YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN MEME KANSERİ (MCF 7) VE FARE FİBROBLAST (L-929) HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE POLİAKRİLİK ASİDİN TOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ

Biyolog Melike ERSÖZ

FBE Biyomühendislik Anabilim Dalından
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. M.Mustafa AKDESTE (YTÜ)
Yrd. Doç.Dr. Zeynep AKDESTE (YTÜ)
İkinci Tez Danışmanı : Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV (YTÜ)

İSTANBUL, 2007

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ vi

KISALTMA LİSTESİ vii

ŞEKİL LİSTESİ viii

ÇİZELGE LİSTESİ xi

ÖNSÖZ xii

ÖZET xiii

ABSTRACT xiv

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 4

2.1 Doku Kültürü 4
2.2 Hücre Kültür Modelleri 5
2.2.1 Primer Hücre Kültürü 6
2.2.2 Diploid Hücre Kültürü 6
2.2.3 Devamlı Hücre Kültürleri 7
2.3 Hücre Kültürlerinin Yapılması 8
2.3.1 Kültürdeki Hücrelerin Gelişme Fazları 8
2.3.1.1 Ayrılma Fazı (Dispersiyon) 8
2.3.1.2 Yapışma Fazı 8
2.3.1.3 Çoğalma Fazı 8
2.3.1.4 Dejenerasyon Fazı 9
2.3.2 Hücre Kültürünün Hazırlanması 9
2.3.2.1 Eksplant Metodu 9
2.3.2.2 Fiziksel Ayrıştırma 10
2.3.2.3 Enzimatik Ayrıştırma 11
2.3.3 Kültürleri Yapılan Hücrelerin Üretilmesi 12
2.4 Kültürde Hücrelerin Gelişimini Etkileyen Faktörler 14
2.4.1 Sıcaklık 14
2.4.2 Osmatik Basınç 14
2.4.3 Hidrojen İyonu Konsantrasyonu (pH) 14
2.4.4 Diğer Organik İyonlar 15
2.4.5 Temel Metabolitler 16
2.4.6 Destekleyici Proteinler 16
2.4.7 Hormonlar 17
2.4.8 Enzimler 17
2.5 Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler 17
2.5.1 EMEM (Eagle's Minimum Esential Medium) 18

2.5.2 Serum 19
2.5.3 Hepes 20
2.5.4 De-İyonize Su 20
2.5.5 Dengeli Tuz Solüsyonu (Balanced Salt Solution; BSS) 20
2.5.6 Fenol Red 21
2.5.7 Antibiyotikler 21
2.6 Besiyerleri ve Hücre Kültürlerine Mikrobiyal Kontaminasyon Açısından Çeşitli Kontrol Testlerinin Uygulanması 23
2.7 Hücre Kültürlerinde Kullanılan Kriyoprezervasyon Yöntemleri 24
2.7.1 Dondurulmuş Hücrelerin Çözünmesi 26
2.7.2 Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi 27
2.7.3 Dondurma İşleminde Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar 27
2.7.4 Sıvı Azot Tankları 28

3. POLİMERLER 29

3.1 Polimerlerin Sınıflandırılması 29
3.1.1 Kimyasal Bileşimlerine Göre 29
3.1.2 Yapılarına Göre 30
3.1.3 Isıya Karşı Davranışlarına Göre 30
3.1.4 Fiziksel Durumlarına Göre 31
3.2 Polielektrolitler 31
3.2.1 Doğal Polielektrolit Kompleksleri 34
3.2.2 Yapay Polielektrolit Kompleksleri 35
3.3 Poliamfolitler 35
3.4 Poliakrilik Asit 36
3.4.1 Poliakrilik Asidin Özellikleri 37
3.4.1.1 Çözünürlük 37
3.4.1.2 Viskozite 37
3.4.1.3 Polimerin Çökme Sıcaklığı 38
3.4.1.4 Polielektrolit Etkisi 38
3.4.2 Kullanıldığı Yerler 38

4. APOPTOZ 40

4.1 Organizmada Hücre Ölümünün Mekanizmaları 40
4.2 Organizmada Apoptotik Hücre Ölümünün Gözlendiği Durumlar 41
4.3 Apoptozda Biyokimyasal Değişiklikler 41
4.4 Apoptozda Hücre Ölümünün Aşamaları 42
4.4.1 Apoptozun Başlatılması 42
4.4.2 Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu 43
4.4.3 Hücrede Oluşan Biyokimyasal ve Morfolojik Değişiklikler: 44
4.4.3.1 Biyokimyasal Değişiklikler 44
4.4.3.2 DNA Kırıklarının Oluşumu 44
4.4.3.3 Hücre İskeletinin Yıkılması 44
4.4.3.4 Hücre Membranı Değişiklikleri 44
4.4.3.5 Morfolojik Değişiklikler 45
4.4.4 Fagositoz 45

