

**DOLGULU YATAK BİYOREAKTÖRDE MEZENKİMAL
KÖK HÜCRE ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF MESENCHYMAL STEM CELL
EXPANSION IN PACKED BED BIOREACTOR**

MUSTAFA CANER KARAASLAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ İŞİL GERÇEK BEŞKARDEŞ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

ÖZET

DOLGULU YATAK BİYOREAKTÖRDE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa Caner KARAASLAN

Yüksek lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Işıl GERÇEK BEŞKARDEŞ

Eş Danışman: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Ağustos 2020, 98 sayfa

Bu çalışma ‘Dolgu Yatak Biyoreaktörde Mezenkimal Kök Hücre Üretiminin Araştırılması’ başlıklı Tez Projesi kapsamında (FYL-2018-17349 nolu) Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Tez çalışmasında, dokunmamış poliester fiber matrislerin (NWPF) taşıyıcı olarak kullanıldığı dolgu yatak biyoreaktörde mezenkimal kök hücre üretiminin araştırılması amaçlanmıştır. Ön çalışmalarda hücre olarak MC3T3-E1 fare kemik öncül hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerin NWPF diskler üzerine yapışmasını sağlamak amacıyla 3M sülfürik asit ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Disklerin hidrofilitesi su temas açısı analizi ile belirlenmiştir. Ardından NWPF disklerle durgun koşullarda hücre kültürü çalışması yapılmış, hücrelerin diskler üzerine yapışıp çoğaldığı Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonraki aşamasında MC3T3-E1 hücreleri ile 0.5L çalışma hacmine sahip dolgu yatak biyoreaktörde (DYB), Fibra-Cel® diskler kullanılarak ön dinamik hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kültürün 1., 3., 5., ve 7. günlerinde disklerden kaldırılan hücreler sayılmış ve kültür sonunda hücre sayısının

biyoreaktörde yaklaşık 5 kat arttığı gözlemlenmiştir. Biyoreaktör için çalışma koşulları belirlendikten sonra, deneylere sıçan adipoz mezenkimal kök hücreler (AdMKH) ile devam edilmiştir. Biyoreaktörde dolgulu yatak yüksekliği, karıştırma hızı ve hücre ekim yoğunluğu gibi farklı işletim parametrelerinin hücrelerin üretim verimine olan etkileri incelenmiştir.

Biyoreaktörde hücre üretim verimini artırmak ve malzeme sarfını azaltarak üretimi daha ekonomik hale getirmek amacıyla biyoreaktörün ölçeği küçültülmüş ve 100 mL hacminde bir DYB tasarımı gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasının son aşamasında AdMKH'ların NWPF diskler üzerindeki canlılığı MTT 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analizi ile, morfolojileri F-aktin/DAPI ve kristal viyole boyamaları ile incelenmiştir. Yüz mL hacimli DYB'de yapılan dinamik kültür sonucunda hücre sayısının 4 kat artış gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, NWPF disklerden hücrelerin %85'inin başarılı bir şekilde kaldırıldığı gözlemlenmiştir. Yüzeiden kaldırılan hücreler tekrar başarılı bir biçimde çoğaltılmıştır. Hücrelerin metabolik aktivitelerinin incelenmesi amacıyla glukoz, laktat ve üre analizi gerçekleştirilmiştir. Kültür süresince belirli günlerde ortamın %50'si değiştirilmesine rağmen glukoz konsantrasyonu kültür başlangıcına göre 2.5 kat azalmıştır. Glukoz konsantrasyonunun düşmesine bağlı olarak ortamda laktat ve üre konsantrasyonları sırasıyla 2 kat ve 5 kat artış göstermiştir. Elde edilen sonuçlardan dinamik hücre kültüründe biriken laktat ve üre konsantrasyonlarına bağlı inhibisyon oluşmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak sunulan tez kapsamında sıçan AdMKH'lerin üretilmesi için üç boyutlu NWPF disklerin kullanıldığı dolgulu yatak biyoreaktörün yüksek yüzey alanı/hacim oranı sağlayarak klinik uygulamalarda ihtiyaç duyulan yüksek miktarda hücre sayısına ulaşma potansiyeline sahip olduğu değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Dinamik hücre kültürü; Dolgulu yatak biyoreaktör; Mezenkimal kök hücre (MKH); Fibra-Cel®; Polietilen tereftalat (PET); Dokunmamış poliester fabrik (NWPF).

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MESENCHYMAL STEM CELL EXPANSION IN PACKED BED BIOREACTOR

Mustafa Caner KARAASLAN

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Asst. Prof. Işıl Gerçek BEŞKARDEŞ

Co-Supervisor: Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Agust 2020, 98 pages

This study was financially supported by Hacettepe University Scientific Research Project Coordination Unit with the project entitled “Investigation of Mesenchymal Stem Cell Expansion In Packed Bed Bioreactor” (FYL-2018-17349).

In the thesis study, it was aimed to investigate mesenchymal stem cell production in packed bed bioreactor where non-woven polyester fiber matrices (NWPF) are used as carrier. In the preliminary studies, MC3T3-E1 mouse pre-osteoblastic cells were used. Surface modification was carried out with 3M sulfuric acid in order to allow the cells to adhere to non-woven polyester fabric discs. The hydrophilicity of the discs was determined by water contact angle analysis. For this purpose, a cell culture study was performed with NWPF discs in static conditions, and the cells were adhered to the discs and evaluated by Scanning Electron Microscope (SEM).

In the next stage of the study, preliminary dynamic cell culture studies were performed in the packed bed bioreactor (PBB) with MC3T3-E1 cells with a working volume of 0.5L, using Fibra-Cel[®] discs. Cells removed from discs on Day 1, 3, 5, and 7 of the culture were

counted, and at the end of the culture, it was observed that the number of cells increased approximately 5-fold in the bioreactor. After carrying out bioreactor optimization, studies were performed with rat adipose mesenchymal stem cell (rAdMSC). The effects of different operating parameters such as packed bed height, mixing speed and cell seeding density in the bioreactor on the production efficiency of the cells were investigated.

In order to increase the cell production efficiency in the bioreactor and reduce the production of material and make the production more economical, the scale of the bioreactor was reduced and a PBB design with a volume of 100mL was designed. In the last part of the thesis study, the viability of rat adipose mesenchymal stem cells on NWPF discs were investigated by MTT 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] - 2,5-diphenyltetrazolium bromide) analysis, and their morphologies were F-actin / DAPI and crystal violet staining. As a result of the dynamic culture, the number of cells increased 4 times. Cell removal was carried out to examine the morphology of cells after removal from NWPF discs. It has been observed that 85% of cells have been successfully removed from disks. For this purpose, the culture was successfully continued by adding the cells removed to 75 cm² flask. Glucose, lactate and urea analysis were performed to examine the metabolic activities of the cells. Although 50% of the medium was changed on certain days during the culture period, the number of cells increased continuously and the glucose concentration decreased 2.5-fold compared to the beginning of the culture. Due to the decrease in glucose concentration, lactate and urea concentrations in the medium increased 2-fold and 5-fold, respectively. From the obtained results, it was determined that there was no inhibition due to the lactate and urea concentrations accumulated in the dynamic cell culture.

As a result, the dynamic cell culture made in PBB within the scope of the presented thesis showed that rat AdMKHs are attached to the fibers of NWPF disks and spread to all regions and have the potential to reach the number of cells needed in clinical applications.

Key Words: Dynamic cell culture; Packed bed bioreactor (PBB); Mesenchymal Stem Cells (MSC's); Fibra-Cel[®]; Polyethylene terephthalate (PET); Nonwoven polyester fabric (NWPF).

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında destekleri ve katkıları ile yol gösteren, tez çalışmalarım boyunca bana gösterdiği sabır ve anlayışla yanımda olan ve beni çalışmaya teşvik eden danışmanım **Dr. Öğr. Üyesi Işıl GERÇEK BEŞKARDEŞ**'e,

Tez çalışmalarım ve deneylerim süresince benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle her daim bana yol gösteren, asilliği, duruşu, karakteri, eğitimci kişiliği ve insani yönü ile hayatımın her alanında kendime örnek aldığım, öğrencisi olmaktan her zaman büyük gurur ve mutluluk duyduğum, bana araştırma grubunda yüksek lisans yapma olanağı sağlayan Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu yürütücümüz ve eş danışmanım değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

FYL-2018-17349 numaralı Hızlı destek Projesi kapsamında çalışmalarımda maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi**'ne,

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerini paylaştan **Dr. Öğr. Üyesi Soner ÇAKMAK** hocam'a ve **Özge Ekin AKDERE**'ye, çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşım **FAYİT PHURKAT**'a,

Zor dönemlerimde her zaman psikolojik destek sağlayan ve yardımını esirgemeyen **Gökçe MÜLAZIMOĞLU**'na, birlikte olmaktan ve çalışmaktan mutluluk duyduğum **Burcu SARIKAYA, Tülay Selin ERTEKİN, Demet ÇAKIR, Sümeyra Nur TURGUT, Sena KOÇ** olmak üzere **Hacettepe Üniversitesi Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu**'nu oluşturan tüm çalışma arkadaşlarıma,

Çalışmalarım boyunca beni her zaman destekleyen teyzem **Songül DALCI**'ya, Glukoz, laktat ve üre analizlerimi yapmak için olanak sağlayan İbni Sina Hastanesi Öğretim üyesi sayın **Prof. Dr. Berrin İmge ERGÜDER** hocama,

Hayatımı anlamlı kılan ve eğitim hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, hedeflerim doğrultusunda ilerlemem için olanak sağlayan, çocukları olmaktan gurur duyduğum annem **Seher KARAASLAN**, babam **Osman KARAASLAN** ve neşe kaynağım **Alisa GARİP**'in annesi ablam **Cansu GARİP**'e

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa Caner KARAASLAN

Ağustos 2020, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kök Hücre.....	4
2.1.1.Kök Hücre Kaynakları ve Sınıflandırılması.....	4
2.2 Mezenkimal Kök Hücreler.....	7
2.2.1 Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları.....	7
2.3 Hücresel Tedavi.....	11
2.3.1 MKH'lerin Kemik ve Kıkırdak Doku Hastalıklarında Kullanımı.....	11
2.3.2 MKH'lerin Kardiyovasküler Hastalıklarda Kullanımı.....	12
2.3.3 MKH'lerin Karaciğer Hastalıklarında Kullanımı.....	12
2.3.4 MKH'lerin Kanser Hastalıklarında Kullanımı.....	13
2.3.5 MKH'lerin Tip 1 Diyabet Hastalığında Kullanımı.....	13
2.4 Mezenkimal Kök Hücre Üretim Prosesleri.....	14
2.4.1 İki Boyutlu Hücre Kültürü.....	14
2.4.2 Üç Boyutlu Hücre Kültürü.....	15
2.4.3 Hücre Üretiminde Biyoreaktör Kullanımının Avantajları.....	15
2.4.4 Hücre Üretiminde Kullanılan Biyoreaktörler.....	16
2.4.5 Biyoreaktör Alt Akım İşlemleri.....	22
2.4.6 Mikrotaşyıcı Teknolojisi.....	22

2.4.7 Üç Boyutlu Dokunmamış Poliester Fabrik (NWPF).....	26
3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	28
3.1 Kullanılan Malzemeler.....	28
3.2 PET Fiber Matrikslerin Yüzey Modifikasyonu ve Karakterizasyon Çalışmaları .	30
3.2.1 Yüzey Modifikasyonları.....	30
3.2.2 Çekme Testi.....	30
3.2.3 Su Temas Açısı Analizi.....	32
3.2.4 SEM ve EDS Analizleri.....	32
3.3 Statik Hücre Kültürü Çalışmaları.....	32
3.3.1 MTT Analizi.....	32
3.3.2 Hücre Sayımı.....	33
3.4 Dinamik Ön Hücre Kültürü Çalışmaları.....	33
3.4.1 MTT Aanalizi.....	35
3.4.2 Hücre Sayısının Belirlenmesi.....	35
3.5 Küçük Ölçekli Dolgulu Yatak Biyoreaktör Çalışmaları.....	38
3.5.1 Küçük Ölçekli Dolgulu Yatak Biyoreaktör Tasarımı.....	38
3.6 Durgun Hücre Kültürü Çalışmaları.....	39
3.7 Dinamik Hücre Kültürü Çalışmaları.....	39
3.7.1 MTT Analizi.....	40
3.7.2 Hemositometrik Sayım ve Hücre Kaldırma Çalışmaları.....	40
3.7.3 NWPF Diskleri Boyama.....	41
3.8 AdMKH Karakterizasyonu.....	42
3.9 Glukoz, Laktat ve Üre Analizi.....	42
3.10 İstatistiksel Analiz.....	42
4.DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	43
4.1 NWPF Disklerin Modifikasyonu.....	43
4.1.1 Su Temas Açısı Tayini.....	43

4.1.2 SEM ve EDS Analizi.....	44
4.1.3 Çekme Testi.....	50
4.2 Durgun Hücre Kültürü Ön Çalışmaları.....	51
4.3 Dinamik Hücre Kültürü Ön Çalışmaları.....	55
4.3.1 Fibra-Cel® ve NWPf Disklerin DAPI/F-Aktin Boyamaları.....	59
4.4 AdMKH Statik ve Dinamik Kültür Çalışması.....	63
4.4.1 Akış Sitometrisi Analizi.....	63
4.4.2 AdMKH Dinamik Hücre Kültürü Çalışması.....	64
4.4.3 Dinamik Kültür Sonrası Kök Hücrelerin Karakterizasyonu.....	73
5. GENEL SONUÇLAR.....	87
KAYNAKLAR.....	90
EKLER.....	96
ÖZGEÇMİŞ.....	97

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1 Erişkin mezenkimal kök hücrelerin kaynakları ve farklılaşabilecekleri hücre tipleri	8
Şekil 2.2 Tek tabakalı kültürde farklılaşmamış mezenkimal kök hücre kültürü (A), osteojenik farklılaşma (B), adipojenik farklılaşma (C), kondrojenik farklılaşma (D) ve (E)	9
Şekil 2.3 Tek tabaka kültürlerde kullanılan T25, T75 ve T175 cm ² flasklar	15
Şekil 2.4 Döner şişe biyoreaktörün şematik görünümü	16
Şekil 2.5 Perfüzyon biyoreaktör sisteminin şematik gösterimi	17
Şekil 2.6 Hollow-fiber biyoreaktörün şematik görünümü	18
Şekil 2.7 Dolgulu yatak biyoreaktörün şematik gösterimi	19
Şekil 2.8 500,000 hücre ekilmiş Cytodex 1 mikrotarıyıcıların DAPI (mavi) ve bir konjüge sekonder antikor (yeşil) ve Texas Red-X phalloidin ile saptanan α -sarkomerik aktin antikorunu kullanılarak floresan boyaması, her bir ölçek 100 μ m temsil etmektedir (A), F-actin ile boyanmış Cytodex 1 mikrotarıyıcıların taramalı taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, ilk iki resim ölçeği 100 μ m, son resim ölçeği 50 μ m temsil etmektedir (B), Farklı hücrelerin birleştirilmiş floresan boyamaları, her bir ölçek 100 μ m temsil etmektedir (C)	25
Şekil 2.9 PET sentez reaksiyonu.....	26
Şekil 3.1 Dolgulu yatak biyoreaktörün şematik görünümü	33
Şekil 3.2 Dolgulu yatak biyoreaktörün kurulumu, a) Disklerin steril olarak sepete yerleştirilmeye hazırlanması işlemi, b) Disklerin sepete steril yerleştirilmesi, c) Sepetin steril hazırlanması, d) Hücreler ve ortamın biyoreaktöre steril aktarımı.	34
Şekil 3.3 Dolgulu yatak biyoreaktör tasarımına ilişkin fotoğraflar, Sepetin tasarımı (a), biyoreaktör içine yerleştirilmesi (b)	39
Şekil 3.4 Ekipmanları ile birleştirilmiş küçük ölçekli dolgulu yatak biyoreaktör (a), Kültürün başlatılması (b).....	40
Şekil 4.1 Grup 0- Kontrol grubu örneklere ait SEM görüntüleri: a) 1000x, b) 5000x c) 1000x büyütme.....	45
Şekil 4.2 Grup 1-H ₂ SO ₄ (+) ile muamele edilmiş örneklere ait SEM görüntüleri: a) 10000x, b) 5000x, c) 1000x büyütme.....	45

Şekil 4.3 Grup 2- Fibra-Cel® örneklerine ait SEM görüntüleri a) 5000x, b) 1000x, c) 500x büyütmeleer.....	45
Şekil 4.4 Grup 3-H ₂ SO ₄ (+) sonikasyon yapılmış örneklere ait SEM görüntüleri: a) 5000x, b) 1000x, c) 250x büyütmeleer.....	46
Şekil 4.5 Grup 4-H ₂ SO ₄ (+) kürlenmiş örneklere ait SEM görüntüleri: a) 10000x, b) 5000x, c) 1000x büyütmeleer.....	46
Şekil 4.6 Grup 0 örneklere ait EDS analizi sonuçları	47
Şekil 4.7 Grup 1- H ₂ SO ₄ (+) örneklerine ait EDS analizi sonuçları	47
Şekil 4.8 Grup 2- Fibra-Cel® örneklerine ait EDS analizi sonuçları.....	48
Şekil 4.9 Grup 3- H ₂ SO ₄ (+) sonikasyon yapılmış örneklere ait EDS analizi sonuçları..	48
Şekil 4.10 Grup 4- H ₂ SO ₄ (+) kürlenmiş örneklere ait EDS analizi sonuçları	49
Şekil 4.11 Kontrol grubu, Grup 1, Grup 3 ve Grup 4 malzemelere ait gerilim-zaman grafiği.	50
Şekil 4.12 PET fiber matrisler üzerinde üreyen hücrelerin durgun kültürde mitokondriyel aktivitelerinin zamanla değişimi. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, Grup 0 kontrol grubu için NWPf disk iken * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001).	51
Şekil 4.13 Grup 0 -Kontrol grubu örneklerine ait SEM görüntüleri (4.gün): a) 5000x, b) 1000x, c) 500x büyütmeleer.....	53
Şekil 4.14 Grup 0 -Kontrol grubu örneklerine ait SEM görüntüleri (11.gün): a) 5000x, b) 1000x, c) 500x büyütmeleer.....	53
Şekil 4.15 Grup 1- H ₂ SO ₄ (+) örneğine ait SEM görüntüsü (4.gün): a) 5000x, b) 1000x, c) 500x büyütmeleer.....	53
Şekil 4.16 Grup 1- H ₂ SO ₄ (+) örneğine ait SEM görüntüsü (11.gün): a) 5000x, b) 1000x, c) 500x büyütmeleer.....	54
Şekil 4.17 Grup 2- Fibra-Cel® örneklerine ait SEM görüntüleri (4.gün): a) 5000x, b)1000x, c) 500x büyütmeleer	54
Şekil 4.18 Grup 2- Fibra-Cel® örneklerine ait SEM görüntüleri (11. gün): a) 10000x, b) 5000x, c) 1000x büyütmeleer.....	55
Şekil 4.19 Farklı işletim koşullarında gerçekleştirilen dinamik kültüre ait MC3T3 hücreleri MTT grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmemiştir.)	56
Şekil 4.20 Fibra-Cel® matrisler üzerinde 100 mL hacimli DYB’de dinamik koşullarda 3x10 ⁷ MC3T3-E1 hücre/ reaktör yoğunluğunda üreyen hücrelerin MTT grafiği.	

(İstatistiksel olarak anlamlı farklılık $n=3$, 0.gün Fibra-Cel [®] disk iken *** $p<0.01$).....	58
Şekil 4.21 100 mL hacimli DYB’de 3×10^4 MC3T3 hücre sayısına ait Fibra-Cel [®] disklerin 0.gün DAPI boyamaları sırasıyla 10x (a, b, c) (bar:200 μm) ve 20x (d, e, f) (bar:100 μm)büyütmeler.....	60
Şekil 4.22 100 mL hacimli DYB’de 4×10^4 MC3T3 hücre sayısına ait Fibra-Cel [®] disklerin 1.gün DAPI boyamaları sırasıyla 10x (a, b, c) (bar:200 μm) ve 20x (d, e, f) (bar:100 μm) büyütmeler.....	60
Şekil 4.23 100 mL hacimli DYB’de 6.5×10^4 MC3T3 hücre sayısına ait Fibra-Cel [®] disklerin 3.gün DAPI boyamaları sırasıyla10x (a, b, c) (bar:200 μm) ve 20x (d, e, f) (bar:100 μm) büyütmeler.....	61
Şekil 4.24 100 mL hacimli DYB’de 7.8×10^4 MC3T3 hücre sayısına ait Fibra-Cel [®] disklerin 5.gün DAPI boyamaları sırasıyla 10x (a, b, c) (bar:200 μm) ve 20x (d, e, f) (bar:100 μm) büyütmeler.....	61
Şekil 4.25 100 mL hacimli DYB’de 12×10^4 MC3T3 hücre sayısına ait Fibra-Cel [®] disklerin 7.gün DAPI boyamaları sırasıyla 10x (a, b, c) (bar:200 μm) ve 20x (d, e, f) (bar:100 μm) büyütmeler.....	62
Şekil 4.26 7. gün hücre kaldırma çalışması sonrası Fibra-Cel [®] disklerin DAPI boyama görüntüleri sırasıyla 10x (a, b, c) (bar:200 μm) ve 20x (d, e, f) (bar:100 μm) büyütmeler.....	62
Şekil 4.27 AKH’lere ait akış sitometrisi analizi sonuçları (Yeşil ve mor histogramlar sırasıyla kontrol ve yüzey IgG işaretleyicileri)	64
Şekil 4.28 100 mL hacimli DYB’de 0.7×10^5 AdMKH hücre sayısına ait NWPF disklerin 1.gün DAPI boyamaları sırasıyla 4x (a, b), 10x (c, d) ve 20x (e, f) büyütmeler.	66
Şekil 4.29 100 mL hacimli DYB’de 1.4×10^5 AdMKH hücre sayısına ait NWPF disklerin 1.gün DAPI boyamaları sırasıyla 4x (a, b), 10x (c, d) ve 20x (e, f) büyütmeler.	67
Şekil 4.30 100 mL hacimli DYB’de 0.7×10^5 AdMKH hücre sayısına ait NWPF disklerin 1.gün F-aktin boyamaları sırasıyla 4x (a, b), 10x (c, d) ve 20x (e, f) büyütmeler.	68
Şekil 4.31 100 mL hacimli DYB’de 1.4×10^5 AdMKH hücre sayısına ait NWPF disklerin 7.gün F-aktin boyamaları sırasıyla 4x (a, b), 10x (c, d) ve 20x (e, f) büyütmeler	69

Şekil 4.32 100 mL hacimli DYB’de 0.7×10^5 AdMKH hücre sayısına ait NWPF disklerin 1.gün DAPI/F-aktin boyamaları sırasıyla 4x (a, b), 10x (c, d) ve 20x (e, f) büyütmeleler.	70
Şekil 4.33 100 mL hacimli DYB’de 1.4×10^5 AdMKH hücre sayısına ait NWPF disklerin 7.gün DAPI/F-aktin boyamaları sırasıyla 4x (a, b), 10x (c, d) ve 20x (e, f) büyütmeleler	71
Şekil 4.34 100 mL hacimli DYB’de dinamik koşullarda gerçekleştirilen NWPF diskler üzerinde üreyen AdMKH lerin MTT grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık $n=3$, 0.gün NWPF disk iken *** $p<0.001$).	72
Şekil 4.35 DYB’de NWPF disklerde üreyen sıçan AdMKH üreme eğrisi (a), TCPS kaplarda üretilen sıçan AdMKH’lerin üreme eğrisi (b).....	75
Şekil 4.36 NWPF disklere ait dinamik kültür DAPI Boyamaları a) 4x, b) 10x, c) 20x büyütmeleler.	77
Şekil 4.37 NWPF disklere ait dinamik kültür F-aktin Boyamaları a) 4x, b) 10x, c) 20x büyütmeleler.	78
Şekil 4.38 NWPF disklere ait dinamik kültür DAPI/FA Boyamaları a) 4x, b) 10x, c) 20x büyütmeleler	79
Şekil 4.39 DYB’den alınan NWPF disklerden kaldırılan 8. pasaj AdMKH’lerin 75 cm ² flastaktaki görüntüsü 10x büyütmeleler a) 1.gün, b) 7.gün.	80
Şekil 4.40 DYB’den alınan NWPF disklerden kaldırılan 8. pasaj AKH’lerin Petri kabındaki DAPI/F-aktin görüntüsü a) 4x, b) 10x, c) 20x büyütmeleler.	81
Şekil 4.41 DYB’den alınan NWPF disklerden kaldırılan 8.pasaj AKH’lerin Petri kabındaki kristal viyole boyamaları a) 10x, b) 20x büyütmeleler.	81
Şekil 4.42 DYB’den kaldırılan dinamik kültür sonrası sıçan adipoz MKH’lerin MTT grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık $n=3$, kontrol 1.gün iken * $p<0.05$, *** $p<0.001$).	82
Şekil 4.43 DYB’de NWPF diskler kullanılarak gerçekleştirilen dinamik kültüre ait glukoz-laktat-üre konsantrasyonlarının zamanla değişimi. (Grafikteki dalgalanma 5. ve 10.günde gerçekleştirilen %50 oranında taze besi ortamı eklenmesinden kaynaklanmaktadır).....	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Farklı kök hücre kaynaklarından elde edilen MKH'lerin çeşitli klinik öncesi ve klinik çalışmalarının ilerleme evreleri	14
Çizelge 2.2 Hücre üretim biyoreaktörlerinin mühendislik parametrelerinin karşılaştırılması.....	20
Çizelge 2.3 Mezenkimal kök hücre üretiminde litre ölçekli biyoreaktörler	21
Çizelge 2.4 Mikrot taşıyıcıların üretici firmaları ve özelliklerinin listesi.....	24
Çizelge 3.1 Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların özeti	29
Çizelge 3.2 Tez çalışması kapsamında PET fiber matrislere uygulanan yüzey modifikasyonları.....	31
Çizelge 3.3 FibraCel® disk taşıyıcıya ait bilgiler.....	35
Çizelge 3.4 Biyoreaktör ile yapılan ön çalışmalara ait koşullar	37
Çizelge 4.1 Çalışma kapsamındaki disk analizlerine ait toplu sonuçlar	49
Çizelge 4.2 PET fiber matris üzerinde disk başına üreyen hücre sayısının zamanla değişimi	52
Çizelge 4.3 Farklı işletim koşullarında gerçekleştirilen dinamik kültür çalışmasına ait hücre sayısının zamanla değişimi.....	57
Çizelge 4.4 100 mL hacimli DYB'de Fibra-Cel taşıyıcılar üzerinde dinamik koşullarda üreyen hücrelerin disk başına düşen hücre sayısının zamanla değişimi....	59
Çizelge 4.5 100 mL hacimli DYB'de NWPF disklerden dinamik koşullarda elde edilen AdMKH'lerin disk başına hücre sayısının zamanla değişimi.	65
Çizelge 4.6 100 mL hacimli DYB'de NWPF disklerden dinamik koşullarda elde edilen AdMKH'lerin disk başına hücre sayısının zamanla değişimi.	73
Çizelge 4.7 DYB'de NWPF diskler ile gerçekleştirilen dinamik kültüre ait zamanla değişen verim faktörleri $Y_{lac/glu}$ ve $Y_{üre/glu}$	86

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C	Karbon
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
μ	Özgül üreme hızı
μm	Mikrometre
mm	Milimetre
mM	mmol/L
mL	Mililitre
ng	nanogram
O	Oksijen
rpm	Dakikadaki devir sayısı
S	Kükürt
sa	Saat
s	Saniye
t_d	İkilenme süresi
q_{glu}	Özgül glukoz tüketim hızı
q_{lak}	Özgül laktat üretim hızı
$q_{\text{üre}}$	Özgül üre üretim hızı

Kısaltmalar

α -MEM	Minimum esansiyel Eagle ortamı α modifikasyonu
2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
AdMKH	Adipoz mezenkimal kök hücre
DAPI	4, 6 Diamidino-2-fenilindol
DPBS	Dulbecco's fosfat tampon çözeltisi
DYB	Dolgulu yatak biyoreaktör
EKH	Embriyonik kök hücre
ECM	Hücre dışı matris
EDS	Enerji dağılımlı X-ray spektroskopisi
FBS	Fetal sığır serumu
GMP	İyi üretim uygulamaları
HSCT	Hematopoetik kök hücre transplantasyonu
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
mRNA	Mesajcı RNA
MKH	Mezenkimal kök hücre
MTT	3-(4,5-dimetil tiazol-2-yl)-2,5-dipfenil tetrazolyum bromid
NWPF	Dokunmamış poliester fabrik disk
PET	Polietilen tereftalat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TCPS	Polistiren kültür kabı

1. GİRİŞ

Hücre üretimindeki en geleneksel yaklaşım farklı yüzey alanlarına sahip 2-boyutlu (2B) kültür kaplarının (flasklar) kullanılmasıdır. Bu tür kaplar mezenkimal kök hücre (MKH) üretimi için ekonomik ve kullanışlı olmakla birlikte, klinikte yüksek miktarda hücreye ihtiyaç duyulması nedeniyle yüzey alanları açısından yetersiz kalmaktadır [1].

Hücre temelli tedavilere yönelik olarak MKH'lerin elde edilmesindeki başarı, etkili izolasyon tekniklerine ve İyi Üretim Uygulamaları (GMP) koşullarında hücre üretim verimine bağlıdır. Yetişkin bir hastayı tedavi etmek için gereken hücre sayısı ($1-9 \times 10^6$ hücre/kg), donörlerden temin edilebilen hücre sayısından çok fazladır. Bu nedenle farklı yaklaşımlar ile tedavi için gerekli hücre sayısının artırılması amaçlanmaktadır. Hücre üretiminin klinikte kullanılabilir olması için hücre sayısının 1×10^{11} ile 1×10^{12} arasında olması gerekmektedir. İki boyutlu kültür sistemlerinin hücre üretim verimini iyileştirmek için çok tabakalı flasklar geliştirilmiştir. On tabakadan oluşan kaplarda yüzey alanı yaklaşık olarak $400\,000\text{ cm}^2$ 'dir ve bir kaptan yaklaşık olarak 9×10^9 hücre elde edilmektedir. Bu durumda MKH'ler kullanılarak gerçekleştirilen klinik uygulamalarda ihtiyaç duyulan hücre sayısına ulaşmak için yaklaşık olarak 50 adet 10 tabakalı flaska ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kadar yüksek sayıda flaskın manipülasyonu oldukça zor olmaktadır. Robotik kolların kullanıldığı yaklaşımlarda ise aynı anda 120 tabakalı 4 flasktan ($4\,800\,000\text{ cm}^2$) yaklaşık olarak 150×10^9 hücre elde edilebileceği gösterilmiştir [2].

Hücre tedavileri için ihtiyaç duyulan hücre sayısının yüksek oluşu ve bu miktarda hücreye düzlemsel kaplarda ancak robotik sistemler ile ulaşılabilmesi nedeniyle, klinik uygulamalar için yüksek verimde işletilebilen ve uygulama kolaylığı sağlayan yenilikçi yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır [3].

Bu hedefe uygun olarak yüzeye-bağımlı hücrelerin yüksek verimde üretilmesine imkan sağlayan mikrot taşıyıcılar geliştirilmiştir ve bu taşıyıcıların dinamik kültür koşullarında kullanımı ile düzlemsel kültür sistemlerindeki problemler büyük ölçüde aşılmıştır [4]. Basit mikrot taşıyıcı süspansiyon kültürleri yüzeye-bağımlı hücreler için geniş yüzey alanı sağlamaktadır. Cytopore™, Cytodex 1-3 ve Cultispher gibi çapları $90-300\ \mu\text{m}$ arasında değişen, küresel formda, cam ve polimerik temelli pek çok ticari mikrot taşıyıcı bulunmaktadır. Hücre üretiminde, uygun kaynaktan izole edilmiş hücreler ilk olarak

durgun ya da dinamik koşullarda mikrotarıyıcılar ekilmektedir ve dinamik koşullarda gerçekleştirilen kültür sonrasında istenilen hücre yoğunluğuna ulaşıldığında tripsin gibi proteolitik enzimlerin kullanımı ile hücreler yüzeyden kaldırılmaktadır. Bu sistemlerde hücre üremesinin desteklenmesi ve hücrelerin mikrotarıyıcı yüzeyinden yüksek canlılık oranlarıyla kaldırılabilmesi için mikrotarıyıcı yüzeyleri kollajen gibi doğal polimerler ile kaplanmaktadır [5].

Dolgulu yatak (packed-bed) biyoreaktörler, öncelikli olarak yüzeye-bağımlı hücrelerin ve antikörlerin üretimi için kullanılan sistemlerdir [9]. Bu reaktörler, genel olarak taşıyıcılar üzerindeki veya içindeki hücreleri destekleyen bir dolgu yataktan ve oksijenli besin ortamını yatağın içinden dolaştırmak için kullanılan bir rezervuardan oluşmaktadır. Bu sistemlerde boncuk formundaki malzemeler, gözenekli matrisler, fiber temelli fabrikler ve oluklu lifler taşıyıcı olarak kullanılabilir. Hücre üretiminde kullanılacak olan taşıyıcı malzemelerin, yüksek yüzey alanı/hacim oranı, otoklavlanabilirlik, kimyasal ve mekanik kararlılık, toksik olmayan malzemedir üretilmiş olması ve kimyasal/biyolojik inertlik gibi çeşitli özelliklere sahip olması gerekmektedir [6].

Dolgulu yatak biyoreaktörlerde taşıyıcılar reaktörün sepet (basket) olarak adlandırılan bölümüne doldurularak (sabitlenerek) kültür sırasında hareket etmeleri engellenmektedir. Dolgulu yatak biyoreaktörler kesikli ya da sürekli koşullarda işletilebilmektedir ve rezervuarın tabanında bulunan karıştırıcının hareketiyle kültür ortamının homojenizasyonu sağlanmaktadır [7].

Dolgulu yatak biyoreaktörlerde fiber temelli taşıyıcıların kullanıldığı durumlarda, bu taşıyıcıların hücre tutunmasını desteklemesi, hücrelere düşük kayma geriliminin etki etmesi ve yüksek hücre yoğunluğuna ulaşılabilmesi gibi pek çok avantajla karşılaşmaktadır. Bu biyoreaktörlerin dezavantajları ise dolgulu yatakta taşıyıcının heterojen dağılımı, sabit yatağın yüksekliğine bağlı olarak dolgulu yatak içinde oluşabilen kütle aktarım kısıtlamaları ve hücre ekimi sırasında hücrelerin doğrudan taşıyıcılara erişememesi şeklinde özetlenmiştir [8].

Sunulan tez çalışmasında, poliester fiber matrikslerin taşıyıcı olarak kullanıldığı dolgulu yatak biyoreaktörde mezenkimal kök hücre üretiminin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik sıçan yağ dokusu (adipoz doku) kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Biyoreaktörde dolgulu yatak yüksekliği, karıştırma hızı, hücre ekim yoğunluğu ve hücre kültür ortamı bileşimi gibi farklı işletim parametrelerinin hücrelerin

Üretim verimine olan etkilerinin incelenebilmesi için öncül çalışmalar preosteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı ile gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin reme davranışlarının belirlenebilmesi için MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) analizi yapılmış ve taşıyıcı malzemelerden kaldırılan hücreler farklılaşmadan tekrar yüzeye yapışıp kültüre devam edilmiştir. Hücrelerin taşıyıcı malzeme üzerindeki dağılımlarını görmek için SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ve taşıyıcı yüzey modifikasyonlarının etkili bir şekilde yapıldığını görmek için EDS (Enerji Dağımlı X-Ray Spektroskopisi) analizi yapılmıştır. Ayrıca kültür ortamının pH değerleri, glukoz ve laktat konsantrasyonlarının ölçümüyle hücrelerin metabolik aktivitelerinin kültür süresince değişimleri gözlemlenmiştir.

Belirlenen amaçlar kapsamında ulaşılmak istenen hedef hücre üretim çalışmalarından edinilmiş bilgiler ışığında fiber temelli taşıyıcılar ile desteklenmiş dolgulu yatak biyoreaktörde klinikte hastalıkların tedavisi için ihtiyaç duyulan hücre üretim verimine ulaşmaya imkan sağlayacak işletim parametrelerini belirlemektir. Üretim sonrası hücre verimi ve hücrelerin kök hücre karakteristikleri belirlenmiş ve dolgulu yatak reaktörün klinik boyutta kök hücre üretimi için uygunluğu değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde yapılan çalışmalar ile ilgili literatür bilgilerine yer verilmiştir. İlk olarak kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler ile ilgili kısa bilgiler sunulmuş, ardından mezenkimal kök hücrelerin klinik uygulamaları ile ilgili özet bilgi verilmiştir. Daha sonra günümüzde hücre kültürü çalışmalarında kullanılmakta olan 2 boyutlu sistemler ve bunu takiben 3 boyutlu sistemlerde kullanılan hücre üretim biyoreaktörleri sınıflandırılmış ve dolgulu yatak biyoreaktör üzerinde kısaca durulmuştur. Son olarak ise çalışmada önemli bir yer tutan mikrot taşıyıcı teknolojilerinden söz edilmiş ve çalışmada kullanılan dokunmamış poliestere fabrik disk (NWPF) taşıyıcılar hakkında bilgi sunulmuştur.

2.1 Kök Hücre

Kök hücreler insan vücudunda her biri yeni hücre fonksiyonu oluşturma kapasitesine sahip olan farklılaşmamış hücrelerdir. Kök hücrelerin en bilinen örneği beyaz ve kırmızı kan hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olan farklılaşmamış kemik iliği hücreleridir [10]. Kök hücreler farklılaşma özelliklerine göre üçe ayrılabilir:

- **Totipotent:** Bir organizmanın oluşumuna katkıda bulunan tüm hücrelere/dokulara farklılaşma özelliği (örneğin döllenmiş yumurta ve zigot).
- **Pluripotent:** Bir organizmanın çoğunu oluşturabilme ama bazılarını oluşturamama özelliği (örneğin embriyonik kök hücreler ve embriyonik germ hücreleri).
- **Multipotent:** Genellikle bir germ tabakasının kökeni ile sınırlı sayıda hücre/dokuları oluşturabilme özelliği (örneğin kemik iliği stromal ve mezenkimal kök hücreler).

Kök hücre sınıflandırması bununla sınırlı değildir. Kök hücre potansiyelini belirleyen şey, büyük ölçüde hücrenin genetik yapısına ve belirli bir hücre tipini oluşturmak için uygun genetik programı içerip içermediğine bağlıdır [11].

2.1.1 Kök Hücre Kaynakları ve Sınıflandırılması

Kök hücreler kökenlerine göre dört tür şeklinde sınıflandırılmaktadır: embriyonik kök hücre, fetal kök hücre, göbek kordonu kök hücresi ve yetişkin kök hücrelerdir. Bazıları, yetişkin ve fetal kök hücrelerin embriyonik kök hücrelerden geliştiğine ve yetişkin organlarda gözlenen birkaç kök hücrenin, hücre nişlerinde kalan orijinal embriyonik kök hücrelerin kalıntıları olduğuna inanmaktadır [10].

2.1.1.1 Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Embriyonik kök hücreler memeli blastosistindeki iç hücre kitlesinden elde edilen özel pluripotent hücrelerdir [12]. Beş-altı günlük insan blastosistinin iç hücre kütlesi, pluripotent embriyonik kök hücrelerin kaynağıdır [10].

İnsan embriyonik kök hücreleri yüksek seviyelerde telomeraz eksprese eder. Kromozom uçlarına telomer tekrarları ekleyen bir ribonükleoprotein olan telomerazın ekspresyonu telomerlerin uzunluklarını korumaktadır. Bu durum insan embriyonik kök hücre hatlarının sınırsız yaşayabilme kapasitesi ile telomeraz aktivitesinin bağlantılı olduğunu göstermektedir. Embriyonik kök hücreler embriyonik ve erişkin kök hücre tiplerine farklılaşabilse de bir organı oluşturabilme kapasitesi sınırlıdır [13].

Klinik çalışmalarda embriyonik kök hücre uygulamalarının pratik ve uygulanabilir olması gerekmektedir. Bu kök hücreler farklı hücrelere farklılaştırılarak yeni ilaçlar için hedef genlerin tanımlanması, yeni bileşiklerin toksisitesinin test edilmesi ve hastalıkların sebep olduğu yok olmuş hücre popülasyonunu yeniden arttırmak amacıyla en çok klinik öncesi araştırmalarda kullanılmaktadır.

İnsan EKH'leri, tripsin içermeyen ortamda kolayca ayrılabilen nispeten düz, kompakt koloniler oluşturur. Bu yönüyle insan EKH kolonileri fare EKH kolonilerinin morfolojisine çok benzemektedir. Ayrıca, insan EKH'leri fare EKH'lerinden daha yavaş büyür; fare EKH'lerinin popülasyon ikilenme süresi yaklaşık 12 saat, insan EKH'lerinin ise yaklaşık 36 saattir. Bu nedenle klinik uygulamalara ait ön çalışmalarda etik problemlerin olması ve ikilenme sürelerinin kısa olması nedeniyle fare EKH'i tercih edilmektedir [14].

2.1.1.2. Yetişkin Kök Hücreler

Yetişkin kök hücreler embriyonik gelişimden sonra vücutta bulunan ve ölmekte olan hücreleri yenilemek ve hasarlı dokuları yeniden üretmek için hücre bölünmesiyle çoğalan, farklılaşmamış hücrelerdir. Canlı bir organizmada yetişkin kök hücrelerin birincil rolleri, buldukları dokuyu korumak ve onarmaktır. Kökenleri (blastosistinin iç hücre kütlesi) ile tanımlanan embriyonik kök hücrelerin aksine, bazı olgun dokulardaki yetişkin kök hücrelerin kökeni halen araştırılmaktadır [15].

