikuchi, A., Yamato, M., Okano, T., 2004, Ultrathin poly(isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control, *Langmuir*, 20, 5506-5511.
- Braunecker, W. A., Matyjaszewski K., 2006, Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives, *Prog. Polym. Sci.* 32, 93-146.
- Brun-Graeppe, A. K. A. S., Richard, C., Bessodes, M., Scherman, D., Merten, O. W., 2010, Thermoresponsive surfaces for cell culture and enzyme-free cell detachment, *Prog. Polym. Sci.*, 35, 1311-1324.
- Bullett, N. A., Talib, R. A., Short, R. D., McArthur, S. L., Shard A. G., 2006, Chemical and thermo-responsive characterisation of surfaces formed by plasma polymerisation of N-isopropyl acrylamide, *Surface and Interface Analysis*, 38, 1109-1116.
- Chaterji, S., Kwon, I. K., Park, K., 2007, Smart polymeric gels: redefining the limits of biomedical devices, *Progress Polymer Science*, 32, 1083-1122.
- Chen, B., Dang, J., Tan, T. L., Fang, N., Chen, W. N., Leong, K. W., Chan, V., 2007, *Biomaterials*, 28, 1503-1514.
- Chen, B., Xu., F. J., Fang, N., Neoh, K. G., Kang, E. T., Chen, W. N., Chan, V., 2008, Engineering cell de-adhesion dynamics on thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide), *Acta Biomaterialia*, 4, 218-229.
- Edmondson, S., Osborne, V. L., Huck, W. T. S., 2003, Poymer brushes *via* surface-initiated polymerizations, 2004, *The Royal Society of Chemistry*, 33, 14-22.
- da Silva, R. M. P., Mano, J. F., Reis, L. R., 2007, Smart thermoresponsive coatings and surfaces for tissue engineering: switching cell-material boundaries, *Trends in Biotechnology*, 25(12), 577-583.
- Deng, J., Wang, L., Liu, L., Yang, W., 2009, Developments and new applications of UV-induced surface graft polymerizations, *Progress Polymer Science*, 34, 156-193.
- Drotleff, S., Lungwitz, U., Breunig, M., Dennis, A., Blunk, T., Tessmar, J., et al., 2004, Biomimetic polymers in pharmaceutical and biomedical sciences, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 385-407.
- Ergin, G., 2010, Şap virusu üretiminin dolgulu reaktörlerde araştırılması. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Fundueanu, G., Constantin, M., Bortolotti, F., Cortesi, R., Ascenzi, P., Manegatti, E., 2007, Poly[(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide-co-(hydroxyethyl-methacrylate))] thermoresponsive microspheres: An accurate method based on

solute exclusion technique to determine the volume phase transition temperature, *European Polymer Journal*, 43, 3500-3509.

Gümüşderelioğlu, M., Karakeçili, A., 2003, Uses of thermoresponsive and RGD/Insulin modified poly(vinyl ether)-based hydrogels in cell cultures, *J. Biomat. Sci:Poly. Edn.*, 14(3), 199-211.

Gümüşderelioğlu, M., Müftüoğlu, O., Karakeçili A., 2004, Biomodification of thermoresponsive copolymer of ethylene glycol vinyl ether by RGD and insulin, *React.&Funct. Poly.*, 58(2), 149-156.

He, C., Kim, S. W., Lee, D. S., 2008, In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery, *J. Controlled Release*, 127:189-207.

Hendrick, V., Muniz, E., Geuskens, G., Wérenne, J., 2001, Adhesion, growth and detachment of cells on modified polystyrene surface, 36, 49-53.

Hersel, U., Dahmen, C., Kesler, H., 2003, RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond, *Biomaterials*, 24, 4385-4415.

Higuchi, A., Yamamoto, T., Sugiyama, K., Hayashi, S., Tak, T. M., Nakagawa, T., Temperature-dependent cell detachment on pluronic gels, *Biomacromolecules*, 6, 691-696.

Isenberg, B. C., Tsuda, Y., Williams, C., Shimizu, T., Yamato, M., Okano, T., et al., 2008, A thermoresponsive, microtextured substrate for cell sheet engineering with defined structural organization, *Biomaterials*, 29, 2565-2572.

Jianguoa, L., Weia, C., Shuiab, W., Fana, O., 2001, Studies of poly(vinyl acetate-co-divinyl benzene) beads as a carrier for the immobilization of penicillin acylase and the kinetics of immobilized penicillin acylase, *Reactive&Functional Polymers*, 48, 75-84.

Kahraman, A. S., 2008, Non-manyetik lateks partiküllerin sentezi, karakterizasyonu ve doku mühendisliği uygulamaları. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Karakeçili, A. G., 2006, Mikrodesenli biyoaktif malzemelerin dizaynı, karakterizasyonu ve doku mühendisliğindeki uygulamaları. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Karakeçili, A., Satriano C., Gümüşderelioğlu, M., Marletta, G., 2008, Thermoresponsive and bioactive poly(vinyl ether)-based hydrogels photochemically immobilized by RGD, *Radiation Physics&Chemistry*, 77(2), 154-161.