5. HÜCRE HATLARI VE HÜCRELERDE TOKSİSİTENİN GÖSTERİLMESİ 46

5.1 Hücre Hatları 46
5.2 Hücrelerde Toksisitenin Gösterilmesi 46

5.2.1 MTT testi 46
5.2.2 Tripan Mavisi Testi 47
5.2.3 DAPI 48

6. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 49

6.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler 49
6.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar 49
6.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler 50
6.2 Deneyde Kullanılan Çözeltiler 51
6.2.1 1x PBS Çözeltisinin Hazırlanması 51
6.2.2 1x Tripsin Solüsyonunun Hazırlanması 51
6.2.3 Medyumun Hazırlanması 51
6.2.4 Hücre Dondurma Medyumu 51
6.2.5 MTT Solüsyonunun Hazırlanması 51
6.3 PAA' nın Konsantrasyonunun Hesaplanması 51
6.3.1 Son Konsantrasyon 50 mg/ml PAA' nın Hazırlanması 51
6.3.2 Son Konsantrasyon 0,5 mg/ml PAA' nın Hazırlanması 52
6.4 Hücre Kültürü 52
6.4.1 Nitrojen Tankında Kriyoprezervasyonu Yapılmış Hücrelerin Kültüre Edilmesi 52
6.4.2 Hücre Kültürünün Tripsinizasyonu 52
6.4.3 Hücrelerin Sayılması 53
6.4.4 Hücrelerin Dondurulması 53
6.4.5 Farklı Hücre Hatlarının Adaptasyonunun Sağlanması 53
6.4.6 MCF 7 Hücrelerinin Laboratuvar Kültürünün Hazırlanması 54
6.4.7 L-929 Hücrelerinin Laboratuvar Kültürünün Hazırlanması 54
6.4.8 X63AG8.653 Hücrelerinin Laboratuvar Kültürünün Hazırlanması 55
6.5 Laboratuvarda Çeşitli Hücre Hatlarından Kriyobankın Oluşturulması 56
6.6 Çeşitli Hücre Kültürlerinde Kriyoprezervasyon 56
6.7 Deneysel Çalışmalarda Kullanılacak Hücre Sayısının Çeşitli Plaklarda Optimizasyonu 57
6.8 PAA'nın Toksisitesinin MCF 7 ve L 929 Hücrelerinde İncelenmesi 57
6.8.1 MTT Deneyinin Yapılışı 57
6.8.2 Tripan Mavisi Boyası İle Hücre Canlılığının Tespiti 58
6.8.3 Hücre Kültüründen Etken Dozun Hesaplanması 58
6.8.4 DAPI ile Apoptoz Tayini 59

7. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR 60

7.1 Çeşitli Hücre Hatlarının Laboratuvarda Adaptasyonu 60
7.1.1 MCF 7 Hücrelerinin Laboratuvarda Adaptasyonu 60
7.1.2 L-929 Hücrelerinin Laboratuvarda Adaptasyonu 62
7.1.3 X63AG8.653 Hücrelerinin Laboratuvarda Adaptasyonu 63
7.2 Hücre Kültürlerinde Saptanan Kriyoprezervasyon 65
7.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılacak Hücre Sayısının Saptanması 69
7.4 Poliakrilik Asidin (pH: 2.5) Farklı Konsantrasyonlarının MCF 7 Hücreleri Üzerinde Etkisi 72
7.4.1 Morfolojik İnceleme 73
7.4.2 Poliakrilik Asidin (pH:2.5) MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini 76
7.4.2.1 Morfolojik İnceleme 76
7.4.3 Poliakrilik Asidin (pH:2.5) MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin EC_{50}'ye

Göre Saptanması 80
7.5 Poliakrilik Asidin (pH:7.00) Farklı Konsantrasyonlarının MCF 7 Hücreleri Üzerinde Etkisi 82
7.5.1 Morfolojik İnceleme 82
7.5.2 Poliakrilik Asidin MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini 85
7.5.2.1 Morfolojik İnceleme 85
7.5.3 Poliakrilik Asidin (pH:7.0) MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin EC_{50}'ye Göre Saptanması 88
7.6 Poliakrilik Asidin (pH: 7.00) Farklı Konsantrasyonlarının L-929 Hücreleri Üzerinde Etkisi 90
7.6.1 Morfolojik İnceleme 90
7.6.2 Poliakrilik Asidin L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini 95
7.6.2.1 Morfolojik İnceleme 95
7.6.3 Poliakrilik Asidin L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin EC_{50}'ye Göre Saptanması 99
7.7 Poliakrilik Asidin (pH:7.0) MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Tripan Mavisi Boyası Kullanılarak Tayini 101
7.7.1 Morfolojik İnceleme 101
7.7.2 Tripan Mavisi İle Boyanma 101
7.8 Poliakrilik Asidin L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Tripan Mavisi Boyası Kullanılarak Tayini 103
7.8.1 Morfolojik İnceleme 103
7.8.2 Tripan Mavisi İle Boyanma 103
7.9 Poliakrilik Asidin Değişik Konsantrasyonlarının MCF 7 Hücreleri Üzerinde Apoptoz Etkisinin DAPI ile Belirlenmesi 105
7.9.1 Morfolojik İnceleme 105
7.9.2 Nükleer Boyanma 108
7.10 Poliakrilik Asidin Değişik Konsantrasyonlarının L-929 Hücreleri Üzerinde Apoptoz Etkisinin DAPI İle Belirlenmesi 111
7.10.1 Morfolojik İnceleme 111
7.10.2 Nükleer Boyanma 114

KAYNAKLAR 119

ÖZGEÇMİŞ 125

SİMGE LİSTESİ

µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µg	Mikrogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
gr	Gram
ºC	Santigrat derece
mM	Milimolar
MA	Moleküler ağırlığı
atm	Atmosfer

KISALTMA LİSTESİ

DMEM	Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumu
DMSO	Dimetil sülfoksit
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
DAPİ	4,6-diamino-2-fenilindol
ETDA	Etilendiamin tetraasetik asit
EC_{50}	Etkili konsantrasyonun %50'si
FBS	Fetal sığır serumu
UV	Ultraviyole
PAA	Poliakrilik asit
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid
SA	Serum albumin
PMMA	Polimetakrilik asit
HEPES	N-2-hidroksi etilpiperazin N-2 etansulfonik asit
PSS	poli(sodyum stiren sülfonat)