Doku kökenli yetişkin bir kök hücreye en iyi örnek kemik iliğinde bulunur. Kemik iliği, kompleks bir hücre dışı matrikse gömülü stromal hücreler tarafından desteklenen karmaşık bir hematopoetik hücre sisteminden oluşan mezoderm türevi bir dokudur.

Kemik iliğinin iki tip kök hücre içerdiğini gösteren kanıtlar vardır. Bunlar, her ikisi de çok potansiyelli hücreler olan hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücrelerdir. İlginç bir şekilde, insan mezenkimal kök hücreleri (MKH) *in vivo* ve *in vitro* olarak, kemik, kıkırdak, yağ ve kas gibi çeşitli yetişkin dokuları oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu yüzden MKH'ler klinik uygulamalarda çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [16].

2.1.1.3 Fetal Kök Hücreler

Fetal kök hücreler multipotent olarak tanımlanır, yani belirli fetal dokularda bulunurlar ve sadece o dokunun hücrelerine farklılaşırlar [17]. Fetal dokular, fonksiyonel hematopoetik hücreler, kardiyomyositler, hepatositler, insülin salgılayan β hücreleri, akciğer progenitör hücreleri, kaslar ve dopaminerjik nöronlar dahil olmak üzere sinir hücrelerini elde etmek için rejeneratif tıpta mühendislik temelli tedavilerde umut verici bir kök / progenitör hücre kaynağını temsil etmektedir [18]. Fetal kök hücreler gebeliğin erken döneminde sadece fetal kan ve hematopoetik organlardan değil, çeşitli somatik organlardan ve gebelik boyunca amniyotik sıvı ve plasentadan izole edilebilir. İlk 3 aylık dönemde fetal kan, karaciğer ve kemik iliği erişkin kök hücrelere kıyasla çok daha ilkel görünen bir mezenkimal kök hücre popülasyonu içermektedir [19].

2.1.1.4 Göbek Kordonu Kök Hücreleri

Göbek kordonu (umbilical cord) hamilelik sırasında anne ve fetus arasındaki bağlantıyı sağlayan kordondur. Amniyotik epitel ve göbek damarları arasında yatan, Wharton'un jölesi adı verilen özel bir embriyonik mukoza bağ dokusundan oluşur. Bu jöle benzeri materyalin ana rolü, fetal ve maternal dolaşım arasında çift yönlü kan akışı sağlayan kapalı damarların sıkışmasını, burulmasını ve bükülmesini önlemektir [14].

İnsan göbek kordon kanı, klinik uygulama için zengin bir hematopoetik kök hücre kaynağıdır. Göbek kordon kanında MKH'lerin varlığı bilinmektedir. Erices ve ark. [20] hematopoetik öncülerle birlikte mezenkimal kök hücrelerin, erken doğum fetusların kanında dolaştığını göstermiştir. Ancak Mareschi ve arkadaşları erken doğum göbek kordon kanından bu hücreleri başarılı bir şekilde izole edememiştir [22]

Son 10 yılda, göbek kordon kanının kemik iliğine bağlı eksiklikleri ve doğuştan metabolizma problemi olan hastaların iyileşmesi için terapötik olarak fayda sağladığı gösterilmiştir. Göbek kordon kanı kemik iliğine göre avantajlar sunar, çünkü kordon kanı insan lökosit antijeni (HLA) doku eşleşmesini gerektirmez, konakçı hastalığa karşı daha

az greft etkisine sahiptir ve allojenik olarak kullanılabilir. Buna ek olarak kordon kanı biriktirilebilir ve kullanıma hazır halde satışa sunulabilir ancak etik problemlerden ötürü kullanımını kısıtlıdır [22].

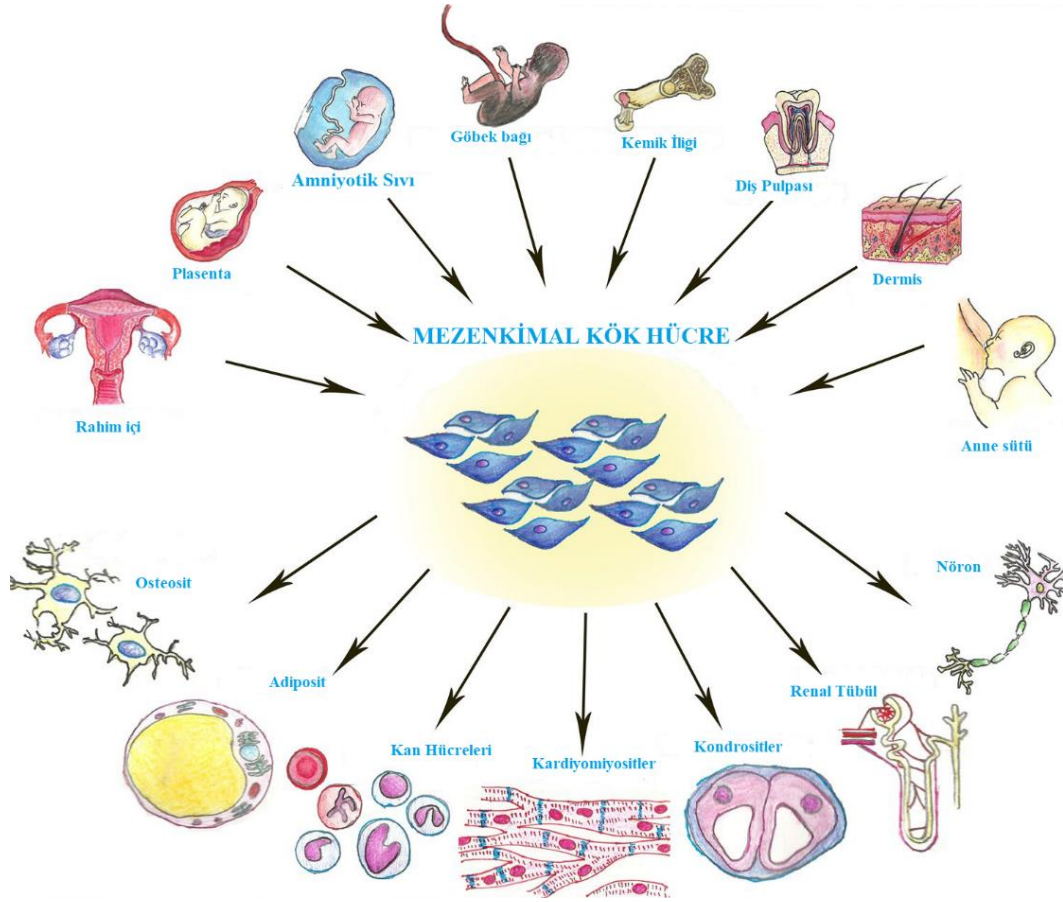
2.2 Mezenkimal Kök Hücreler

1960-1970'lerde Friedenstein ve arkadaşları fare kemik iliğinden iğ şeklinde hücrelerin bir alt popülasyonu olan birim fibroblast kolonisi oluşturma yeteneğinde hücreler izole etmiş ve karakterize etmişlerdir [23]. Mezodermden türetilen bu hücreler daha sonra MKH olarak tanımlanmış ve birden fazla türe farklılaşma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir [24]. Bu parçalara ayrılmamış plastik yapışkan hücre popülasyonunun oldukça heterojen olduğu ve "köklüğünü" destekleyen tatmin edici bir kanıt olmadığı göz önüne alınarak, bu hücrelerin multipotent mezenkimal stromal kök hücreler veya MKH olarak adlandırılması önerilmiştir [25]. Mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak, yağ ve kas içeren bağ doku hücrelerine farklılaşma kapasitelerine sahiptir. Ek olarak, kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelere stromal destek sisteminin sağlanmasında rol oynarlar [26]. Mezenkimal kök hücreler kemik iliği içinde çekirdekleşmiş toplam hücre popülasyonunun %0.001-0.01'i kadar küçük bir oranını temsil etmektedir [27].

2.2.1 Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

İlk olarak kemik iliğinden izole edilen yetişkin mezenkimal kök hücreler, mezodermal (osteositler, kondrositler ve adipositler), ektodermal (nöronlar) ve endodermal kökenlerin hücrelerine farklılaşma potansiyeline sahip olan multipotent kök hücreler olarak tanımlanmıştır [29]. Yetişkin MKH'lerin diğer seçkin kaynakları arasında plasenta, göbek kordonu, amniyon sıvısı, yağ dokusu, diş özü, anne sütü ve sinoviyum bulunur [30].

Mezenkimal kök hücreler üzerinde yapılan araştırma giderek artmaktadır ve hücrelerin çeşitli dokulardan izole edilmesi ve standart kültür koşulları altında büyümesi, çoğalması nispeten kolaydır. Mezenkimal kök hücrelerin endodermal ve ektodermal farklılaşmalar dahil olmak üzere farklı dokulara farklılaşmaları doku kökenine göre değişmektedir [33]. Farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin farklılaşabileceği hücre tipleri Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

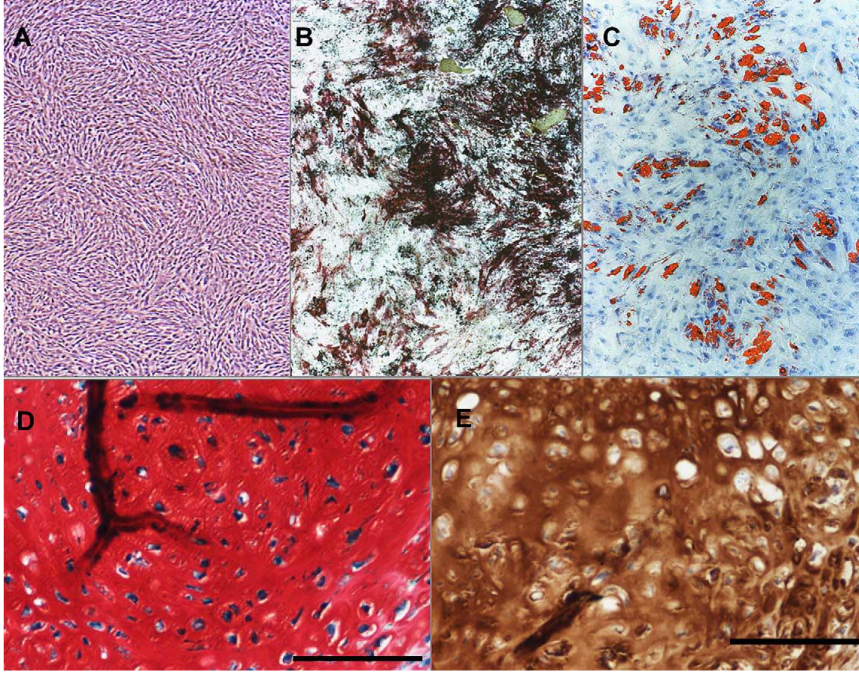


Şekil 2.1 Erişkin mezenkimal kök hücrelerin kaynakları ve farklılaşabilecekleri hücre tipleri [28].

2.2.1.1 Kemik İliği

Kemik iliği, hematopoetik doku hücrelerini ve ilişkili stromal hücreleri içeren iki farklı hücre hattından oluşur [31]. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, hepatositleri içeren endodermal hücre hatları ve nöronları içeren ektodermal hücre hatları dahil olmak üzere miyositler, kondrositler, osteositler ve adipositleri içeren mezodermal hücre hatlarına farklılaşabilme yeteneğine sahiptir [32]. Multipotent mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu için temel kaynak kemik iliği olmasına rağmen kemik iliğinin izole edilmesi oldukça invazif bir işlemdir ve mezenkimal kök hücrelerin sayısı, farklılaşma potansiyeli ve maksimum ömrü hücreler yaşlandıkça azalmaktadır. Bu yüzden mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu için alternatif kaynaklar yoğun bir şekilde araştırılmaktadır [33]. Kemik iliği türevli mezenkimal kök hücrelerin immüno fenotipiyle ilgili olarak kültüre edilen hücrelerin CD44, CD73, CD90, CD105 ve CD146 dahil olmak üzere çeşitli spesifik olmayan hücre yüzey işaretleyicilerini eksprese ettiği, ancak CD11b, CD14,

CD45 ve CD34'ün ekspresyonundan yoksun olduğu gösterilmiştir [34]. Tek tabakalı hücre kültüründe farklılaşmış ve farklılaşmamış MKH'ler Şekil 2.2' de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Tek tabakalı kültürde farklılaşmamış mezenkimal kök hücre kültürü (A), osteojenik farklılaşma (B), adipojenik farklılaşma (C), kondrojenik farklılaşma (D) ve (E) [44].

2.2.1.2 Yağ Doku

Mezenkimal kök hücrelerin bir diğer yetişkin kök hücre tipi olan adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreler ilk olarak yağ dokudan Zuk ve arkadaşları tarafından 2001'de izole edilmiştir ve yüksek mezodermal farklılaşma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir [35].

Adipoz kökenli kök hücreler kondrositler [36], kardiyomyositler [37] nöronlar [38], endotel hücreler [37] ve düz kas hücreleri [39-40] içeren birçok hücre hatlarına farklılaşma yeteneğine sahiptirler [23]. Bu kök hücreler makroskopik olarak beş tipe ayrılır; kemik iliği yağ dokusu, kahverengi yağ doku, meme yağ dokusu, mekanik yağ doku ve beyaz yağ doku [41].

Kahverengi yağ dokusu işlevsel olarak son derece özelleşmiştir ve vücut ısısını koruma görevi gördüğünden memelilerin yavrularında bol miktarda bulunur. Mitokondriyel bakımdan zengin olan kahverengi yağ yetişkinlerde seyrek, ancak göğüs ve boyun kısımlarında bulunabilir [42].

Literatüre göre adipoz mezenkimal kök hücrelerin fenotipik profili çok kararlıdır ve mezenkimal kök hücrelerin %90'ından daha fazlası yüzey işaretleyicilerini bulundurur. Bu yüzey işaretleyicileri: CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD54, CD55, CD71, CD73, CD90, CD105, CD146, CD 166, ve STRO-1dir. Aynı zamanda HLA-DR, CD4, CD11b, CD14, CD16, CD45, CD56, CD62E, CD79, CD104, CD117 ve CD106 hematopoetik yüzey işaretleyicileri negatiftir [43].

2.2.1.3 Göbek Kordon Kanı

Mezenkimal kök hücreler aynı zamanda göbek kordonundan da elde edilmektedir. Göbek kordonu kök hücreleri yetişkin MKH'lerden daha ilkel özelliklere sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı klinik uygulamalarda MKH olarak faydalı olmaktadır. Yeni doğmuş bireyin doğumundan sonra kolayca elde edilmeleri ve embriyonik kök hücre kullanımı ile ilgili etik problemlerin üstesinden gelinmesi nedeniyle avantajlı olmaktadır. MKH'ler göbek kordonunun dört farklı bölmesinden, Wharton'un jölesinden, göbek damarlarını çevreleyen dokudan, göbek kordon kanından ve göbek damarının alt bölgesinden izole edilirler. Ayrıca yağ dokusu, kemik, kıkırdak, iskelet kası hücreleri, kardiyomiyosit benzeri hücreler ve nöral hücreler oluşturmak üzere uyarılabilirler [44].

Göbek kordonu kanı MKH'leri *in vitro* olarak daha yüksek çoğalma kapasitesine sahip olmaları ve yetişkin MKH'lerden daha hızlı ikilenme süresine sahip olmaları gibi farklı fizyolojiye sahiptirler. Kordon kanının farklı bölümlerinden elde edilen hücreler arasında da farklılık vardır. MKH'ler, Wharton'un jölesinde göbek kordon kanına kıyasla çok daha yüksek konsantrasyonda bulunurken, göbek kordon kanı hematopoetik kök hücreler açısından zengindir [45].

2.2.1.4 Sinovyal Membran

MKH'ler sinovyal membran ya da kendi sinovyal sıvısından izole edilebilirler ve ilgi çekici bir hücre kaynağıdır. Sinovyal MKH'ler önemli ölçüde yapışma yeteneğine sahiptir ve birden fazla hücre tipine farklılaşabilme potansiyeline sahiptir [44].

Multipotent MKH'ler aynı zamanda insan diz eklemlerinin sinovyal sıvısından elde edilmektedir [46]. Sinovyal MKH'ler kemik iliği MKH'lerden daha yüksek kondrojenik potansiyele sahiptir. Sinovyal MKH transplantasyonu kıkırdak ve menüsküsü yeniler. Bu yüzden sinovyal MKH'ler kıkırdak hasarının yenilenmesi için klinikte kullanılmaktadır. Sinovyal doku histolojik olarak üç bölge içinde sınıflandırılmıştır. Bunlar; yüzey, stromal ve perivasküler bölgelerdir. Sinovyal MKH'ler ayrı ayrı bölgelerden izole edilirse

klirik kullanımlarda daha ilgi çekici olacaktır. Bu aynı zamanda sinovyumdaki hücrelerin fizyolojik rolleri hakkında da önemli bilgi sağlayacaktır [47].

2.3 Hücresel Tedavi

MKH'lerin olağanüstü özelliklerinden yararlanarak hayvan modellerinde doku onarım potansiyellerini değerlendirmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Hastalık ve yaralanma şekline bağlı olarak genetik modifikasyon ve doku iskelelerinin kullanımı ile ilgili farklı stratejiler tasarlanmıştır. MKH'lerin işleyiş şeklini tanımlamak için temel çalışmalar yapılmış, ayrıca MKH'lerin kullanımının güvenlik ve etkinliğinin yanı sıra terapötik potansiyeli de vurgulanarak, zararlara verdikleri cevaplar da ele alınmıştır. Ancak MKH'lerin klinik çalışmalara geçilmesinden önce bazı konuların çözüme kavuşturulması gerektiği vurgulanmıştır [48]. Klinik çerçevede MKH'ler ortopedik yaralanmalar, kemik iliği transplantasyonu, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, otoimmün hastalıklar, diyabet ve karaciğer hastalıkları gibi hastalıklar olmak üzere çeşitli şartlarda gerçekleştirilen deneylerle araştırılmaktadır. Ayrıca, MKH'lerin tümör oluşumunu engelleyen genleri eksprese etmesine yönelik genetik modifikasyonlara neden olması kanser oluşumunu engellediğinden kanser tedavisi olarak klinik kullanımda beklentiler sağlamaktadır [49-52].

2.3.1 MKH'lerin Kemik ve Kıkırdak Doku Hastalıklarında Kullanımı

MKH'lerin osteoblastlar, tenositler, ve kondrositlere farklılaşma yetenekleri ortopedide kullanımını çekici hale getirmiştir. İlk olarak MKH'lerin osteogenez imperfekta (OI) ve hipofosfatazi gibi kemik bozukluklarının tedavisinde fayda sağladığı gösterilmiştir. Osteogenez imperfekta rahatsızlığı olan pediatrik hastalara allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HSCT) uygulanmış ve nakledilen kemik iliği hücrelerinin, kemik yapısında ve işlevinde iyileşmeye yol açan fonksiyonel osteoblastlar ürettiği gözlemlenmiştir [50]. Her ne kadar düşük düzeyde bir hücre nakline ulaşılmış olsa da 8 ila 36 aylık çalışmayı takiben transplantasyon hastalarında sürekli iyileşme olduğu gösterilmiştir [51]. Aynı zamanda MKH transplantasyonunun kıkırdak onarımı ile önemli klinik iyileşmeler sağladığı gösterilmiştir, ancak kıkırdak rejenerasyonunun altında yatan mekanizmalar hala bilinmemektedir [49].

2.3.2 MKH'lerin Kardiyovasküler Hastalıklarda Kullanımı

Mezenkimal kök hücreleri kullanarak gerçekleştirilen kardiyovasküler terapilerde üç mekanizma üzerinden başarı sağlanmaktadır: birincisi anti-enflamatuar özelliklerinin, ikincisi apoptozu inhibe eden faktörleri salgılama yeteneklerinin ve üçüncüsü ise kardiyak kök hücrelerin aktivitesinin uyarılmasıdır. Mezenkimal kök hücrelerin kalbi onarması için yeni kalp kaslarına farklılaşması gerekir. Kardiyak hasarın deneysel hayvan modelleri ile yapılan klinik öncesi çalışmalarda MKH'ler, enfarktüslü miyokardın onarımına yardımcı olarak etki göstermiştir [53].

Rejeneratif ve immünomodülatör özellikleri nedeniyle kardiyovasküler onarım için MKH tedavisi ilgi çekici bir alan olmuştur [52]. Klinik öncesi çalışmalarda MKH'lerin kardiyak onarımını arttırdığı ve iyileştirdiği gözlemlenmiştir [54-55-56]. Bu çalışmalar kök hücre tedavisinin potansiyelini ortaya koysa da tam kardiyak iyileşme hedefi klinik çalışmalarda gerçekleştirilememiştir [57].

2.3.3 MKH'lerin Karaciğer Hastalıklarında Kullanımı

MKH transplantasyonunun karaciğer fibrozu için umut verici bir tedavi potansiyeline sahip olduğu kanıtlanmıştır. Fibrotik karaciğerde MKH'nin hayatta kalması ve aşılması ile ilgili sorunlar devam etmektedir. MKH'ler fibrotik karaciğerin rejenerasyon potansiyeline sahip olmasına rağmen hepatik farklılaşmayı iyileştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle MKH'lerin karaciğer onarımını arttırmak amacıyla daha fazla araştırma ve geliştirme çalışmalarına ihtiyaç olduğu belirtilmiştir [53].

Mezenkimal kök hücreler kendini yenileyebilme potansiyeli ve immüno-modülatör özellikleri nedeniyle karaciğer hastalıklarının tedavisi için kullanılma potansiyeline sahiptir. Yapılan faz 1 çalışmasında karaciğer sirozunun son evresinde olan 4 hasta MKH'ler kullanılarak tedavi edilmiş ve tedavi sürecinde herhangi bir yan etki olmaksızın yaşam kalitesinin arttığı gösterilmiştir [58]. Karaciğer sirozunun son evresinde olan 8 hasta üzerinde yapılan başka bir faz 1 ila 2 çalışmasında hastalar otolog mezenkimal kök hücrelerle tedavi edilmiştir. Mezenkimal kök hücre uygulamasında karaciğer fonksiyonları iyileştirilmiş ve iyi tolere edildiği gösterilmiştir [59].

2.3.4 MKH'lerin Kanser Hastalıklarında Kullanımı

MKH'lerin tümör bulma yetenekleri kemoatraksiyona bağlı gibi görünmektedir. Aslında, MKH'ler sitokinler tarafından düzenlenebilen kemokin ve kemokin reseptörlerini eksprese etmektedir. Bunun yanında MKH'lerin kemokinleri ve reseptörlerini, sitokinleri kodlayan mRNA'ları eksprese ettikleri de gösterilmiştir [60]. MKH'ler tümör hedefli tedaviler için gen taşıyıcı araçlar olarak kullanılmaktadır. Bazı ön klinik kanser modellerinde, MKH'ler sitokinler, büyüme faktörü antagonistleri, antianjiyojenik faktörler, ön ilaç dönüştürücü enzimler ve proapoptotik proteinleri eksprese etmek için genetik olarak modifiye edilmiştir. Bu gibi modifiye edilmiş MKH'ler, kolon kanseri, pankreas kanseri, akciğer kanseri, göğüs kanseri, yumurtalık kanseri, prostat kanseri, hepatosellüler karsinom, glioma, melanoma, malin mezotelyoma ve lenfoma gibi farklı tümör tipi modellerde kullanılmıştır. Bu klinik öncesi çalışmalar, MKH tabanlı yaklaşımların terapötik yararlarını açıkça göstermesine rağmen, anti-kanser tedavileri için taşıyıcı araçlar olarak MKH'leri kullanan çok az sayıda klinik çalışma onaylanmıştır [61].

2.3.5 MKH'lerin Tip 1 Diyabet Hastalığında Kullanımı

Tip 1 diyabet, pankreasın β -hücrelerine karşı doğrudan oto-antikor üretiminin aracılık ettiği otoimmün bir hastalıktır. Bu hücrelerin tahrip olmasının bir sonucu olarak, üretilen insülin miktarı şeker kan seviyesini kontrol etmek için yeterli değildir. Son zamanlarda, MKH'lerin glukozaya duyarlı, insülin üreten hücreler olarak ayırt edilebildikleri ve immünomodülatör özelliklere sahip oldukları için bu problemlerin üstesinden gelebileceği düşünülmüştür [62]. Ranhua Jiang ve arkadaşlarının insan plasenta türevli MKH'ler ile tip 2 diyabet hastası olan 10 kişi üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada tedaviden sonra tüm hastalar en az 3 ay boyunca izlenmiş olup, günlük kullanılan insülin dozu ortalama 63.7 miligram'dan 34.7 miligrama düşmüştür ve C-peptid seviyesinin 4.1 ng/mL'den 5.6 ng/mL'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. Ateş yükselmesi, karaciğer hasarı ve başka bir yan etki bildirilmemiştir. Bu pilot klinik deneyden elde edilen sonuçlar, plasenta türevli MKH transplantasyonunun, adacık hücresi fonksiyon bozukluğu olan tip 2 diyabet hastaları için basit, güvenli ve etkili bir terapötik yaklaşımı temsil ettiğini göstermiştir [63]. Mezenkimal kök hücrelerin kaynaklarına göre faz çalışmaları Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Farklı kök hücre kaynaklarından elde edilen MKH'lerin çeşitli klinik öncesi ve klinik çalışmalarının ilerleme evreleri [21].

Kaynaklar	Fazlar	Hedef Hastalıklar
Kemik İliği	Klinik öncesi Faz I-II Faz III	Miyokardiyal bozukluk, Kornea hasarı, Karaciğer sirozu, Kronik böbrek hastalıkları, Omurilik yaralanması, Crohn Hastalığı
Omurilik	Klinik öncesi Faz I/II Faz III Faz IV	Felç, Alzheimer hastalığı, Multiple Sclerosis, Deri hastalıkları, Alzheimer hastalığı, Diz eklemi kıkırdak yaralanması, Hematolojik Maligniteler, Ağır Aplastik Anemi
Yağ Doku	Klinik öncesi Faz I-II Faz III Faz IV	Crohn hastalığı, Yumurtalık hasarı, Karaciğer sirozu, Beyin hasarı, Serebellar ataksi, Diz Osteoartriti, Yumurtalık yetmezliği
Plasenta	Klinik öncesi Faz I	Hiperglisemi, Hipoksik iskemi, İdiyopatik Pulmoner Fibrozis
Amniyotik Sıvı	Klinik öncesi	Fibrozis, Akut Tübüler Nekroz, Parkinson

2.4 Mezenkimal Kök Hücre Üretim Prosesleri

MKH'ler kullanım ihtiyacına göre *ex vivo* olarak 2 boyutlu ve 3 boyutlu hücre kültür kaplarında çoğaltılmaktadır. Bu kapların seçimi ihtiyaç duyulan hücre sayısına göre değişkenlik göstermektedir. Klinik ölçekli mezenkimal kök hücrelerin üretiminde henüz üç boyutlu üretim sistemleri kullanılmaya başlanmamıştır.

2.4.1 İki Boyutlu Hücre Kültürü

MKH'lerin *ex vivo* kültürü için iki platform vardır: Tek tabakalı kültür ve süspansiyon kültür. Her iki platformda da MKH'lerin yüzeye yapışması gerekmektedir. Tek tabakalı kültürde MKH'ler kaplanmış yüzeylerde ya da yüzey modifikasyonu yapılmış kaplarda çoğalır. Klinik çalışmalarda T75 ve T125 flaskların T25 flasklardan daha avantajlı olduğu gösterilmiştir. Mikroküreler ile de kısa zamanlı kültürlerde yapılmaktadır, ancak klinik uygulamalarda tek tabakalı kültürler kullanılmaktadır [64]. Memeli hücre kültüründe kullanılan flasklar Şekil 2.3 de gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Tek tabaka kültürlerde kullanılan T25, T75 ve T175 cm² flasklar [105].

MKH'lerin kültüründeki geleneksel teknik tek tabaka kültürdür. Bu teknik MKH'lerin genetik stabiliteleri ve özellikleri değişmeden uzun süre çoğalmasına olanak sağlar. Yapılan çalışmalarda MKH'lerin 15. pasaja kadar karyotiplerini koruduğu belirlenmiştir [65]. Klinik uygulamalar için MKH kültürlerinin çoğu tek tabakalı kültür olarak yapılmaktadır. Bu teknikte flask kalitesi çok önemli olmaktadır. Yüzey modifikasyonu yapılmış flasklarda MKH'ler daha iyi çoğalmaktadır. Son zamanlarda kullanılan kapalı kültür sistemleri ile kontaminasyon gibi risk etmenleri önemli ölçüde azaltılmıştır, ancak tamamıyla kapalı bir sistemin kullanılması birçok sınırlamaya sebep olduğundan dolayı her yapılan kültür A sınıfı bir kabin sistemi gerektirmektedir [64]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar üç boyutlu kültür sistemlerinin iki boyutlu kültür sistemlerine göre hücrelerin dokularda bulunduğu gerçek mikroçevreyi daha doğru bir şekilde temsil ettiğini göstermiştir [94].

2.4.2 Üç Boyutlu Hücre Kültürü

Üç boyutlu kültürler tamamen kapalı ve otomatik bir biyoreaktörde yürütülürler. Biyoreaktörlerin temel avantajları geniş bir yüzey alan / hacim oranı, kapalı bir sistem, otomatik ekim ve kültür parametrelerinin otomatik kontrolüdür [64].

2.4.3 Hücre Üretiminde Biyoreaktör Kullanımının Avantajları

Biyoreaktörler, biyolojik süreçleri etkilemek için mekanik etki sağlayan bir cihaz olarak tanımlanabilir [67]. Biyoreaktörler, hücrelere biyokimyasal ve fiziksel düzenleyici sinyaller sağlayarak ve hücreleri farklılaşmaya veya *in vivo* implantasyondan önce hücre dışı matris üretimini destekleyerek yeni dokunun *in vitro* gelişimine yardımcı olmak için kullanılabilir [66]. Hücreler mekanik uyarıya yanıt verdikleri için biyoreaktörler kullanılarak kolayca uyarılırlar. Böylece hücrelerin statik kültürde olduğundan daha kısa

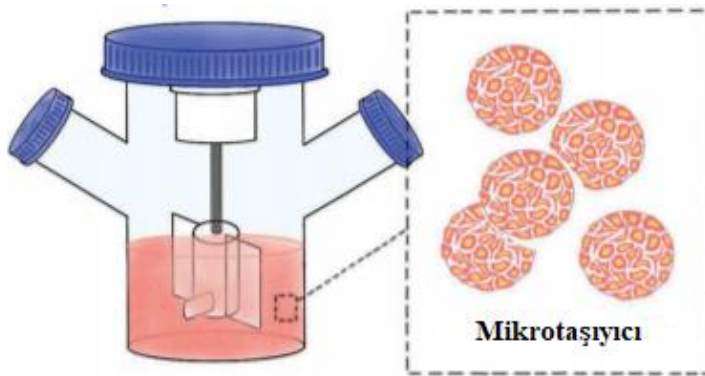
bir sürede ve daha homojen bir şekilde hücre dışı matris (ECM) üretmesi teşvik edilir [68].

Biyoreaktörlerin bir başka önemli uygulaması hücrel farklılaşmadır. Mekanik uyarım ile kök hücreler istenilen hücre fenotipine sahip hücrelere farklılaşabilirler. Biyoreaktörler farklılaşmayı yönlendiren biyokimyasal ve fiziksel düzenleyici sinyaller gönderebilirler [69]. Mekanik uyarımın yanında biyoreaktörler hücrelerin eş dağılımını da sağlamak için kullanılabilirler. Heterojen hücre dağılımı, *in vitro* organ gelişimi veya üç boyutlu doku geliştirilmesine yönelik çalışmaların önünde büyük engeldir.

2.4.4 Hücre Üretiminde Kullanılan Biyoreaktörler

2.4.4.1 Karıştırmalı Biyoreaktörler (Spinner Flask)

Tipik olarak karıştırmalı biyoreaktörler 120 mL hacimdedirler ve kültür yapılırken 50-80 rpm arasında karıştırma sağlanır. Kültür ortamları ise her iki günde %50 olarak değiştirilir [70]. Karıştırmalı biyoreaktörler biyolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmasına rağmen, sistem içindeki akış özellikleri iyi belirlenememiştir. Biyolojik uygulamalarda akışkanlar mekaniğini analiz eden belli başlı uygulamalar özellikle döner şişelerde sınırlıdır. Ek olarak biyoreaktörün tasarımı ve hücre kültürü prosedürleri açısından hidrodinamik kuvvet görmezden gelinmiştir, bu yüzden mekanik kuvvetin hücre kültürünü nasıl etkilediğinin kavranması sınırlıdır [71]. Karıştırmalı biyoreaktör şematik olarak Şekil 2.4'de gösterilmiştir.

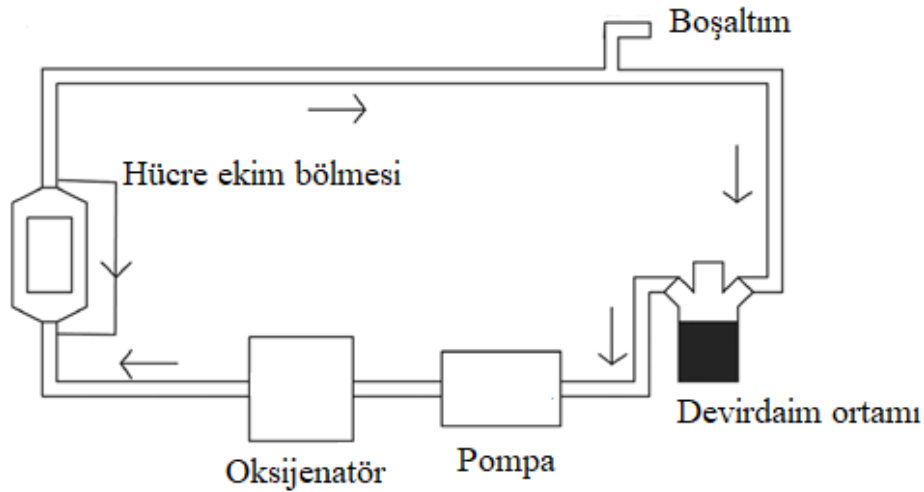


Şekil 2.4 Döner şişe biyoreaktörün şematik görünümü [72].

Döner şişelerde fare beyin kök hücreleri ile 44 günlük bir kültür yapılmış ve ortam her dört günde bir değiştirilmiştir [72]. Hacmi 500 mL olan karıştırmalı biyoreaktörlerde yapılan bu çalışmada hücrelerin sorunsuz bir şekilde farklılaşmadan çoğaldığı gözlemlenmiştir. zur Nieden ve arkadaşlarının 7. pasaj embriyonik kök hücreler ile yaptıkları 28 gün süren çalışmada ise hücrelerin fenotiplerini korunduğu rapor edilmiştir [95].

2.4.4.2 Perfüzyon Biyoreaktörler

Perfüzyon biyoreaktörlerde kültür ortamını sürekli veya sürekli olmayan bir şekilde perfüze edebilen pompa sistemi vardır. Çeşitli perfüzyon biyoreaktörleri test edilmiştir, ancak çoğu, bir pompa, bir kültür ortam haznesi, bir boru devresi ve kutusu, iskeleleri tutan bölmeler veya sütunlardan oluşan benzer bir temel tasarıma sahiptir [73]. Doğrudan perfüzyon sistemlerinde kendine özgü dağılımlarda yüksek hücre ekimine ulaşıldığı ve büyük yapılar içinde bu hücrelerin uzun süre canlılıklarını koruduğu rapor edilmiştir. Perfüzyon sistemlerindeki akış kaynaklı kayma gerilimleri, osteoprogenitör hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını iyileştirmek ve kontrollü fiziksel şartlandırma varlığında *in vitro* doku gelişiminin temel yönlerini incelemek için de kullanılmıştır. Ancak mevcut perfüzyon biyoreaktör sistemleri tasarım açısından karmaşık, kullanımının zor olmasından dolayı verimsiz olma eğilimindedir [74]. Perfüzyon biyoreaktör şematik olarak Şekil 2.5 'de gösterilmiştir.

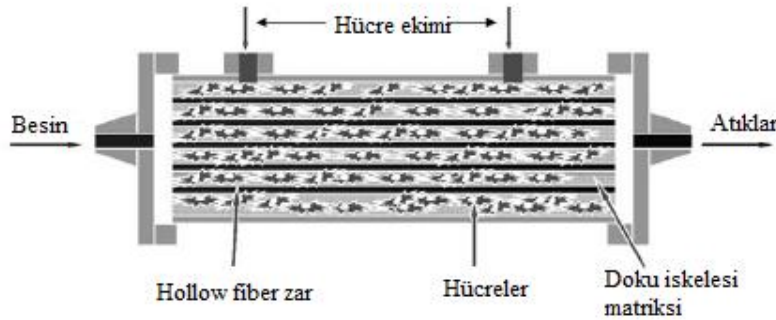


Şekil 2.5 Perfüzyon biyoreaktör sisteminin şematik gösterimi [73].

2.4.4.3 Hollow-Fiber Biyoreaktörler

Yüzey bağımlı hücre tipleri için hollow-fiber biyoreaktörler hücrelerin maruz kaldığı kayma gerilimi ve kütle aktarım hızına karşı *in vivo* benzeri mikro ortam sağlar. Hollow-fiber aynı zamanda tüm biyoreaktör konfigürasyonlarının en yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahiptir. Teorik olarak bu faktör daha az popülasyon varyasyonu ve ucuz işletme maliyeti ile birlikte çok fazla sayıda hücresel ürün elde edilmesini sağlar [75].

Hollow-fiber biyoreaktörlerde hücreler içi boş polimerik zarlardan oluşan bir ağıın bulunduğu iskele malzemesi üzerinde büyütülür ve desteklenir. Hollow-fiber membran duvarları belirli çözünen maddelere yarı geçirgendir. Örneğin küçük moleküllerin (besinler, oksijen metabolik atıklar) ve büyük moleküllerin (büyüme faktörleri) geçişine izin verir, ancak hücreleri tamamen tutar. Hollow-fiber içinden akan oksijen ve besinler zarlardan yayılabilir [76]. Hollow-fiber biyoreaktör şematik olarak Şekil 2.6 da gösterilmiştir.



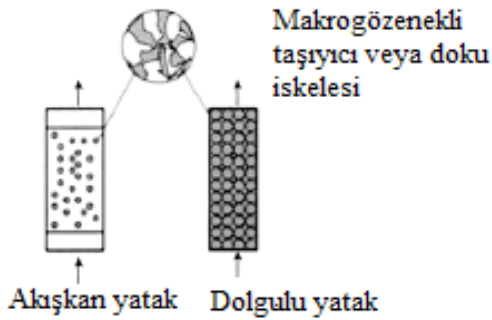
Şekil 2.6 Hollow-fiber biyoreaktörün şematik görünümü [76].

2.4.4.4 Dolgulu Yatak Biyoreaktör

Memeli hücreler ile dolgulu yatak biyoreaktör (DYB) çalışmaları 1950'lerde başlamıştır. DYB'lerde hücreler silindirik bir kap içerisine yerleştirilmiş dolgu malzemesi üzerinde immobilize edilir [80]. Bugüne kadar, litre ölçekli kaplarda insan MKH çoğaltımı mikrotaşyıcı biyoreaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Alternatif olarak dolgulu yatak biyoreaktörler düşük kayma gerilimine sahip üç boyutlu bir ortamda homojen hidrodinamik ortam ve yüksek yüzey/hacim oranı sağlar. DYB, pH ve çözünmüş O₂ gibi hücre kültürü parametrelerini tam olarak kontrol etme kapasitesine sahiptir ve embriyonik kök hücrelerin yanı sıra insan amniyotik sıvıdan türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin çoğaltılmasında da kullanılmıştır [77].

Dolgulu yatak biyoreaktörler tipik olarak, taşıyıcıların içindeki veya üzerindeki hücreleri destekleyen yerleşik bir yatak ve oksijeni ve besin ortamını yatak boyunca yeniden dolaştırmak için kullanılan bir rezervuardan oluşur. DYB sistemlerindeki en önemli yaklaşım hücreler için en uygun matriks bulunarak ve en uygun küçük ölçekli yatak kullanılarak çalışmaya başlanmasıdır. Optimal bir matriks, hücre yapışması, hücre çoğalması ve hücre üretiminin gerekli kombinasyonunu sağlayan bir yapıdır. Bu matriks daha sonra genellikle laboratuvar ölçeğinde gerçekleştirilen perfüzyon deneyleri yoluyla DYB'nin çalışma parametrelerini (dolgu yatak yüksekliği ve hacmi, perfüzyon hızı, dolgu yatak boyunca ortamın doğrusal hızı) optimize etmek için kullanılır [78].

Dolgulu yatak biyoreaktör ile hayvan hücreleri çoğaltılırken taşıyıcı içindeki oksijen eksikliğinden dolayı hücre üremesinde sınırlama olur. Bu durum temelde kültür ortamındaki oksijenin çözünürlüğünün düşük olmasından kaynaklanmaktadır [9]. Kayma geriliminin düşük olması nedeniyle serum veya protein içermeyen kültür ortamı kullanılır. Bu durum ortam değişiminin daha kolay olmasına olanak sağlar ve prosesin alt akım işlemlerini azaltır. Basit ve kullanımı kolay bir DYB tasarımı ile sabit yataklı biyoreaktör sistemleri yüksek hücre yoğunluğu (yaklaşık 10^8 hücre/mL) sağlanır [79]. Dolgulu yatak biyoreaktör şematik olarak Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7 Dolgulu yatak biyoreaktörün şematik gösterimi [82].