Kato, D., Takeuchi, M., Sakurai, T., Furukawa, S., Mizokami, H., Sakata M., Hirayama, C., Kunitake, M., 2003, The design of polymer microcarrier surfaces for enhanced cell growth, 24, 4253-4264.

- Kim, D. J., Heo, J-Y., Kim, K. S., Insung S. Choi, I., 2003, Formation of thermoresponsive poly(Nisopropylacrylamide)/dextran particles by atom transfer radical polymerization, *Macromol. Rapid Commun.*, 24, 517-521.
- Kim, M. R., Jeong, J. H., Park, T. G., 2002, Swelling induced detachment of chondrocytes using RGD-modified poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel beads. *Biotechnol. Prog.*, 18, 495-500.
- Kikuchi, A., Okano, T., 2005, Nanostructured designs of biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs, *Journal of Controlled Release*, 101-115.
- Klouda, L., Mikos, A. G., 2007, Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 34-45.
- Kong, B., Choi, J. S., Jeon, S., Choi, I.S., 2009, The control of cell adhesion and detachment on thin films of thermoresponsive poly[(N-isopropylacrylamide)-r- ((3-(methacryloylamino)propyl)-dimethyl(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide)], 30, 5514-5522.
- Kopecek, J., 2007, Hydrogel biomaterials: a smart future?, *Biomaterials*, 28, 5185-5192.
- Kopecek, J., Yang, J., 2007, Hydrogels as smart biomaterials, *Polym. Int.*, 56, 1078-1098.
- Kuckling, D., 2009, Responsive hydrogel layers-from synthesis to applications, *Colloid Polymer Science*, 287, 881-891.
- Kushida, A., Yamato, M., Kikuchi, A., Okano, T., 2001, Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: the noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces, *J. Biomed Mater. Res.*, 54, 37-46.
- Li, L., Zhu, Y., Li, B., Gao, C., 2008, Fabrication of thermoresponsive polymer gradients for study of cell adhesion and detachment, *Langmuir*, 24, 13632-13639.
- Langer, R., Vacanti J.P., 1993, Tissue engineering, *Science*, 260, 920-926.
- Lanza R. P., Langer L., Vacanti J., 2000, Principles of Tissue Engineering, Academic Press, 9p.
- Malda, J. et al., 2003, Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances differentiation, *Tissue Engineering*, 9, 939-948.
- Malda, J., Frondoza C.G., 2006, Microcarriers in the engineering of cartilage and bone. *Trends in Biotechnology*, 24, 299-304.
- Maroudas, N.G., Schmitt C.M., 1973, Anchorage-dependent embryo cells. *Cell Differentiation*, 2(4), 243-246.

Matrab, T., Chancolon, J., L'hermite M. M., Rouzaud, J-N., Deniau, G., Boudou, J-P, Chemimi, M. M., Michel Delamar, M., 2006, Atom transfer radical polymerization (ATRP) initiated by aryl diazonium salts: a new route for surface modification multiwalled carbon nanotubes by tethered polymer chains, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 287, 217-221.

Matyjaszewski, K., 1996, Controlled Radical Polymerization, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 1, 769-776.

Min, K., Hu, J., Wang, C., Elaissari, A., 2002, Surface modification of polystyrene latex particles via atom transfer radical polymerization, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 40, 892-900.

Mittal, V. et al., 2007, Synthesis of temperature-responsive polymer brushes from polystyrene latex particles functionalized with ATRP initiator, *European Polymer Journal*, 43, 4868-4881.

Mizutani, A., Kikuchi, A., Yamato, M., Kanazawa, H., Okano, T., 2008, Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells, *Biomaterials*, 29, 2073-2081.

Moran, M. T., Carroll, W. M., Selezneva, I., Gorelov, A., Rochev, Y., 2007, Cell growth and detachment from protein-coated PNIPAAm-based copolymers, *J. Biomed Mater. Res., Part A(81A)*, 870-876.

Müftüoğlu O., 2001, Sıcaklık-duyarlı hidrojellerin biyomodifikasyonu ve hücre kültür teknolojisindeki uygulamaları. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Nagase, K., Kobayashi, J., Okano, T., 2009, Temperature-responsive intelligent interfaces for biomolecular separation and cell sheet engineering, *J. R. Soc. Interface*, 6, 293-309.

Newman K. D., McBurney M. W., 2004 Poly(D-,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres as biodegradable microcarriers for pluripotent stem cells., *Biomaterials*, 25, 5763-5771.

Nilsson K., Buzsaky, F., Mosbach, K., 1986, Growth of anchorage-dependent cells on macroporous microcarrier, *Biol. Technol.*, 4, 989-990.