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3. 1 (a) Polivinilpiridinyum, (b) sodyum polistiren sülfonat (Dautzenberg vd., 1994) 31
Şekil 3. 2 Poli(akrilik asit)in sulu çözeltideki dissosiyasyonu 32
Şekil 3. 3 İki sentetik polielektrolitin kimyasal yapısı. 32
Şekil 3. 4 Çözeltiye tuz ilavesi sonucu polielektrolit zincirinin yumak konformasyonunu alması 33
Şekil 3. 5 Yüksüz polimerlerde ve polielektrolitlerde viskozite-derişim ilişkisi 34
Şekil 3. 6 Poliakrilik asidin kimyasal yapısı [1] 36
Şekil 7. 1 MCF 7 hücrelerinin 24 saat sonraki mikroskobik görüntüsü (20x). 60
Şekil 7. 2 MCF 7 hücrelerinin 7. gündeki mikroskobik görüntüsü (20x). 61
Şekil 7. 3 MCF 7 hücrelerinin 9. gündeki mikroskobik görüntüsü (40x). 61
Şekil 7. 4 L 929 hücrelerinin 48 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x) 63
Şekil 7. 5 X63AG8.653 hücrelerinin 48 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x) 64
Şekil 7. 6 Kriyo tankında dondurulduktan sonra kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 24 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x) 66
Şekil 7. 7 Strofor kutuda dondurulduktan sonra kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 24 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x) 66
Şekil 7. 8 Santrifüj tüp standında dondurulduktan sonra kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 24 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x) 67
Şekil 7. 9 Kriyo tankında dondurulduktan sonra kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 72 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x) 68
Şekil 7. 10 Strofor kutuda dondurulduktan sonra kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 72 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x) 68
Şekil 7. 11 Santrifüj tüp standında dondurulduktan sonra kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 72 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x) 69
Şekil 7. 12 Kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin mikroskobik incelenmesi (20x). 73
Şekil 7. 13 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 2.5) ‘nın 1 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x). 74
Şekil 7. 14 Son konsantrasyon 20 mg/ml PAA (pH:2.5)’nın 1 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x). 74
Şekil 7. 15 Kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin mikroskobik incelenmesi (20x). 75
Şekil 7. 16 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 2.5) ‘nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x). 75
Şekil 7. 17 Son konsantrasyon 20 mg/ml PAA (pH:2.5)’nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x). 76
Şekil 7. 18 Kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelemesi (40x). 78
Şekil 7. 19 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 2.5) ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (40x). 78
Şekil 7. 20 Son konsantrasyon 2 mg/ml PAA (pH: 2.5) ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (40x). 79
Şekil 7. 21 Son konsantrasyon 20 mg/ml PAA (pH: 2.5) ile muamele edilmiş MCF 7

hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu (formazan kristali oluşmamıştır) mikroskobik incelenmesi (40x). 79
Şekil 7. 22 Kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin mikroskobik incelenmesi (20x). 83
Şekil 7. 23 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 7.0) 'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x). 83
Şekil 7. 24 Son konsantrasyon 2 mg/ml PAA (pH:7.0)'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x). 84
Şekil 7. 25 Son konsantrasyon 20 mg/ml PAA (pH:7.0)'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x). 84
Şekil 7. 26 Kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x). 86
Şekil 7. 27 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 7.0) ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x). 86
Şekil 7. 28 Son konsantrasyon 2 mg/ml PAA (pH: 7.0) ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x). 87
Şekil 7. 29 Son konsantrasyon 20 mg/ml PAA (pH: 7.0) ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x). 87
Şekil 7. 30 Kontrol grubu L-929 hücrelerinin mikroskobik incelenmesi (20x). 91
Şekil 7. 31 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 7.0) 'nın 1 saatlik inkübasyonu sonucu L-929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x) 91
Şekil 7. 32 Son konsantrasyon 2 mg/ml PAA (pH: 7.0) 'nın 1 saatlik inkübasyonu sonucu L-929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x) 92
Şekil 7. 33 Son konsantrasyon 25 mg/ml PAA (pH: 7.0) 'nın 1 saatlik inkübasyonu sonucu L-929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x) 92
Şekil 7. 34 Kontrol grubu L-929 hücrelerinin mikroskobik incelenmesi (20x) 93
Şekil 7. 35 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 7.0) 'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu L-929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x) 94
Şekil 7. 36 Son konsantrasyon 2 mg/ml PAA (pH: 7.0) 'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu L-929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x) 94
Şekil 7. 37 Son konsantrasyon 25 mg/ml PAA (pH: 7.0) 'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu L-929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x) 95
Şekil 7. 38 Kontrol grubu L-929 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x). 97
Şekil 7. 39 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 7.0) ile muamele edilmiş L-929 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x). 97
Şekil 7. 40 Son konsantrasyon 2 mg/ml PAA (pH: 7.0) ile muamele edilmiş L-929 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x). 98

Şekil 7. 41 Son konsantrasyon 25 mg/ml PAA (pH: 7.0) ile muamele edilmiş L-929 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x). 98
Şekil 7. 42 Lameller üzerinde kültüre edilen kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin mikroskobik görüntüsü (20x)..... 106
Şekil 7. 43 Lameller üzerinde kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 0.005 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş mikroskobik görüntüsü (20x). 106
Şekil 7. 44 Lameller üzerinde kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 4 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş mikroskobik görüntüsü (20x)..... 107
Şekil 7. 45 Lameller üzerinde kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 10 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş mikroskobik görüntüsü (20x)..... 107
Şekil 7. 46 Kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x)..... 109
Şekil 7. 47 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x)..... 109
Şekil 7. 48 Son konsantrasyon 4 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x). 110
Şekil 7. 49 Son konsantrasyon 10 mg/ml poliakrilik asit (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x).. 110
Şekil 7. 50 Lameller üzerinde kültüre edilen kontrol grubu L-929 hücrelerinin mikroskobik incelenmesi. 112
Şekil 7. 51 Lameller üzerinde kültüre edilen L-929 hücrelerinin 0,005 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş mikroskobik görüntüsü. 112
Şekil 7. 52 Lameller üzerinde kültüre edilen L-929 hücrelerinin 4 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş mikroskobik görüntüsü. 113
Şekil 7. 53 Lameller üzerinde kültüre edilen L-929 hücrelerinin 10 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş mikroskobik görüntüsü. 113
Şekil 7. 54 Kontrol grubu L-929 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x)..... 115
Şekil 7. 55 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş L-929 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x). 115
Şekil 7. 56 Son konsantrasyon 4 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş L-929 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x). 116
Şekil 7. 57 Son konsantrasyon 10 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş L-929 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x). 116