Hücre üretiminde en yaygın olarak statik ve karıştırılmalı kaplar, döner duvarlı ve perfüzyon biyoreaktörler kullanılmaktadır [81]. Klinik ölçekte MKH'lerin yüksek sayılarına ihtiyaç duyulması nedeniyle hem tam otomatik bir sistemin kullanılması, hem de bu sistemin ucuz olması gerekmektedir. Bu ihtiyacı karşılayacak biyoreaktör tipinin dolgulu yatak biyoreaktör olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [98]. Hücre üretim biyoreaktörlerinin mühendislik parametreleri Çizelge 2.2 'de, mikrot taşıyıcı destekli litre ölçekli biyoreaktörler ile yapılan insan MKH üretimi ile ilgili olarak yapılan çalışmalar Çizelge ise 2.3'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2 Hücre üretim biyoreaktörlerinin mühendislik parametrelerinin karşılaştırılması [81]

Biyoreaktör tipi	Genel tanımlar	Kütle transfer mekanizması	Kayma gerilimi	Özel kullanım	Doku	Önem
Statik kültür	Besin akışı olmayan kesikl kültür	Kütle transferi difüzyon ile gerçekleşir	Çok düşük	Hücre çoğaltmak	-	Hücre yapılarının homojen yapısı ve difüzyon sınırlamaları
Karıştırmalı kap 	Manyetik karıştırıcı ile ortam karıştırılır	Kütle transferi konveksiyon ile gerçekleşir	Yüksek	Taşıyıcıya dinamik ekim	Kıkırdak	Kayma geriliminin ayarlanması ve kütle transferinin artırılması
Perfüzyon 	Kültür ortamı 3 boyutlu taşıyıcıların üzerinden veya yanından akar	Kütle transferi konveksiyon ile gerçekleşir	Normal	Fiziksel ve çevresel olarak insan dokularına benzer dokuları üretmek	Epitel hücreler, kıkırdak ve arterler	Özellikle insan hücrelerinin taşıyıcı malzemeye ekimi ve çoğaltımı

Çizelge 2.3 Mezenkimal kök hücre üretiminde litre ölçekli biyoreaktörler [77].

Hücre Tipi	Biyoreaktör hacmi (L)	Biyoreaktör tipi	Malzeme	Kültür süresince kat artışı	İkilenme süresi (saat)
İnsan Kemik iliği MKH	3.0	Mobius Cellready biyoreaktör	Cytodex1 ve 3 Hillix mikrotarıyıcı Cultishper S ve G	40.0;12 gün	54
İnsan MKH	3.0	Mobius Cellready biyoreaktör	Kollajen kaplı mikrotarıyıcı	5.2;5 gün	48
İnsan MKH	2.5	Biostat B plus biyoreaktör	Gözeneksiz P-102L Mikrotarıyıcı (SoloHill)	7.0;12 gün	76.8
İnsan Yağdoku MKH	2.0	Univessel SU2L (Sartorius stedimBiotech)	PronektinF kaplı mikrotarıyıcı (SoloHill)	35.0;7 gün	25.6
İnsan Yağ/Kemik MKH	1.0	Bioflo 110 biyoreaktör	Gözeneksiz plastik mikrotarıyıcı (SoloHill)	7.0;7 gün 5.0;7 gün	60/105
İnsan Yağ doku MKH	2.5	Bioflo 310 biyoreaktör	Fibra-Cel® diskler (Eppendorf)	9.2; 9 gün	67.2

2.4.4.5 Tek Kullanımlık Biyoreaktörler

Cam veya paslanmaz çelikten yapılmış tekrar kullanılabilir biyoreaktörlerin yanında FDA onaylı plastiklerden yapılmış tek kullanımlık biyoreaktörler de vardır. Bu biyoreaktörlerin birçok avantajı olsa da çeşitli sınırlamaları vardır. En sık tartışılan konular, tek kullanımlık biyoreaktörlerin kullanımında sensörler için enstrümantasyon eksikliği ve ürünle doğrudan temas halinde olan plastik torba veya kabın iç tabakasından olası sızıntılardır. Bu tür biyoreaktörlerin hepsi ya silindirik rijit bir kap ya da esnek bir torba içermektedir. Bu esnek torbaların bir kap yardımıyla sabitlenmesine dikkat çekilmektedir [102].

Hayvan hücreleri için biyoreaktör seçimi bir dizi faktöre bağlıdır. Bu faktörler hücrenin morfolojisi, büyümesi ve üretim davranışı ile karakterize edilen üretilecek hücre hattı ve tek kullanımlık biyoreaktör tipinin seçimi üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir.

Biyoreaktörün ölçeği ve akış düzeni, karıştırma süreleri, hacimsel oksijen aktarım hızları, spesifik güc giriş verileri, kayma gerilmesi dağılımı vb. dahil olmak üzere mühendislik parametreleri tek kullanımlık plastik biyoreaktörlerde de kritik faktörlerdir. Büyük firmalar karıştırmalı kaplarda yaptıkları hücre kültürlerinde hızlı bir şekilde tek kullanımlık biyoreaktörleri kullanmaya başlamışlardır [92].

2.4.5 Biyoreaktör Alt Akım İşlemleri

MKH'lerin alt akım işlemleri taşıyıcıları reaktörden ayırdıktan sonra malzemelerin yıkanması, hücrelerin enzimatik olarak ayrılması ve dondurulmasına kadar geçen süreci içerir. MKH'lerin allojenik hücre terapisi için alt akım teknolojisine bağlı olarak çok az sayıda çalışma yapılmıştır. GMP şartlarında kapalı bir sistem yeterli canlılık ve işlevselliğe sahip, oldukça saf bir hücre ürünü elde etmek için alt akım işlemleri, işlem süresinin kısaltılması, hacmin azaltılması, düşük kayma gerilimi ve sistemin ölçeklendirilmesi gibi spesifik gereksinimleri karşılamalıdır [100].

Genel olarak hücrelerin üretimi doğrudan biyoreaktör içerisinde gerçekteşirilir. Üretim sonunda karıştırıcı durdurulur ve pipetle ortam çıkarılmadan mikrotarıyıcılar biyoreaktör tabanından alınır. Bu noktada, mikrotarıyıcıların veya hücre-mikrotarıyıcı agregatlarının sedimentasyon hızı önemlidir. Bu durumda ortam yoğunluğuna yakın yoğunluğa sahip mikrotarıyıcı kullanılması gerekir. Mikrotarıyıcılar sistemden ayrıldıktan sonra tekrar hücreleri mikrotarıyıcılardan ayırmak gerekir. Bu işlem mikrotarıyıcıların boyutuna yakın filtrasyon işlemi ile veya enzimatik olarak gerçekteşirilir [101].

2.4.6 Mikrotarıyıcı Teknolojisi

Mikrotarıyıcı teknolojisi, biyofarmasötik endüstrisinde aşı üretimi için yüzeye bağımlı hücrelerin kültüre edilebilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve ilk olarak 1967'de DEAE-Sephadex küreciklerinin insan embriyonik akciğer hücrelerini ve tavşan embriyonik deri hücrelerini kültüre edebilmek için tanımlanmıştır [83].

Mikrotarıyıcılar tipik olarak 90-350 μm çapında ve sudan biraz daha fazla yoğunluğa sahip, hücre yapışmasını ve büyümesini destekleyen mikrokürelerdir. Hücre kültürüne mikrotarıyıcıların katılması yüksek yüzey/hacim oranı nedeniyle nispeten düşük hacimlerde yüksek hücre yoğunluğu elde edilmesine katkıda bulunur. Dahası mikrotarıyıcılı 3 boyutlu hücre kültürlerinde mekanik uyarım sayesinde hücre fenotipinin korunması sağlanmaktadır [84]. Hem ticari olarak var olan hem de özel uygulamalar için geliştirilen birçok mikrotarıyıcı, hücresel tedavi ve hücre üretim uygulamaları için

kullanılmaktadır. Ticari olarak gözenekli ve gözeneksiz mikrotarıyııcılar bulunmaktadır. Mikrotarıyııcılar jelatin, cam, kollajen veya selülozdan üretilirler. Hücre kültürü performansını daha da arttırmak için, bu mikrotarıyııcılar ECM bileşenleri veya küçük moleküller gibi farklı kaplama malzemeleri ile işlevsel hale getirilirler [85].

Geleneksel tek tabakalı hücre kültürüne kıyasla, mikrotarıyııcı-destekli kültürler, yüksek hücre yoğunluklarının ve antikolar gibi hücresele ürünlerin daha yüksek verimlerinin elde edilebilmesi bakımından avantaj sağlar. Mikrotarıyııcı sistemin temel avantajı maliyetin ve kontaminasyon riskinin azaltılması, pasaja gerek kalmadan kültür süresinin artması ve fizyolojik ortam nedeniyle *in vivo* koşulların taklit edilmesidir. Bu nedenle, mikrotarıyııcı kullanımı hücre kültürlerinde ve viral aşu üretiminde tercih edilmektedir [86].

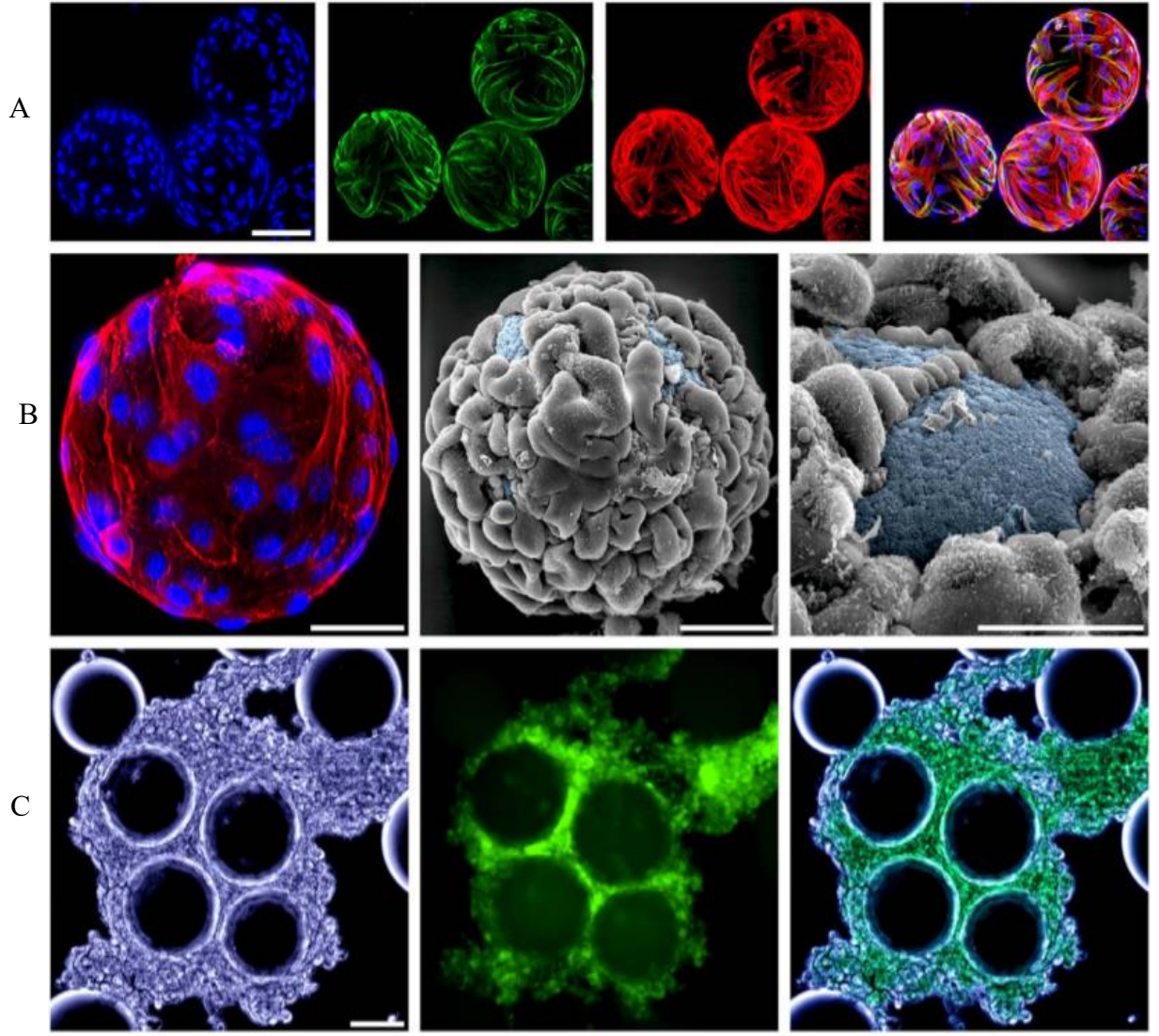
Kök hücre üretimi için ticari olarak çeşitli doğal ve sentetik temelli mikrotarıyııcılar mevcuttur. Bu mikrotarıyııcılar dekstran (Cytodex-1, Cytodex-3), jelatin (CultispherS), selüloz (DE-53, cytopore-2), polistiren (Plastic, FACT III), poliester (Fibra-Cel®), ve hidrosillenmiş metakrilat (Tosoh 10 PR) bazlı olabilmektedirler [87].

Mikrotarıyııcı seçimi hücre kültüründe çok önemlidir. Mikrotarıyııcı tipleri boyut, çekirdek malzeme (modifiye polistiren, selüloz, dekstran, jelatin) ve yüzey kaplamasında kullanılan malzemeler (kolajen, fibronektin, dietilaminoetil, trietilamonyum) açısından büyük ölçüde farklılık gösterir. Çekirdek malzemesi ve yüzey kaplaması sadece mikrotarıyııcı yerleşimi ve hücre büyümesini etkilemez, aynı zamanda mikrotarıyııcıları süspanse halde tutmak ve yeterli kütle transferi için gerekli olan karıştırıcı hızını etkiler.

İlginç bir şekilde, farklı araştırma gruplarında yapılan araştırmalar, farklı mikrotarıyııcı yüzey substratlarının fenotipte bir değişikliğe neden olabileceğini göstermiştir ki bu, farklı yüzey işaretleyicilerinin (örn. CD90, CD105, CD166) ekspresyon seviyesindeki azalma ile fark edilir hale gelmiştir. Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalar malzeme sertliği, nanotopografi ve lokal eğriliği içeren düzlemsel yapının insan MKH çoğalımında hücrelerin fenotipini korunmasını ve farklılaşmayı etkileyebileceğini göstermiştir [84]. Çeşitli mikrotarıyııcıların özellikleri Çizelge 2.4'de, görünümleri ise Şekil 2.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4 Mikrotarıyıcıların üretici firmaları ve özelliklerinin listesi [84].

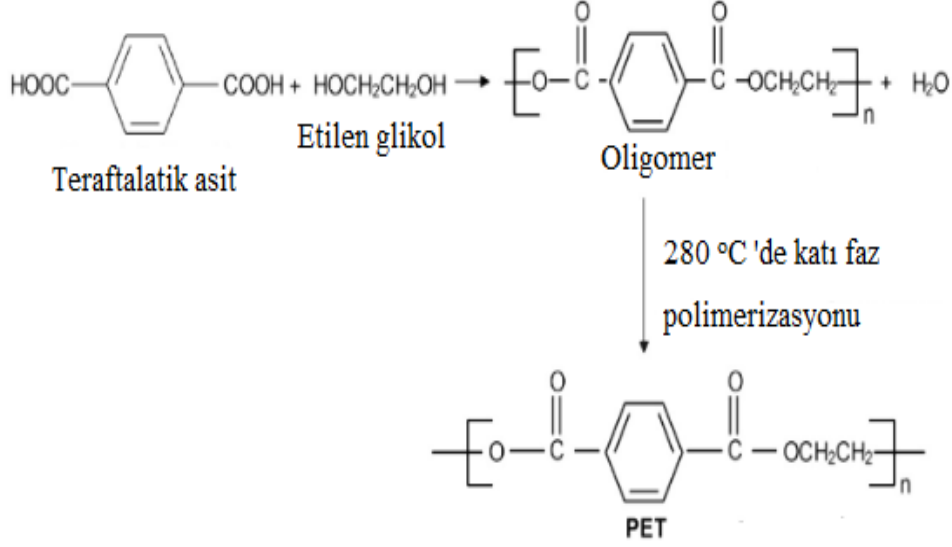
Mikrotarıyıcı	Üretici	Tip	Yoğunluk (g/mL)	Boyut (µm)	Alan (cm ² /g)	Kullanım kapasitesi (g/L)
Cytodex 1	Pharmacia	Katı	1.03	147-248	4400	2.5
Cytodex 3	Pharmacia	Katı	1.04	141-211	2700	2.5
Collagen	<i>SoloHill</i>	Katı	1.03	150-210	325	20
Plastic	<i>SoloHill</i>	Katı	1.03	150-210	325	20
FACT	<i>SoloHill</i>	Katı	1.03	150-210	325	20
ProNectin	<i>SoloHill</i>	Katı	1.03	150-210	325	20
Plastic Plus	<i>SoloHill</i>	Katı	1.03	150-210	325	20
Cultispher-G	Hyclone	Geçirgen	1.04	170-270	Bilinmiyor	1
Cultispher-GL	Hyclone	Geçirgen	1.04	170-270	Bilinmiyor	1
Cultispher-S	Hyclone	Geçirgen	1.04	170-270	Bilinmiyor	1
Cytopore 1	Pharmacia	Geçirgen	1.03	200-280	11000	1
Cytopore 2	Pharmacia	Geçirgen	1.03	200-280	11000	1



Şekil 2.8 500,000 hücre ekilmiş Cytodex 1 mikrot taşıyıcıların DAPI (mavi) ve bir konjüge sekonder antikor (yeşil) ve Texas Red-X phalloidin ile saptanan α -sarkomerik aktin antikorunu kullanılarak floresan boyaması, her bir ölçek 100 μ m temsil etmektedir (A), F-actin ile boyanmış Cytodex 1 mikrot taşıyıcıların taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, ilk iki resim ölçeği 100 μ m, son resim ölçeği 50 μ m temsil etmektedir (B), Farklı hücrelerin birleştirilmiş floresan boyamaları, her bir ölçek 100 μ m temsil etmektedir (C) [85].

2.4.7 Üç Boyutlu Dokunmamış Poliester Fabrik (NWPF)

PET (Polietilen Tereftalat), yüksek mukavemet, şeffaflık ve güvenlik özelliklerine sahip yarı kristal, termoplastik bir poliesterdir [89]. Dimetil tereftalat (DMT) veya tereftalik asidin (TPA) etilen glikol (MEG) ile ön polimerizasyonu, PET sentezindeki ilk endüstriyel adımdır [90]. PET sentez reaksiyonu Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9 PET sentez reaksiyonu [89].

PET büyük ölçekli tekstil teknolojileri kullanılarak üretilmektedir. PET, mekanik mukavemeti iyi ve besin alışverişi için yüksek kütle transfer katsayısına sahip biyoyumlu, biyobozunur olmayan bir matris oluşturur. Yüksek gözeneklilik ve yüzey alanı hücrelerin çoğalmasına olanak sağlar [98].

Dokunmamış poliester fiber matrisler (NWPF) doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır ve fonksiyonel doku ve hücrelerin gelişimi için hücrelerin dengeli ve farklılaşmadan çoğalmasını sağlamak için mikroyapısının modifikasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır [87]. Dacron olarak da bilinen polietilen tereftalat (PET), protez vasküler greftleri olarak kullanılmaktadır ve mükemmel mekanik mukavemet ve iyi biyoyumluluğa sahiptir [88].

Doku mühendisliği uygulamaları için lifli doku iskelelerini iki büyük grup oluşturmaktadır: Elektroeğirilmiş nanofiber ağlar ve mikrofiber tekstiller. Nano lifli iskelelere olan ilgi son on yılda giderek artmıştır [87]. Gözenek boyutları ayarlanabildiği için dokunmamış kumaşlar filtrasyon uygulamalarında da kullanılmaktadır. Ayrıca, bu yararlı özelliğinden dolayı doku mühendisliği uygulamalarında özellikle kıkırdak doku

mühendisliği ve biyomalzemeler için de kullanılmıştır [89]. Dokunmamış fiber matriksler, yüzey/hacim oranının yüksek olması, hücrelerin yapışması için boyutlarının uygun olması ve işlenebilecek biyomalzeme çeşitliliğine sahip olmalarından dolayı popülerdirler [87].

NWPF'ler doku kültürü kaplarında (TCPS kaplar) ve dolgulu yatak biyoreaktörlerde farklı boyutlarda kesilerek ve modifiye edilerek etkili bir şekilde kullanılabilir. NWPF'ler çeşitli yüzey modifikasyonları yapılarak FibraCel® ve BioNOC® ismiyle ticari olarak da piyasada bulunmaktadır [88].

Ouyang ve arkadaşları erişkin kök hücreleri üretmek için PET matrisleri kullanarak gerçekleştirdikleri 15 günlük çalışmada hücre sayısının 105 kat arttırarak 4.0×10^6 hücre sayısına ulaştığını ve çoğalan hücrelerin farklılaşmadan kaldığını gözlemlemiştir [91]. Ma ve Zhao PET kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada perfüzyon tipi biyoreaktörde hücre sayısını 40 kat arttırarak 4.22×10^8 hücre sayısına ulaştıklarını rapor etmişlerdir [92].

3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez kapsamında yapılan çalışmalar üç ana başlık altında incelenmiştir. İlk bölümde hücre taşıyıcı olarak kullanılacak NWPF matrislerin modifikasyon işlemleri açıklanmıştır. İkinci kısmında preosteoblastik MC3T3-E1 hücreleri ve sıçan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler (rAdMKH) ile yapılan statik hücre kültür çalışmaları özetlenmiştir. Son bölümde ise dolgulu yatak biyoreaktörde gerçekleştirilen 3 boyutlu dinamik hücre çalışmaları hakkında bilgi sunulmuştur.

3.1 Kullanılan Malzemeler

Ön çalışmalarda kullanılan Fibracel® diskler Eppendorf (Almanya) firmasından satın alınmıştır. NWPF (Reemay 2214 polyester nonwoven fabric) modifikasyon işlemi için kullanılan sülfürik asit (H₂SO₄) Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Fetal sığır serumu (FBS), L-glutamin, Alpha-MEM (w/o L-glutamin), penisilin-streptomisin, tripsin / EDTA çözeltisi, gentamisin, amfoterisin B 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT), glutaraldehit (hacim/hacim, %25), hidroklorik asit (HCl), 4,6-diamidine-2'-phenylindole, propidyum iyodür (DAPI) ve (Triton X- 100 Sigma-Aldrich (ABD) firmasından satın alınmıştır. Dulbecco Fosfat Tampon Çözeltisi (DPBS) NZYTech (Portekiz) firmasından satın alınmıştır. Ön çalışmalarda kullandığımız 1L hacimli otoklavlanabilir DYB New Brunswick™ (ABD) firmasından temin edilmiştir. Küçük ölçekli (100 mL) otoklavlanabilir DYB Sesim Kimya Ltd.Şti. (Türkiye) firmasından satın alınmıştır.

Çizelge 3.1 Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların özeti.

Gerçekleştirilen çalışmalar	Yapılan analizler
<p>1.Reemay 2214 (NWPF) disk karakterizasyonu</p> <ul style="list-style-type: none"> Grup 0 (Kontrol), Grup 1 (3M H₂SO₄ ile muamele), Grup 3 (3M H₂SO₄ ile muamele ve sonikasyon) Grup 4 (3M H₂SO₄ ile muamele ve kütleme). 	<ul style="list-style-type: none"> Su temas açısı analizi. EDS analizi. SEM analizi Çekme testi
<p>2.Statik hücre kültürü çalışmaları</p> <ul style="list-style-type: none"> Grup 0 (Kontrol), Grup 1 (3M H₂SO₄ ile muamele) Grup 2 Grup 3 (3M H₂SO₄ ile muamele ve sonikasyon) Grup 4 (3M H₂SO₄ ile muamele ve kütleme). Hücre: MC3T3 (3X10⁴ hücre/disk) 	<ul style="list-style-type: none"> Hücre sayısının belirlenmesi MTT analizi SEM analizi
<p>3.Dinamik ön hücre kültürü çalışmaları (Çalışma 1, 2, 3)</p> <ul style="list-style-type: none"> Taşıyıcı : Fibra-Cel® (çalışma 1: 10g, çalışma 2: 10g, çalışma 3: 5g) Hücre: MC3T3 Ekim yoğunluğu: çalışma 1 x10⁷ hücre/reaktör, 2 x10⁷, hücre/reaktör, çalışma 3 1.5x10⁷ hücre/reactor. Çalışma hacmi : 0.5 L Kültür süresi: 7 gün 	<ul style="list-style-type: none"> Hücre sayısının belirlenmesi MTT analizi Hücre kaldırma çalışması
<p>4.Dinamik hücre kültürü DYB optimizasyon çalışmaları</p> <ul style="list-style-type: none"> Taşıyıcı: Fibra-Cel® (1 g), NWPF disk (1g) Hücre: MC3T3 , AdMKH Ekim yoğunluğu: 3x10⁷ hücre/ reaktör Çalışma hacmi: 100 mL Kültür süresi: 7 gün 	<ul style="list-style-type: none"> Hücre sayısının belirlenmesi MTT analizi Hücre kaldırma çalışması DAPI/F-aktin boyama.
<p>5.Dinamik hücre kültürü çalışmaları</p> <ul style="list-style-type: none"> Taşıyıcı: NWPF disk (1g) Hücre: AdMKH Ekim yoğunluğu: 3x10⁷ hücre/reaktör Çalışma hacmi: 100 mL Kültür süresi: 12 gün 	<ul style="list-style-type: none"> Hücre sayısının belirlenmesi MTT analizi Hücre kaldırma çalışması DAPI/F-aktin boyama Dinamik kültür sonrası DAPI/F-aktin , kristal biyole boyama Glukoz, laktat ve üre analizi.

3.2 PET Fiber Matrislerin Yüzey Modifikasyonu ve Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.1 Yüzey Modifikasyonları

Çalışmalar için 6 mm çapında kesilen NWPF taşıyıcı diskler, yüzey hidrofilitésinin ve biyoyumluluğunun artırılması amacıyla, farklı metotlar ile modifikasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Çalışmada kullanılan PET fiber matrislerin hidrofilitésinin artırılmasına yönelik olarak uygulanan sülfürik asit uygulamaları Çizelge 3.2’de detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Karşılaştırma yapabilmek amacıyla kontrol gruplarına ticari ürün olan Fibra-Cel® diskler de eklenmiş ancak bu taşıyıcılara herhangi bir modifikasyon işlemi uygulanmamıştır.

3.2.2 Çekme Testi

Çekme testi yapılması amacıyla NWPF malzemeler 10 cm x 10 cm boyutunda kesilmiştir. Çekme testi TA-XT PlusC Texture Analyser cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Test yapılacak örnekler cihazın kısıkaçlarına yerleştirilmiş ve dakikada 15 mm çekilerek [93] test tamamlanmıştır.

Çizelge 3.2 Tez çalışması kapsamında PET fiber matrislere uygulanan yüzey modifikasyonları.

<p>0.Grup (Kontrol grubu)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Reemay 2214 malzemesi herhangi bir yüzey muamelesi yapılmadan kullanılmıştır.
<p>1. Grup EtOH-3M - H₂SO₄</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Örnekler 10 dk ultra saf su ile yıkanmış ardından 10 dk süreyle %96 (v/v)'lık etanolde yıkanmıştır. • Yıkanan örnekler 1 gece 70 °C de kurutulmuştur. • Kurutulan örnekler 3M H₂SO₄ ile 24 sa muamele edilmiştir. • Sülfürik asit ile muamele edilmiş örnekler akış halindeki ultra saf su ile 30 dk süreyle 2 kez yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur [94].
<p>2. Grup</p>	<p>Fibra-Cel[®] Bu gruba herhangi bir modifikasyon işlemi uygulanmamıştır.</p>
<p>3.Grup EtOH-3M-H₂SO₄-S(+)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Örnekler 10 dk ultra saf su ile yıkanmış ardından 10 dk süreyle %96 (v/v)'lık etanolde yıkanmıştır. • Yıkanan örnekler 1 gece 70 °C de kurutulmuştur. • Kurutulan örneklere 3M H₂SO₄ ile 10 dk sonikasyon uygulanmıştır. • Sülfürik asit ile muamele edilmiş örnekler akış halindeki ultra saf su ile 30 dk süreyle 2 kez yıkanmış ve kurutmaya bırakılmıştır [94].
<p>4.Grup Na₂CO₃- 3M- H₂SO₄- K(+)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Örnekler 1 sa süreyle 80°C' de %1 (w/w) Na₂CO₃ ile yıkanmıştır. • Yıkanan örnekler 3M H₂SO₄ ile 15 dk süreyle muamele edilmiştir. • Örnekler 110°C' de 6 dk süre ile kürlenmiştir. • Kürlenmiş örnekler ultra saf su ile 30 dk süreyle 2 kez yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur [96].

3.2.3 Su Temas Açısı Analizi

PET fiber matrislerin sülfürik asit uygulaması öncesi ve sonrasındaki hidrofilitelerinin değerlendirilebilmesi için statik su temas açısı ölçümleri, Kruss DSA 100 (Almanya) marka cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Statik temas açısı değerleri, oda sıcaklığında, yakalanmış damla (sessile drop) yöntemi ile ölçülmüştür.

3.2.4 SEM ve EDS Analizleri

PET fiber matrislerin yüzey morfolojilerinin belirlenebilmesi amacıyla oda sıcaklığında kurutulan örnekler karbon ile kaplanarak taramalı elektron mikroskobu (SEM, TESCAN, GAIA3 Triglav™, ABD) ile görüntülenmiştir. Ayrıca malzeme yüzeyinde noktasal olarak elementel bileşimi tanımlamak amacıyla SEM cihazına entegre Oxford Xmax 150 Enerji Dağılım X-ışını Spektrometresi (EDS) ile analizler gerçekleştirilmiştir.

3.3 Statik Hücre Kültürü Çalışmaları

Hazırlanan örnekler PBS (pH:7.4) içinde 121°C'de 20 dk boyunca otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Ön hücre kültür çalışmalarında 14. pasajdaki MC3T3-E1 hücreleri kullanılmıştır. Hücreler %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) Penisilin/ Streptomisin ve %1 (v/v) L-glutamin içeren α -MEM ortamında (büyüme ortamı) 175 cm²'lik flasklarda kültüre edilerek çoğaltıldıktan sonra üç paralel (her grup için 3 disk) 3×10^4 hücre/disk olacak şekilde 10 μ L'lik hücre süspansiyonunun diskler üzerine damlatılması ile disklere ekilmiştir. 24 gözlü non-treated kaplarda üç saatlik inkübasyonun ardından hücre ekili disklerin bulunduğu gözlere 1 mL büyüme ortamı eklenmiştir ve örnekler 7 gün boyunca 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde (Heraus, Almanya) inkübe edilmiştir. Hücre kültür çalışması boyunca 3. ve 6. günlerde kültür ortamı taze ortam ile değiştirilmiştir. Birinci, 4., ve 11. günlerde gözlerden alınan diskler %2.5 (v/v)'luk glutaraldehit ile oda sıcaklığında muamele edilmiş ve ardından SEM ile görüntülenmiştir.

3.3.1 MTT Analizi

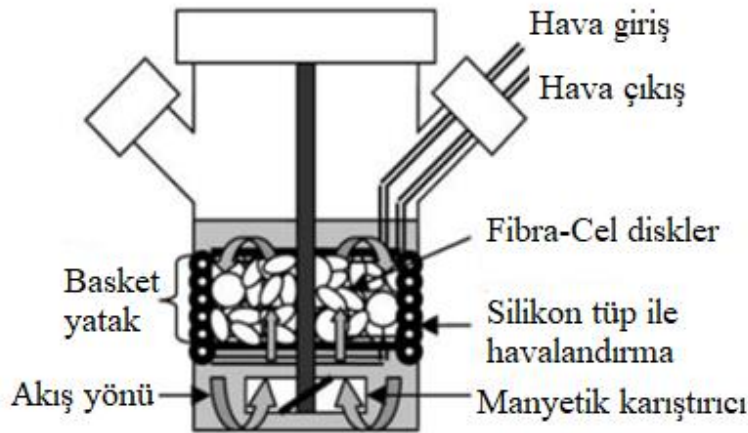
PET diskler üzerinde çoğalan canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin belirlenmesi için MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) analizi gerçekleştirilmiştir. Kültürün 1., 3., 5. ve 7. günlerinde örnekler üzerine 600 μ L serumsuz taze besi ortamı ile 60 μ L MTT eklenerek 37°C'de 3 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından 400 μ L izopropanol çözeltisi gözlere eklenerek oluşan mor renkli formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen bu çözelti 96-gözlü polistiren kabin gözlerine aktarılmış (200 μ L/göz) ve mikropłaka okuyucu yardımıyla 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de optik yoğunluk ölçümü yapılmıştır.

3.3.2 Hücre Sayımı

Hücre sayımı için kültürün 1. ve 7. günlerinde diskler 24 gözlü kültür kaplarından başka steril kaplara aktarılmıştır. Gözlere 1 mL PBS eklenmiş (pH:7.4) ve yıkanmıştır. Ardından disklerin buldukları gözlere 500 µL tripsin-EDTA (%0.25) çözeltisinden eklenmiş ve 5 dk süreyle inkübatör içinde bekletilmiştir. İnkübatörden alınan 24 gözlü kapların içindeki tripsin pipetlenmiş ve ardından üzerine 500 µL FBS içeren ortam eklenmiştir. Toplam 1 mL hacimdeki hücre süspansiyonu daha sonra hemositometrik olarak sayılmıştır. Sayım Neubauer Lamı kullanılarak floresan mikroskopu altında 10x büyütme ile gerçekleştirilmiştir.

3.4 Dinamik Ön Hücre Kültürü Çalışmaları

Dinamik kültür çalışması için 1 L hacmine sahip dolgulu yatak biyoreaktör (New Brunswick Scientific, U.S.A) kullanılmıştır. Biyoreaktör ve ekipmanları çalışmadan önce 121°C'de 30 dk süre ile otoklavlanmış, steril şartlar bozulmadan laminar kabine alınmıştır. Biyoreaktörün ekipmanları yerleştirilirken steril eldivenler kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan biyoreaktöre ait şema Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

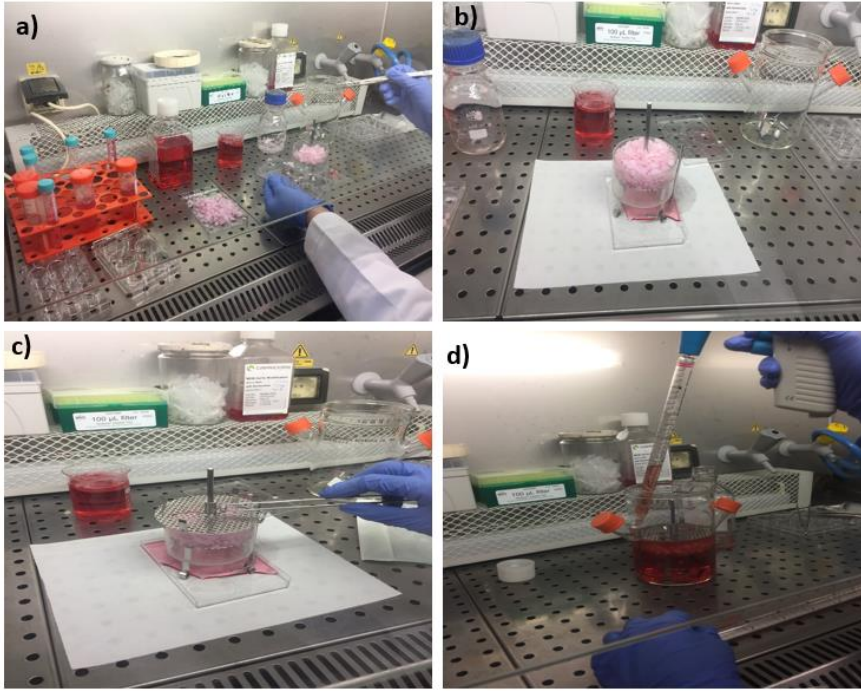


Şekil 3.1 Dolgulu yatak biyoreaktörün şematik görünümü [94].

Dinamik kültür öncesinde 9. pasajda bulunan MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattı kullanılmıştır. İlk olarak hücreler 150 cm² lik flaskta çoğaltılmıştır. Hücre kültür ortamı hazırlanması için;

- i) %10 (v/v) Fetal Sığır Serum (FBS)
- ii) %1 antibiyotik karışımı (100 birim/mL penisilin-100 µL/mL streptomisin)
- iii) %1 L-glutamin
- iv) %88 (v/v) Alpha-MEM (w/o L-glutamin) kullanılmıştır.

10 g FibraCel® PBS içinde 121°C 'de 20 dk süreyle otoklavlandıktan sonra laminar kabin içinde steril olan biyoreaktör içerisinde yerleştirilmiştir. Daha sonra flasklardan elde edilen toplamda 30×10^6 hücre statik ekimle disklerin üzerine ekilmiş ve 0.5 L kültür ortamı eklendikten sonra biyoreaktör inkübatöre alınmıştır. Biyoreaktörün karıştırma hızı 50 rpm'e ayarlanarak 10 günlük kültür çalışması başlatılmıştır. Birinci, 3., 5., 7. ve 10. günde MTT analizi ve hücre sayımı yapılarak hücrelerin canlılığı ve miktarları belirlenmiştir. Bu işlem için biyoreaktör inkübatörden laminar kabin içine alınarak steril pens yardımıyla biyoreaktörün sepetinin farklı kısımlarından örnekler alınmıştır. Biyoreaktör içerisindeki besi ortamının pH değişimi pH metre yardımıyla 1., 3., 5., 7. ve 10. günde takip edilmiştir. Biyoreaktörün kurulumu Şekil 3.2'de görülmektedir. Kullanılan FibraCel® disklerin özellikleri ise Çizelge 3.3'te özetlenmiştir.



Şekil 3.2 Dolgulu yatak biyoreaktörün kurulumu: a) Disklerin steril olarak sepete yerleştirilmeye hazırlanması işlemi, b) Disklerin sepete steril yerleştirilmesi, c) Sepetin steril hazırlanması, d) Hücreler ve ortamın biyoreaktöre steril aktarımı.

Çizelge 3.3 FibraCel® disk taşıyıcıya ait bilgiler [94].

Yapı malzemesi	PET (polipropilen ile yüzey modifikasyonu yapılmış)
Disk kalınlığı	0.431 mm
PP destek kalınlığı	0.508 mm
Disk çapı	6 mm
Yoğunluk	1.037-1.040 g/cm ³
Toplam yüzey alanı	1200 cm ² /g disk
Disk ağırlığı	0.00572 g
1 gramda bulunan disk sayısı	175 adet
Otoklavlanabilirlik	Evet
Fiber çapı	14-20 µm
Porozite	%90
İnokulum yoğunluğu	0.2-1x10 ⁶ hücre/mL
Maksimum hücre sayısı	6x10 ⁸ hücre/disk
Kullanılabilen hücre tipi	Süspanse ve yüzey bağımlı hücreler

3.4.1 MTT Aanalizi

MTT 3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) analizi için kültürün 1., 3.,5.,7. ve 10. günlerinde Bölüm 3.3.1’de anlatılan işlemin aynısı uygulanmıştır.

3.4.2 Hücre Sayısının Belirlenmesi

Hücreler hemositometrik sayım yöntemiyle Neubauer lamı kullanılarak 10x büyütme ile 1. ve 7. günlerde biyoreaktör sepetinin farklı bölgelerinden diskler alınarak floresan mikroskop (Olympus Microscopy, ABD) kullanılarak sayılmıştır. Hücre sayımı için Bölüm 3.3.2’de anlatılan işlemin aynısı uygulanmıştır.

Aynı çalışma aynı koşullarda 4. günde kültür ortamının %50 si değiştirilerek denenmiştir. Öncekinden farklı olarak biyoreaktör önce 100 rpm’de 1 gece çalıştırılmış, daha sonra 50 rpm’e ayarlanarak 7 günlük kültür çalışması devam ettirilmiştir. Birinci, 3. 5. ve 7.günde MTT ve hücre sayımı yapılarak hücrelerin canlılıkları ve miktarları belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında aynı şartlarda yatak yüksekliği yarıya indirilerek 5g Fibra-Cel® malzeme kullanılmış ve biyoreaktöre 15x10⁶ hücre ekilerek 7 günlük hücre kültür

çalışması gerçekleştirilmiştir. Üçüncü ve 5. günlerde ortamın %50'si değiştirilmiştir. Biyoreaktör ile yapılan çalışma koşulları Çizelge 3.4'te özetlenmiştir.

Çizelge 3.4 Biyoreaktör ile yapılan ön çalışmalara ait koşullar.