Okano, T., Yamada N., Sakai H., Sakurai. Y., 1993, A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide), *J. Biomed Mater. Res.*, 27, 1243-1251.

Reis R. L., Mano J.F., da Silva R. M. P., 2007, Smart thermoresponsive coatings and surfaces for tissue engineering: switching cell-material boundaries. *Trends in Biotechnology*, 25, 577-583.

Reuveny, S., 1990, Microcarrier culture systems, *Bioprocess Technol.*, 10, 271-341.

Roy, I., Gupta, M. N., 2003, Smart polymeric materials: emerging biochemical applications, *Chem. Biol.*, 10, 1161-1171.

San Antonio, J. D., Lander, A. D., Wright, T. C., Karnovsky, M. J., 1992, Heparin inhibits the attachment and growth of balb/c-3-3 fibroblasts on collagen substrates, *J Cell Physiol*, 150, 8-16.

Seal, B. L., Otero T. C., 2001, Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, *Materials Science and Engineering*, 34, 147-230.

Shin, H., Jo, S., Mikos, A. G., 2003, Biomimetic materials for tissue engineering, *Biomaterials*, 24, 4353-4364.

Silva, G. A., Ducheyne, P., Reis, R. L., 2007, Materials in particulate form for tissue engineering. 1. Basic concepts, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1, 4-24.

Salata, O. V., 2004, Applications of nanoparticles in biology and medicine, *Journal of Nanobiotechnology*, 2, 1-6.

Schmaljohann, D., Oswald, J., Jorgensen, B., Nitschke, M., Beyerlein, D., Werner, C., 2003, Thermo-responsive PNIPAAm-g-PEG films for controlled cell detachment, *Biomacromolecules*, 4, 1733-1739.

Stile, R. A., Healy, K. E., 2001, Thermo-responsive peptide-modified hydrogels for tissue regeneration, *Biomacromolecules*, 2, 185-194.

Takamatsu, H., Uchida, S., Matsuda, T., 2008, In-stu harvesting of adhered target cells using thermoresponsive substrate under a microscope: Principle and instrumentation, *Journal of Biotechnology*, 134, 297-304.

Tanaka, F., Koga, T., Winnik, F., 2008, Temperature-responsive polymers in mixed solvents: competitive hydrogen bonds cause cononsolvency, *Phys. Rev. Lett.*, 101, 28302.

van Der Velden-De Groot, C.A.M., 1995, Microcarrier technology, present status and perspective, *Cytotechnology*, 18, 51-56.

van Wezel A. L., 1967, Growth of cell strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture, *Nature*, 216, 64-65.

Véliz, E. C., Rodriguez G., Cardero, A. F., 2008, Bioreactors for animal cells, *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, Castilho, L. R., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler, M. (eds), Taylor & Francis Group, New York, 221-258.

Vivek, A. V., Dhamodharan, R., 2008, Amphibilic polystyrene-*graft*-poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl-methacrylate) hydrogels synthesized via room temperature ATRP: Studies on swelling behaviour and dye sorption, *Reactive&Functional Polymers*, 68, 967-973.

Wang, C., Gong, Y., Zhong, Y., Yao, Y., Su, K., Wang, D., 2009, The control of anchorage-dependent cell behaviour within a hydrogel/microcarrier system in an osteogenic model, *Biomaterials*, 30, 2259-2269.

Watanabe, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Yang, J., Kikuchi, A., Okano, T., et al., 2007, Development of transplantable genetically modified corneal epithelial cell sheets for gene therapy, *Biomaterials*, 28, 745-749.

Webb, K., Hlady, V., Tresco P. A., 2000, Relationships among cell attachment, spreading, cytoskeletal organization, and migration rate for anchorage-dependent cells on model surfaces, *J. Biomed Mater. Res.*, 49, 362-368.

Xu, F. J., Neoh, K.G., Kang, E. T., 2009, Bioactive surfaces and biomaterials via atom transfer radical polymerization, *Progress in Polymer Science*, 34, 719-761.

Xu, F. J. et al., 2006, Thermoresponsive comb-shaped copolymer-Si(100) hybrids for accelerated temperature-dependent cell detachment, *Biomaterials*, 27, 1236-1245.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hediye Özgen TİMUÇİN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1977

Medeni Hali : Bekar

### Eğitim:

Lise : 1991-1994 Ankara Ayrancı Lisesi

Lisans : 1994-2001 Hacettepe Üniversitesi Mühendislik  
Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

### İş Tecrübesi:

2004- 2007 Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel  
Müdürlüğü İstanbul İl Kontrol Laboratuvarı (Mühendis)

2007-2008 Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar  
Genel Müdürlüğü Zirai Mücadele Merkez Araştırma  
Enstitüsü (Mühendis)

2008-Devam Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Sağlığı ve  
Güvenliği Genel Müdürlüğü İş Sağlığı ve Güvenliği  
Merkez Müdürlüğü (Mühendis)