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3. 1 25 ^{o}C ‘de Poliakrilik Asidin Çözünürlüğü 37
Çizelge 4. 1 Apoptozu engelleyen proteinler 42
Çizelge 6. 1 Deneyde kullanılan sarf maddeler 50
Çizelge 7. 1 Dondurma öncesi, dondurma sonrası ve kültür sonrası MCF 7 hücrelerinin sayısı 65
Çizelge 7. 2 Mikroplak kuyularına ekilen hücre sayısı ve yaklaşık yüzeyi kaplama yüzdeleri 70
Çizelge 7. 3 Mikroskobik inceleme ile belirlenen 24.saatte ki yüzey kaplama eğrisi 71
Çizelge 7. 4 96.saatte yüzeyi tamamen kaplayan kuyularda ki hücrelerin sayısı 71
Çizelge 7. 5 96.saatte hücrelerin sayı grafiği 72
Çizelge 7. 6 Farklı konsantrsayonlardaki PAA ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin 1 saatlik MTT ile etkileşimi 77
Çizelge 7. 7 Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA’nın MCF 7 hücreleri üzerindeki % canlılık oranları 80
Çizelge 7. 8 Farklı konsantrasyonlarda ki PAA’nın MCF 7 hücrelerindeki % canlılığı 80
Çizelge 7. 9 PAA’nın MCF 7 hücrelerinde % canlılık eğrisi 81
Çizelge 7. 10 Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA’nın MCF 7 hücreleri üzerindeki % canlılık oranları 88
Çizelge 7. 11 Farklı konsantrasyonlarda ki PAA’nın MCF 7 hücrelerindeki % canlılığı 88
Çizelge 7. 12 Farklı konsantrasyonlarda ki PAA’nın MCF 7 hücrelerindeki % canlılık eğrisi 89
Çizelge 7. 13 Farklı konsantrsayonlardaki PAA ile muamele edilmiş L-929 hücrelerinin 1 saatlik MTT ile etkileşimi 96
Çizelge 7. 14 Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA’nın L-929 hücreleri üzerindeki % canlılık oranları 99
Çizelge 7. 15 Farklı konsantrasyonlarda ki PAA’nın L-929 hücrelerindeki % canlılığı 100
Çizelge 7. 16 PAA’nın L-929 hücrelerinde % canlılık eğrisi 100
Çizelge 7. 17 Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA’nın MCF 7 hücreleri üzerindeki etkisinin tripan mavisi boyanması sonucu hesaplanan canlı ve ölü hücre sayısı ile % canlılık oranları 102
Çizelge 7. 18 Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA’nın MCF 7 hücreleri üzerindeki etkisinin tripan mavisi ile sayılması sonucu hesaplanan canlı hücre sayısı 102
Çizelge 7. 19 Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA’nın L-929 hücreleri üzerindeki etkisinin tripan mavisi boyanması sonucu hesaplanan canlı ve ölü hücre sayısı ile % canlılık oranları 104
Çizelge 7. 20 Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA’nın L-929 hücreleri üzerindeki etkisinin tripan mavisi boyanması sonucu hesaplanan canlı hücre sayısı 104

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimimde ve tezimin oluşmasında gösterdiği ilgi ve bilimsel katkılarından dolayı her zaman saygıyla anacağım ve değerini hiçbir zaman unutmayacağım merhum danışman hocam Prof.Dr.M.Mustafa AKDESTE'ye; tüm üzüntüsüne rağmen beni sınavımda yalnız bırakmayan ve hocamın eksikliğini hissettirmeyen hocam Yrd.Doç.Dr.Zeynep AKDESTE'ye, Hücre Kültür Laboratuvarında deneysel çalışmalarımda beni yönlendiren ve bilgisini esirgemeyen ikinci danışmanım Prof.Dr.Adil ALLAHVERDİYEV'e; deneysel sonuçlarımı yorumlamamda değerli katkılarıyla her zaman yanımda olan Yrd.Doç.Dr.Melahat BAĞIROVA'ya;

Tezimde MCF 7 meme kanseri hücrelerini kullanmama olanak sağlayan Prof.Dr.Nedret ALTIOK'a; L-929 fare fibroblast hücrelerini kullanmama olanak sağlayan Doç.Dr.S.İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN'a;

Eğitimim süresince anlayışlarını ve desteklerini esirgemeyen İstanbul Bilim Üniversitesi'nde ki hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma;

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımları ve dostlukları için Biyomühendislik Bölümündeki tüm arkadaşlarıma;

Tezimin yazım aşamalarında büyük yardımını gördüğüm kardeşim Melih'e; sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim Özge, Özgür ve Emir'e; beni her konuda destekleyip ve hep yanımda olan aileme ve dostlarıma;

Bana ve bu teze emeği geçmiş olan herkese;

SONSUZ TEŞEKKÜRLER.

ÖZET

Son yıllarda biyopolimerler tıbbın çeşitli alanlarında; ortopedide, kemoterapide, immünojide, dişçilikte olmak üzere geniş şekilde kullanılmaktadır. Herhangi bir polimerin praktikte uygulanabilmesi için biyouyumluluğunun incelenmesi gerekmektedir. Bir polielektrolit olan poliakrilik asidin (PAA) immünolojide adjuvant etkisi, tıbbi deneylerde antitrombojenik etkisi ve ilaç salınım sistemlerinde taşıyıcı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Literatürde PAA'nın çeşitli konjugatlarıyla ilgili çalışmalar olmasına rağmen, tek başına toksisitesine ait çalışmalar bulunmamaktadır. Biyopolimer çalışmalarında toksisitenin belirlenmesi son derece önemlidir. Bu amaçla çeşitli hücrelerin kültürleri kullanılmaktadır. Ancak PAA'nın ve konjugatlarının toksisitesinin tayin edilmesinde kullanılan hücre kültürlerinden hangisinin daha duyarlı olduğu konusunda bilgiler bulunmamaktadır.