3 Boyutlu Dinamik Kültür Ön Çalışma Parametreleri										
Dinamik Kültür	Hücre Tipi	Malzeme	Malzeme Miktarı (g)	Hücre Ekim Yoğunluğu	Kültür Süresi (gün)	Karıştırma Hızı (rpm)	Yatak Yüksekliği (cm)	Ortam Değişimi	Çalışma Hacmi (L)	Analizler
Çalışma 1	MC3T3-E1 fare kemik öncül hücreleri	Fibra-Cel [®]	10	30x10 ⁶ (hücre/reaktör)	7	50	5	Yapılmadı	0.5	<ul style="list-style-type: none"> • MTT analizi • Hücre sayısının belirlenmesi
Çalışma 2	MC3T3-E1 fare kemik öncül hücreleri	Fibra-Cel [®]	10	30x10 ⁶ (hücre/reaktör)	7	50	5	4. gün %50	0.5	<ul style="list-style-type: none"> • MTT analizi • Hücre sayısının belirlenmesi • Hücre kaldırma çalışması
Çalışma 3	MC3T3-E1 fare kemik öncül hücreleri	Fibra-Cel [®]	5	15x10 ⁶ (hücre/reaktör)	7	50	2.5	5.gün %50	0.5	<ul style="list-style-type: none"> • MTT analizi • Hücre sayısının belirlenmesi • Hücre kaldırma çalışması

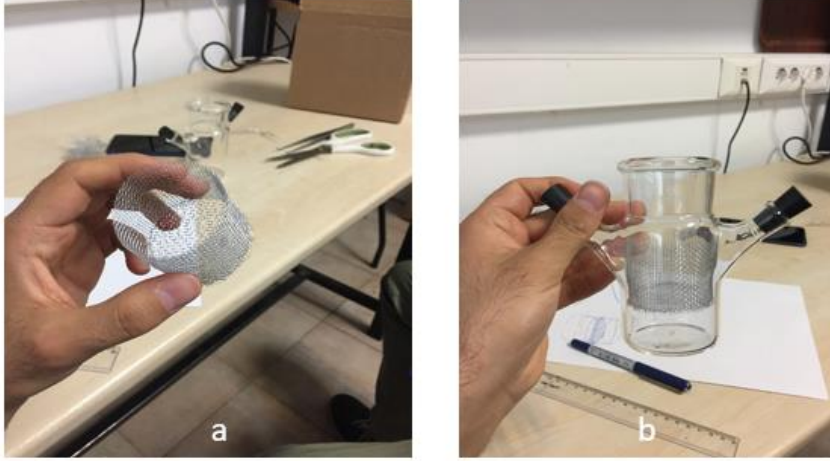
Çizelge 3.3'te belirtilen 2. dinamik kültür çalışmasında biyoreaktördeki bütün malzemelerden hücreleri kaldırma çalışması yapılmıştır. Hücre kaldırma çalışması için 7. günün sonunda taşıyıcı diskler steril bir kap içerisine alınmış ve 25 ml PBS eklenerek inkübatör içinde 15 dk süre ile 50 rpm hızda karıştırılmıştır. Ardından PBS laminer kabin içerisinde kabin içinden uzaklaştırılmış ve üzerine 25 mL tripsin eklenerek 15 dk süreyle 50 rpm de inkübatör içinde karıştırma sağlanmıştır [97]. Daha sonra tripsin üzerine 25 mL serum içeren hücre kültür ortamı eklenmiş ve 4°C'de 1000 rpm, 5 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılmış ve hücrelerin üzerine 10 mL ortam eklenilerek hemositometrik sayım işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.5 Küçük Ölçekli Dolgulu Yatak Biyoreaktör Çalışmaları

Bu bölümde belirtilen çalışmalarda 100 mL hacminde DYB'de Fibracel® diskler ve MC3T3-E1 fare kemik öncül hücreleri kullanılarak biyoreaktör çalışma koşulları belirlenmiştir. Aynı koşullar kullanılarak sıçan Adipoz Mezenkimal Kök Hücre (rAdMKH) ve NWPf taşıyıcı diskler kullanılarak 3 boyutlu dinamik hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak küçük ölçekli dolgulu yatak biyoreaktör tasarlanmıştır.

3.5.1 Küçük Ölçekli Dolgulu Yatak Biyoreaktör Tasarımı

Çalışmada verimi artırmak ve malzeme sarfını azaltmak amacıyla biyoreaktörün ölçeği küçültülmüştür. Dolgulu yatak biyoreaktör tasarımı için 100 mL çalışma hacimli otoklavlanabilir cam biyoreaktör Sesim Kimya Ltd.Şti. (Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Tasarım yapılırken paslanmaz çelik tel ile biyoreaktörün hacmi hesaplanarak sepet kısmı oluşturulup biyoreaktörün içinde ortada kalacak şekilde yerleştirilmiştir. Hücre kültüründe kullanım amacıyla biyoreaktörün içindeki dolgulu yatak sepet sistemi 15 gün süre ile su içinde paslanma olup olmadığını gözlemlemek amacıyla bekletilmiş ve herhangi bir oksitlenmeye rastlanılmamıştır. Biyoreaktör sistemi hücre kültürü çalışmasında dolgulu yatak sepetin yüksek sıcaklıkta bozulmadığını görmek amacıyla 121°C sıcaklıkta 30 dk süre ile otoklavlanmış, dolgulu yatak kısmında herhangi bir sorun ile karşılaşılmamıştır. Şekil 3.3- a ve b de dolgulu yatak biyoreaktör sepetinin tasarım aşamaları gösterilmiştir. Sepet biyoreaktörün hacmine uygun şekilde hesaplanıp tasarlandığından dolayı biyoreaktörün içerisinde yerleştirildiğinde herhangi bir eklenti ile tutturulmasına gerek kalmamıştır.



Şekil 3.3 Dolgulu yatak biyoreaktör tasarımına ilişkin fotoğraflar, Sepetin tasarımı (a), biyoreaktör içine yerleştirilmesi (b)

3.6 Durgun Hücre Kültürü Çalışmaları

Küçük ölçekli biyoreaktörün ön hücre kültür çalışmalarında 14. pasajdaki MC3T3-E1 hücreleri kullanılmıştır. Hücreler %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) Penisilin/Streptomisin ve %1 (v/v) L-glutamin içeren α -MEM ortamında (büyüme ortamı) 175 cm²'lik flasklarda 7 gün boyunca 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüve (Heraus, Almanya) inkübe edilmiştir. Yedinci günün sonunda hücreler dinamik hücre kültürü çalışmasında kullanılmak üzere 100 mL hacimli biyoreaktöre aktarılmıştır.

3.7 Dinamik Hücre Kültürü Çalışmaları

Gerçekleştirilen ön çalışmalarda Fibra-Cel[®] diskler dinamik koşullarda MC3T3-E1 hücreleri ekilmiştir ve 7 günlük kültür boyunca MTT analizi ve hemositometrik sayım yapılmıştır, ayrıca 7 gün boyunca kültür ortamının pH ölçümü gerçekleştirilmiştir. Fibra-Cel[®] diskler DPBS (pH:7.4) içinde 121°C'de 20 dk boyunca otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sonrasında örnekler 50 mL'lik steril şişede büyüme ortamına alınarak 37°C'de 2 gün boyunca serum proteinlerinin malzeme yüzeyine adsorpsiyonunun gerçekleştirilmesi için şartlama işlemi uygulanmıştır. 2 gün sonra α -MEM atılıp disklerin üzerine hücreler eş dağılımlı bir şekilde ekilmiş ve 2 gün süreyle inkübatörde bekletilmiştir. İki g Fibra-Cel[®] diskler 10x10⁶ hücre ekilmiş olup kültür 7 gün devam ettirilmiştir. Kültürün 3. ve 5. gününde ortamın %50 si değiştirilmiştir. Kültür boyunca biyoreaktör 50 rpm hızında 24 sa süreyle çalıştırılmıştır. Karışma manyetik karıştırıcı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. MTT analizi ve hücre sayımı için Bölüm 3.4 'te belirtilen işlemlerin aynısı uygulanmıştır.

Dolgulu biyoreaktör sistemi 4 farklı parçadan oluşmaktadır: i) cam reaktör haznesi, ii) metalik sepet, iii) havalandırma sistemi ve iv) hidrofobik filtre. Cam reaktör haznesinde iki adet yan kol bulunmaktadır. Yan kollara takılan özel kapak sistemi ile havalandırma için kullanılan hidrofobik filtreler ve steril enjektör iğnesi yardımıyla biyoreaktör içine hava girişi sağlanmaktadır. Şekil 3.4 -a ve b de dinamik kültür için hazır hale getirilmiş biyoreaktörlerin kültüre başlangıç fotoğrafları gösterilmektedir.



Şekil 3.4 Ekipmanları ile birleştirilmiş küçük ölçekli dolgu yatak biyoreaktör (a), kültürün başlatılması (b).

3.7.1 MTT Analizi

Fibra-Cel[®] diskler üzerinde çoğalan canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin belirlenmesi için MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Kültürün 1., 3., 5. ve 7. günlerinde biyoreaktör inkübatörde çıkarılarak laminer akışlı kabinde steril koşullarda örnekleme yapılmıştır. MTT analizi için Bölüm 3.3.1'deki işlemlerin aynısı uygulanmıştır.

3.7.2 Hemositometrik Sayım ve Hücre Kaldırma Çalışmaları

Fibra-Cel[®] matrisler üzerinde canlılıklarını devam ettiren hücre sayısının belirlenebilmesi için Neubauer Lamı kullanılarak hemositometrik sayım gerçekleştirilmiştir. Kültüre edilen örnekler DPBS (pH:7.4) ile yıkanmıştır ve 24 gözlü kültür kapları içinde örneklere tripsin/EDTA karışımı eklenerek 37°C'de'de 5 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Büyüme ortamı kullanılarak tripsin enzimi inhibe edilmiştir ve elde edilen hücrelerden 4°C'de, 1000

rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilerek hücre pelleti elde edilmiştir. Hücreler, fizyolojik tuzlu su kullanılarak hazırlanan %0.4'lük (w/v) Tripan Mavisi çözeltisi ile yeniden süspanse hale getirildikten sonra sayılmıştır. Biyoreaktör çalışmalarında, dinamik kültür çalışmasının sonunda üretilen tüm hücrelerin canlılıklarına zarar vermeden yüksek verimle kaldırılması amaçlanmaktadır. Deneysel çalışmalarda kullandığımız örneklerin tek tek analiz edilmesi yaklaşımının yüksek sayıdaki (350 adet) örneklere uygulanması mümkün olmamaktadır. Bu nedenle çalışmalarımız devam ederken hücre üretimine yönelik hücre kaldırma denemeleri de gerçekleştirilmiştir. Bu amaca yönelik olarak biyoreaktörden alınan hücreli örnekler 4 kısma bölünmüş ve sayılmıştır. Hücre kaldırma çalışması Bölüm 3.4.2'de anlatılan işlem aynısı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar biyoreaktördeki toplam örnek sayısına genişletilerek normalize edilmiştir.

3.7.3 NWPF Diskleri Boyama

DAPI, 4,6-diamidine-2'-phenylindole, hücrelerin çekirdeklerini boyamaktadır. 100 mL hacimde yapılan hücre kültüründe Fibracel® disklerin 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde biyoreaktörden alınarak DAPI boyamaları ile hücrelerin malzeme üzerine yapışması ve çoğalması incelenmiştir. Bu işlem için biyoreaktörden alınan Fibracel® diskler ilk olarak 24 gözlü kaplar içerisinde oda sıcaklığında %2.5 (v/v)'luk glutaraldehit ile 10 dk süreyle karanlıkta çeker ocak içerisinde fikslenmiştir. Ardından malzemeler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. DAPI boyası hazırlanırken 1 mL hacimde Eppendorf tüpüne 1 mL PBS alınmış ve 10µL'si atılmıştır. Atılan PBS yerine 10µL DAPI çözeltisi eklenerek pipetlenmiştir. Hazırlanan DAPI boya çözeltisi örnekler üzerine pipetle eklenmiş 10 dk karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Boyanan örnekler 3 kez PBS ile yıkanmış ve floresan mikroskopta görüntüleri alınmıştır. Ön çalışmalar yapıldıktan sonra 100 mL çalışma hacmine sahip tasarlanan biyoreaktör ile 3 boyutlu rAdMKH ile aynı koşullarda 7 günlük hücre kültürü yapılmıştır. İstenilen hücre sayısına (3×10^7) 7. pasajda ulaşılmıştır. Hücreler %10 (v/v) FBS, %0.4 (v/v) penisilin/streptomisin, %0.2 (v/v) gentamisin, %0.2 (v/v) ampB, %1 (v/v) L-glutamin içeren α -MEM ortamında (büyüme ortamı) 175 cm²'lik flasklarda 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Yedinci günün sonunda hücreler dinamik hücre kültürü çalışmasında kullanılmak üzere 100 mL hacimli biyoreaktöre aktarılmıştır. Bu yapılan çalışma Bölüm 3.4.3.3'te belirtilen kültür koşulları ve yapılan analizlerle tamamen aynıdır, ancak hücre olarak sıçan Adipoz MKH kullanılmıştır. Kaldırılan hücreler tekrar 175 cm² flaska ekilip 8. pasajdaki hücrelerin morfolojileri 7 gün süreyle incelenmiştir. Hücrelerin DAPI ve F-aktin boyamaların yapılması için 1., 3., 5. ve 7. günde alınan taşıyıcı diskler % 2.5 (v/v)'luk glutaraldehit ile karanlık

ortamda oda sıcaklığında 10 dk süre ile sabitlenmiş ve DAPI/F-Actin boyamaları yapılarak görüntülenmiştir. Boyama işlemi yukarıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.8 Adipoz MKH Karakterizasyonu

Hücrelerin metabolik aktiviteleri MTT analizi ile belirlenmiştir. Aynı zamanda hücre morfolojilerini görmek amacıyla dinamik kültür sonrasında kristal viyole ve DAPI/F-aktin boyamaları gerçekleştirilmiştir. DAPI/F-aktin boyamalar Bölüm 3.4.3.3.3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Kristal viyole boyama için Petri kaplarına 5×10^3 hücre/cm² yoğunluğunda ekilmiştir. Hücreler yüzeyi kapladıktan sonra kültür kabındaki besi ortamı uzaklaştırılmış 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Fiksasyon 1/1(v/v) oranında aseton/metanol karışımı ile 4 °C'de 20 dk boyunca yapılmıştır. Ardından %20'lik (v/v) metanol çözeltisinde hazırlanan %0.5'lik (w/v) kristal viyole çözeltisi hücrelerin üzerine eklenmiş ve 30 dk beklenmiştir. Hücreler son olarak musluk altında yıkanmış ve optik mikroskop altında morfolojileri gözlemlenmiştir.

3.9 Glukoz, Laktat ve Üre Analizi

Kültür süresince biyoreaktörde çoğalan hücrelerin besin kaynağı ve metabolitlerin konsantrasyon değişimleri izlenerek hücrelerin metabolik aktiviteleri belirlenmiştir. Bu amaçla besinlerin glukoz analizi, metabolitlerin ise laktat ve üre tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Glukoz, laktat ve üre analizi, Ankara Üniversitesi İbni Sina Hastanesi, Biyokimya laboratuvarındaki biyokimya analizör cihazı (AU 680 Beckman Coulter, Calif., ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Glukoz, laktat ve üre analizi için 'Sigma Aldrich, Germany' firmasına ait test kitleri kullanılmıştır.

3.10 İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler GraphPad Instat Software programı ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Veriler MTT analizi için p-değerinin 0.05'den az olduğu durumlar için anlamlı kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde tez çalışmalarında elde edilen sonuçlar 3 aşamada tartışılmıştır. Bunlar: (1) NWPF disklerin modifikasyonu, (2) MC3T3-E1 statik hücre kültürü çalışmaları ve sıçan AdMKH hücre kültürü çalışmaları, (3) MC3T3-E1 dinamik hücre kültürü çalışmaları ve sıçan AdMKH hücre üretimi ve buna bağlı olarak gerçekleştirilen analizlerdir. Yapılan çalışmada ilk olarak malzeme modifikasyonu gerçekleştirilmiş ve bulgular tartışılmıştır. Sonrasında hücre kültüründe kullanılan modifikasyonu gerçekleştirilmiş malzemelerin statik hücre kültür çalışmaları literatür ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Son olarak ise dinamik hücre kültürü çalışmaları ile üretilen MKH'lerin klinik ölçekte üretimine yönelik değerlendirmeler literatürle kıyaslanarak tartışılmıştır.

4.1 NWPF Disklerin Modifikasyonu

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak malzemeye hücrelerin başarılı bir şekilde yapışması ve malzemenin yüzeyinde çoğalması gerekmektedir. Tez kapsamında kullanılan NWPF oldukça hidrofobik bir yapıya sahiptir ve hücrelerin yapışıp aynı zamanda çoğalması için elverişsiz bir ortam sunmaktadır [94]. Bu problemin önüne geçmek için malzemeler Çizelge 3.2'de detaylıca verilmiş olan çeşitli modifikasyon işlemlerinden geçirilmiştir. Yüzey modifikasyonu farklı ajanlar kullanılarak farklı yöntemlerle yapılabilir. Örneğin, oksidasyon, hidroliz, sülfonasyon, iyonize modifikasyonu gibi. Yüzey oksidasyon yöntemlerinin amacı, PET liflerinin yüzeyleri üzerindeki C-H, C-O ve C-C bağlarını oksitlemektir ve hidroliz yöntemlerinin amacı, güçlü bir şekilde COOH ve OH grupları üretmek için COO'yu hidrolize etmektir. İyonik gruplar, iyonize modifikasyon yöntemi kullanılarak PET makromoleküllerine eklenebilir. Aromatik halkaların sülfonasyonu PET makromoleküllerine SO₃H gruplarını sokar ve bu gruplar PET fiber yüzeyinin hidrofilikliğini artırır [64]. Tez çalışması kapsamında NWPF disklerin modifikasyonunda sülfonasyon yöntemi kullanılmıştır.

4. 1.1 Su Temas Açısı Tayini

Çalışmada kullanılan PET fiber matrislerin hidrofilisitesinin artırılmasına yönelik olarak uygulanan ve Çizelge 3.1'de açıklanan sülfürik asit uygulamaları sonrasında elde edilen örneklerin su temas açıları değerlendirilmiştir.

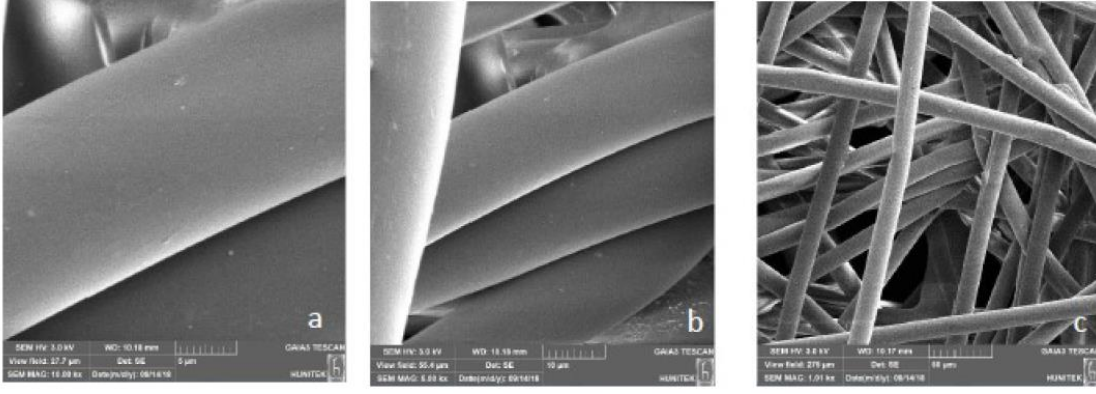
Kontrol grubu olan Reemay 2214 dokunmamış PET fiber (NWPF) matrise sessile drop yöntemi uygulanırken su damlasının malzeme yüzeyi tarafından hiç emilmediği gözlemlenmiş ve su temas açısı 120° olarak belirlenmiştir. Bu malzemenin hidrofobik özellikte olduğunu göstermektedir. Sülfürik asit muamelesi sonrası örneklerde ise (Grup 1) su temas açısı 107°

olarak belirlenen grupta, su damlasının malzeme yüzeyi tarafından biraz daha fazla emildiği gözlemlenmiştir. Grup 2, ticari bir ürün olduğu için PET fiber matrislerin hangi yüzey muamelesi ile hazırlandığı bilgisine ulaşılammıştır, ancak su temas açısı ölçümleri malzemenin süperhidrofilik özellikte olduğunu göstermiştir. Sadece sülfürik asit muamelesi hidrofilisite üzerinde çok fazla etki göstermediği için bu yöntemle sonikasyon ve kütleme yaklaşımları da eklenerek, sırasıyla Grup 3 ve Grup 4 hazırlanmıştır. Grup 3 hazırlanırken uygulanan sonikasyon hidrofilisiteyi artırmamıştır. Bununla birlikte 110°C’de kütleme yapılan örneklerde (Grup 4) malzemeye süperhidrofilik özellik kazandırılmıştır. Su temas açısı 0° olarak belirlenen gruplarda, sessile drop yöntemi uygulanırken su damlasının 1 sn içinde malzeme yüzeyi tarafından emildiği gözlemlenmiştir.

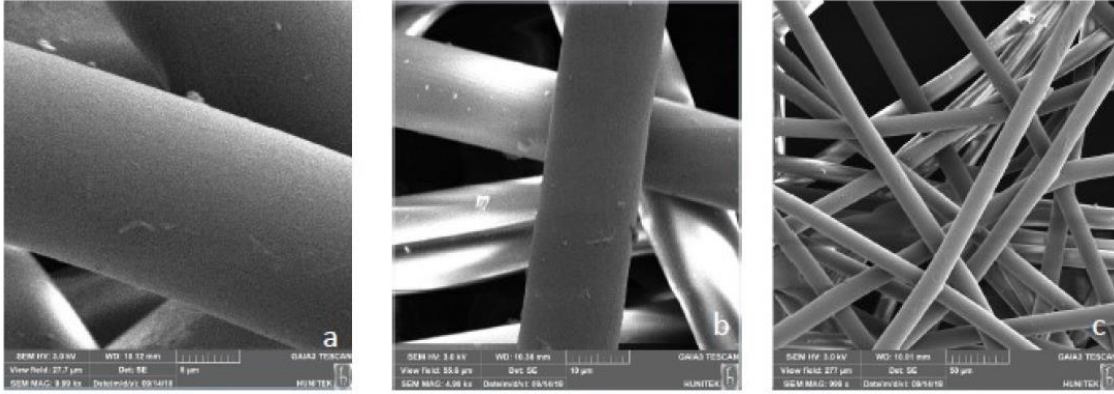
4.1.2 SEM ve EDS Analizi

4.1.2.1 SEM Analizi

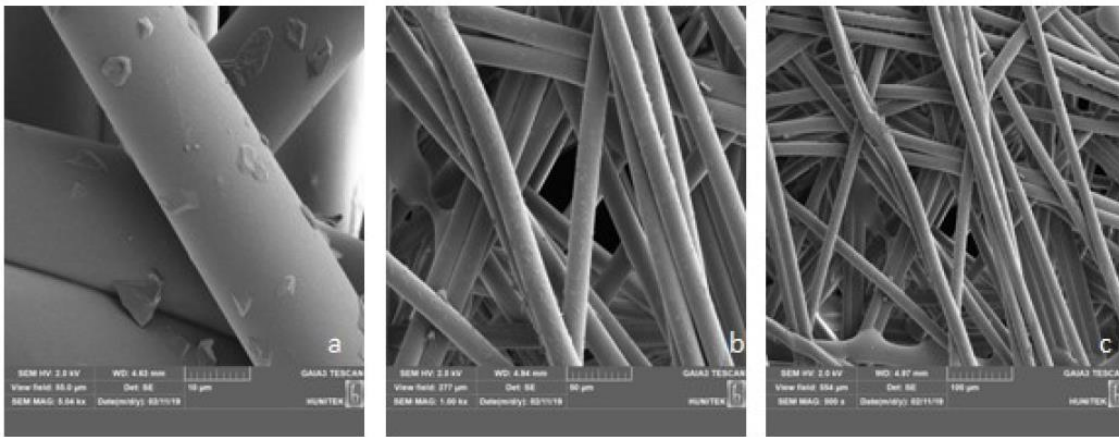
Sülfürik asit uygulaması öncesinde ve sonrasında malzeme gruplarının yüzey özelliklerinin incelenebilmesi için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntüler Şekil 4.1-4.5’te sunulmuştur. Şekil 4.1 incelendiğinde kontrol grubuna ait fiberlerin yaklaşık 15 µm çapa sahip olduğu ve farklı büyütme oranlarında alınan tüm fotoğraflarda yüzeylerinin pürüzsüz olduğu görülmektedir. Şekil 4.2 incelendiğinde sülfürik asit muamelesinin fiber yüzeyinde herhangi bir deformasyon meydana getirmediği görülmüştür. Şekil 4.3 incelendiğinde ticari bir ürün olan Fibra-Cel[®] matrisine ait fiberlerin düzgün morfolojide oldukları ve fiber çaplarının yaklaşık 15 µm olduğu bulunmuştur. Şekil 4.3-a’da fiber yüzeyinde bulunan pürüzlülüklerin örnekleri yıkamak için kullanılan PBS (pH:7.4) tuzları olduğu düşünülmüştür. Şekil 4.4 incelendiğinde sonikasyon altında sülfürik asit muamelesi uygulanan malzemelerin fiberlerinde deformasyon ve kopmalar gözlemlenmiştir. Şekil 4.5 incelendiğinde ise sülfürik asit muamelesine ek olarak 110°C’de kütleme yapıldığından fiberlerdeki deformasyonunun daha fazla olduğu saptanmıştır.



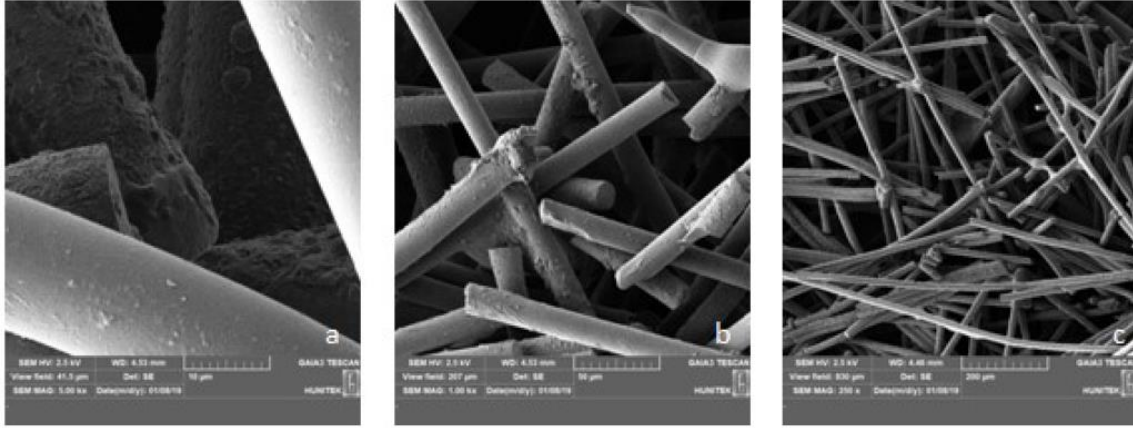
Şekil 4.1 Grup 0- Kontrol grubu örneklere ait SEM görüntüleri: a) 1000x, b) 5000x c) 1000x büyütme.



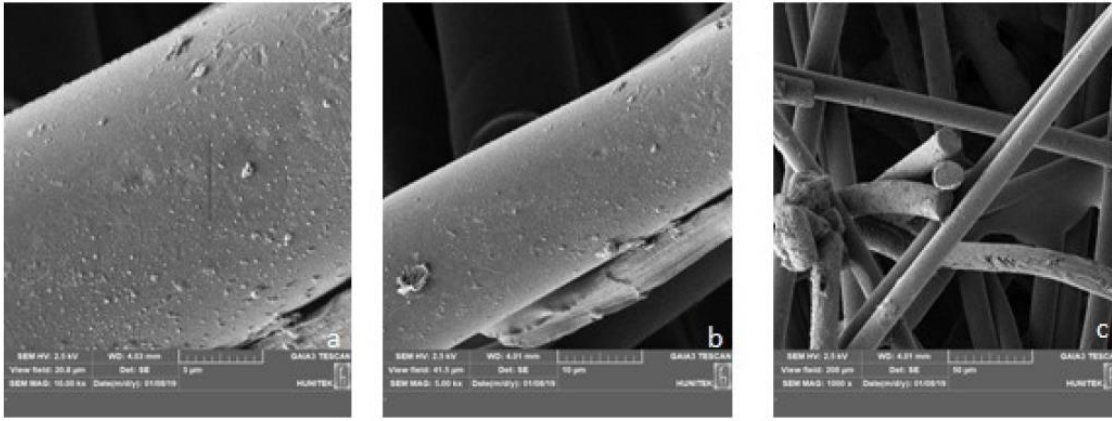
Şekil 4.2 Grup 1-H₂SO₄(+) ile muamele edilmiş örneklere ait SEM görüntüleri: a) 10000x, b) 5000x, c) 1000x büyütme.



Şekil 4.3 Grup 2- Fibra-Cel[®] örneklerine ait SEM görüntüleri a) 5000x, b) 1000x, c) 500x büyütme.



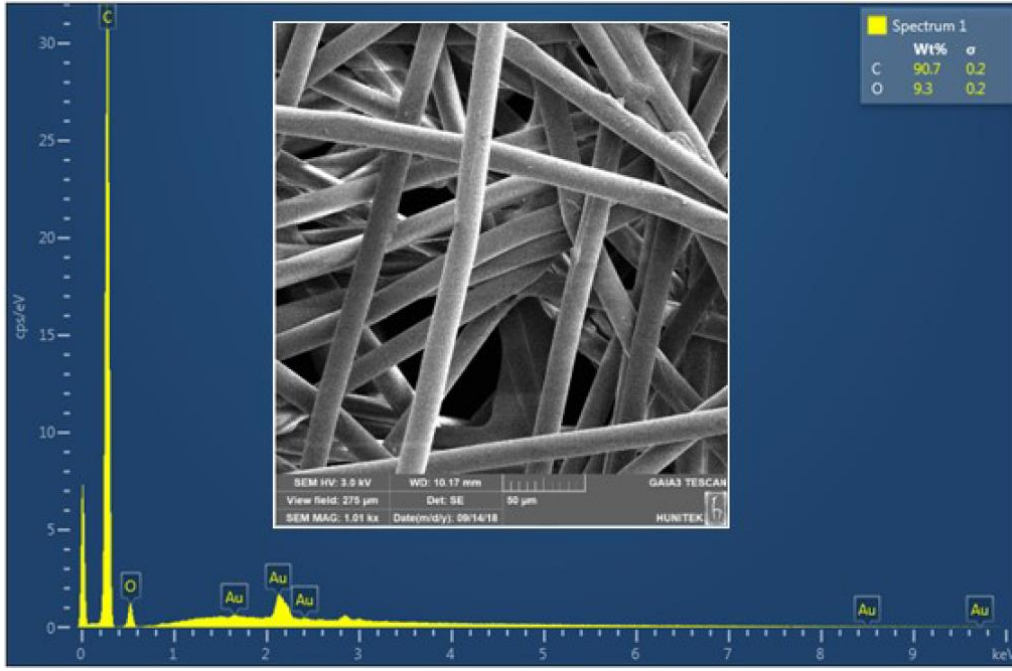
Şekil 4.4 Grup 3-H₂SO₄(+) sonikasyon yapılmış örneklere ait SEM görüntüleri: a) 5000x, b) 1000x, c) 250x büyütme.



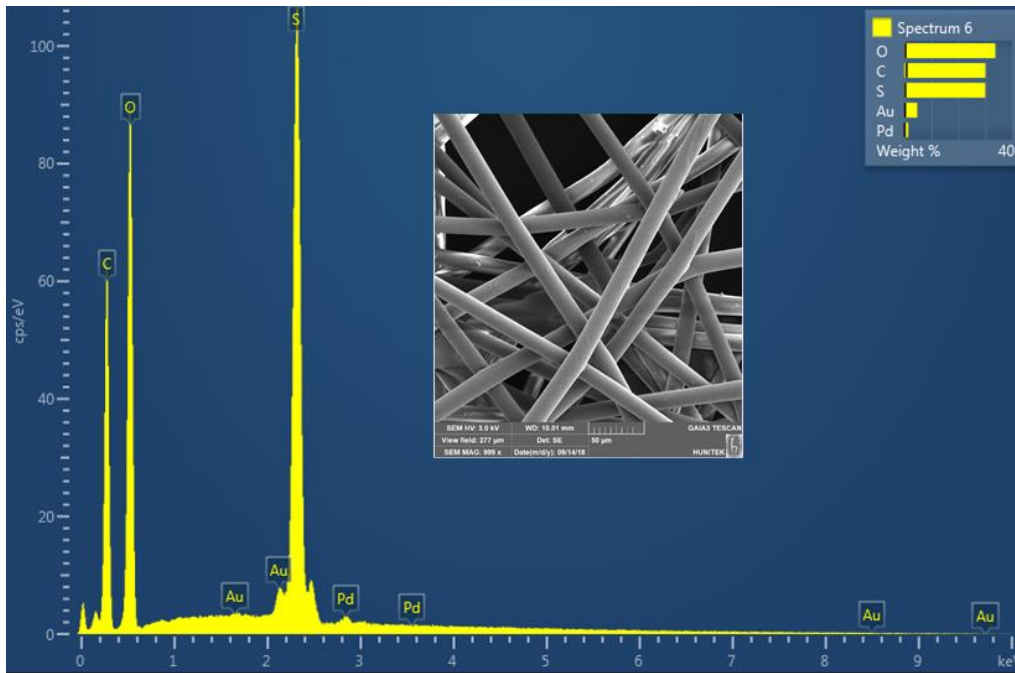
Şekil 4.5 Grup 4-H₂SO₄(+) kürlenmiş örneklere ait SEM görüntüleri: a) 10000x, b) 5000x, c) 1000x büyütme.

4.1.2.2 EDS Analizi

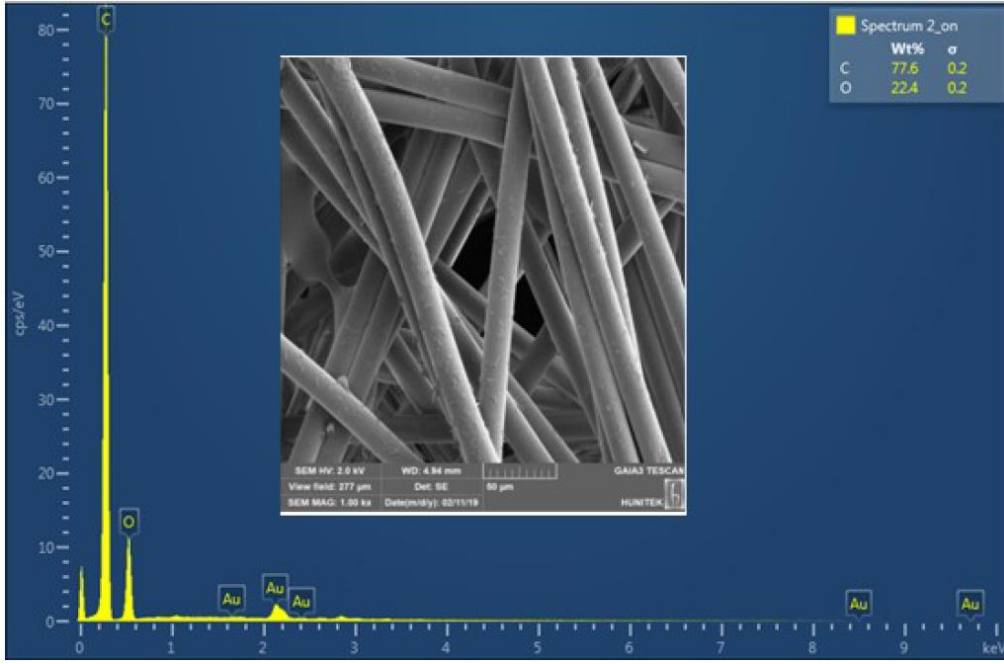
Malzeme yüzeyinde noktasal olarak elementel bileşimi tanımlamak amacıyla EDS analizi gerçekleştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.6-4.10'da sunulmuştur. Kontrol grubunda (Grup 0) sülfürik asit muamelesi olmadığı için sadece C ve O elementlerine rastlanmıştır (Şekil 4.6). Şekil 4.7 incelendiğinde sülfürik asit muamelesi uygulanmasında beklendiği gibi kükürt elementine rastlanmıştır. Şekil 4.8'de Fibra-Cel® yüzeyindeki elementel bileşimin Grup 0'da C ve O'dan oluştuğu, Grup 1'de ise yüzey muamelesinden dolayı S atomlarına rastlanmıştır. Şekil 4.9'da elde edilen sonuçlar incelendiğinde sonikasyon altında gerçekleştirilen sülfürik asit uygulamasının bu muamelenin etkinliğini ve yüzeydeki kükürt oranını önemli oranda artırdığını göstermektedir. Şekil 4.10'da ise 110 °C sıcaklıkta kürlenme işleminin yüzeydeki kükürt oranını önemli oranda artırdığı görülmüştür.



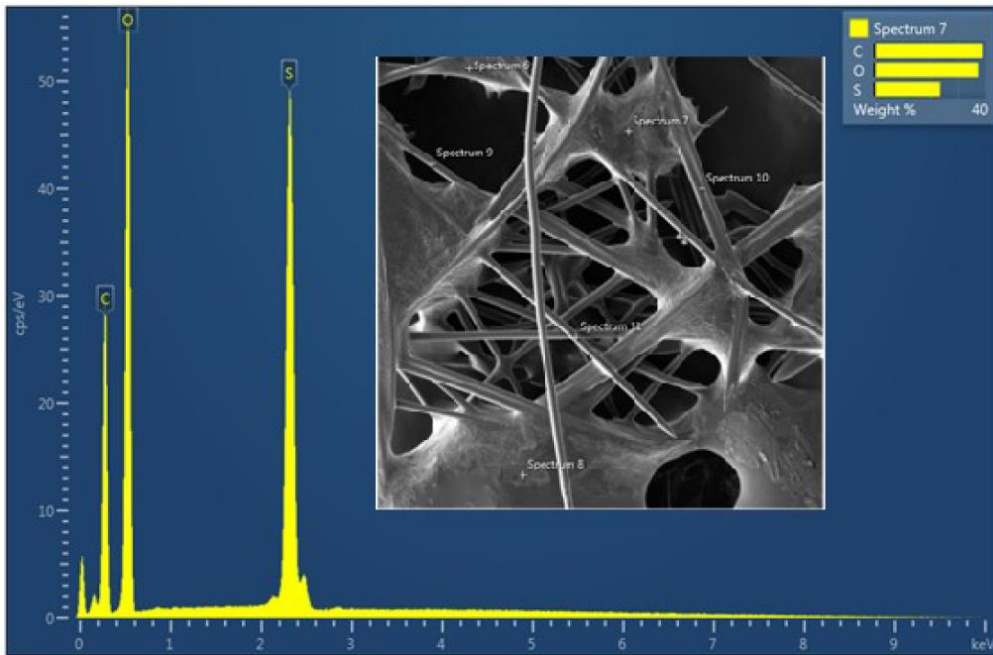
Şekil 4.6 Grup 0 örneklere ait EDS analizi sonuçları.



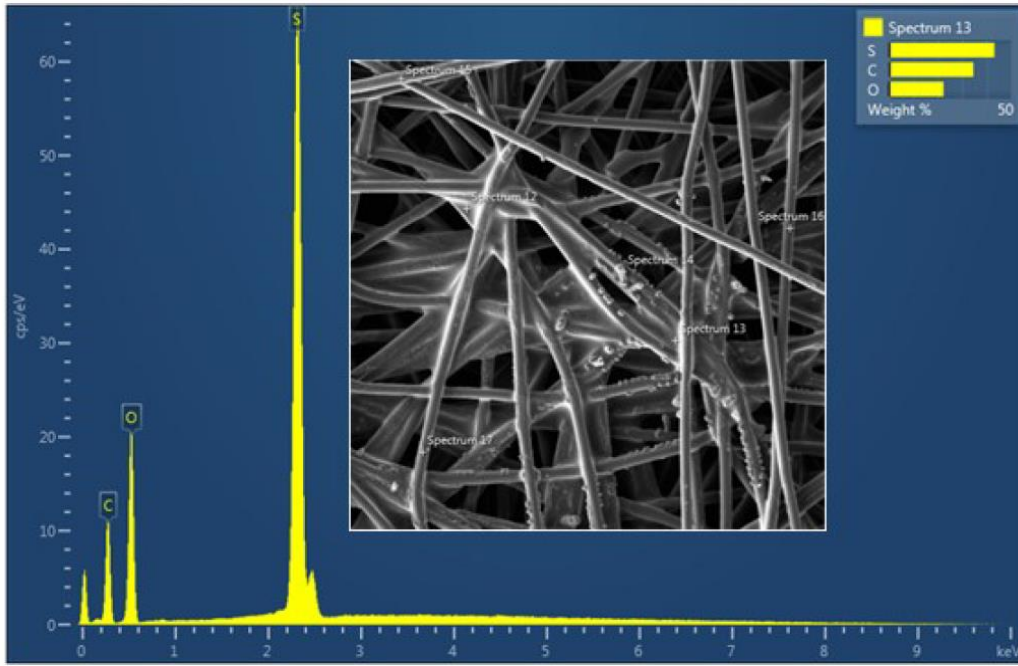
Şekil 4.7 Grup 1- H₂SO₄(+) örneklerine ait EDS analizi sonuçları.



Şekil 4.8 Grup 2- Fibra-Cel® örneklerine ait EDS analizi sonuçları.



Şekil 4.9 Grup 3- H₂SO₄(+) sonikasyon yapılmış örnekler için EDS analizi sonuçları.