Tezin amacı; insan meme kanseri (MCF 7) ve fare fibroblast (L-929) hücrelerinin kültürlerinin yapılması ve bu hücre kültürlerinde PAA'nın toksisitesinin çeşitli yöntemlerle incelenmesidir. Çalışmada hücre kültürü, kriyoprezervasyon, 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT), tripan mavisi ve 4,6-diamidino 2 phenylindole (DAPI) yöntemleri kullanılmıştır. Birinci aşamada ilk kez olarak Y.T.Ü Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarında MCF 7 ve L-929 hücrelerinin adaptasyonluğu sağlanmış ve devamlı kültürü elde edilmiştir. Bu hücrelerin kriyoprezervasyonunun sağlanmasında optimal şartlar belirlenmiş ve laboratuvarda hücrelerin yeterli miktardaki kriyobankı oluşturulmuştur. Çalışmamızda ilk kez MCF 7 hücre kültürünün PAA'nın toksisitesinin incelenmesinde uygun bir model olduğu ortaya konmuştur. Yapılan kültür çalışmalarının sonraki aşamalarında PAA'nın pH'a ve konsantrasyona bağlı olarak toksik etkisinin incelenmesi sonucunda farklı hücrelerde farklı olduğu belirlenmiştir. PAA'nın EC_{50} değeri MCF 7 hücrelerinde 6.6 iken L-929 hücrelerinde 1,8 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar polimerlerin hücre kültüründe toksisitesinin belirlenmesinde uygun hücre kültürü seçilmesinin dikkate alınmasını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Hücre Kültürü, MCF 7, L-929, Poliakrilik Asit, Toksisite, MTT, DAPI

ABSTRACT

In recent years, biopolymers are widely used in various fields of medicine; namely, orthopedics, chemotherapy, immunology and dentistry. It is very important to test compatibility to determine the practical applicability of any polymer. Many effects of polyacrylic acid (PAA), which is a polyelectrolyte, is known by researchers. Its adjuvant effect in immunology, antitromogenic effect in medical experiments and its use as transporter in drug release systems is among its applications. Despite there are various studies of PAA with several different conjugates, there is no study on its individual toxicity. It is severely important to determine the toxicity in biopolymer studies and several cell lines are used for this kind of studies. But there is no information on the sensitive cell lines for PAA and its conjugates.

The aim of this thesis is to make the culture of human mammary cancer cell line MCF-7 and mouse fibroblast cell line L-929 and examine the PAA toxicity on these cells by using various methods. The methods used in this study are; cryopreservation, 3-(4,5-dimethyltriazol-2-il)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), trypan blue and 4,6-diamidino 2 phenylindole (DAPI). Initially, the adaptation of MCF 7 and L-929 cell lines is provided in the tissue culture laboratory of Yıldız Technical University, Department of Bioengineering for the first time and their stable cultures were established. Optimization of cryopreservation conditions was achieved and satisfactory cryobanks of these cells were generated in the laboratory. In this study, it is established for the first time that, MCF 7 cell line is a suitable cell line for toxicity studies of PAA. In the latter steps of culture studies which include toxicity analysis of PAA in varying pH and concentration; differential toxicity in different cell lines was detected. IC_{50} value of PAA is shown to be 6,6 in MCF 7 cells whereas 1,8 in L-929 cell lines. These results indicate the importance of the choice of cell lines used in toxicity analysis.

Keywords: Cell culture, MCF 7, L-929, Polyacrylic Acid, Toxicity, MTT, DAPI

1. GİRİŞ

Son yıllarda biyopolimerler tıbbın çeşitli alanlarında; ortopedide, ilaç salınım sistemlerinde, immünojide, dişçilikte, vücut içi (kalp kapakları, suni tendonlar, kontakt lensler) ve vücut dışı (hemodiyaliz için kateterler, oksijeneratörler, gözlük camları) uygulamalarda olmak üzere geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Bir polimerin tıp ve biyolojide kullanılabilmesi için biyolojik uyumluluk, kimyasal ve ısıl kararlılık, uygun mekanik özellikleri taşıması gerekir. Biyouyumluluk ile ilgili çalışmalarda da anyonik yapılı polielektrolitlerin ilgi çektiği görülmektedir. Bu nedenle anyonik yapıda bir polimer olan poliakrilik asidin (PAA) önemli bir yeri vardır.

Yapılan bazı çalışmalarda, PAA'nın bir model polimer olarak immünolojide organizmanın bağışıklığını arttırmak için antijenlerle birlikte girebilen yabancı kimyasal maddeler olarak adjuvant etkisi, tıbbi deneylerde kanın dolaşımını engelleyen tortuların çözülmesini sağlayan antitrombojenik etkisi ile ilaç salınım sistemlerinde taşıyıcı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Suda çözünen polielektrolitler ve bunların çeşitli interpolimer komplekslerinin vücut şartlarında hücrelerle etkileşim mekanizması altında pek çok çalışmalar yapılmaktadır (Water soluble polymers 1972; Mustafaev vd., 2001).

PAA veteriner uygulamalarında kullanılan aşılarda yardımcı olarak görev yapmaktadır. PAA'nın tavuklarda aktif olmayan New Castle virüsüne karşı immün yanıtı arttırdığı görülmüştür. Bunun yanı sıra proteinlerin PAA'ya kovalent olarak bağlanması antijenlerin immünojenliğini arttırır (Hilgers vd., 1998).

E. De Clereq e P. De Somer tarafından yapılan başka bir araştırmada avesicular stomatitis (ağız mukozasının iltihabı) virüsü ile letal dozda enfekte olmuş yeni doğan fareye interferon ve poliakrilik asit interperitonel olarak enjekte edilmiş ve bunların virüse karşı koruyucu etkisi tespit edilmiştir. Poliakrilik asit virüs ile enfekte edilmiş farelerde ölüm oranını %50 azaltmıştır. İn vivo virüs enfeksiyonlarının proflaksisinde (hastalığa tutulmamak için alınan tedbirler) poliakrilik asidin uygun olabileceğine karar verilmiştir (E. De Clereq vd., 2002).

Yapılan bir çalışmada PAA ve jelatinden oluşturulan çapraz bağlı hidrojellerin (CHGP) bağ kuvveti, fibrin yapıştırıcının bağ kuvveti ile kıyaslanarak yumuşak dokular için bir biyolojik yapıştırıcı olarak tanımlanmıştır. CHGP toksisite değerlendirmeleri için in vitro testler yapılmıştır. Bu tedavi edici hidrojelin fare derisinde fibrin yapıştırıcıdan daha yüksek bir kuvvetli bağlanmayla yeterli adezyonu gösterdiği tespit edilmiştir (Ghavamzadeh vd.,2004).

Nanoteknolojik gelişmeler içinde oluşturulan multifonksiyonel subselüler boyutlu nanopartikül dizaynlarının hücre-nanopartikül etkileşimleri doğrultusunda bilgiler sağlayacağı düşünülmüş ve bu prob modelin kısa süreli biyouyumluluğu hücre kültür sistemlerinde değerlendirilmiştir. % 0.5 poliakrilik asit ve % 4.5 poli(akrilik amid-co-akrilik asit) yapılan iki fazlı nanokolloidin insan endotelyal hücre ve sıçan fibroblast hücre kültürlerinde bir kalorimetrik proliferasyon test ile hücre proliferasyonunu etkilemediği belirlenmiştir. Ayrıca Annexin V ve propidyum iyot ile yapılan çifte boyama ve bunu izleyen flowstometrik analiz sonucunda bu prob yüksek hücre canlılığı göstermiştir. Bu çalışmalar geniş konsantrasyon aralığında değişen iki fazlı nanokolloidin fizyolojik sistemlerde kısa süreli biyouyumluluğunu önermiş ve gelecek çalışmalarda reseptör veya hedef yüzey işaretleyici incelemelerini olası kılmıştır (Mutsumi vd., 2007).

Sargı bezi uygulamaları için hidrojel karekteristik sağlamak amacıyla kitin-PAA hazırlanmıştır. Tabakanın biyouygunluğu L 929 fare fibroblast hücre soyu ile incelenmiştir. Yapılan kültür çalışmalarında L 929 hücrelerinin bu film tabaka üzerinde proliferasyonunun ve bağlantısının olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar 1:4 kitin PAA oranı sargı bezi için potansiyel bir kullanıma sahip olduğunu önermiştir (Tanodekaew vd., 2004).

Tıbbın ve biyolojinin çeşitli alanlarında biyopolimerlerin toksisitesinin belirlenmesi son derece önemlidir. Litarütürde PAA'nın çeşitli polimerlerle, hidrojellerle ve kopolimerlerle oluşturularak yapılan çalışmalarda toksisitesi tayin edilmiştir. Bu çalışmalarda Coco-2 (insan kolon adenokarsinomu), insan korneyal epitelyum hücreleri, insan toplar damar endotel hücreleri, L 929 (fare fibroblast hücreleri), HOS (insan osteosarkoma), hepatosit hücreleri, ilik hücreleri, koyun kırmızı kan hücreleri, MT-4 (insan lenfoyid hücreleri), BLM, PC 12, L 1210, COS 7 (maymun böbrek hücresi), ve CHO (hamster yumurta hücresi) olmak üzere çeşitli hücre hatları kullanılmıştır.

Literatürde PAA'nın tek başına toksisitesine ait çalışmalar bulunmamaktadır. Ayrıca PAA'nın ve konjugatlarının toksisitesinin tayin edilmesinde kullanılan bu hücre kültürlerinin hangisinin daha duyarlı olduğu konusunda bilgi bulunmamaktadır. Çalışmanın amacı olarak PAA'nın farklı hücre kültürlerinde (MCF 7 ve L-929) toksisitesi incelenmiştir. MCF 7 hücre kültüründe bu konuyla ilgili hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada MCF 7 ve L-929 hücre hatları üzerinde PAA'nın değişik konsantrasyonlarının toksik etkisi morfolojik, MTT ve tripan mavisi yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Morfolojik olarak gözlemlenen hücre ölümünü daha iyi karekterize etmek için MCF 7 ve

L-929 hücreleri DNA spesifik bir boya olan DAPI (4,6-Diamidino 2 fenilindol) ile boyanarak floresan mikroskopta incelenmiştir.

Kullanılan yöntemlerle tez çalışmasında gerek MCF 7 gerekse L-929 hücre hatlarında PAA'nın farklı konsantrasyonlarına bağlı olarak meydana getirdiği morfolojik değişiklikler ve bu morfolojik değişiklikler sonucunda hücrelerin canlılıkları tespit edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Doku Kültürü

Bir organın tümünün ya da bir parçasının, herhangi bir dokunun veya hücrenin kültürü anlamında doku kültürü terimi kullanılır.

Doku veya organ kültürlerinde kültüre edilen bu doku ya da organların tüm genel özellikleri ve normal fonksiyonları korunmaktadır. Bir organın in vivo doku bütünlüğü ve hücreler arası ilişkisi organ kültüründe de in vitro olarak hemen hemen aynı doku bütünlüğünü ve hücreler arası ilişkiyi gösterir. Bir organ kültüründe kültüre edilen organın yapısı, fonksiyonları, histolojik ve biyokimyasal özellikleri korunur. Organ kültürleri kısa ömürlü olduklarından dolayı günlerce, hatta bazen haftalarca üremeden sabit bir şekilde kalır ve bundan dolayı in vitro olarak çoğaltılamaz. Şişe yüzeyi, petri kutusu veya tespit edici, besleyici, koruyucu özellikleri olan plazma üzerine organ parçacıkları yerleştirilebileceği gibi, 45 ºC de ısıtılmış ve koruyucu madde olmayan bir şişenin yüzeyine de konularak bu dokunun yüzeye yapışması sağlanabilir. Organ kültürleri özellikle deri, beyin, solunum ve özefagusun kirpikli epiteli ile fetal barsak epitelinden yapılır. Bu kültür genellikle viral enfeksiyonlar sonrası meydana gelen histopatolojik değişiklikleri incelemek amaçlı kullanılır. Solunum virüsleri ile enfeksiyonların histopatogenezinin çalışılmasında solunum yolu epitelinin organ kültürlerinden faydalanılır (Lenette ve Schmidt, 1979; Baker ve Breach, 1980; Balows vd., 1991; Akan, 1994; Alberts vd., 1994).

Canlı kalmış doku, doku veya organ parçalarının fizyolojik tuzlu suda 24-72 saat muhafaza edilmesi sonucu in vitro olarak oluşur. Canlı kalmış dokuda 37 ºC de inkübasyona bırakılmasına rağmen hücre üremesi meydana gelmez (Gürtürk, 1977).