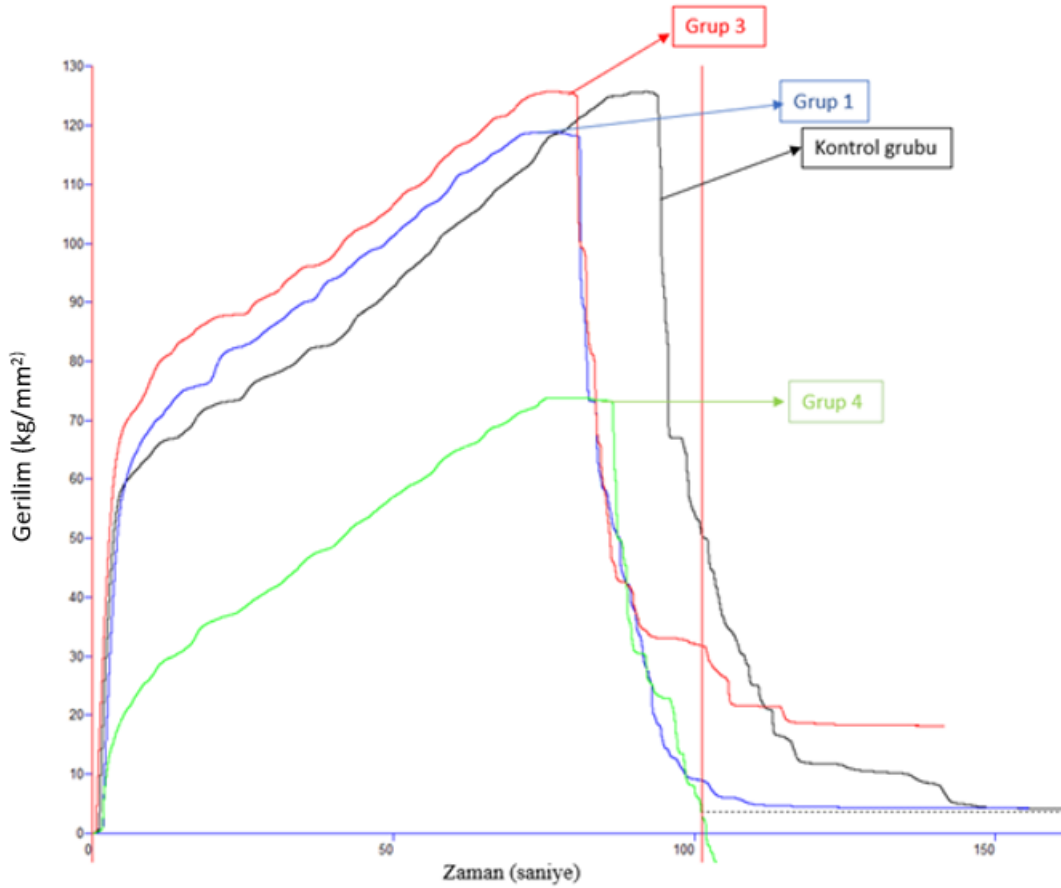


Şekil 4.10 Grup 4- H₂SO₄(+) kürlenmiş örneklere ait EDS analizi sonuçları.

Çizelge 4.1 Çalışma kapsamındaki disk analizlerine ait toplu sonuçlar.

Grup No	Modifikasyon	Fiber çapı (µm)	Su temas açısı (°)	Elementel Bileşim
0	Yok	15	120	C, O
1	3M H ₂ SO ₄	15	107	C, O, S
2	Fibra-Cel®	15	0	C, O
3	3M H ₂ SO ₄ (sonikasyon)	15	120	C, O, S
4	3M H ₂ SO ₄ (kürleme)	15	0	C, O, S

4.1.3 Çekme Testi

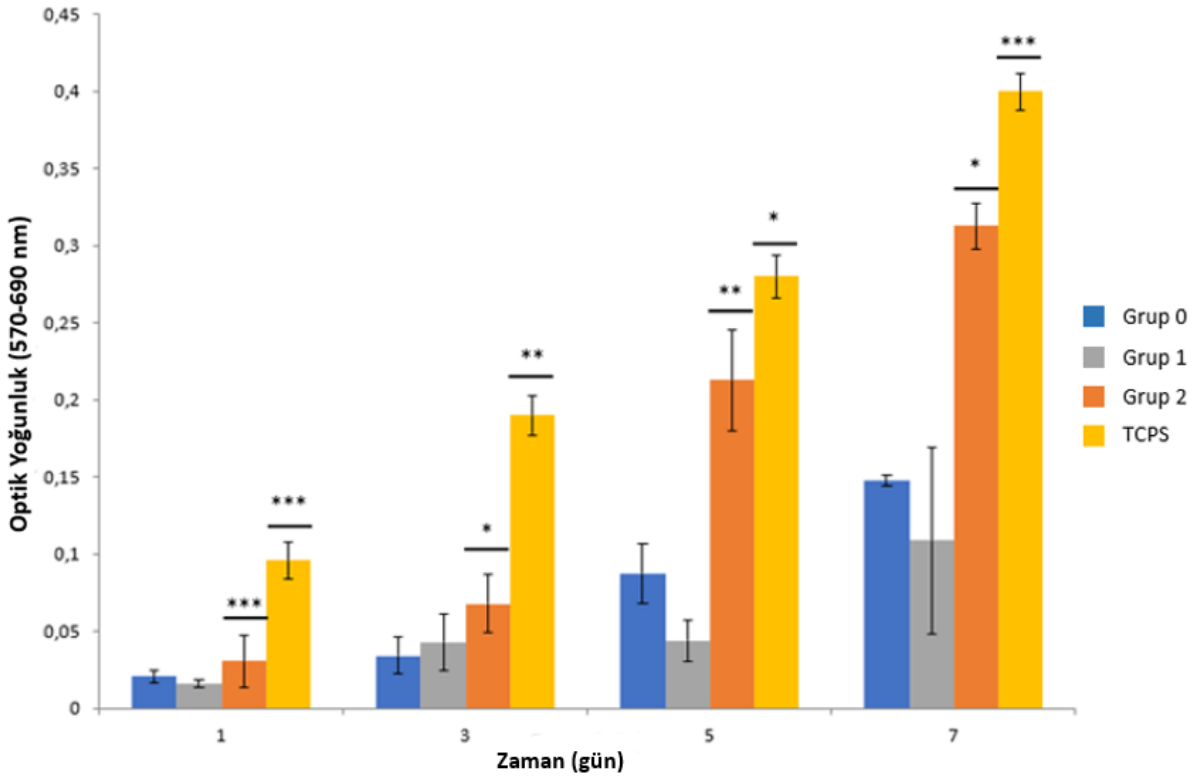


Şekil 4.11 Kontrol grubu, Grup 1, Grup 3 ve Grup 4 malzemelere ait gerilim-zaman grafiği.

10x10 cm boyutunda kesilmiş malzemelere ait çekme testi grafiği Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Grafikte verilen sonuçlar incelendiğinde 3M H₂SO₄ ile muamele edilen Grup 1’in, kontrol grubuna göre dayanımı azalsa dahi gerilimleri arasında büyük bir fark gözlemlenmemiştir. Kontrol grubu yaklaşık 100 saniye sonunda kopmuştur. Grup1 de ise malzeme yaklaşık 90 saniye dayanmış ve ardından kopmuştur. Kontrol grubu ve Grup 3 arasında bir fark gözlemlenmemiştir. Grup 4’de ise diğer gruplara göre gerilim değeri kürlenmeden dolayı fiberlerin yapısında bozulmalar olduğundan gerilimi 70 kg/mm²’ye düşmüş ve yaklaşık 90 saniye sonra kopmuştur. Bu sonuçlar bize Grup 1 malzemelerin sülfürik asit ile muamele edilmesine rağmen fiber yapılarında bozulmaların oluşmadığını ve hücre kültürü çalışmaları için uygun olduğunu göstermiştir. NWPF malzemeler ile yapılan çekme testi ile karşılaştırıldığında malzemenin yüzey modifikasyonunun Grup 1 malzeme dayanımının azalmasına neden olmadığını ve bu nedenle hücre kültüründe kullanımının literatür ile uyumlu olduğunu göstermiştir [99].

4.2 Durgun Hücre Kültürü Ön Çalışmaları

Bölüm 4.1’de sunulan sonuçlarda Grup 3 ve Grup 4’te sülfürik asit uygulamasının fiber yapısına zarar verdiği görülmüştür. Bu nedenle ön hücre kültür çalışmalarında Grup 0-Kontrol, Grup 1- H₂SO₄(+) ve Grup 2- Fibra-Cel® örneklerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Malzeme yüzeyindeki ve 24 gözlü polistiren kültür kaplarında (TCPS) üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin mitokondriyel aktivitelerinin zamanla değişimi Şekil 4.12’de sunulmuştur. Grup 0 ile Grup 1 ve Grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Grup 0 ve TCPS arasında ise * p<0.05 olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek aktiviteye 7. günde TCPS’te ulaşılmıştır. Malzeme gruplarında ise Grup 2- Fibra-Cel® örneklerindeki hücre aktivitesinin 5. günden itibaren Grup 0 ve Grup 1’e göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Grup 0 ve Grup 1 arasında dikkate değer bir farklılık görülmemiştir.



Şekil 4.12 PET fiber matrisler üzerinde üreyen hücrelerin durgun kültürde mitokondriyel aktivitelerinin zamanla değişimi. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, Grup 0 kontrol grubu için NWPf disk iken * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001).

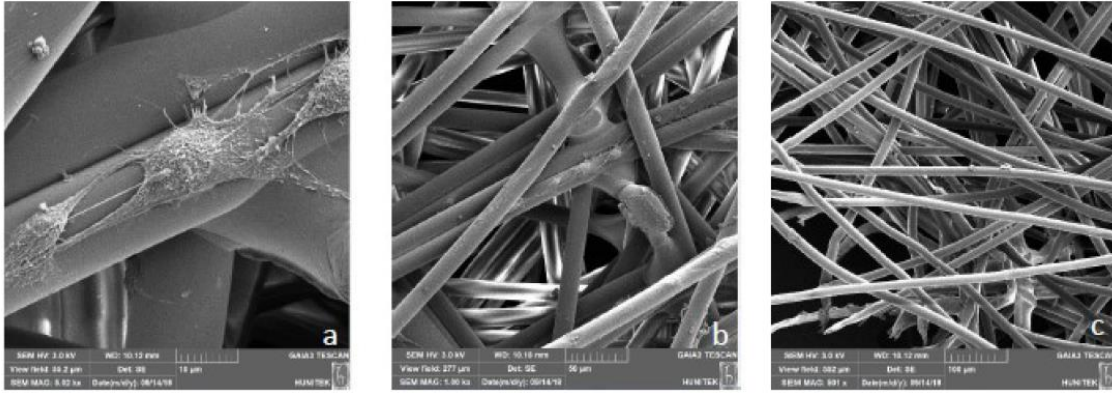
Kültürün 1. ve 7. günlerinde hemositometrik sayım ile elde edilen hücre sayıları Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Hücre ekim yoğunluğu TCPS için göz başına; malzemeler için ise örnek başına 3x10⁴ hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirilmiştir. TCPS’lerde 1. gündeki hücre sayısı ekim veriminin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu nedenle TCPS’teki hücre sayısı 7. günün

sonunda 6.2×10^4 'e kadar çıkmıştır. Bununla birlikte malzeme gruplarındaki 1. gün hücre sayıları hücre ekim veriminin yaklaşık olarak %50 olduğunu ortaya koymuştur. Hücre ekimi gerçekleştirilirken malzemelerin yerleştirildiği polistiren kaplar hücre yapışmasını desteklemeyecek özellikte olacak şekilde (non-treated) seçilmiştir. Buna rağmen disklere damlatılan süspansiyondaki hücrelerin yarısı disklere yapışmamıştır. Yedi günlük kültür boyunca hücre sayısı artış oranları incelendiğinde Grup 0 ve Grup 2'nin benzer oranlara sahip olduğu (yaklaşık 2 kat) görülmüştür. Bununla birlikte Grup 1, TCPS'teki artış oranını yakalayarak (yaklaşık 2.6 kat) hücre üremesini iyi bir şekilde desteklemiştir.

Çizelge 4.2 PET fiber matris üzerinde disk başına üreyen hücre sayısının zamanla değişimi.

Zaman (gün)	Hücre sayısı			
	TCPS	Grup 0 kontrol	Grup 1	Grup 2
1	$2.5 \times 10^4 \pm 94$	$1.4 \times 10^4 \pm 176$	$1.3 \times 10^4 \pm 100$	$1.5 \times 10^4 \pm 226$
7	$6.2 \times 10^4 \pm 318$	$2.9 \times 10^4 \pm 79$	$3.4 \times 10^4 \pm 169$	$3.2 \times 10^4 \pm 400$
Hücre sayısı kat artış oranı	2.5	1.9	2.6	2.1

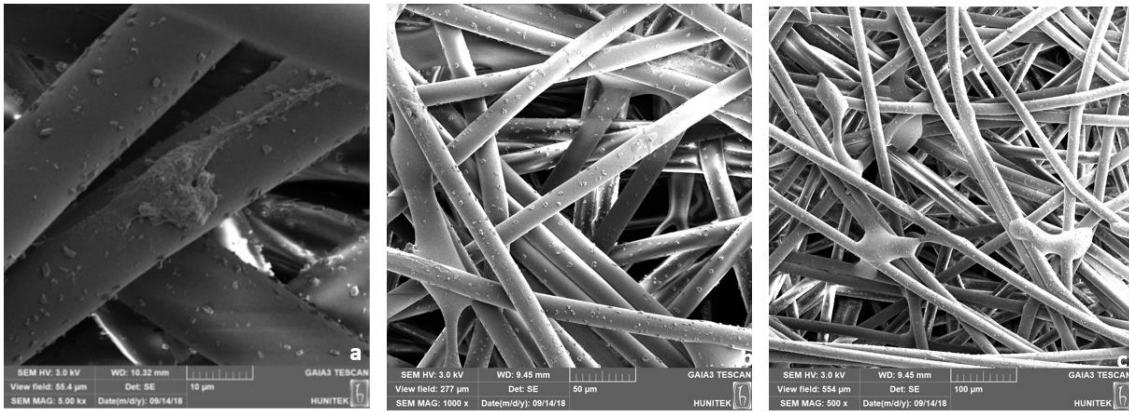
Hücrelerin farklı malzemeler üzerindeki yapışma yoğunluğunun ve dağılımının değerlendirilebilmesi için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Hücre kültür çalışmaları 7 gün boyunca sürdürülmüştür ancak hücre-biyomalzeme etkileşiminin takibi için 11. günde SEM analizi için ayrıca örnekleme yapılmıştır. Grup 0-Kontrol örnekleri üzerinde üreyen hücrelerin kültürün 4. ve 11. günlerindeki SEM görüntüleri sırasıyla, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te sunulmuştur. Dördüncü günde fiberlere yapışan hücreler görülmektedir, ancak hücre yoğunluğu düşüktür. Bununla birlikte özellikle 11. günde hücrelerin fiberler üzerinde yoğun bir şekilde üredikleri gözlemlenmiştir.



Şekil 4.13 Grup 0 -Kontrol grubu örneklerine ait SEM görüntüleri (4.gün): a) 5000x, b) 1000x, c)500x büyütmeleler.



Şekil 4.14 Grup 0 -Kontrol grubu örneklerine ait SEM görüntüleri (11.gün): a) 5000x, b) 1000x, c) 500x büyütmeleler.

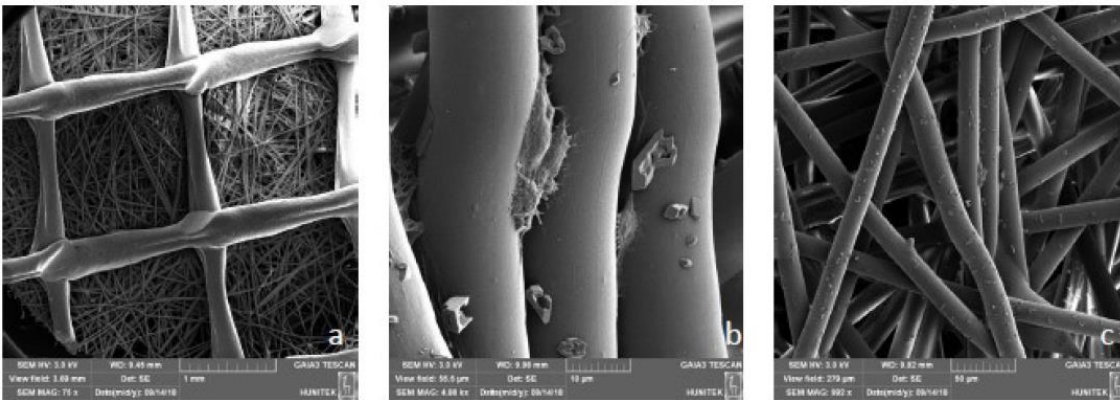


Şekil 4.15 Grup 1- H₂SO₄(+) örneğine ait SEM görüntüsü (4.gün): a) 5000x, b) 1000x, c) 500x büyütmeleler

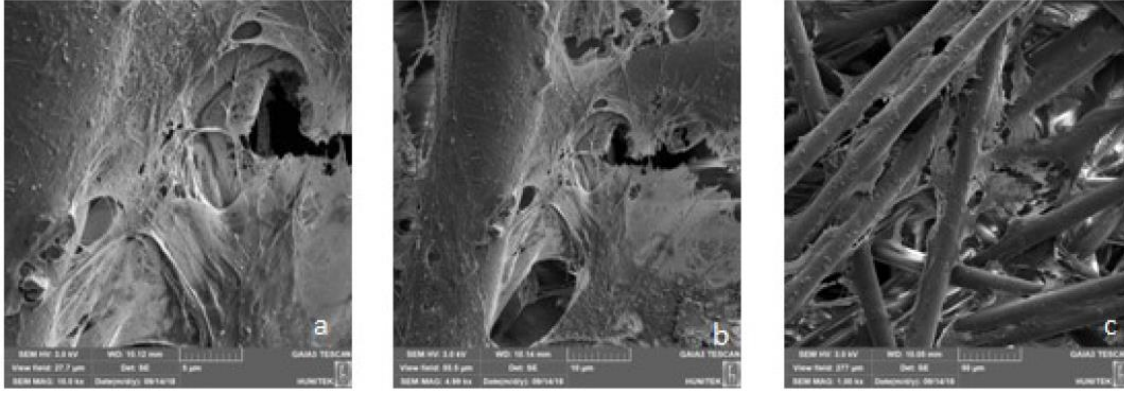


Şekil 4.16 Grup 1- H₂SO₄(+) örneğine ait SEM görüntüsü (11.gün): a) 5000x, b) 1000x, c) 500x büyütme

Grup 1’de disk üzerinde üreyen hücrelerin 4. ve 11. günlerindeki SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da sunulmuştur. Hücreler belirtilen günlerde disklerin fiberlerine yapışmış ve yoğun bir şekilde çoğalmıştır. Grup 2- Fibra-Cel® örnekleri üzerinde üreyen hücrelerin kültürün 4. ve 11. günlerindeki SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de sunulmuştur. Şekil 4.17-a’da Fibra-Cel’deki polipropilen ağ tabakasına ait fiberler de görüntülenmiştir. Dördüncü günde fiberlere yapışan hücre yoğunluğunun diğer gruplara göre daha düşük olduğu dikkat çekmiştir. Kültürün 11. gününde hücrelerin fiberler üzerinde yoğun bir şekilde üredikleri ve kendi hücre dışı matrislerini ürettikleri dikkat çekmiştir. Ticari olarak hücre üretiminde kullanılan bu malzemenin hücre üremesini başarılı bir şekilde desteklemesi literatürle [94] uyumlu bir sonuçtur.



Şekil 4.17 Grup 2- Fibra-Cel® örneklerine ait SEM görüntüleri (4.gün): a) 5000x, b) 1000x, c) 500x büyütme

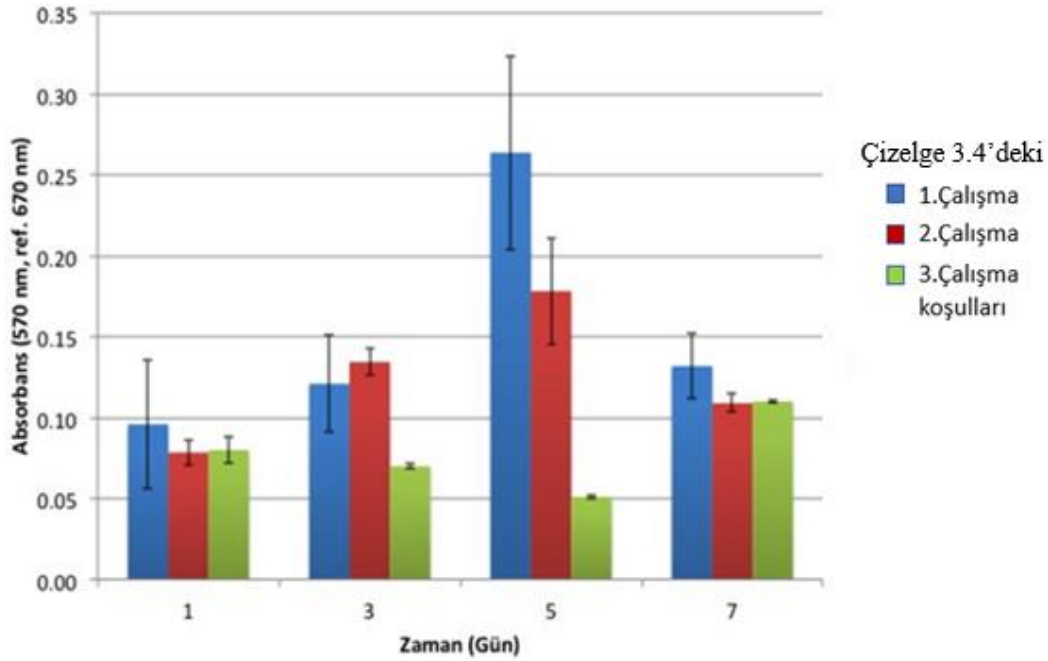


Şekil 4.18 Grup 2- Fibracel® örneklerine ait SEM görüntüleri (11. gün): a) 10000x, b) 5000x, c) 1000x büyütme

4.3 Dinamik Hücre Kültürü Ön Çalışmaları

Durgun ön hücre kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlar değerlendirilerek biyoreaktör çalışmalarında ilk olarak Grup 2- Fibracel® örneklerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaca yönelik olarak Çizelge 3.3’de açıklanan 3 biyoreaktör çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu 3 deney için kültürün 1., 3., 5. ve 7. günlerinde gerçekleştirilen MTT analizine ait sonuçlar Şekil 4.19’da verilmiştir. Biyoreaktör çalışmalarında gerçekleştirilen pH ölçümleri pH’nın kültür boyunca 7.8 ile 8.0 aralığında değiştiğini göstermiştir. Bu değerler hücrenin çoğalması için optimum pH seviyeleridir [94].

Şekil 4.18’de birinci dinamik çalışmadan elde edilen MTT sonuçları incelendiğinde kültürün 5. gününe kadar hücre aktivitesinin arttığı görülmektedir. Kültürün devam eden günlerinde ise hücre aktivitesi düşüşe geçmiştir. Bu deneyde kültür ortamı yenilenmediği ve havalandırma yapılmadığı için hücre aktivitesinin düşüşünün besin ve oksijen derişimindeki azalma ile ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir. Bu nedenle 2. çalışmada havalandırma sistemi kullanılmıştır ve kültür ortamı yenilenmiştir. Deneydeki işletim koşullarındaki değişikliklere rağmen hücre aktivitesinin 5. günde yine düşüşe geçtiği görülmektedir. Dolgulu yatak biyoreaktörlerde yatak yüksekliğine bağlı olarak difüzyon kısıtlamalarının olabileceği ilgili literatürde tartışılan bir olgudur [77]. Bu nedenle 3. biyoreaktör deneyinde havalandırma ve kültür ortamı değişikliğinin yanısıra, difüzyon kısıtlamalarını aşabilmek amacıyla yatak yüksekliğini azaltmak için örnek ağırlığı 10 g’dan 5 g’a düşürülmüştür. Ancak bu durumda da dinamik ekim veriminin düşmesine bağlı olarak absorbans değerlerinin düşük olduğu dikkat çekmiştir. Elde edilen bu sonuçlar biyoreaktördeki hücre ekim veriminin düşük olduğunu göstermiştir. Bu nedenle biyoreaktörde hücre ekim verimini artırmaya yönelik olarak 24 saatlik durgun inkübasyon yaklaşımı uygulanmıştır.



Şekil 4.19 Farklı işletim koşullarında gerçekleştirilen dinamik kültüre ait MC3T3 hücreleri MTT grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmemiştir.)

Farklı işletim koşullarında gerçekleştirilen dinamik kültür çalışmalarından elde edilen hemositometrik sayım sonuçları Çizelge 4.3 de sunulmuştur. Biyoreaktörde gerçekleştirilen dinamik ekim yaklaşımında 1. ve 2. çalışmalarda reaktör başına 30 milyon hücre ekilmiştir. Sepete yüklenen 10 g malzeme yaklaşık olarak 1750 Fibra-Cel® disk içermektedir. Bu durumda hedeflenen hücre ekim yoğunluğu 1.7×10^4 hücre/disk olarak ifade edilebilmektedir. Üçüncü çalışmada ise reaktöre 15 milyon hücre ekilmiştir, ancak malzeme miktarı da aynı oranda azaldığı için 3. çalışmada da hedeflenen hücre ekim yoğunluğu aynı kalmıştır. Birinci günde elde edilen hücre sayıları incelendiğinde 10 g disk ile gerçekleştirilen 1. ve 2. çalışmalarda ekim veriminin %85'in üstünde olduğu görülmektedir. Bununla birlikte 3. çalışmada ekim verimi yaklaşık %65 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar 3. çalışmanın MTT analizinden elde edilen düşük absorbanslar ile tutarlılık göstermiştir. Kültürün devam eden günlerinde bütün çalışmalarda hücre sayısı artış göstermiştir. En yüksek hücre miktarına 1. çalışmada ulaşılmıştır. Biyoreaktörün yüksek hacimde olması havalandırma ve ortam değişimi yapılmıyorsa bile hücre üremesini destekleyecek bir ortam sunmuştur ve disk başına hücre sayısı 7 günlük kültürde 5.3 kat artış göstermiştir. İkinci ve üçüncü çalışmalarda daha düşük hücre sayılarına ve benzer artış oranlarına ulaşılmıştır (yaklaşık 4.3 kat). Bu oranlar durgun kültürdeki artış

oranlarından yaklaşık 2 kat daha yüksektir. Bu sonuçlar dolgulu yatak biyoreaktörün seçilen işletim koşullarında hücre üremesini desteklediğini göstermektedir. Ancak daha yüksek mitokondriyal aktivite ve hücre sayılarına ulaşabilmek için ekim verimini yükseltme ve hücre ekim yoğunluğunu artırmaya yönelik çeşitli yaklaşımlar denenmiştir.

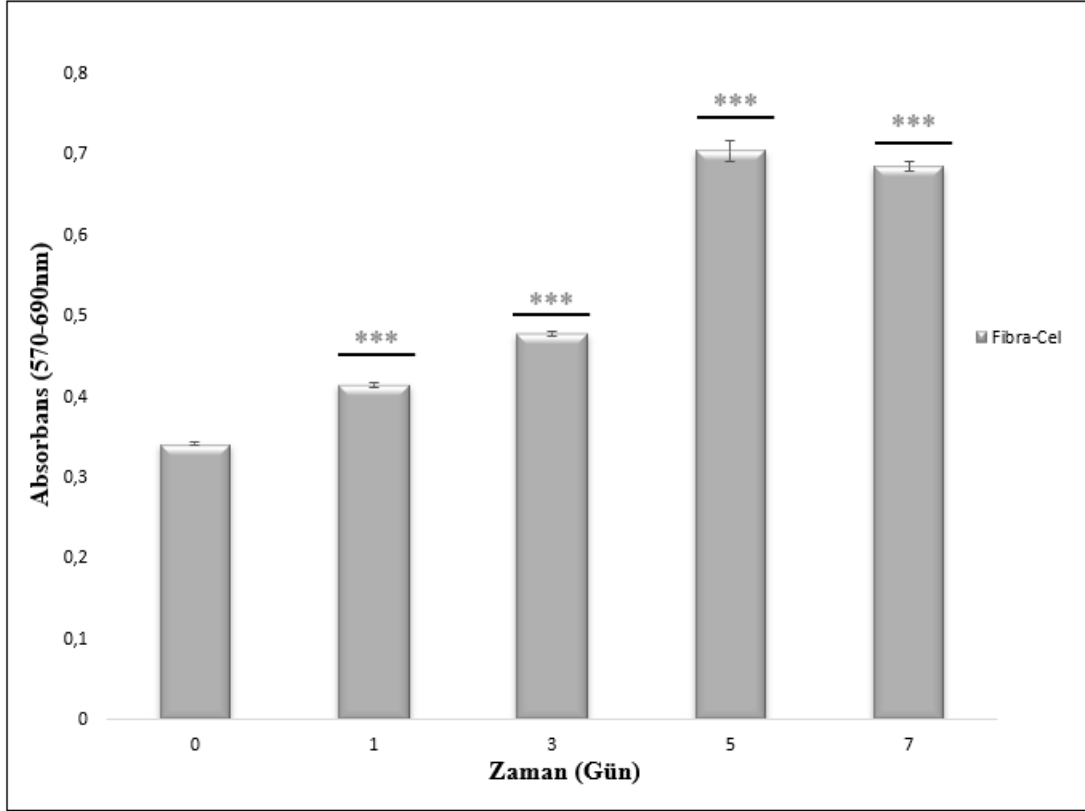
Çizelge 4.3 Farklı işletim koşullarında gerçekleştirilen dinamik kültür çalışmasına ait hücre sayısının zamanla değişimi.

Zaman (gün)	1. Çalışma (hücre/disk)	2. Çalışma (hücre/disk)	3. Çalışma (hücre/disk)
1	$1.5 \times 10^4 \pm 266$	$1.4 \times 10^4 \pm 104$	$1.2 \times 10^4 \pm 53$
3	$3.3 \times 10^4 \pm 140$	$2.6 \times 10^4 \pm 180$	$1.5 \times 10^4 \pm 110$
5	$7.3 \times 10^4 \pm 85$	$4.0 \times 10^4 \pm 100$	$3.4 \times 10^4 \pm 160$
7	$8.0 \times 10^4 \pm 100$	$6.0 \times 10^4 \pm 130$	$5.0 \times 10^4 \pm 50$
Hücre sayısı kat artışı	5.3	4.3	4.3

Biyoreaktörde Fibra-Cel® diskler üzerinde üretilen hücrelerin malzeme yüzeyinden yüksek verimde ve sağlıklı bir şekilde kaldırılabilmesi, biyoreaktörde hücre üretirken büyük önem taşımaktadır. Bu amaca yönelik olarak, 2. çalışmada 7. günde MTT, sayım ve diğer analizler için örnekleme yapıldıktan sonra kalan örnekler kullanılarak, Bölüm 3.4.2’de açıklanan yaklaşımlar uygulanarak hücre kaldırma denemeleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar biyoreaktörden elde edilen toplam hücre sayılarına ulaşabilmek için uygun katsayılar ile çarpılarak normalize edilmiştir. Birinci çalışma da 1.05×10^8 , 2. çalışmada 1.0×10^8 ve 3. çalışmada 1.0×10^8 hücre /reaktör olduğu tespit edilmiştir. Biyoreaktörden hücrelerin sağlıklı bir şekilde kaldırılması için uygulanan etüv içindeki 15 dk süreyle tripsinizasyon işlemi başarılı olmuştur. Bu sonuçlara göre en etkin hücre kaldırma tekniğiyle ulaşılabilecek hücre sayısı 0.5 L çalışma hacmine sahip DYB için yaklaşık 1×10^8 hücredir.

Verimi arttırmak ve malzeme sarfını azaltmak amacıyla 100 mL hacmindeki DYB’de Fibra-Cel® malzemeler kullanılarak MC3T3-E1 hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmada verimin arttığı gözlemlenmiştir. Verimin artması yatak yüksekliği ve malzeme miktarına ekilen hücrelerin orantılı olmasından ve malzemelerin kültür öncesinde 1 gün süreyle serumlu kültür ortamında bekletilmesi ve ardından 1 gün süre ile hücrelerin Fibra-Cel® malzemelere ekilerek kültür için ortama şartlandırılmasından kaynaklanmaktadır. Biyoreaktörün pH ölçümleri

düzenli aralıklarla 7 gün boyunca ölçülmüş ve taze ortam eklenmeden pH'ın 7.4 seviyesinde devam ederken ortam eklendiğinde pH'ın 7.8 seviyesinde sabit kaldığı gözlemlenmiştir. Bu değerler hücreler için optimum pH seviyesinde kültürün yapıldığını göstermektedir. Malzemeye ekilecek hücre miktarı yatak yüksekliği ile orantılı olacak şekilde hesaplanmıştır. DYB sepeti 2.5 cm yüksekliğine sahiptir ve 2g (350 disk) Fibra-Cel® malzeme için ideal ortam oluşturmuştur.



Şekil 4.20 Fibra-Cel® matrisler üzerinde 100 mL hacimli DYB'de dinamik koşullarda 3×10^7 MC3T3-E1 hücre/ reaktör yoğunluğunda üreyen hücrelerin MTT grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık $n=3$, 0.gün Fibra-Cel® disk iken *** $p<0.01$).

Şekil 4.20'de kültürün 5. gününe kadar hücre aktivitesinin arttığı görülmektedir. Kültürün devam eden günlerinde ise hücre aktivitesi düşüşe geçtiği gözlemlenmiştir. Bu durumun ortamın %50 sinin 5. günde değişmesine rağmen yetersiz kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda biyoreaktörün kollarından ek havalandırma yapılmadığı için hücre aktivitesindeki düşüşünün besin ve oksijen derişimlerindeki azalma ile ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir. Dinamik kültür öncesinde hem malzemelerin şartlanması hem de hücrelerin dinamik kültür öncesinde bekletilerek malzemelere yapışmasının sağlanması mitokondriyel aktivitelerinin artmasına neden olmuştur. Yedinci

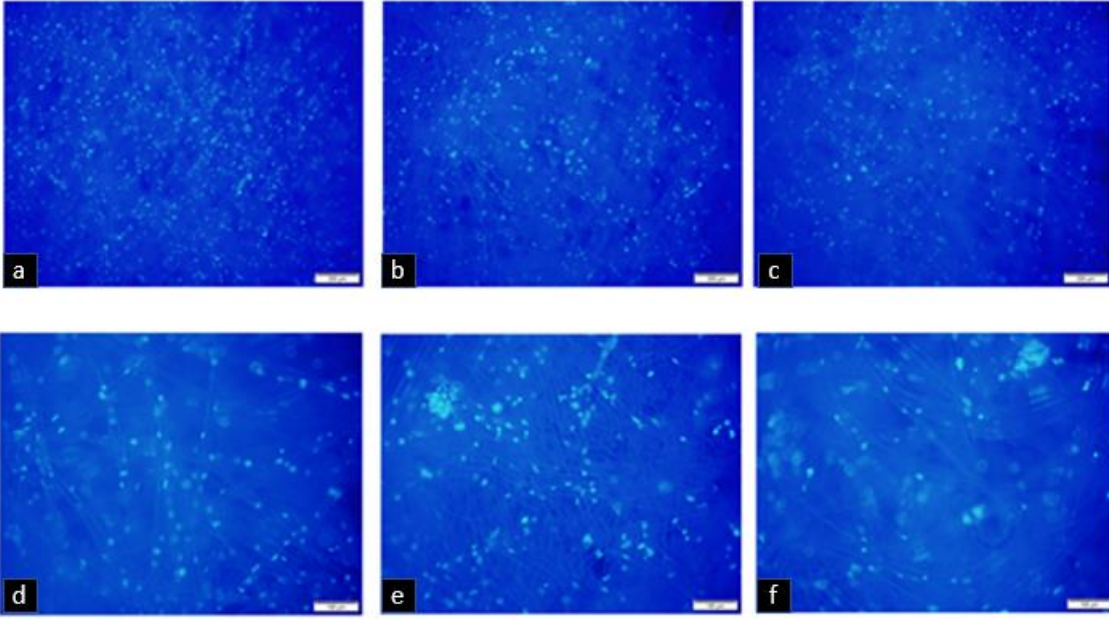
günde biyoreaktörde disk başına hücre sayısı ile tüm reaktördeki hücre sayısı 4.2×10^7 hücre olarak hesaplanmıştır. Hücre kaldırma çalışmasında biyoreaktördeki hücrelerin yaklaşık %75 i başarılı bir şekilde kaldırılmıştır. Hücre sayısı 7. günde 4.2 kat artış göstermiştir. Bu elde edilen veriler ile kendi tasarladığımız dolgulu yatak biyoreaktör ile kök hücrelerin de aynı şekilde başarılı bir şekilde üretilebileceği değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.4 100 mL hacimli DYB'de Fibracel® taşıyıcılar üzerinde dinamik koşullarda üreyen hücrelerin disk başına düşen hücre sayısının zamanla değişimi.

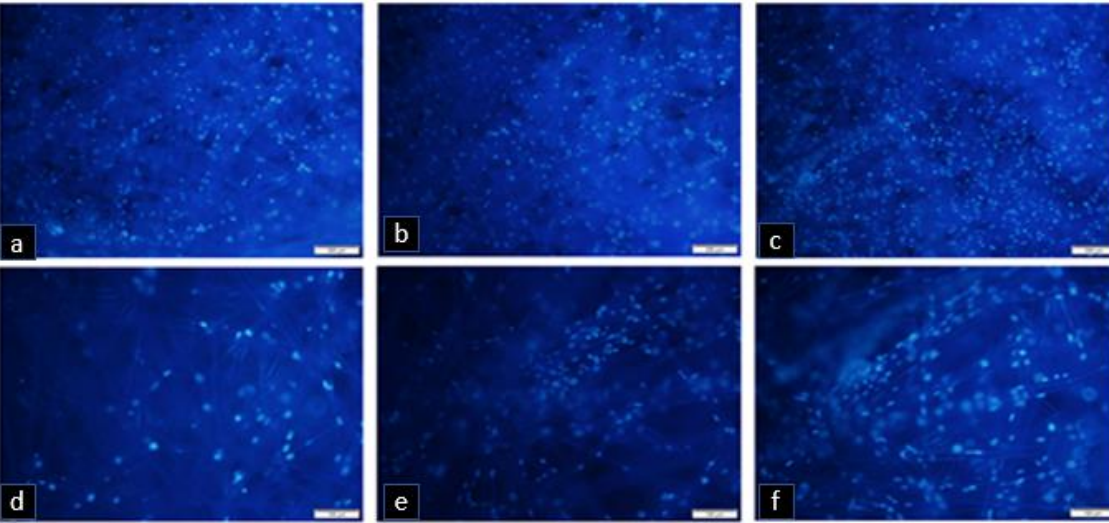
Zaman (gün)	Hücre sayısı (hücre/disk)
0	$3 \times 10^4 \pm 1100$
1	$4 \times 10^4 \pm 800$
3	$6.5 \times 10^4 \pm 400$
5	$7.8 \times 10^4 \pm 2000$
7	$12 \times 10^4 \pm 600$

4.3.1 Fibracel ve NWPF Disklerin DAPI/F-Aktin Boyamaları

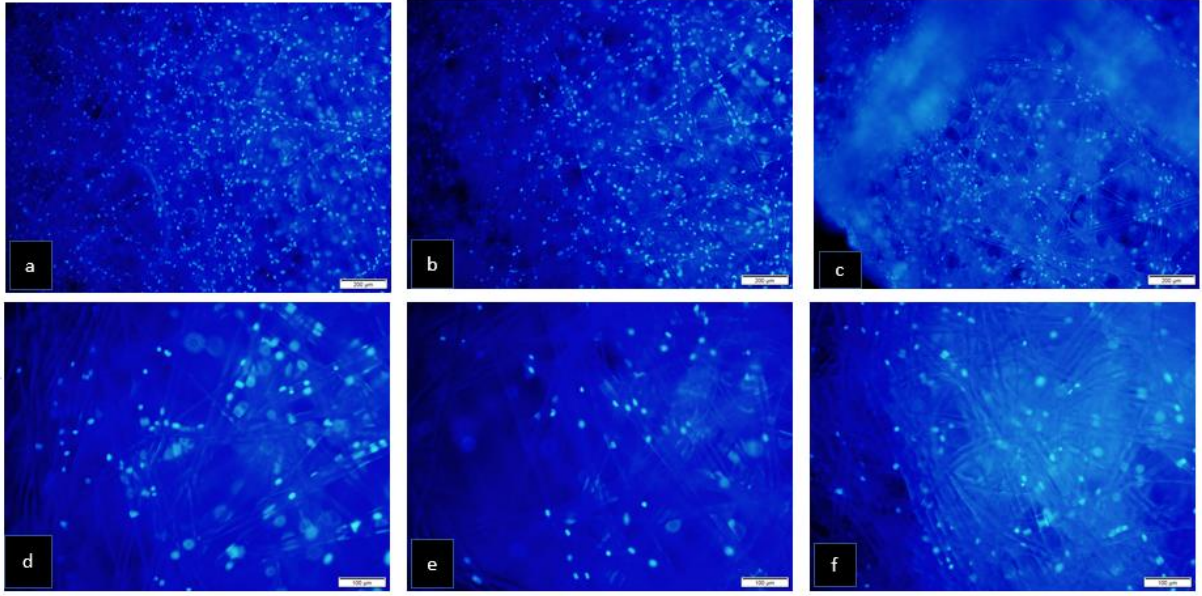
Hücre morfolojilerinin belirlenmesi için immünohistolojik analizler yapılmıştır. DAPI hücre çekirdeklerini boyayan ajandır ve hücre çekirdekleri floresan mikroskop ile mavi renkte görünmektedir. Fibracel® disklerin boyanması sonucu çekilen görüntüler Şekil 4.21-4.26 arasında görünmektedir. Fotoğraflardan hücrelerin fiber yapıya yapışıp malzemenin tüm yüzeyine yayıldığı gözlemlenmiştir. Aktin filamentleri, hücre yüzey şeklinin oluşmasında görev alan önemli yapı elemanlarıdır. Aktin filamentlerin görünmesi için kullanılan boyama tekniğinde Alexa Fluor 488 Phalloidin hücre zarı ilişkili F-aktin işaretleyicisidir. Bu boyama tekniği ile hücreler boyandığı zaman floresan mikroskop altında hücre iskeletleri yeşil renkte görünmektedir.



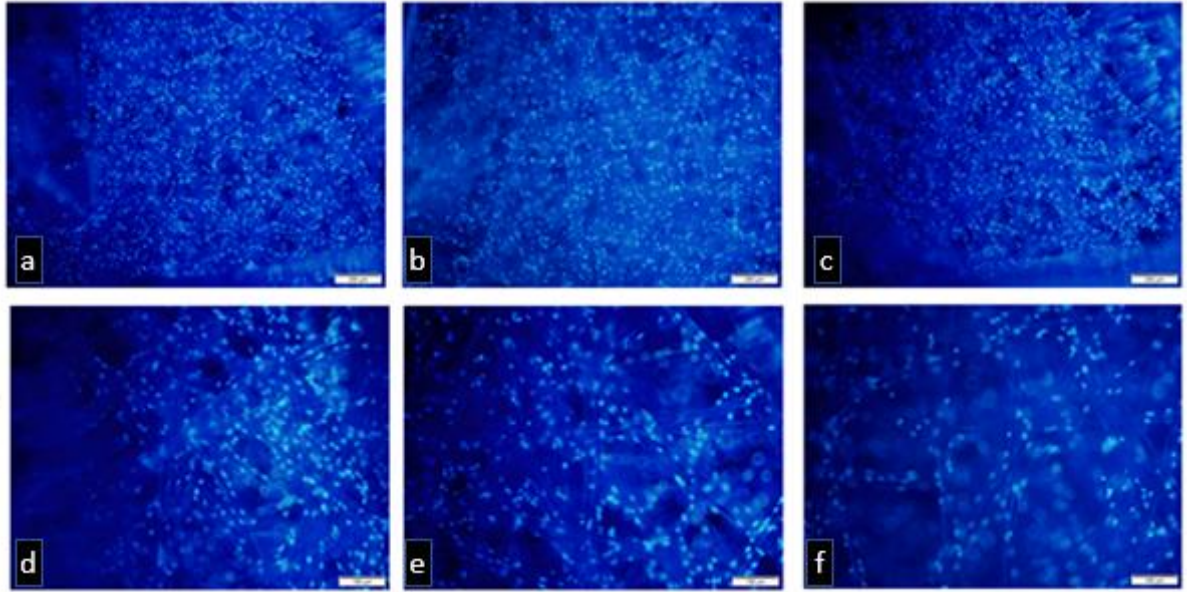
Şekil 4.21 100 mL hacimli DYB’de 3×10^4 MC3T3 hücre sayısına ait Fibracel® disklerin 0.gün DAPI boyamaları sırasıyla 10x (a, b, c) (bar:200 μm) ve 20x (d, e, f) (bar:100 μm) büyütmeleler.



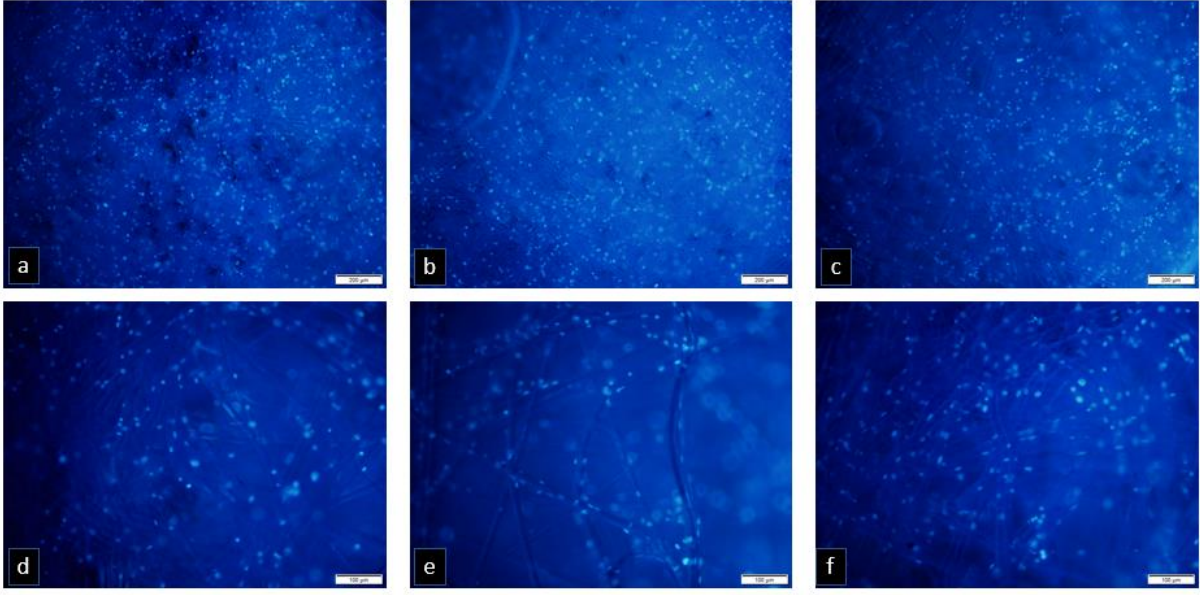
Şekil 4.22 100 mL hacimli DYB’de 4×10^4 MC3T3 hücre sayısına ait Fibracel® disklerin 1.gün DAPI boyamaları sırasıyla 10x (a, b, c) (bar:200 μm) ve 20x (d, e, f) (bar:100 μm) büyütmeleler.



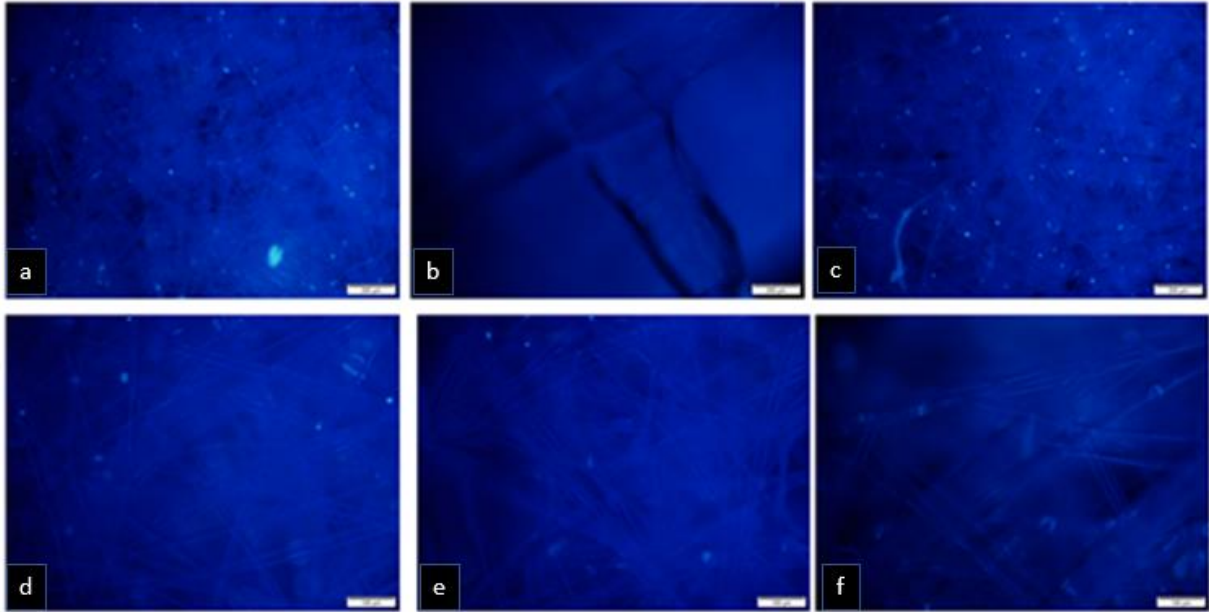
Şekil 4.23 100 mL hacimli DYB’de 6.5×10^4 MC3T3 hücre sayısına ait Fibracel® disklerin 3.gün DAPI boyamaları sırasıyla 10x (a, b, c) (bar:200 μm) ve 20x (d, e, f) (bar:100 μm) büyütmeleler.



Şekil 4.24 100 mL hacimli DYB’de 7.8×10^4 MC3T3 hücre sayısına ait Fibracel® disklerin 5.gün DAPI boyamaları sırasıyla 10x (a, b, c) (bar:200 μm) ve 20x (d, e, f) (bar:100 μm) büyütmeleler.



Şekil 4.25 100 mL hacimli DYB’de 12×10^4 MC3T3 hücre sayısına ait Fibracel® disklerin 7.gün DAPI boyamaları sırasıyla 10x (a, b, c) (bar:200 µm) ve 20x (d, e, f) (bar:100 µm) büyütmeleler.



Şekil 4.26 7. gün hücre kaldırma çalışması sonrası Fibracel® disklerin DAPI boyama görüntüleri sırasıyla 10x (a, b, c) (bar:200 µm) ve 20x (d, e, f) (bar:100 µm) büyütmeleler.

Kültürün 0. gününde hücreler genellikle malzemenin ortasındaki fiberlerde toplanmıştır (Şekil 4.21). Kültürün 1. gününde hücreler üreme fazına geçtikleri için fiberlerin farklı yerlerinde eş dağılımlı bir şekilde hücrelerin çoğalmaya başladığı görülmektedir (Şekil 4.22). Kültürün 3.

ve 5. günlerinde hücreler üreme fazında çoğalmaya devam etmiş ve (Şekil 4.23 ve 4.24) fiberlerin yüzeyi tamamen kaplanmıştır. Kültürün 7.gününde hücreler maksimum seviyede fiberlere tutunmaya devam etmiştir (Şekil 4.25). Hücre sayısı ile DAPI görüntüleri kıyaslandığında elde edilen sonuçların tutarlı olduğu görülmektedir. Yedinci günde hücreleri malzemelerden kaldırmak için uygulanan prosedürün hücrelerin %90'ının malzemelerin yüzeyinden başarılı bir şekilde kaldırılmasında etkili olmuştur (Şekil 4.26).

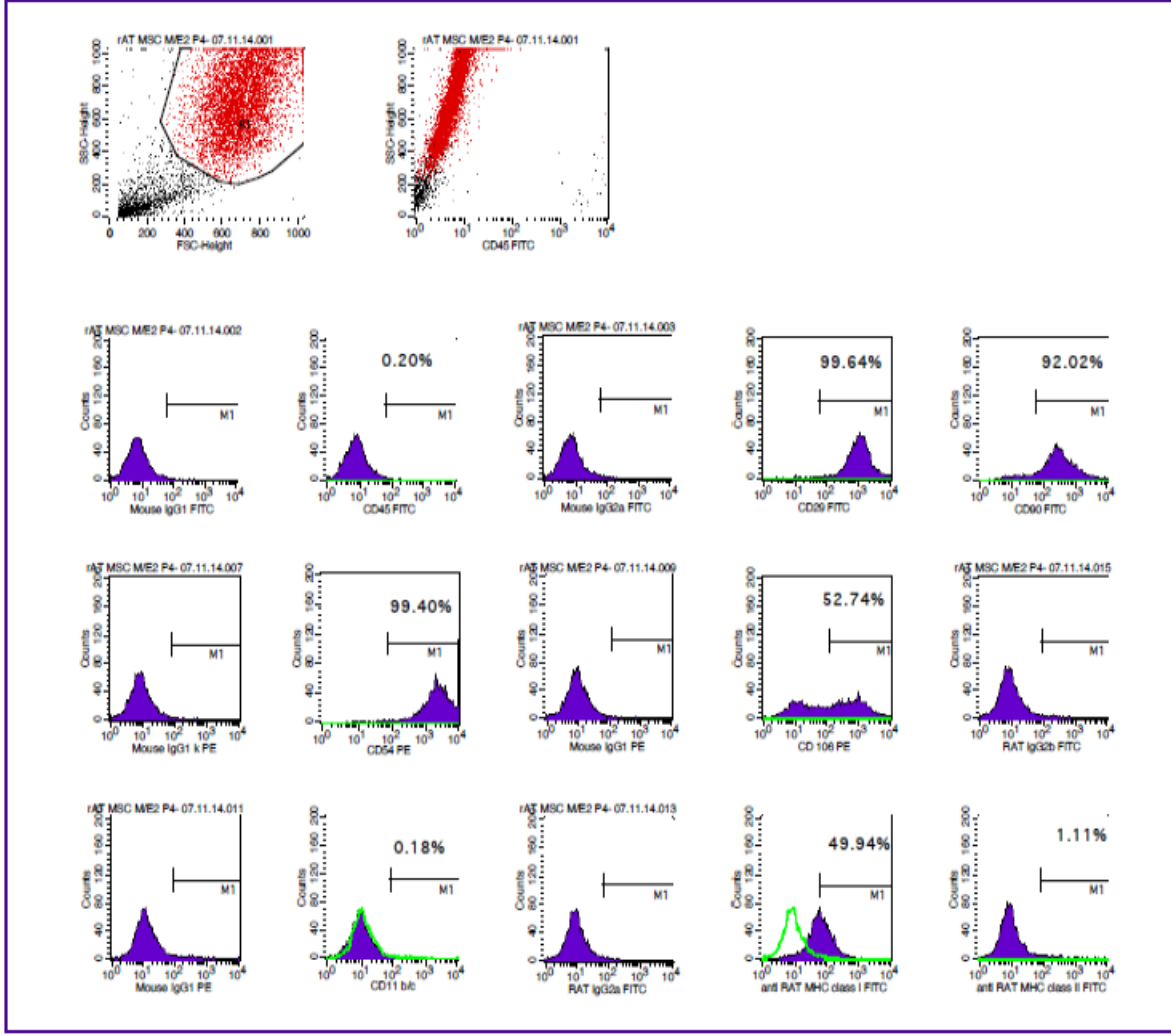
4.4 AdMKH Statik ve Dinamik Kültür Çalışması

4.4.1 Akış Sitometrisi Analizi

Hücrelerin kök hücrelere özgü yüzey antijenlerini taşıdığını belirlemek için akış sitometrisi analizinden yararlanılmıştır. Hücre süspansiyonu akış sitometrisi analizinde lazer ışığı kullanılarak aydınlatılan bir bölmeden geçirilerek ışık saçılımı, floresan emisyonu gibi özellikler dijital sinyallere dönüştürülmektedir. Oluşan bu sinyaller ile hücrenin yüzey antijenleri, DNA içeriği, enzim aktivitesi gibi bilgilere ulaşılmaktadır. Bu yöntemde yanıl saçılım kanal (side scatter channel, SSC) dedektörü hücrenin granüler içeriği hakkında bilgi verirken ileri saçılım kanal (Forward scatter channel, FSC) dedektörü hücrenin boyutu hakkında bilgi vermektedir. Sıçan adipoz MKH'lerin akış sitometrisi analizinde SSC ve FCS dedektöründe elde edilen sinyaller Şekil 4.27'de verilmiştir. Grafikte tek çekirdekli hücre özelliğine sahip olan hücre grubu ve böylece hücre süspansiyonundaki lenfosit veya granülosit gibi hücrelerin IgG işaretlenme oranları değerlendirme dışı bırakılmıştır. Diğer grafikte CD45 antijeni ile yapılan işaretleme sonucu, SSC dedektöründen elde edilen sinyaller değerlendirilmiştir. Bu grafikte kırmızı işaretlenmiş hücrelerin grafiğin sol üst bölümünde bulunması, hücrelerin CD45 negatif olduğunu göstermektedir.

Yeşil renk kontrol, mor ise yüzey IgG işaretleyicilerden alınan sonuçları ifade etmektedir. Yeşil ve mor histogramların çakışması, negatif işaretleme göstermektedir.

AKH'lerin literatürle uyumlu olarak CD29, CD90, CD54, CD106 ve MHC sınıf I belirteçleri için pozitif olduğu görülmüş, CD45, CD11b ve MHC sınıf II antijenleri için ise oldukça düşük işaretlenme oranları tespit edilmiştir. Akış sitometrisi ile elde edilen veriler ışığında, AKH'lerin yüksek saflıkta olduğu ve mezenkimal hücrelere uygun yüzey antijenlerini ifade ettikleri belirlenmiştir [103].



Şekil 4.27 AKH'lere ait akış sitometrisi analizi sonuçları (Yeşil ve mor histogramlar sırasıyla kontrol ve yüzey IgG işaretleyicileri) [103].

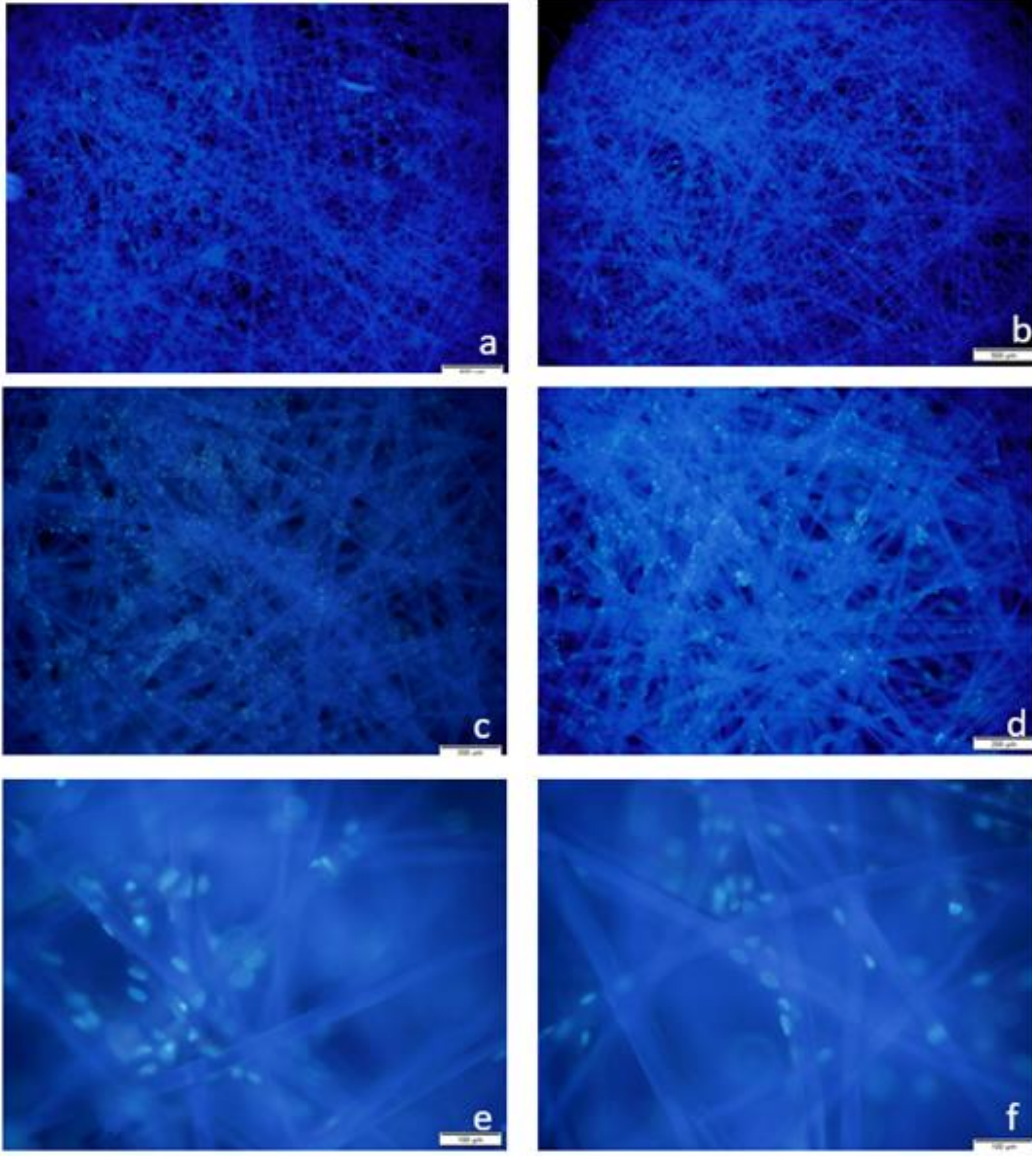
4.4.2 AdMKH Dinamik Hücre Kültürü Çalışması

Bölüm 4.3'te elde edilen veriler ışığında NWPf diskler ile (Grup1) biyoreaktörün işletim koşulları belirlenmiş ve AdMKH'ler ile DYB'de Çizelge 3.4'de anlatılan Çalışma 2'ye ait işletim parametreleri ile kültüre devam edilmiştir. Hücre olarak 4. pasajda olan sıçan adipoz mezenkimal kök hücreleri, 1g NWPf (720 adet) diskler üzerine 3×10^7 hücre/reaktör yoğunluğunda ekilmiş ve 7 günlük hücre kültürü çalışması 100 mL hacimli DYB kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

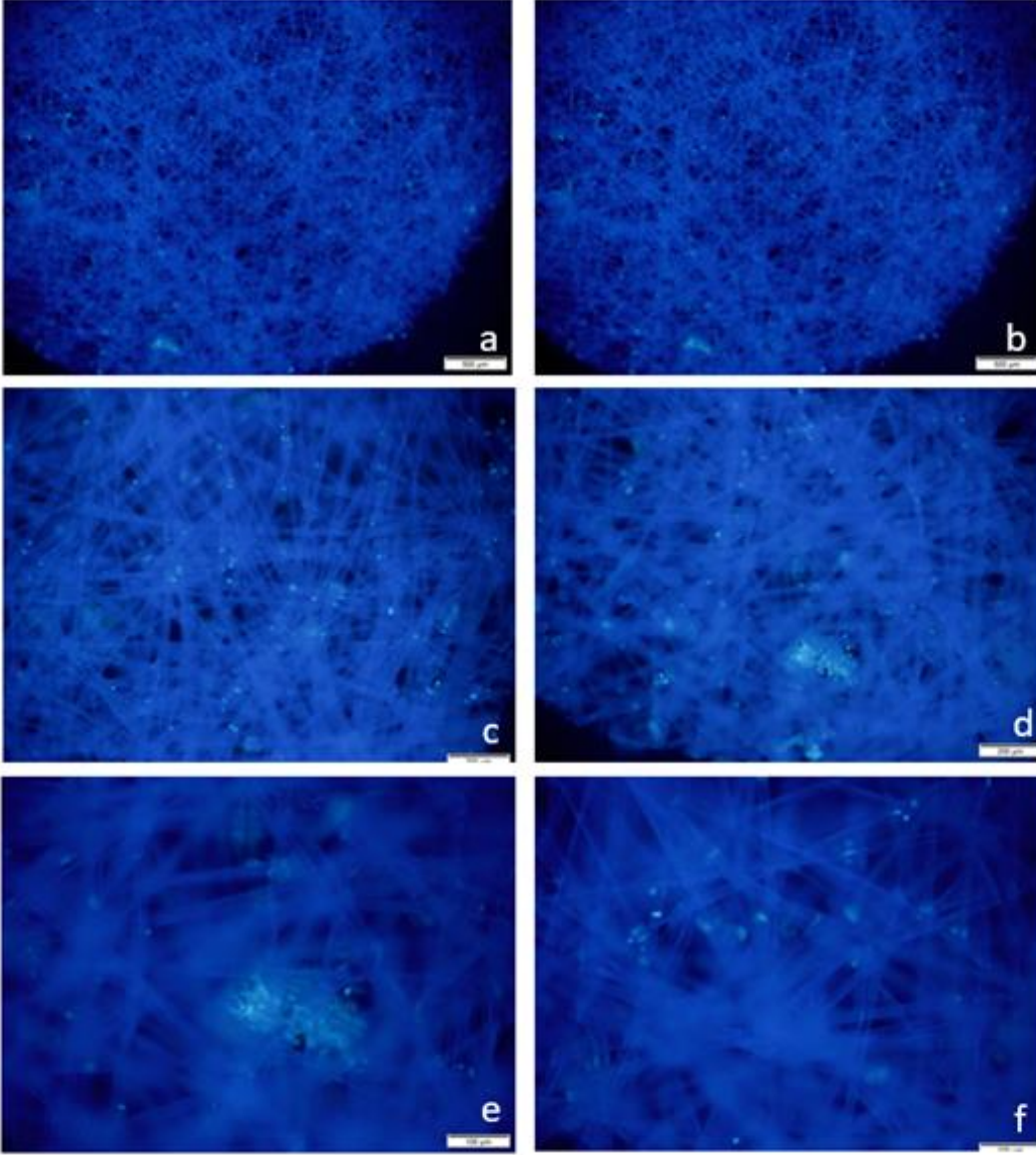
Çizelge 4.5 100 mL hacimli DYB’de NWPF disklerden dinamik koşullarda elde edilen AdMKH’lerin disk başına hücre sayısının zamanla değişimi.

Zaman (gün)	Hücre sayısı (hücre/disk)
1	$0.7 \times 10^5 \pm 540$
3	$1.0 \times 10^5 \pm 660$
5	$1.2 \times 10^5 \pm 790$
7	$1.4 \times 10^5 \pm 1000$
Hücre kat artışı 3.4	Toplam 1×10^8 hücre/reaktör

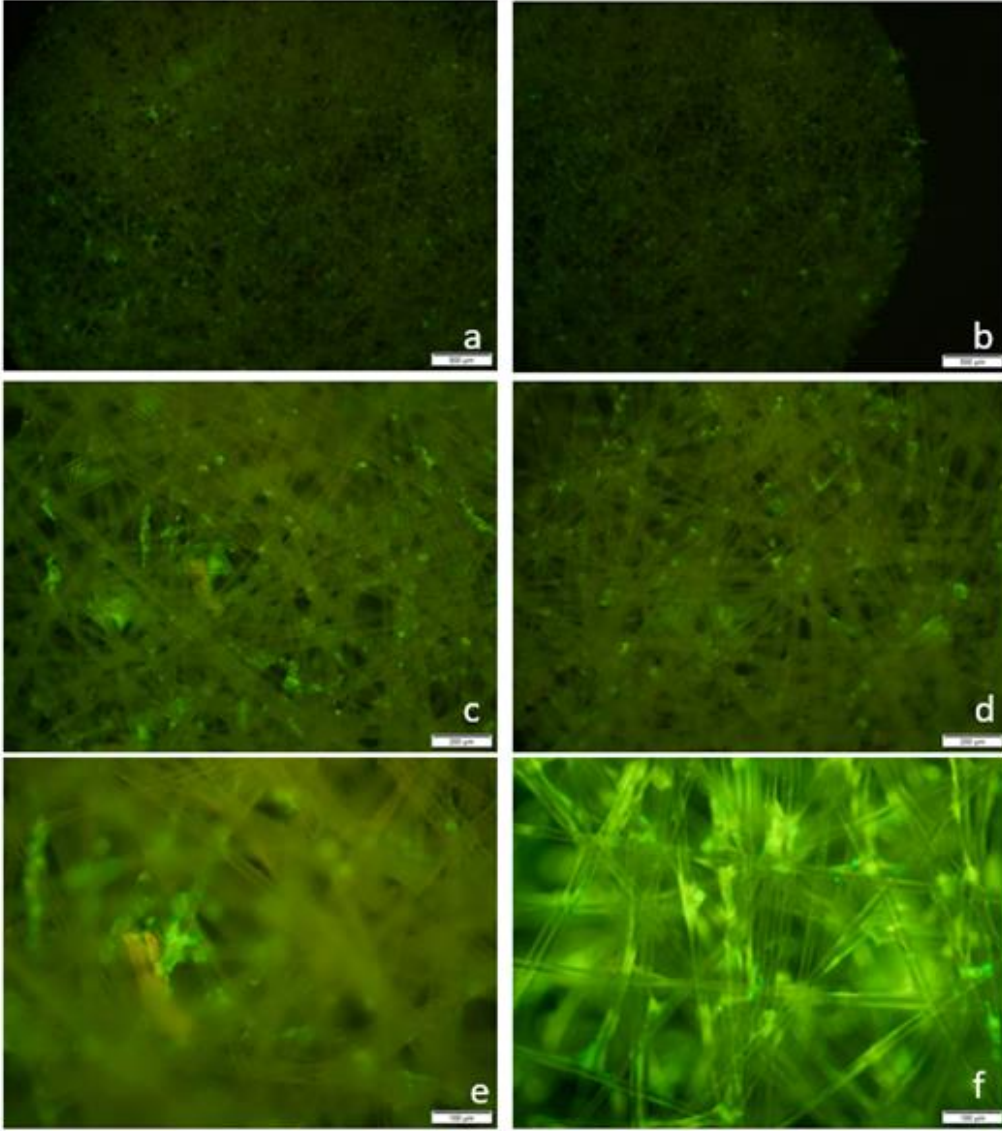
Hücre sayısı 1. günden 7. güne kadar sürekli olarak artış göstermiştir. Kültür sonunda 3.4 kat artarak 1×10^8 hücre/reaktör elde edilmiştir (Çizelge 4.5). Hücre ekim veriminin iyileştirilmesi ile daha iyi sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir. Biyoreaktörün ortamı 3. ve 5. günlerde %50 oranında değiştirilmiştir. NWPF disklerin DAPI ve F-aktin boyamaları yapılarak elde edilen sonuçların tutarlılığı desteklenmiştir. Hücrelerin eş dağılımlı bir şekilde ekilmemiş olması 1. ve 7. günlerde DAPI/FA boyamaları gerçekleştirilerek net bir şekilde gözlemlenmiştir (Şekil 4.28-4.33).



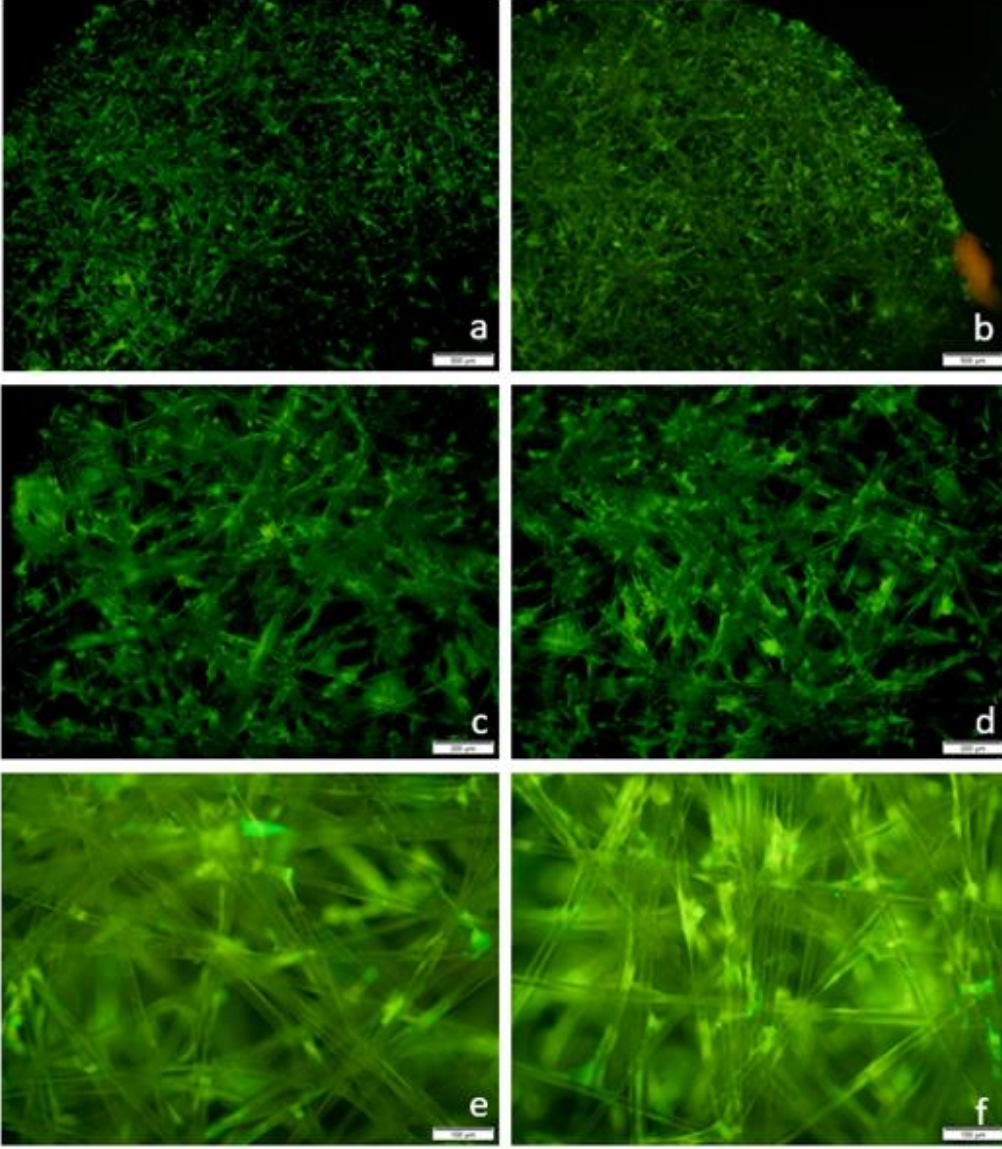
Şekil 4.28 100 mL hacimli DYB’de 0.7×10^5 AdMKH hücre sayısına ait NWPF disklerin 1.gün DAPI boyamaları sırasıyla 4x (a, b), 10x (c, d) ve 20x (e, f) büyütmeleler.



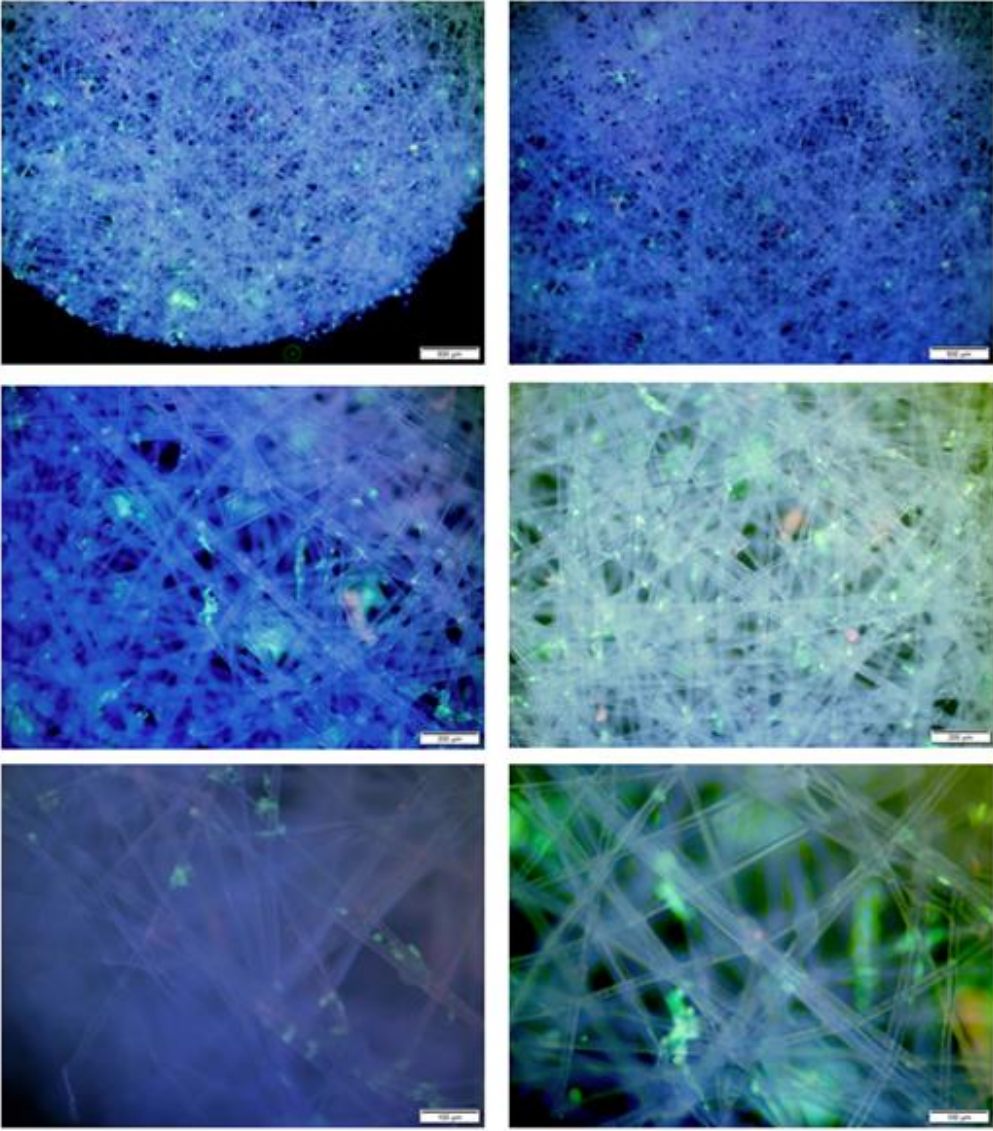
Şekil 4.29 100 mL hacimli DYB’de 1.4×10^5 AdMKH hücre sayısına ait NWPF disklerin 1.gün DAPI boyamaları sırasıyla 4x (a, b), 10x (c, d) ve 20x (e, f) büyütmeleler.



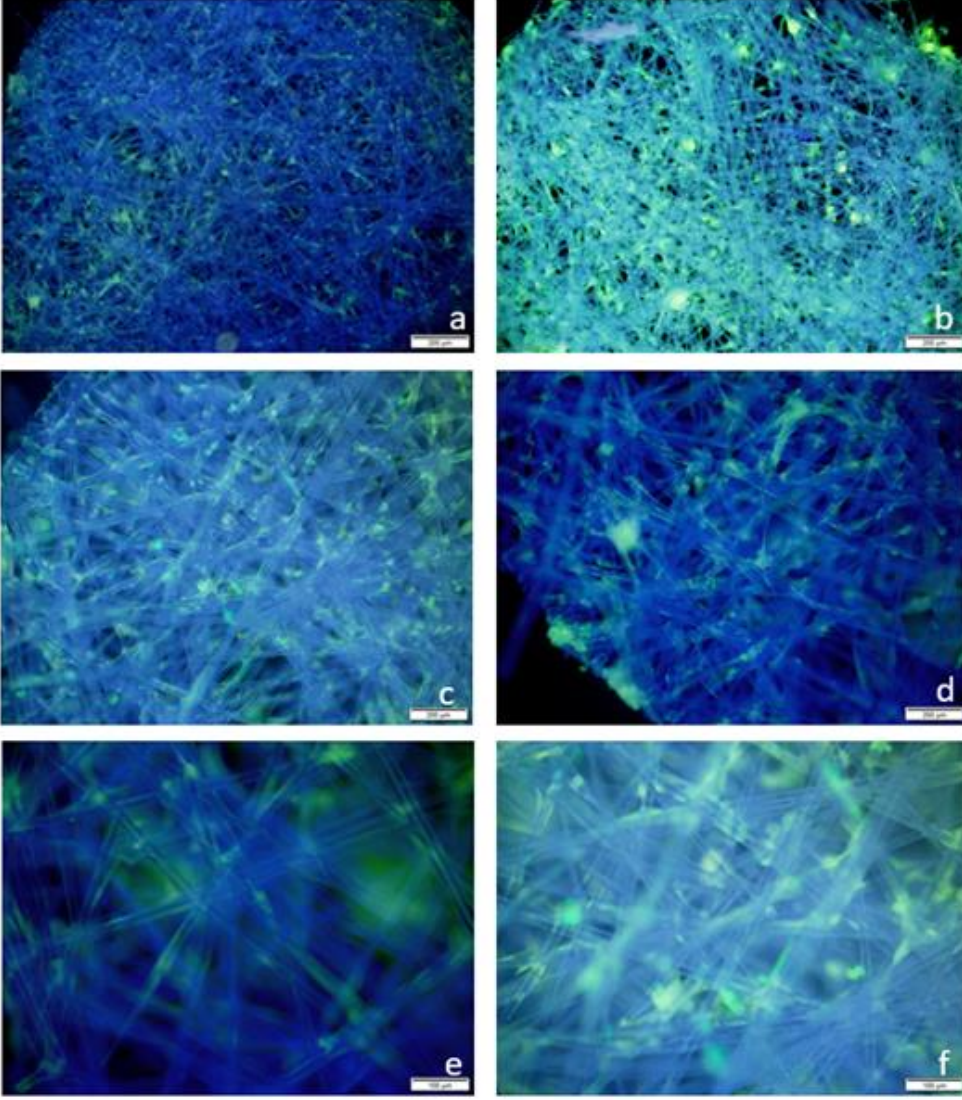
Şekil 4.30 100 mL hacimli DYB’de 0.7×10^5 AdMKH hücre sayısına ait NWPF disklerin 1.gün F-aktin boyamaları sırasıyla 4x (a, b), 10x (c, d) ve 20x (e, f) büyütmeleler.



Şekil 4.31 100 mL hacimli DYB’de 1.4×10^5 AdMKH hücre sayısına ait NWPF disklerin 7.gün F-aktin boyamaları sırasıyla 4x (a, b), 10x (c, d) ve 20x (e, f) büyütmeleler.

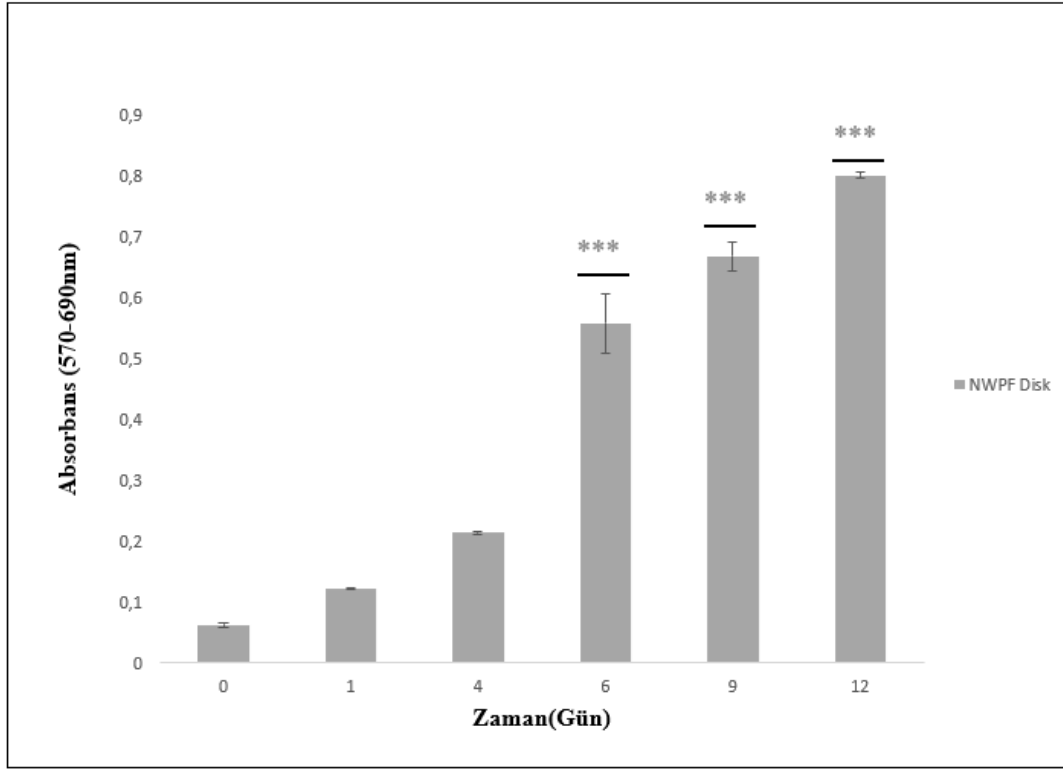


Şekil 4.32 100 mL hacimli DYB’de 0.7×10^5 AdMKH hücre sayısına ait NWPF disklerin 1.gün DAPI/F-aktin boyamaları sırasıyla 4x (a, b), 10x (c, d) ve 20x (e, f) büyütmeleer.