Yapılan ilk hücre kültürü çalışmaları 19. yüzyılda başlamıştır. Fizyologlar organizmanın ölümü ile birlikte çeşitli organ ve dokuların hemen ölmediğini, bu organ ve dokuların metobolizmalarının bir süre daha devamlılığını koruduğunu belirlemişlerdir. Bu anlamda 1885 yılında Wilhelm Roux ilk defa tavuk embriyosu sinir hücrelerini 37 ºC de tuzlu suda bekletmiş ve bunun sonucunda bu sinir hücrelerinin organizma dışında 1-2 gün canlılığını koruduğunu gözlemlemiştir. 1897 yılında Loeb in vitro olarak kan yapan hücreleri ve bağlayıcı dokuları uzun süre yaşatmayı başarmıştır. Ljunggren ise bir asit sıvısı içersinde insanlara ait deri parçalarını haftalarca canlı olarak muhafaza edebilmiştir (Gürtürk, 1977; Baker ve Breach, 1980; Alberts vd., 1994).

Harrison tarafından 1907 yılında ilk defa modern anlamda doku kültürü tekniği geliştirilmiştir. Harrison aseptik koşullar altında koagüle kurbağa lenfi içerisinde çıkardığı kurbağa sinir dokusunu haftalarca yaşatmayı başarmış ve bunun sonucunda sinir hücrelerinin geliştiğini gözlemlemiştir. Hücre kültürü teknikleri gelişmeye başladıktan sonra zamanla bakteriyel kontaminasyon problemi ortaya çıkmış. 1927 yılında deneysel cerrahi çalışmaları ile Nobel ödülü kazanan Alexis Carrel hücre kültürlerinin hazırlanmasında bakteri kontaminasyonlarını önlemek için aseptik teknikler kullanmıştır. Alexis Carrel bu aseptik teknikleri kullanarak antisepsi ve sterilizasyonun önemini göstermiştir. Bu yıllarda Carrel ayrıca hücrenin üretilmesi için gerekli olan en uygun besiyerinin üretilmesine yönelik araştırmalarına başlamıştır. Carel bu çalışmalarını daha sonra Baker ile birlikte sürdürmüştür. Tüm bu gelişmeler ışığında sentetik besiyerleri yapılmaya başlanmıştır. 1933 yılında Vogelaar ve Ehrlichmann ilk defa pepton, hemin, sistin, insülin, tiroksin ve glukozdan oluşan bir sentetik besiyeri hazırlamışlardır (Gürtürk, 1977; Alberts vd., 1994; Murray vd., 1995).

Bütün bunların sonucunda ilk defa 1907 yılında başlayan hücre kültürü çalışmaları 1947 yılına kadar bakteriyel kontaminasyonlar ile olan mücadelede ki güçlükler ve hücre kültüründe üreyen virüslerin tespitinin bilinememesi gibi nedenlerden dolayı gerçek anlamda hak ettiği değeri bulamamıştır. Hücre kültürlerinin yapılabilmesi ancak antibiyotiklerin kullanım alanına girmesiyle birlikte kontaminasyonun önlenebilmesi sonucunda mümkün olmuştur (Hsiung, 1973; Gürtürk, 1977).

2.2 Hücre Kültür Modelleri

Bir doku veya organdan hücrelerin izole edilerek in vitro olarak üretilmesi ve bu üretilen hücrelerin devamlılığının sağlanması hücre kültürü olarak adlandırılır. Hücreler şişe yüzeyine yapıştırılan doku parçasından sponton migrasyon ile şişe yüzeyine yayılarak üretilebileceği gibi, dokudan mekanik ya da enzimatik yollarla ayrıştırılarak da üretilebilir (Hsiugn, 1973; Alberts vd., 1994; Doyle vd., 1995). Hücreler hücre kültüründe doku organizasyonu göstermezler. Hücreler doku organizasyonunu göstermediğinden dolayı da genellikle histiotipik yapılarını ve çoğunlukla bu yapılarla ilişkili olarak biyokimyasal özelliklerini de kaybetmişlerdir. Genellikle hücreler hücre kültüründe özel şartların sağlanması koşuluyla çoğalmadan canlılıklarını korurlar. Aynı zaman da bunun tam tersine hücreler istenilen miktarlarda çoğaltılarak da elde edilebilirler. Hücreler seçici besiyerinde üretilerek, fiziksel hücre seperasyonu yapılarak veya klonlama ile fenotipik ya da genotipik olarak ayrılarak karakterize edilebilir. Bunun sonucunda da belirlenmiş bir hücre popülasyonu dondurularak uzun yıllar saklanabilir (Freshney, 1986,1987; Doyle vd., 1995).

2.2.1 Primer Hücre Kültürü

Primer hücre kültürü organizmada ki yeni alınan organ ve dokulardan ilk üretilen hücre kültürüdür. Primer eksplant tekniği, mekanik yöntemler ya da enzimatik yöntemler kullanılarak organ veya dokulardan primer hücre kültürü hazırlanabilir. İçerisinde besiyeri bulunan kültür şişelerine inoküle edilen canlı hücreler şişe yüzeyine yapışarak çoğalmaya başlar. Birbirine değen hücrelerde kontakt inhibisyon nedeniyle çoğalma durur ve bunun sonucunda tek tabakalı hücre kültürü gelişir. Transforme olmayan hücrelerin hücre kültürleri için düz bir zemine yapışması söz konusudur. Bu nedenle hem primer, hem de diploid hücrelerin süspansiyon kültürleri yapılamamıştır (Ustaçelebi, 1991; Konneman vd., 1992; Akan, 1994; Ryan, 1994).

Metabolik aktivitenin düşük olduğu primer kültürlerinin besiyerlerinde buna paralel olarak asit birikimi de yavaştır. Primer hücre kültürlerinde primer hücreler en fazla 8-10 pasaja kadar kültüre devam ettirilebilir. Primer hücre kültürlerinde ki bu primer hücreler genellikle orijinal hücrelere özgü karakteristik diploid kromozomuna sahiptir. Primer hücre kültürü genellikle epitelyal, fibroblast ya da epitelyal ve fibroblast hücrelerinin bir arada bulunduğu heterojen yapı gösterir. Primer hücre kültür teknikleri özellikle echovirüsler veya ortomyxovirüslerin izolasyonu için faydalı olsa da, bu tekniklerin bazı dezavantajları vardır. Bu dezavantajlardan biri primer hücre kültürleri taze doku örneklerinden hazırlanmalıdır. Bir diğer dezavantaj özel ihtimam gerektiren primer hücre kültürlerinin hazırlanması zordur. Ayrıca konak hücrede endojen virüslerin latent halde bulunması ya da kültürde meydana gelen kontaminasyon hücrenin üremesi ve virüs izolasyonu açısından zorluklar oluşturabilir (Freshney, 1987; Balows vd., 1991).