Şekil 4.33 100 mL hacimli DYB’de 1.4×10^5 AdMKH hücre sayısına ait NWPF disklerin 7.gün DAPI/F-aktin boyamaları sırasıyla 4x (a, b), 10x (c, d) ve 20x (e, f) büyütmeleler.

Elde edilen görüntülerden hücrelerin tüm malzemelerin yüzeyini kaplaması amacıyla kültür öncesinde hücreleri şartlandırmak için yapılan statik ekimin iyileştirilmesi ve kültür süresinin uzatılmasının olumlu sonuçlar vereceği düşünülmüştür. Çalışma aynı şartlarda aynı parametrelerle kültür süresi 12 güne çıkarılarak tekrarlanmış ve elde edilen sonuçlar kültür öncesi ekimin ve kültür süresinin önemini ortaya koymuştur. Dinamik kültüre başlamadan önce hücre süspansiyonu malzemelerin tamamına eş dağılımlı bir şekilde eklenmelidir ve etüv içerisinde dinamik kültür öncesinde 24 saat boyunca bekletilmelidir.



Şekil 4.34 100 mL hacimli DYB’de dinamik koşullarda gerçekleştirilen NWPF diskler üzerinde üreyen AdMKH lerin MTT grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, 0.gün NWPF disk iken *** p<0.001).

100 mL hacimli DYB ve NWPF ile gerçekleştirilen bu çalışmada kültür süresi 12 güne çıkarıldığından dolayı biyoreaktörde hücrelerin sürekli çoğalması besiyortamı ihtiyacını arttırmıştır. Bu nedenle besiyortamı 3., 5., 7. ve 10.günlerde yarı yarıya değiştirilmiştir. Kültürde çoğalan AdMKH’lerin mitokondriyel aktiviteleri 12 gün boyunca sürekli artış göstermiştir (Şekil 4.34). Fibra-Cel® ile yapılan MKH kültürleri ile kıyaslandığında en iyi elde edilen sonuçlar kültür süresinin uzatılması ve dinamik kültür öncesinde statik ekim veriminin artırılması ile elde edilmiştir. Hücre sayılarının sürekli artış göstermesi MTT sonuçları ile kıyaslandığında yapılan çalışmanın doğru bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. Hücre sayısı 12 günlük kültür süresinde sürekli artış göstermiştir. Başlangıçta DYB’ye 3×10^7 hücre ekilmiş ve 12 gün sonunda 1.2×10^8 hücre alınmıştır. 12 günlük kültür sonunda hücre sayısı 4 kat artış göstermiştir (Çizelge 4.6). Biyoreaktörden alınan hücreler tekrar 75 cm^2 flaska ekilmiş ve hücre kültürünün başarılı bir şekilde devam ettiği ve aynı zamanda hücrelerin pasajının ilerlemesine rağmen dinamik kültür sonrasında farklılaşmadan kültüre devam ettiği görülmüştür. Bu sonuçlar klinik uygulamalar için mezenkimal kök hücrelerin DYB ile üretilmesinin uygun olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.6 100 mL hacimli DYB’de NWPF disklerden dinamik koşullarda elde edilen AdMKH’lerin disk başına hücre sayısının zamanla değişimi.

Zaman (gün)	Hücre sayısı (hücre/NWPF disk)
0	$4.1 \times 10^4 \pm 550$
1	$4.2 \times 10^4 \pm 780$
4	$4.4 \times 10^4 \pm 345$
6	$6.4 \times 10^4 \pm 400$
9	$9.0 \times 10^4 \pm 1000$
12	$17.0 \times 10^4 \pm 1200$
Hücre kat artışı: 4 kat	Toplam 1.2×10^8 hücre/reaktör

4.4.3 Dinamik Kültür Sonrası Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

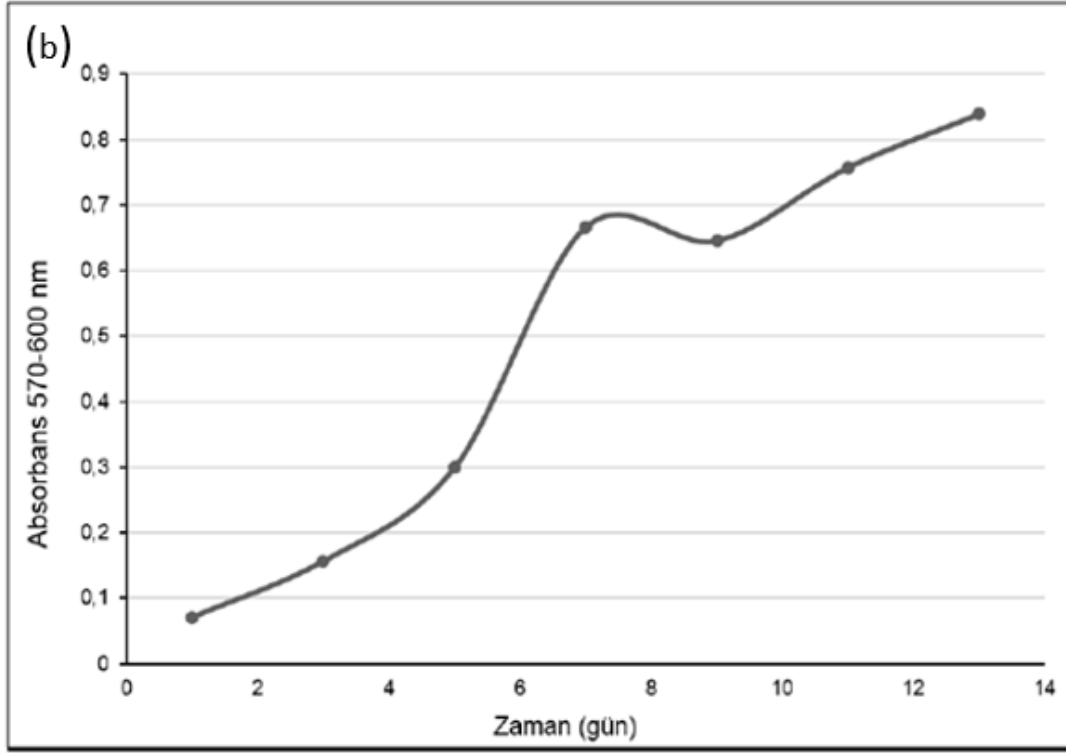
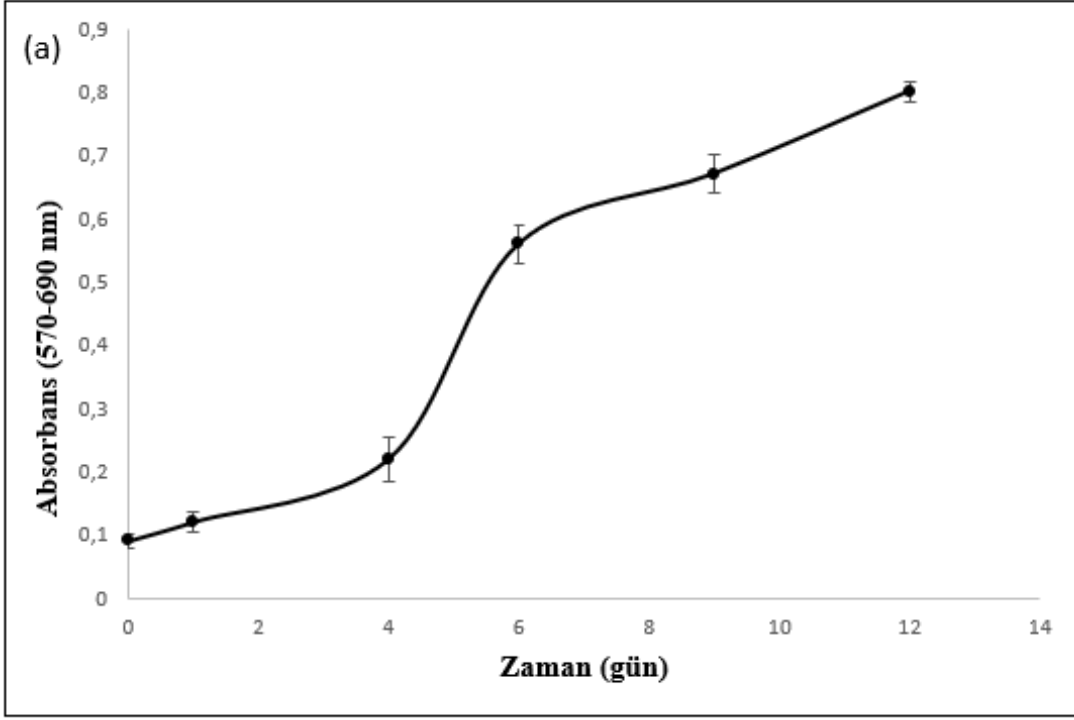
Sıçan adipoz MKH lerin karakterizasyon çalışmaları Bölüm 4.3.1’ de anlatılan dinamik hücre kültürü çalışması ile gerçekleştirilmiştir. Dinamik kültür sonrasında hücreler 7. pasaja ulaşmıştır. Bu amaçla dinamik kültür sonrasında NWPF disklerden kaldırılan hücrelerin morfolojileri, iskelet organizasyonunun belirlenmesi amacıyla kristal viyole ve DAPI/F-aktin boyamaları ile incelenmiştir. Daha sonra hücrelerin bir kısmı 75 cm² flaska ekilmiş ve hücrelerin kültüre sağlıklı bir şekilde devam ettiği ve çoğaldığı gözlemlenmiştir. MTT analizi ile hücrelerin biyoreaktörde NWPF diskler üzerindeki üremelerine bağlı olarak metabolik aktiviteleri belirlenmiştir.

4.4.3.1 Üreme Analizi

Sıçan adipoz MKH’lerin üreme özelliklerinin belirlenmesi için 12 günlük dinamik kültürde üretilen hücrelerin üreme grafiği çizilmiş ve sıçan AdMKH’lerin spesifik büyüme hızları logaritmik faz olarak kabul edilen 4. ve 12. günler arasında hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisi absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları belirlenerek çizilmiştir. Hücrelerin spesifik büyüme hızı ve ikilenme süresini hesaplamak için ln_x-zaman grafiği çizilmiştir (Ek1). Kalibrasyon grafiğinden yola çıkılarak sıçan adipoz MKH lerin maksimum spesifik büyüme hızı 0.0051 sa⁻¹ ikilenme süresinin ise 45 saat olduğu bulunmuştur. TCPS kaplarda gerçekleştirilen sıçan AdMKH kültüründe ikilenme süresinin 44 saat olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç literatür ile uyumludur [103].

Dinamik kültürün üreme eğrisi çıkarılarak literatürdeki statik MKH kültürü ile kıyaslandığında dinamik kültür de çok kısa sürede daha yüksek hücre sayısına ve absorban değerlerine ulaşmıştır [103]. Dinamik kültüre ait hücre üreme eğrisi grafiği Şekil 4.34-a' da gösterilmiştir. MKH temelli hücre tedavisi yaklaşımlarında kısa sürede çok fazla hücre üretilmesi ve üretilen hücrelerinde canlılığının korunması gerekmektedir. Oniki günlük kültür süresince kültürün başlangıcında ve 1. günde hücrelerin gecikme fazında olduğu görülmüştür. Dördüncü günden itibaren hücreler logaritmik faza geçmiş ve hücre sayısında ve absorbanlarında sürekli artış gözlemlenmiştir. Onikinci günde hücrelerin logaritmik fazda olması ile elde edilen bu sonuç DYB ile MKH kültürünün üç boyutlu olarak gerçekleştirdiğinde statik kültüre göre daha verimli olduğunu ve hücre canlılığının da daha iyi olduğunu göstermiştir.

Sıçan adipoz dokudan elde edilen MKH'lerin metabolik aktiviteleri 12 günlük dinamik kültür süresince takip edilmiştir. Kalibrasyon eğrisinde absorban değerlerine karşılık gelen hücre sayıları Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Absorban değeri MTT analizi ile belirlenmiştir.

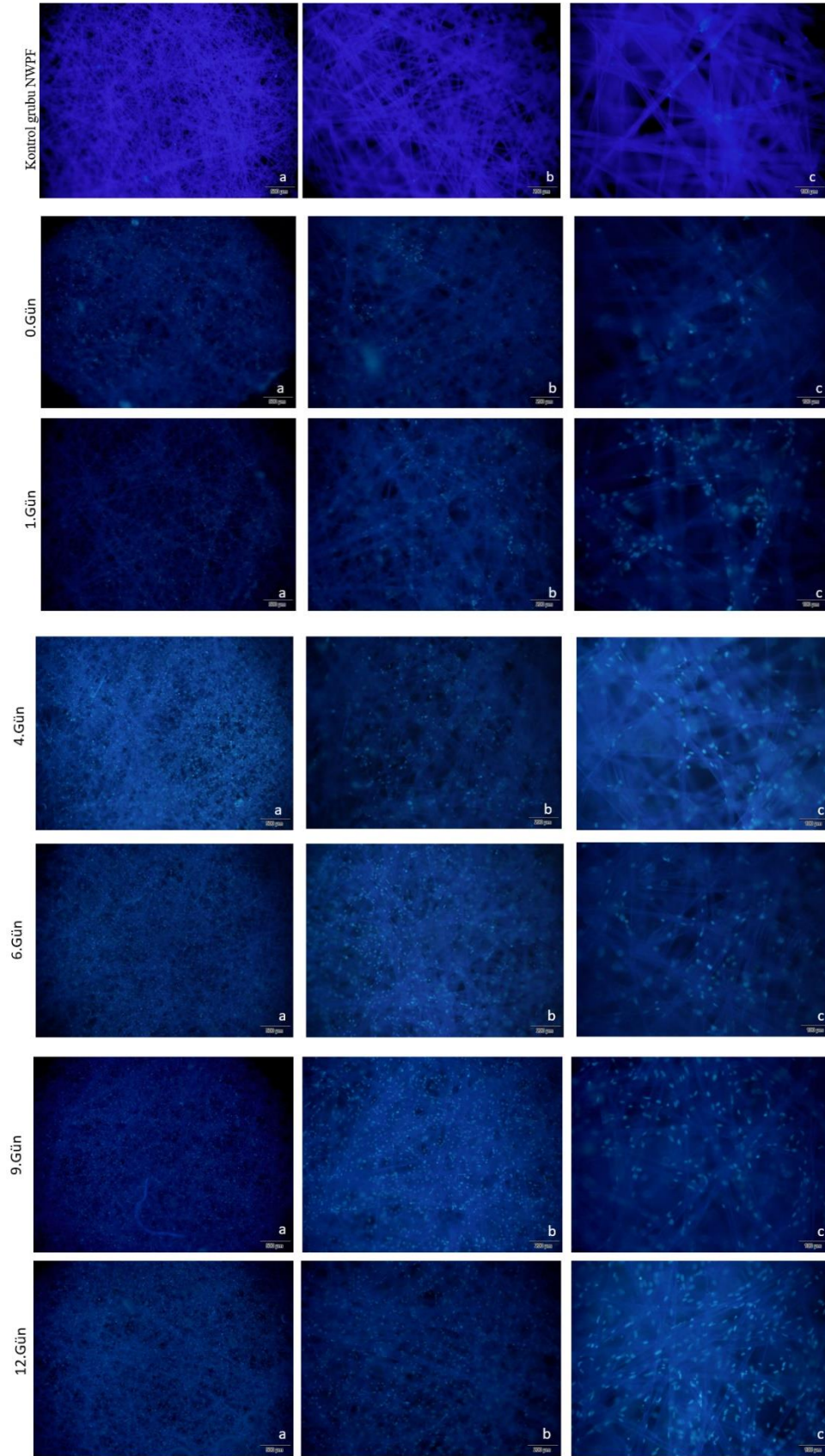


Şekil 4.35 DYB’de NWPF disklerde üreyen sıçan AdMKH üreme eğrisi (a), TCPS kaplarda üretilen sıçan AdMKH’lerin üreme eğrisi (b) [103].

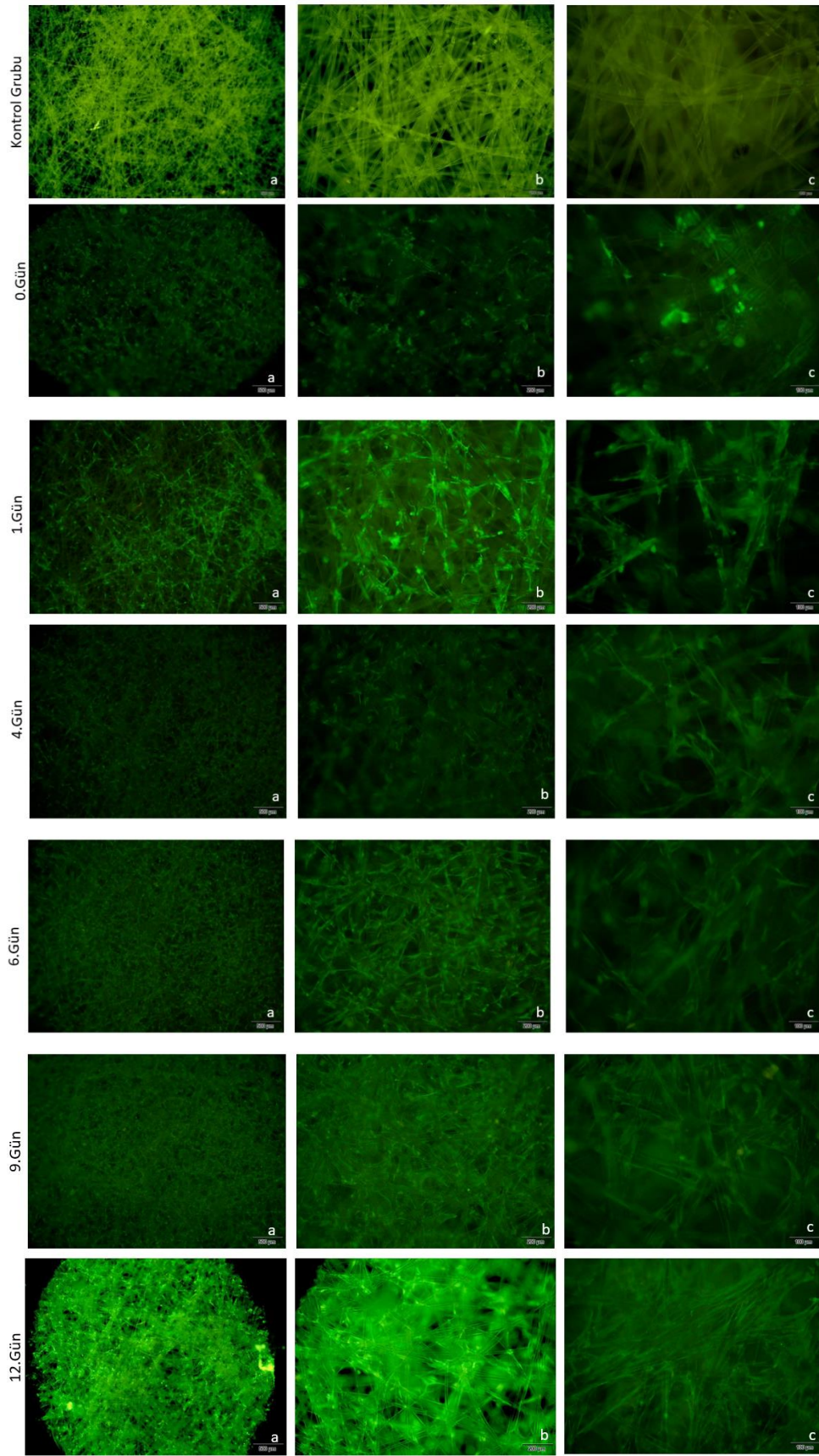
4.4.3.2 DAPI/F-Aktin Boyaması

NWPF diskler ile yapılan DYB hücre kültürü çalışmasında belirli günlerde alınan NWPF disklerin ayrı ayrı DAPI, F-aktin ve DAPI/F-aktin boyamaları yapılarak hücre morfolojileri incelenmiştir. Hücresiz NWPF diskler kontrol grubu olup hücreli NWPF diskler ile karşılaştırılmıştır. NWPF disklere ait DAPI boyamalar floresan mikroskop altında gözlemlenmiştir. Şekil 4.36 incelendiğinde 0. ve 1. günde hücreler adaptasyon fazında olduğundan NWPF diskler üzerinde çoğalan hücreler arasında bir fark gözlemlenmemiştir. Dördüncü günden itibaren hücreler logaritmik faza geçtiğinden disklerin fiber yapıları üzerinde hücreler yayılarak çoğalmaya başlamıştır. Dördüncü, 6., 9. ve 12. günler incelendiğinde hücre sayısının sürekli artış gösterdiği ve malzemelerin yüzeyini tamamen kapladığı ve malzemelerin tüm bölgelerine eş dağılımlı bir şekilde yayıldığı 20x görüntülerde net olarak izlenmiştir. Şekil 4.37 incelendiğinde F-aktin boyamaları görülmektedir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında yine hücrelerin diskler üzerindeki fiberlere hücre filamentlerinin eş dağılımlı bir şekilde yerleştiği gözlemlenmiş ve 12. günde en iyi görüntüler saptanmıştır. DAPI/F-aktin boyamalarının birlikte olduğu görüntüler ise Şekil 4.38’de görülmektedir. Elde edilen bu görüntüler ile boyamaların başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve hücrelerin NWPF diskler üzerinde eş dağılımlı olarak yerleştiği saptanmıştır. En iyi görüntü 12. günde 20x büyütmede hücrelerin fiberler üzerinde bulunduğu ve filamentlerinin fiberler üzerine yayıldığı kontrol grubu ile kıyaslandığında net bir şekilde görülmüştür. Bu sonuçlar ayrıca DYB hücre kültürü öncesinde gerçekleştirilen statik ekimin iyi bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir.

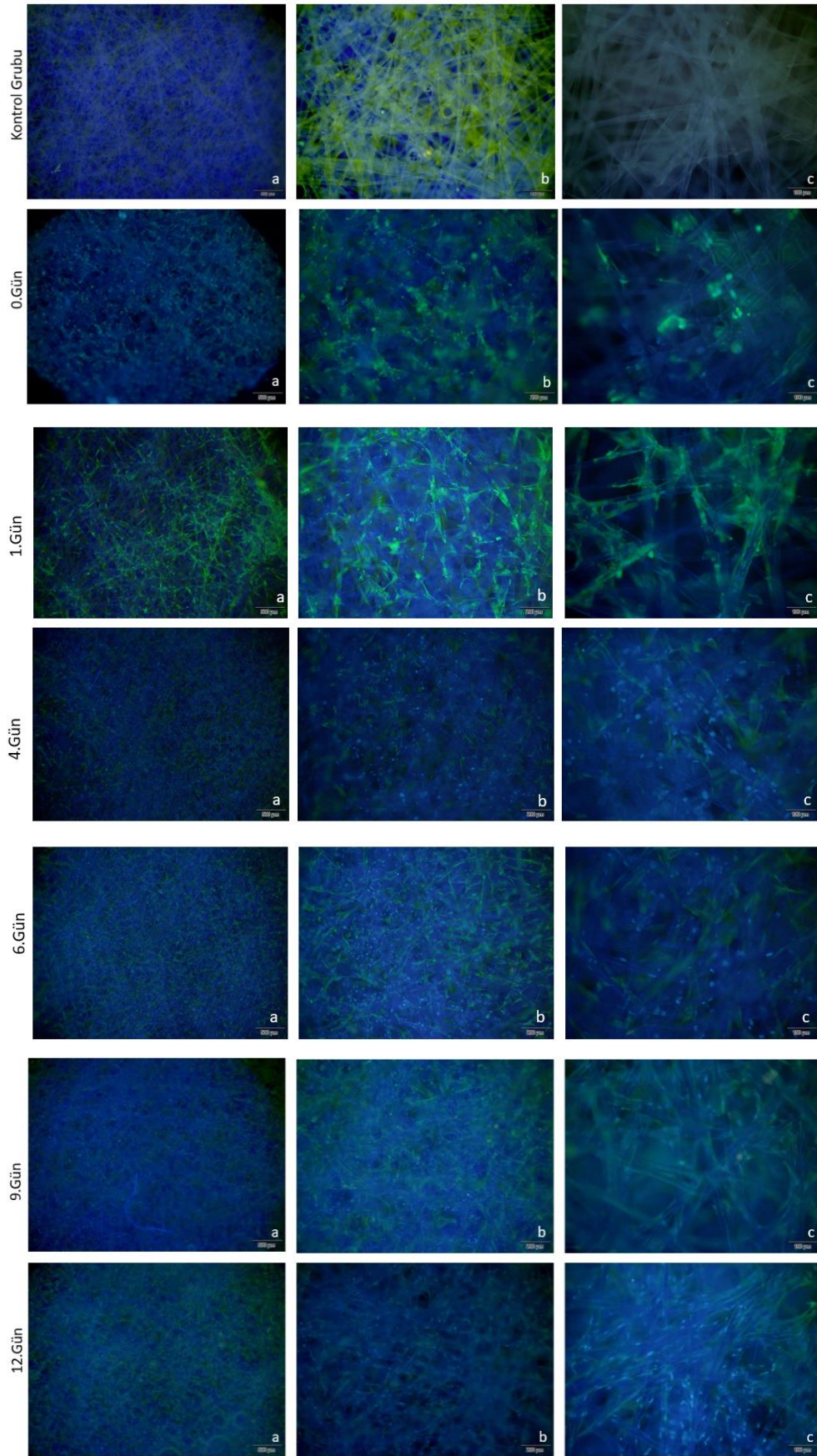
Dolgulu yatak biyoreaktörde Fibra-Cel'lere AdMKH ekilerek gerçekleştirilen dinamik kültür çalışması ile NWPF disklere ekilen AdMKH dinamik kültür çalışması kıyaslandığında, MTT analizinden ve hücre sayımından elde edilen sonuçlar NWPF diskler ile gerçekleştirilen dinamik kültür çalışmasının daha iyi sonuçlar verdiğini göstermiştir. Bunun sebebi ise Fibra-Cel® diskler ticari olarak mevcut olup süperhidrofilik yapıya sahiptir. Hücre kültürü çalışmalarında süper hidrofilik yapıya sahip malzemeler kullanıldığında hücrelerin malzeme fiberlerine yapışmadan ortama karışma ihtimali göz önüne alındığında hücre kültürünün olumsuz etkilenmesi söz konusudur [94].



Şekil 4.36 NWPF disklere ait dinamik kültür DAPI boyamaları a) 4x, b) 10x, c) 20x büyütme.



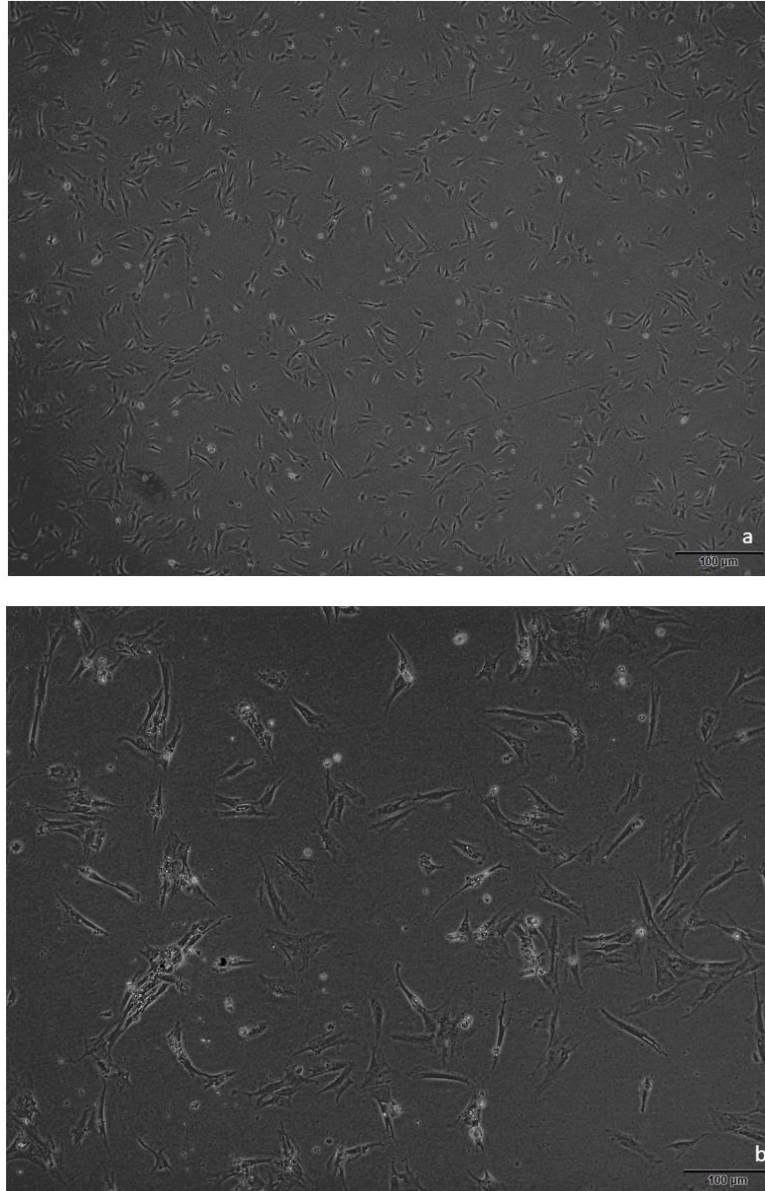
Şekil 4.37 NWPF disklere ait dinamik kültür F-aktin boyamaları a) 4x, b) 10x, c) 20x büyütmeleler.



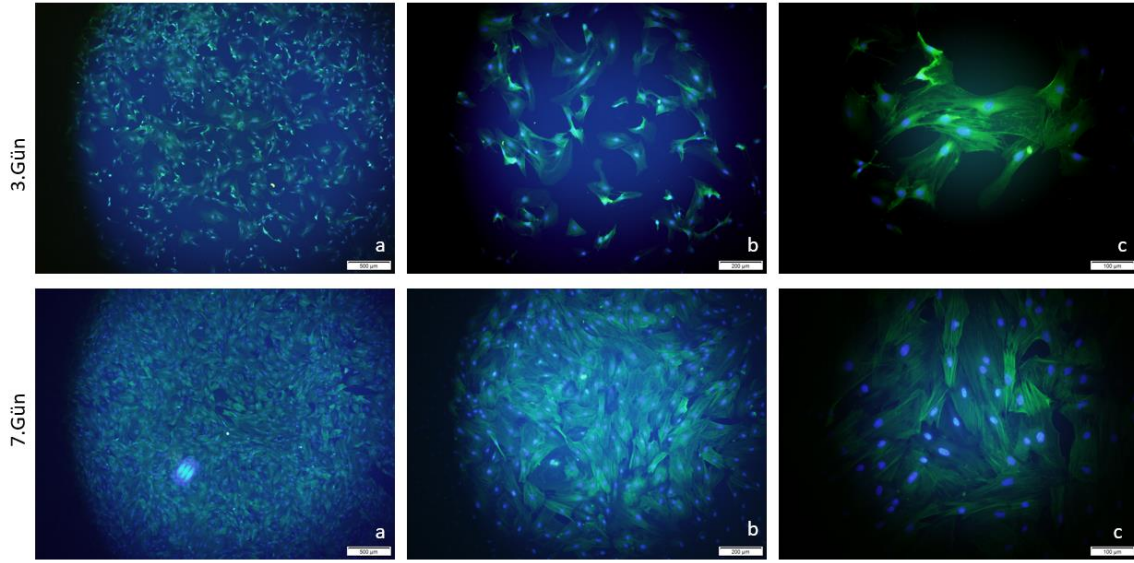
Şekil 4.38 NWPF disklere ait dinamik kültür DAPI/FA boyamaları a) 4x, b) 10x, c) 20x büyütmeleler.

4.4.3.3 Dinamik Kültür Sonrası Hücre Kültürü Çalışmaları

Dinamik hücre kültür çalışmalarında, biyoreaktörden alınan tüm hücrelerin biyoreaktörün hidrodinamik etkilerinden etkilenmemesi gerekmektedir. Kültür sonunda DYB’de gerçekleştirilen NWPF disklerin kullanıldığı dinamik kültürde tüm hücreler disklerden kaldırılmış ve tekrar 75 cm² flaska 5x10⁵ hücre ekilerek kültürün başarılı bir şekilde devam ettiği, hücrelerin morfolojilerinin pasajı ilerlemesine rağmen değişmediği ve farklılaşmadığı Şekil 4.39’da gösterilmiştir.



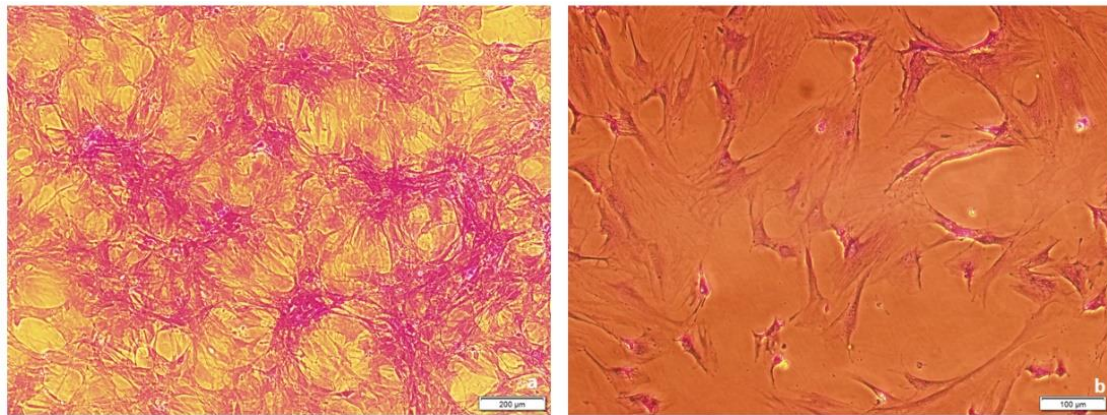
Şekil 4.39 DYB’den alınan NWPF disklerden kaldırılan 8. pasaj AdMKH’lerin 75 cm² flastaki görüntüsü 10x büyütme a) 1.gün, b) 7.gün.



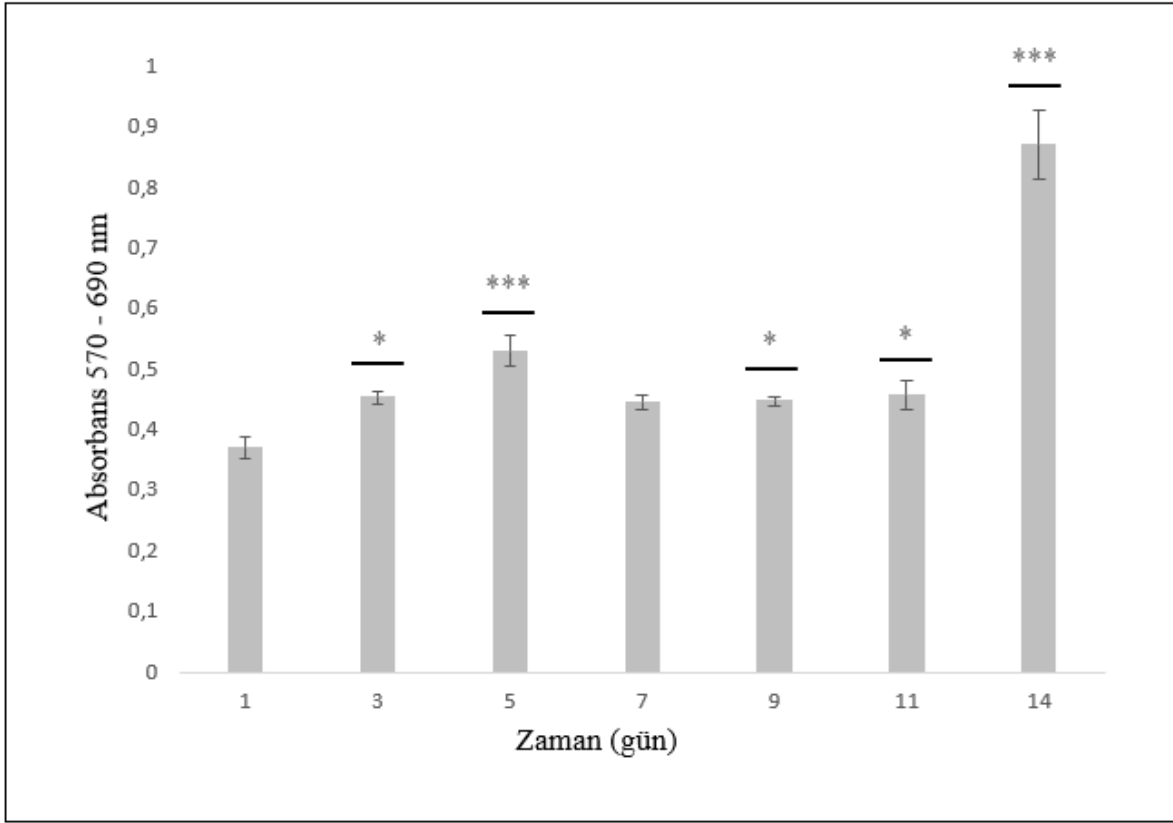
Şekil 4.40 DYB'den alınan NWPF disklerden kaldırılan 8.pasaj AdMKH'lerin Petri kabındaki DAPI/F-aktin görüntüsü a) 4x, b) 10x, c) 20x büyütme.

Şekil 4.39'da gösterilen 75 cm² flastaki hücreler Image J programı kullanılarak yüzey alanı hesaplanmış ve toplam yüzey alanı 75.84±6.3 mm²/flask olarak hesaplanmıştır. NWPF disklerden kaldırılan 5x10³ hücre Petri kabına ekilerek DAPI/F-aktin boyamaları gerçekleştirilmiştir. Floresan mikroskop kullanılarak elde edilen görüntüler Şekil 4.40'da gösterilmiştir. Hücrelerin başarılı bir şekilde çoğaldığı ve 8.pasajda olmasına rağmen 3. günden 7.güne kadar çoğalmaya devam ettiği gözlemlenmiştir.

DAPI/F-aktin boyamalarına ek olarak AdMKH morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla kristal viyole boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kristal viyole boyamasında hücre çekirdekleri koyu mor renkte hücre iskeletleri ise açık mor renkte görülmektedir. Petri kabına ekilen 5x10³ hücreye ait optik mikroskopta elde edilen görüntüler Şekil 4.41'de gösterilmiştir.



Şekil 4.41 DYB'den alınan NWPF disklerden kaldırılan 8. pasaj AdMKH'lerin Petri kabındaki kristal viyole boyamaları a) 10x, b) 20x büyütme.



Şekil 4.42 DYB' den kaldırılan dinamik kültür sonrası sıçan adipoz MKH'lerin MTT grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol 1.gün iken * p<0.05, *** p<0.001).

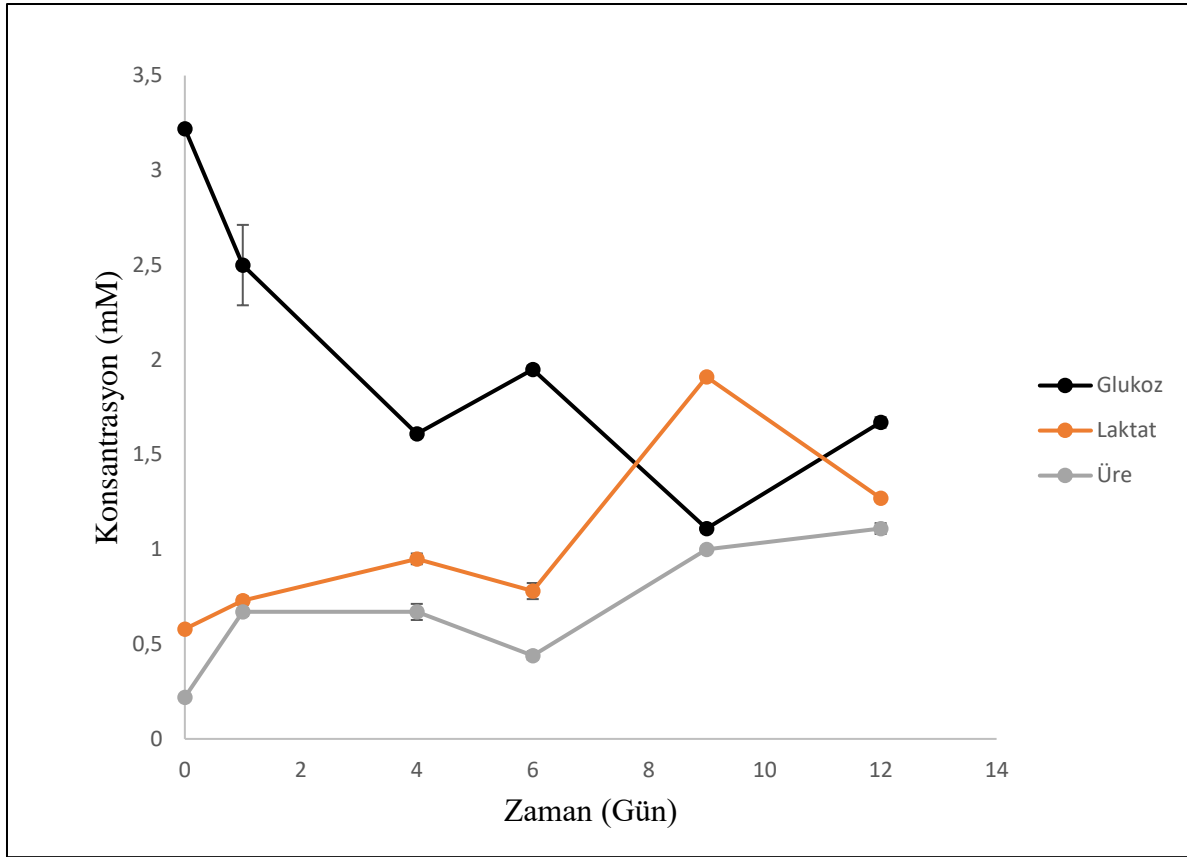
Dinamik kültür sonrasında kaldırılan hücrelerin mitokondriyel aktivitelerini belirlemek amacıyla 24 gözlü polistiren kaplarda 8. pasajda olan cm^2 başına 1.6×10^4 AdMKH ekilerek 14 gün süren MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.42 incelendiğinde absorbans 1. gün 0.35 değerine ulaşılmıştır. Üçüncü günde artış göstermiş ve 0.45 değerine ulaşmıştır (*p<0.05). Birinci gün ve 7.gün arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Dokuzuncu ve 11.günlerde absorbans değerleri sabit kalmıştır (*p<0.05). Ondördüncü güne gelindiğinde absorbans 1. güne göre yaklaşık 3 kat artış göstermiş 0.93 değerine ulaşmıştır (***p<0.001). Dinamik kültür sonrasında elde edilen MTT analizi sonuçları hücrelerin ileri pasaj olmasına rağmen mitokondriyel aktivitelerinin iyi olduğunu ve üretilen hücrelerin tekrar kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

4.4.3.4 Glukoz, Laktat ve Üre analizi

Dinamik kültür süresince hücrelerin metabolik aktiviteleri hakkında bilgi edinmek için temel enerji kaynağı olan glukoz ve hücrenin metabolik aktiviteleri sonucu ortama salınan laktat ve üre konsantrasyonları ölçülmüştür. NWPF diskler üzerinde üreyen sıçan adipoz MKH'lere ait glukoz tüketimi, laktat ve üre üretiminin zamanla değişimi Şekil 4.43'te gösterilmiştir. Şekil

4.43 incelendiğinde kültürün 0. gününde glukoz miktarı en yüksek seviyededir ve biyoreaktör kültürü başlatıldığında henüz hücreler logaritmik faza geçemedikleri için ortamda glukoz konsantrasyonu azalmamıştır. Glukoz konsantrasyonu 0. günde 3.22 mM olarak ölçülmüş laktat ve üre ise 0.58 ve 0.22 mM olarak belirlenmiştir. Kültürün 1. gününde hücreler çoğalmaya başladıklarından glukoz konsantrasyonu 2.5 mM olarak ölçülmüş ve buna bağlı olarak laktat ve üre konsantrasyonu 0.73 ve 0.67 mM olarak ölçülmüştür ve artış göstermiştir. Kültürün 4. gününe kadar ortam değişimi yapılmadığından 4.gün glukoz konsantrasyonu azalmaya devam etmiş 1.61mM olarak ölçülmüştür. Laktat konsantrasyonu 0.95 mM olarak ölçülmüş ve artış göstermiştir ancak üre miktarı 0.67 mM olarak sabit kalmıştır. 5. günde ortam değişimi %50 oranında yapılmıştır. Ortama taze besi ortamı eklendiğinden 6.günde glukoz konsantrasyonu 1.95mM olarak ölçülmüş ve artış göstermiştir. Laktat konsantrasyonu 0.78 mM olarak azalmış, üre konsantrasyonu ise 0.44 mM olarak azalmıştır. Kültürün 9. gününde hücre sayısının artması ortamdaki glukozun azalmasına sebep olmuştur ve glukoz konsantrasyonu 1.11mM olarak ölçülmüştür. Glukoz azaldığından laktat ve üre konsantrasyonları sırasıyla 1.91mM ve 1mM olarak ölçülmüş ve artış göstermiştir. Kültürün 10.gününde tekrar besi ortamı %50 oranında yenilendiğinden 12. günde glukoz konsantrasyonu 1.67 mM olarak ölçülmüş, laktat ve üre konsantrasyonu sırasıyla 1.27 mM ve 1.11 mM olarak belirlenmiştir.

Biyoreaktörde kültür başlangıcında ölçülen glukoz konsantrasyonu kültür sonu ile kıyaslandığında yaklaşık 2.5 kat azalış göstermiştir. Ortama taze besi ortamı eklenmesi glukoz miktarının 6. ve 10. günlerinde artış gösterse de başlangıç konsantrasyonu ile kıyaslandığında 2.5 kat azalmıştır. Laktat ve üre konsantrasyonları da dinamik kültür başlangıç konsantrasyonları ile kıyaslandığında laktat konsantrasyonu yaklaşık 2 kat artış göstermiş, üre konsantrasyonu ise 5 kat artış göstermiştir. Bunun sebebi hücrelerin kültür süresince sürekli çoğalmasından kaynaklanmaktadır. Grafikteki dalgalanma 5. ve 10.günde ortama %50 oranında taze besiyortamı eklenmesinden kaynaklanmaktadır. Beklenildiği gibi ortam değişimlerinden sonra glukoz konsantrasyonlarında artış gözlemlenmiş, laktat ve üre konsantrasyonlarında azalma meydana gelmiştir.



Şekil 4.43 DYB’de NWPF diskler kullanılarak gerçekleştirilen dinamik kültüre ait glukoz-laktat-üre konsantrasyonlarının zamanla değişimi. (Grafikteki dalgalanma 5. ve 10.günde gerçekleştirilen %50 oranında taze besi ortamı eklenmesinden kaynaklanmaktadır.)

Glukoz, kültürde minimum 1.67 mM seviyeye ulaştığında laktat 1.27mM ve üre 1.11 mM’a maksimum seviyeye ulaşmıştır. NWPF diskler kullanılarak DYB’de gerçekleştirilen sıçan adipoz MKH kültürü çalışmasında glukoz sınırlaması söz konusu olmamıştır. Literatürde bildirilen sınırlayıcı konsantrasyonlardan uzaktır (<0.1mM). Ortamda biriken laktat konsantrasyonu ve üre konsantrasyonu maksimum 1.27mM ve 1.11 mM olarak ölçüldüğünden literatürde bildirilen toksik seviyelere (1.6-1.9 mM) ulaşmadığından laktattan ve üreden oluşan inhibisyon olmamıştır [94].

Özgül metabolik hızlar

Özgül metabolik hız, canlı hücrelerin temelinde hesaplanan üretim ve tüketim hızları olarak tanımlanmıştır.

$$-q_{\text{Glu}} = \frac{1}{Xv} \frac{d[\text{Glu}]}{dt} \quad (4.1)$$

$$q_{Lak} = \frac{1}{Xv} \frac{d[Lak]}{dt} \quad (4.2)$$

$$q_{Üre} = \frac{1}{Xv} \frac{d[Üre]}{dt} \quad (4.3)$$

X_v ; Kültürdeki canlı hücre sayısı (Hücre.mL^{-1}), $[Glu]$, $[Lak]$, $[Üre]$ sırasıyla glukoz, laktat ve üre konsantrasyonları (mM), t ; zaman (saat), Özgül glukoz tüketim hızı (q_{Glu}), özgül laktat üretim hızı (q_{Lak}) ve özgül üre üretim hızı ($q_{Üre}$) [104].

Glukozdan görünür laktat verimi ($Y_{Lac/Glu}$), glukolizis yoluyla glukozun ne kadarının laktata dönüştüğünü gösterir (Eşitlik 4.4).

$$Y_{Lac/Glu} = \frac{q_{Lak}}{q_{Glu}} \quad (4.4)$$

$$Y_{Üre/Glu} = \frac{q_{Üre}}{q_{Glu}} \quad (4.5)$$

MTT analizi sonucuna göre üstel üreme fazında olan hücrelerin sayıları Eşitlik 4.1 de yerine konulduğunda 1-4 gün, 4-6 gün, 6-9 gün ve 9-12 günlerde glukoz tüketimi sırasıyla q_{glu} değerleri sırasıyla 0.508×10^{-10} mmol glukoz hücre⁻¹ saat⁻¹, 0.605×10^{-10} mmol glukoz hücre⁻¹ saat⁻¹, 0.171×10^{-10} mmol glukoz hücre⁻¹ saat⁻¹, 0.136×10^{-10} mmol glukoz hücre⁻¹ saat⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde özgül laktat üretim hızları belirtilen günler için sırasıyla hesaplandığında 0.300×10^{-10} mmol laktat hücre⁻¹ saat⁻¹, 0.254×10^{-10} mmol laktat hücre⁻¹ saat⁻¹, 0.295×10^{-10} mmol laktat hücre⁻¹ saat⁻¹, 0.103×10^{-10} mmol laktat hücre⁻¹ saat⁻¹ olduğu bulunmuştur. Belirtilen günler için üre üretimi sırasıyla 0.212×10^{-10} mmol üre hücre⁻¹ saat⁻¹, 0.143×10^{-10} mmol üre hücre⁻¹ saat⁻¹, 0.154×10^{-10} mmol üre hücre⁻¹ saat⁻¹, 0.907×10^{-10} mmol üre hücre⁻¹ saat⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Tsai ve arkadaşları yaptığı çalışmada glukoz tüketimi 12.48 pmol/hücre⁻¹ saat⁻¹ ve 9. günde laktat tüketimi 20.95 pmol/hücre⁻¹ saat⁻¹ olarak hesaplamıştır [74]. 12 günlük dinamik kültürden elde edilen veriler Tsai ve arkadaşlarının 9 günlük dinamik kültürü ile kıyaslandığında glukoz tüketim hızı ve laktat üretim hızının daha az olduğu görülmektedir. Bunun nedeni ise Tsai ve arkadaşlarının 2.5L hacminde daha büyük DYB kullanmasından kaynaklanmıştır. Eşitlik 4.4 ve 4.5 kullanılarak verim faktörleri hesaplanmıştır. Hesaplanan verim faktörleri Çizelge 4.7'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.7 DYB’de NWPf diskler ile gerçekleştirilen dinamik kültüre ait zamanla değişen verim faktörleri $Y_{lac/glu}$ ve $Y_{üre/glu}$.

Kültür süreleri (gün)	$Y_{lac/glu}$ (mol laktat/mol glukoz)	$Y_{üre/glu}$ (mol üre/mol glukoz)
1-4	0.60	4.15
4-6	0.40	0.23
6-9	1.73	0.90
9-12	0.80	6.72

Doğru hesaplamalar yapabilmek için diğer besin maddelerinin (ör: glutamin, penisilin/streptomisin) metabolizmaları sonucu açığa çıkan laktat miktarları da düşünülmelidir. Çizelge 4.7’de 5. günde ortam değiştirildiği için $Y_{üre/glu}$ değeri 4-6 gün arasında 0.23’e düşmüştür. Ortamda glukoz konsantrasyonunun azalmasına bağlı olarak $Y_{lac/glu}$ 6.günde artmış ve 10. günde ortam %50 oranında değiştirildiği için 9.günden sonra 0.80’e düşmüştür. Benzer şekilde $Y_{üre/glu}$ 6.günden itibaren 0.90 olarak belirlenmiş ve 12.güne gelindiğinde 6.72 olarak maksimum seviyeye ulaşmıştır. Literatürde memeli hücrelerin enerji metabolizması için glukozun laktata metabolize edilmesi sonucunda $Y_{lac/glu}$ değerinin 1.1-1.7 mol laktat/mol glukoz olduğu belirtilmiştir [94]. $Y_{lac/glu}$ üst limit değeri sadece 6-9 günlerde aşıldığı görülmüştür.

3. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasında DYB’de üç boyutlu taşıyıcı malzeme olan NWPF diskler kullanılarak sıçan adipoz dokusundan elde edilen MKH dinamik hücre kültürü çalışması gerçekleştirilmiş ve hücrelerin üç boyutlu kültür ve sonrasındaki morfolojileri incelenmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

- Çalışmanın ilk aşamasında üç boyutlu kültürde kullanacağımız NWPF disklerin farklı yüzey modifikasyonları ile hidrofilitenin artırılarak hücrelerin fiber yüzeylerine daha iyi yapışması amaçlanmıştır ve 3M H₂SO₄ ile malzemelerin yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiştir.
- Farklı yüzey modifikasyon metotları uygulanarak hidrofilitenin artırılmasına yönelik çalışmalarda sülfürik asit molaritesi aynı olsa dahi sonikasyon yapılan ve kütleme yapılan malzemelerin fiberlerindeki kırılmalar SEM analizi ile gözlemlenmiştir.
- SEM analizleri sonucunda 3M H₂SO₄ ile gerçekleştirilen herhangi ek işlem uygulanmayan Çizelge 3.1’de belirtilen Grup 1 yüzey modifikasyonu protokolü ile hücre kültürü çalışmalarına devam edilmiştir.
- Çekme testi sonucunda kontrol grubu ile 3M H₂SO₄ ile yüzey modifikasyonu yapılan malzemelerin zamana karşı kopma mukavemeti incelenmiş olup sülfürik asit ile yüzey modifikasyonu yapılmasına rağmen kopma mukavemetleri arasında büyük bir fark gözlemlenmemiştir.
- Statik hücre kültürü çalışmalarında bir diğer kontrol grubu olan ve ticari olarak satılan Fibra-Cel® diskler NWPF disklerle göre daha iyi sonuçlar vermiştir ancak TCPS kaplardaki hücreler ile kıyaslandığında Fibra-Cel® disklerin hücre sayısı ve MTT analizi sonuçları TCPS’lere göre daha düşük gözlemlenmiştir.
- MC3T3-E1 hücre hattı ile gerçekleştirilen statik hücre kültürü çalışmasında hücrelerin fiber yapılaraya yapışıp çoğaldığını görmek için SEM analizi yapılmış ve 11 günlük kültür gerçekleştirilmiştir. 11 gün sonunda SEM görüntüleri hücrelerin sorunsuz bir şekilde yapışıp çoğaldığı görülmüş, uygulanan yüzey modifikasyonu metodunun başarılı olduğu ve sonraki çalışmalarda Çizelge 3.1’de Grup 1 olarak adlandırılan yüzey modifikasyonu protokolü uygulanmıştır.
- Fibra-Cel® diskler kullanılarak dinamik ön hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

- Yapılan çalışmalarda çalışma 1, çalışma 2 ve çalışma 3 olarak isimlendirilen dinamik kültür çalışmaları 0.5 L çalışma hacmine sahip DYB içerisine 5g Fibra-Cel® malzemelere MC3T3-E1 hücreleri ekilerek 7 günlük dinamik hücre kültürü denemeleri yapılmıştır.
- Hücre sayısı ortalama 4 kat artmış olmasına rağmen 0.5L çalışma hacmine sahip DYB dinamik kültürü için hücre kat artışının az olduğu gözlemlenmiştir. MTT analizi sonuçları ise istenilen düzeyde olmamıştır. Disk başına ekilen hücre yoğunluğunun az olması hücrelerin diğer Fibra-Cel® disklere göçünü engellemiş ve istenilen miktarda hücre sayısı elde edilememiştir.
- Yatak yüksekliği azaltılmış 5g malzeme yerine 2.5g malzeme kullanılmış ancak yine diğer malzemelere hücre göçü istenilen düzeyde gerçekleşmemiştir.
- Elde edilen bütün verilerde istenilen düzeyde sonuçlar elde edilememiştir bunun nedeninin malzemelerin DYB'ye alınmadan önce statik ekim ile malzemelere ekilmemesi ve şartlandırılmamasından kaynaklandığı belirlenmiştir.
- DYB dinamik hücre kültürü çalışmalarında kültür parametrelerini iyileştirmek ve verimi arttırmak amacıyla biyoreaktörün ölçeği küçültülmüş ve 100 mL hacimli otoklavlanabilir cam rezervuar tasarlanmıştır. Sepet kısmı için paslanmaz çelik tel biyoreaktörün hacmine uygun şekilde tasarlanmış ve cam rezervuarın içine yerleştirilmiştir.
- 100 mL hacimli DYB ile Fibra-Cel® diskler MC3T3-E1 hücreleri ekilerek 7 günlük dinamik hücre kültürü denemeleri yapılmıştır. Kültür parametrelerinin iyileştirmek amacıyla hücre kültürü çalışması öncesi malzemeler serumlu kültür ortamı içinde 1 gece %5 CO₂ %95 hava içeren etüvde bekletilmiştir. Ardından flasktan alınan 30x10⁶ hücre etüvde bulunan diskler ekilmiş ve 1 gece etüvde bekletilmiş ardından tüm hücreli diskler DYB içine alınmış ve hücre kültürü başlatılmıştır.
- Elde edilen veriler ışığında MTT analizi sonucu absorbanların ve disk başına düşen hücre sayısının 1.,3.,5., ve 7. günlerde arttığı gözlemlenmiştir. Hücre sayılarındaki artışı ve malzeme fiberlerinin her bölümüne eş dağıldığını görmek amacıyla DAPI/F-aktin boyamaları yapılarak floresan mikroskop altında görüntüleri alınmış ve hücrelerin eş dağılımlı olarak disklerin her bölgesine yerleştiği gözlemlenmiştir.
- Dinamik kültür bitiminde Fibra-Cel® disklerden tüm hücreler kaldırılmış ve DAPI boyamalar ile hücrelerin %85'inin disklerden kaldırıldığı gözlemlenmiştir. Uygulanan hücre kaldırma protokolünün 3 boyutlu fiber temelli taşıyıcılarda kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir.

- Kültür parametreleri değiştirilmeden 100 mL hacimli DYB'de NWPF disklere MC3T3-E1 hücreleri ekilmiş ve Fibracel® diskler gibi MTT analizinde absorbanlarının arttığı ve hücre sayısının 7 günlük kültür süresince arttığı gözlemlenmiştir.
- Kültür parametrelerinin uygunluğu belirlendikten sonra sıçan adipoz MKH kullanılarak 7 günlük DYB dinamik hücre kültürü çalışması gerçekleştirilmiş ve MTT analizinde absorbanlarının ve hücre sayısının arttığı gözlemlenmiştir. DAPI/F-aktin boyamaları yapılarak hücrelerin malzemelerin tüm bölgelerine eş dağılımlı olarak yerleştiği gözlemlenmiştir.
- DYB'de NWPF diskler kullanılarak gerçekleştirilen dinamik sıçan AKH hücre kültüründe kültür süresi 12 güne çıkarılmış daha önce yapılan çalışmalara göre en iyi sonuçlar elde edilmiştir. NWPF disklerden kaldırılan hücreler tekrar flaska ekilmiş ileri pasaj olmasına rağmen farklılaşma olmadan kültüre başarılı bir şekilde devam etmiştir. Hücre morfolojileri DAPI/F-aktin ve kristal viyole boyamaları yapılarak gözlemlenmiş ve kültür sonrasında hücrelerin morfolojilerinde değişiklik gözlemlenmemiştir.
- Glukoz konsantrasyonu, hücre sayısı sürekli artış gösterdiğinden biyoreaktörün ortamı değiştirilse dahi başlangıç konsantrasyonuna göre 2.5 kat azalış göstermiştir. Laktat ve üre konsantrasyonu ise ortamda metabolitlerin birikmesi sonucu artış göstermiştir.
- Elde edilen konsantrasyonlardan laktat ve üreye bağlı bir inhibisyonun oluşmadığı gözlemlenmiştir.

Çalışmaların sonucunda dolgulu yatak biyoreaktörde sıçan adipoz mezenkimal kök hücrelerin kültür parametreleri belirlenmiş olup kök hücre temelli klinik tedavi yaklaşımlarında ihtiyaç duyulan hücre sayısına kısa sürede ulaşılabildiği ve klinik uygulamalarda kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] A. Mizukami, M. D. Orellana, S. C. Caruso, K. L. Prata and D. C. Tovas, *Biotechnology progress*, 29 (2013) 568-572.
- [2] J. Rowley, E. Abraham, A. Campbell, H. Brandwein, S. Oh, *Bioprocess International* 10 (2012) 16-22.
- [3] A.V.R. Carlos, T.G. Fernandes, M.M.Diogo, C.L. da Silva, J.M.S. Cabral, *Biotechnology advances*, 29 (2011) 815–829.
- [4] Q.A. Rafiq, K. Coopman, A.W. Nienow, C.J. Hewitt, *Biotechnology Journal* 11 (2016) 473–486.
- [5] A. Shekaran, A. Lam, E. Sim, L. Jialing, L. Jian, J.T. Wen, J.K. Chan, M. Choolani, S. Reuveny, W. Birch, S. Oh, *Cytotherapy* 18 (2016) 1332–1344.
- [6] M. Gümüşderelioğlu, E. Aslankaraoğlu, S. İ. Gürhan, *Biotechnology and applied biochemistry*, 33 (2010) 167–172.
- [7] F. Meuwly, P.A. Ruffieux, A. Kadouri, U.von Stockar, *Biotechnology Advances* 25 (2007) 45-56.
- [8] C. Schirmaier, V. Jossen, S.C. Kaiser, F. Jüngerkes, S. Brill, A.Safavi-Nab, A. Siehoff, C. van den Bos, D. Eibil, R. Eibil, *Engineering in Life Sciences*, (2014) 292–303.
- [9] F. Dieter, P. Ralf, *Journal of Biotechnology*, 72 (1999) 169–184.
- [10] A. Bongso and E. H. Lee, *Stem Cells: from bench to bedside*, 1 (2005).
- [11] A. Vats, N. S. Tolley, J. M. Polak and L. D. K. Buttery, *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 27 (2002) 227-232.
- [12] A. Bongso and M. Richards, *History and perspective of stem cell research." Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 18 (2004) 827-842.
- [13] N. W. Kim, M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. C. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, J. W. Shay, *Science*, 266 (1994) 2011-2015.
- [14] A. Can, S. Karahuseynoglu, *Stem cells*, 25 (2007) 2886-2895.
- [15] K. Kalra and P.C. Tomar, *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2 (2014) 919-930.
- [16] N. Serakinci, W. K. Keith, *European journal of cancer*, 42 (2006) 1243-1246.
- [17] K. O'Donoghue, N. M. Fisk, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 18 (2004) 853-875.
- [18] M. Mimeault, R. Hauke and S. K. Batra, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 82

- (2007) 252-264.
- [19] P. V. Guillot, K. O'Donoghue, M.R.C.O.G, H. Kurata and N. M. Fisk, *Seminars in Reproductive Medicine*, 24 (2006) 340-347.
- [20] A. Erices, P. Conget and J. Minguell, *British Journal of Haematology*, 109 (2000) 235-242.
- [21] L. K. Branski, G. G. Gauglitz, D. N. Herndon, and M. G. Jeschke, *Burns*, 35 (2009) 171-180.
- [22] K Mareschi, E Biasin, W Piacibello, M Aglietta, E Madon, F Fagioli, *haematologica* 86 (2001) 1099-1100
- [23] A. M. de Soure, A. F. Platzgummer, C. L. da Silva, J. M. S. Cabral, *Journal of Biotechnology*, 236 (2016) 88–109.
- [24] A. I. Caplan, *Journal of orthopaedic research*, 9 (1991) 641-650.
- [25] E. M. Horwitz, K. L. Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. S. Cortenbach, F.C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause and A. Keating, *Cytotherapy*, 7 (2005) 393-395.
- [26] F. P. Barry, J. M. Murphy, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36 (2004) 568–584.
- [27] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, D. R. Marshak, *Science*, 284 (1999) 143-147.
- [28] D. Macrin, J. P. Joseph, A. A. Pillai, A. Devi, *Stem Cell Reviews and Reports* 13 (2017) 741-756.
- [29] M. Quartu, M. P. Serra, M. Boi, V. Ibba, T. Melis and M. D. Fiacco, *BMC neuroscience*, 9 (2008) 108.
- [30] Y. Ogata, Y. Mabuchi, M. Yoshida, E. G. Suto, N. Suzuki, T. Muneta, I. Sekiya, C. Akazawa, *PloS one*, 10 (2015).
- [31] P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, P. G. Robey, *Stem cells*, 19 (2001) 180-192.
- [32] F. Dueñas, V. Becerra, Y. Cortes, S. Vidal, L. Sáenz, J. Palomino, M. D. los Reyes and O. A. Peralta, *BMC veterinary research*, 10 (2014) 154.
- [33] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, K. Bieback, *Stem cells*, 24 (2006) 1294-1301.
- [34] C. Pontikoglou, F. Deschaseaux, L. Sensebé, H. A. Papadaki, *Stem Cell Reviews and Reports*, 7 (2011) 569-589.
- [35] P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz, and M. H. Hedric, *Tissue engineering*, 7 (2001) 211-228.
- [36] H. A. Awad, M. Q. Wickham, H. A. Leddy, J. M. Gimble, F. Guilak, *Biomaterials*, 25 (2004) 3211-3222.

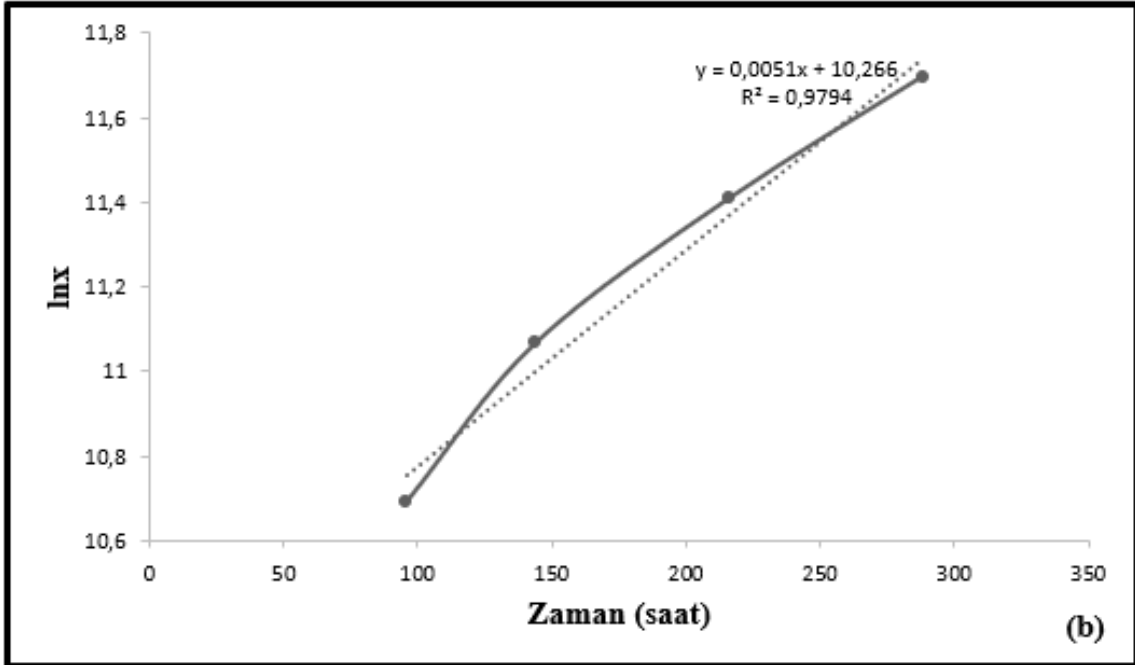
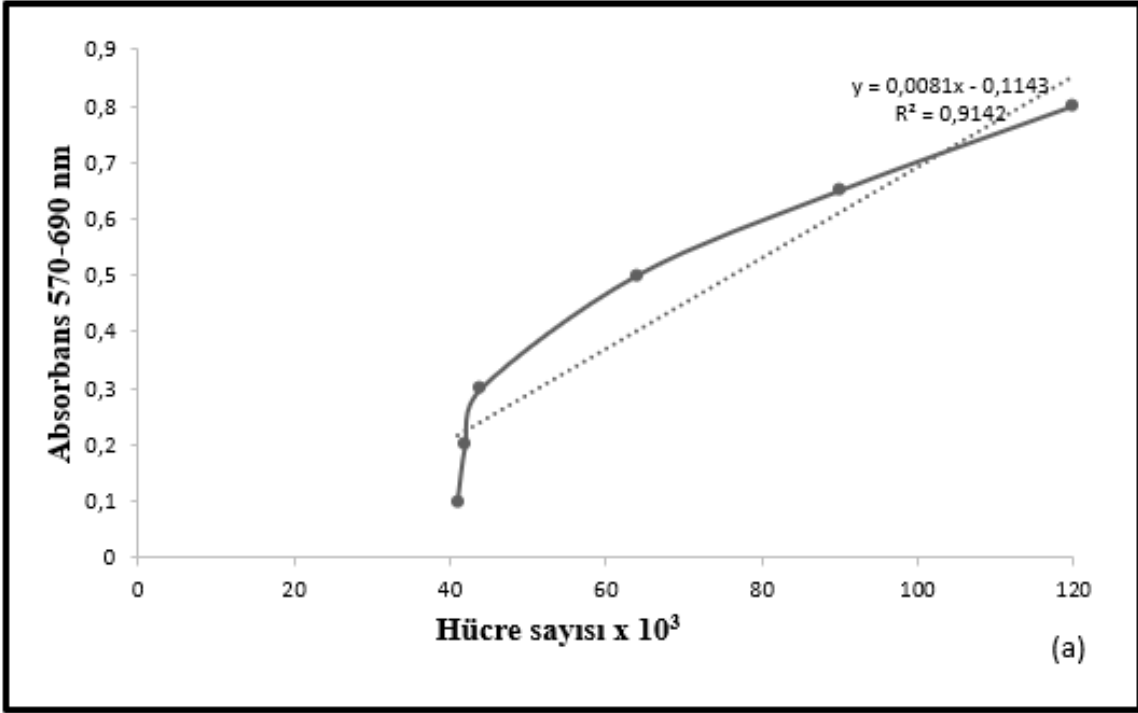
- [37] Y. S. Choi, G. J. Disting, S. Stubbs, S. Arunothayaraj, X. L. Han, P. Collas, W. A. Morrison, R. J. Dilley, *Journal of cellular and molecular medicine*, 14 (2010) 878-889.
- [38] S. Jang, H. H. Cho, Y. B. Cho, J. S. Park and H. S. Jeong, *BMC cell biology* 11 (2010) 25.
- [39] J. K. Fraser, I. Wulur, Z. Alfonso and M. H. Hedrick, *Trends in biotechnology*, 24 (2006) 150-154.
- [40] P. A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D. A. D. Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim, and M. H. Hedrick, *Molecular biology of the cell*, 13 (2002) 4279-4295.
- [41] J. M. Gimble, A. J. Katz, and B. A. Bunnell, *Circulation research* 100 (2007) 1249-1260.
- [42] B. Weyand, M. Dominici, R. Hass, R. Jacobs and C. Kasper, *Mesenchymal Stem Cells- Basics and Clinical Application II*. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [43] Y. A. Romanov, A. N. Darevskaya, N. V. Merzlikina, and L. B. Buravkova, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 140 (2005) 138-143.
- [44] A. G. Via, A. Frizziero, F. Oliva, *Muscles, ligaments and tendons journal*, 2 (2012) 154.
- [45] M. L. Weiss and D. L. Troyer, *Stem cell reviews*, 2 (2006) 155-162.
- [46] C. D. Bari, F. D. Accio, P. Tylzanowski, and F. P. Luyten, *Arthritis & Rheumatism*, 44 (2001) 1928-1942.
- [47] M. Mizuno, H. Katano, Y. Mabuchi, Y. Ogata, S. Ichinose, S. Fujii, K. Otabe, K. Komori, N. Ozeki, H. Koga, K. Tsuji, C. Akazawa, T. Muneta and I. Sekiya, *Stem cell research & therapy* 9 (2018) 1-11.
- [48] N. K. Satija, V. K. Singh, Y. K. Verma, P. Gupta, S. Sharma, F. Afrin, M. Sharma, P. Sharma, R. P. Tripathi, G. U. Gurudutta *Journal of cellular and molecular medicine* 13 (2009) (11-12) 4385-4402.
- [49] N. Kim and S. Cho, *The Korean journal of internal medicine*, 28 (2013) 387.
- [50] E. M. Howirtz, D. J. Prockop, L.A. Fitzpatrick, W. W. K. Koo, P. L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J. C. Marx, R. E. Pyeritz, M. K. Brenner, *Nature Medicine*, 5 (1999) 309-313.
- [51] E. M. Howirtz, D. J. Prockop, L.A. Fitzpatrick, P. L. Gordon, W. W. K. Koo, L.A. Fitzpatrick, M. D. Neel, M. E. McCarville, P. Orchard, R. E. Pyeritz and M. K. Brenner, *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 97 (2001) 1227-1231.
- [52] N. Kim and S. Cho, *The Korean journal of internal medicine*, 28 (2013) 387
- [53] M. Das, I. B. Sundell and P. S. Koka, *Journal of Stem Cells*, 8 (2013) 1.

- [54] S. Zhang, J. Ge, A. Sun, D. Xu, J. Qian, J. Lin, Y. Zhao, H. Hu, Y. Li, K. Wang, and Y. Zou, *Journal of Cellular Biochemistry*, 99 (2006) 1132–1147.
- [55] S. Jiang, H. Kh. Haider, N. M. Idris, A. Salim, M. Ashraf, *Circulation research*, 99 (2006) 776-784.
- [56] N. Nagaya, K. Kangawa, T. Itoh, T. Iwase, S. Murakami, Y. Miyahara, T. Fujii, M. Uematsu, H. Ohgushi, Y. Yamagishi, T. Takudome, H. Mori, K. Miyatake, S. Kitamura, *Circulation*, 112 (2005) 1128-1135.
- [57] L. Bagno, K. E. Hatzistergos, W. Balkan and J. M. Hare, *Molecular Therapy*, 26 (2018) 1610-1623.
- [58] M. Mohamadnejad, K. Alimoghaddam, M. M. Bonab, M. Bagheri, M. Bashtar, H. Ghanaati, H. Baharvand, A. Ghavamzadeh, R. Malekzadeh, *Archives of Iranian medicine*, 10 (2007) 459-466
- [59] P. Kharaziha, P. M. Hellström, B. Noorinayer, F. Farzaneh, K. Aghajani, F. Jafari, M. Telkabadi, A. Atashi, M. Honardoost, M. R. Zali and M. Soleimani, *Eur J Gastroenterol Hepatol* 21 (2009) 1199–1205.
- [60] S. T. Nguyen, V. Q. Pham, N. K. Pham and P. V. Pham, *Sciencedomain international*, 4 (2014) 1387-1396.
- [61] A. Mohr, R. Zwacka, *Cancer Letters*, 414 (2018) 239-249.
- [62] A. Farini, C. Sitzia, S. Erratico, M. Meregalli, and Y. Torrente, *Stem cells international*, 11(2014).
- [63] R. Jiang, Z. Han, G. Zhuo, X. QU, X. Li, X. Wang, Y. Shao, S. Yang, Z. C. Han, *Frontiers of medicine*, 5 (2011) 94-100.
- [64] F. Xu, G. Zhang, F. Zhang, Y. Zhang, *Applied surface science*, 349 (2015) 437-444.
- [65] P. V. Pham and N. B. Vu, *Progress in Stem Cell*, 3 (2016) 87-96.
- [65] G. Chen, A. Yue, Z. Ruan, Y. Yin, R. Wang, Y. Ren, L. Zhu, *PloS one*, 9 (2014).
- [66] S. Partap, N. A. Plunkett and F. J. O'Brien, *Tissue engineering*, (2010) 323-337.
- [67] E. M. Darling, and K. A. Athanasiou, *Tissue engineering*, 9 (2003) 9-26.
- [68] S. E. Carver and C. A. Heath, *Tissue engineering*, 5 (1999) 1-11.
- [69] G. N. Bancroft, V. I. Sıkavitsas, A. G. Mikos, *Tissue engineering*, 9 (2003) 549-554.
- [70] M. Z. Ismadi, K. Hourigan and A. Fouras, *Processes* 2 (2014) 753-772.
- [71] K. Joshi, R. Dadsena, P. Parida and B. P. Nayak, *Fabrication and Characterization of a Perfusion Bioreactor for Interface Tissue Engineering*. 2013, PhD Thesis.
- [72] J. Phan, P. Kumar, D. Hao, K. Gao, D. Farmer and A. Wang, *Journal of extracellular vesicles* 7 (2018) 1522236.

- [72] J. A. King, W. M. Miller, *Current opinion in chemical biology* (2007) 394-398.
- [73] H. Ye, D. B. Das, J. T. Triffitt, Z. Cui, *Journal of Membrane Science*, 272 (2006) 169-178.
- [74] N.M.S. Bettahalli, H. Steg, M. Wessling, D. Stamatialis, *Journal of Membrane Science*, 371 (2011) 117–126.
- [75] A. C. Tsai, Y. Liu, T. Ma, *Biochemical Engineering Journal*, 108 (2016) 51–57.
- [76] F. Meuwly, P.A. Ruffieux, A. Kadouri, U. von Stockar, *Biotechnology Advances*, 25 (2007) 45–56.
- [77] V. Jossen, R. Pörtner, S. C. Kaiser, M. Kraume, D. Eibl and R. Eibl, *Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine*, (2014).
- [78] N. S. Nik, G. Amoabediny, B. Pouran, H. Tabesh, M. A. Shokrgozar, N. Haghhighipour, N. Khatibi, F. Anisi, K. Mottaghy and B. Z. Doulabi, *BioMed research international*, (2013).
- [79] R. Pörtner, S. Nagel-Heyer, C. Goepfert, P. Adamietz and N. M. Meenen, *Journal of bioscience and bioengineering*, 100 (2005) 235-245.
- [80] A. L. V. Wezzel, *Nature*, 216 (1967) 64-65.
- [81] S. R. Caruso, M. D. Orellana, A. Mizukami and T. R. Fernandes, *Biotechnology progress*, 30 (2014) 889-895.
- [82] M. Mrakovcic, M. Absenger, R. Riedl, C. Smole, E. Roblegg, L. F. Fröhlich, Eleonore Fröhlich, *PLoS One*, 8 (2013).
- [83] S. Sart, S. N. Agathos, Y. Li, *Biotechnology progress*, 29 (2013) 1354-1366.
- [84] D. Kong, M. Chen, R. Gentz and J. Zhang, *Cytotechnology*, 29 (1999) 151-158.
- [85] C. A. Pacak., M. T. Eddy., L. Woodhull, K. R. Wang., I. Alpatov, S. Fullen, R. P. Dowd, Y. H. Choi, D. B. Cowan, *PLoS One*, 8 (2013).
- [86] Y. Li, T. Ma, S. T. Yang, D. A. Kniss, *Biomaterials*, 22 (2001) 609-618.
- [87] J. Zarge, P. Huang, H.P. Greisler. *Blood vessels. Principles of tissue engineering*. Austin, TX: Academic Press, (1997) 349-64.
- [88] C. A. Pacak., M. T. Eddy., L. Woodhull, K. R. Wang., I. Alpatov, S. Fullen, R. P. Dowd, Y. H. Choi, D. B. Cowan, *PLoS One*, 8 (2013).
- [89] A.M. Al-Sabagh, F.Z. Yehia, Gh. Eshaq, A.M. Rabie, A.E. ElMetwally, *Egyptian Journal of Petroleum*, 25 (2016) 53-64.
- [90] C. Bach, X. Dauchy, M. C. Chagnon, S. Etienne, *Water research*, 46 (2012) 571-583.
- [91] A. Ouyang, R. Ng, S. T. Yang, *Stem cells* 25 (2007) 447-454.

- [92] Y. Cao, D. Li, C. Shang, S. T. Yang, J. Wang and X. Wang, *Biomedical Materials*, 5 (2010) 065013.
- [93] R. P. Padbury and J. S. Jur, *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 33 (2015) 01A112.
- [94] G. Ergin, Şap Virüsü Üretiminin Dolgulu Reaktörlerde Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
- [95] R. P. Padbury and J. S. Jur, *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 33 (2015) 01A112.
- [96] H.A. Abid, Surface Hydrophilization of Polyester, Technical University of Liberec, Textile Technics and Materials Engineering, M.Sc., 2011.
- [97] Z. Zhao, J. Zhou, T. Fan, L. Li, Z. Liu, Y. Liu, M. Lu, *Materials chemistry and physics*, 203 (2018) 89-96.
- [98] B. C. Mehta, D. W. Holman, D. M. Grzybowski, J. J. Chalmers, *Tissue Engineering*, 13 (2007) 1269-1279.
- [99] R. P. Padbury and J. S. Jur, *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 33 (2015) 01A112.
- [100] A. Mizukami and K. Swiech, *Stem cells international*, (2018).
- [101] V. Jossen & C. van den Bos, R. Eibl, D. Eibl, *Applied microbiology and biotechnology*, 102 (2018) 3981-3994.
- [102] C.Löffelholz, U. Husemann, G. Greller, W. Meusel, J. Kauling, P. Ay, M. Kraume, R. Eibl and D. Eibl, *Chemie Ingenieur Technik*, 85 (2013) 40-56.
- [103] I. Shikhaliyeva, Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının Bor Katkılı Hap-Kaplı Kitosan Doku İskelelerinde İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2015.
- [104] E. A. Akçael, Poliester Fiber Destekli Dolgulu Yatak Biyoreaktörlerde Hibridoma Kültürü ve Monoklonal Antikor Üretimi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006.
- [105] <https://openwetware.org/wiki/Haynes:SplittingCells> (Erişim tarihi: 20 Ağustos 2019).

EKLER



Şekil 1 MTT analizi sonucu elde edilen 12 günlük dinamik kültür sıçan adipoz MKH kalibrasyon eğrisi (a) ve özgül üreme hızı ve ikilenme süresini hesaplamak için kullanılan ln x-t grafiği (b).