2.2.2 Diploid Hücre Kültürü

Primer hücre kültürünün subkültürü sonucunda meydana gelen hücre kültürleri; histolojik olarak tek tip hücreden oluşan ve az sayıda pasajı yapılabilen sonlu hücre kültürleri ve sınırsız bölünme kapasitesine sahip devamlı hücre kültürleri olmak üzere iki şekilde bilinmektedir. Sonlu hücre kültürleri az sayıda pasajının yapılabilmesinden dolayı sınırlı sayıda subkültürden sonra üreme yeteneklerini kaybederler. Sınırsız bölünme kapasitesine sahip devamlı hücre kültürlerinin ise sonsuz sayıda subkültürleri yapılabilir. Az sayıda pasajı yapılan ve sınırlı sayıda subkültürden sonra üreme yeteneklerini kaybeden sonlu hücre kültürleri diploid hücre kültürü olarak da adlandırılır. Genellikle diploid hücre kültürleri iğ şeklindeki fibroblastoid hücrelerden oluşur. İnsan embriyonik dokularından ya da yeni doğanın sünnet derisinden elde edilen fibroblastoid hücre kültürlerinden 50–100 pasaj yapılabilir. Diploid hücre kültürlerinin

ilk pasajlarına ait hücre kültürleri sıvı nitrojende saklanabilir ve bu hücreler 8–10 pasaja kadar viral duyarlılıkta değişme meydana gelmeden kullanılabilir. Diploid hücre kültüründeki bu hücrelerin en az %75'i primer hücrelerde olduğu gibi orijinal olarak elde edilen normal hücre türü ile aynı karyotipe sahiptir. Bazı virüsler için diploid hücre kültürleri primer kültürler kadar duyarlı değildir. Bunun yanı sıra çok sayıda pasaj yapılmış kültürlerde virüs replikasyonu yeterli olmayabilir. MRC-5 ve WI-38 insan akciğer fibroblast kültürleri diploid hücre kültürlerine örnek verilebilir (Ustaçelebi, 1991; Akan, 1994).

2.2.3 Devamlı Hücre Kültürleri

Devamlı hücre kültürleri sonsuz üreme özelliğine sahip ölümsüz hücrelerden oluşur. İn vitro olarak tümörlerden alınan hücrelerden ya da hücrelerin spontan veya kimyasal ajanlarla transformasyonunun sonucunda devamlı hücre kültürleri elde edilir.

Normal bir hücre kültürünün devamlı hücre kültürü olabilmesi için 50 ya da daha fazla subkültürünün yapılmış olması gerekir. Devamlı hücre kültüründe genellikle hücreler in vitro da uzun süreli yaşamları boyunca geçirdikleri mutasyonlar sonucunda morfolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından orijinal hücrelerden farklılık gösterirler. Devamlı hücrelerde poligonal veya bal peteği formunda epitelyal hücre morfolojisi görülür ve bunlar genellikle kromozom sayıları bakımından aneuploidlerdir. (Ustaçelebi, 1991; Ryan, 1994; Boyd, 1995).

Primer veya diploid hücre kültürü ile kıyaslama yapıldığında devamlı hücre kültüründe bir cam veya plastik yüzeyde kültürün başlatılması için gerekli olan hücre sayısı daha azken, hücrelerin üreme hızları daha fazladır ve kontakt inhibisyon kaybolmuştur. Bütün bunların sonucunda devamlı hücre kültüründeki hücreler aşırı üremeye eğilim gösterirler.

Tanı amaçlı laboratuvarlarda devamlı hücre kültürleri HeLa (insan servikal epitelyal karsinoma), Hep-2 (insan larinks epitelyal karsinoma), BHK 21 (bebek hamster böbreği; Baby Hamster Kidney), MDCK (köpek böbreği; Canin Kidney), RK 13 (tavşan böbreği; Rabbit Kidney), Vero (Afrika yeşil maymun böbreği) ve RD (insan rabdomiyosarkom) için çok sık kullanılır. HSV, adenovirüs, poliovius, coxsackievirüs gibi virüsların üretilmesi için HeLa ve Hep-2 devamlı hücre kültürleri kullanılır (Freshney, 1987; Balows vd., 1991; Shalaby, 1991).

2.3 Hücre Kültürlerinin Yapılması

2.3.1 Kültürdeki Hücrelerin Gelişme Fazları

İn vitro kültürü yapılan hücrenin morfolojisi in vivo ortamdakine göre oldukça farklıdır. İn vitro olarak çoğaltılmak istenen hücre bu esnada 4 fazdan geçer (Freshney, 1986; Balows vd., 1991; Doyle vd., 1995).

2.3.1.1 Ayrılma Fazı (Dispersiyon)

Direkt olarak insan, hayvan veya kültürden alınan hücreler, normal şekilleri nasıl olursa olsun süspansiyon halinde iken tek tek ya da çok sayıda biraraya toplamış kümeler halinde ve ışığı fazla kıran yüzeyler şeklinde görünürler. Bu hücreler sıvı içersinde tek tek ya da kümeler halinde serbest durumdadır. Hücreler protoplazmalarının kontraksiyonu sonucu orijinal şekillerinden farklı olarak yuvarlak hale gelirler. Bu aşama dispersiyon veya ayrılma fazı olarak adlandırılır.

2.3.1.2 Yapışma Fazı

Süspanse halinde serbest olan yuvarlak hücreler bir katı yüzey ile temas ettiklerinde bu katı yüzeye yapışırlar. Hücreler bu yapışma sonucunda yapılarına göre poligonal veya fusiform şekline dönüşürler. Hücrenin yüzeye yapışma enasında hücrede herhangi bir çoğalma meydana gelmez. Fakat oldukça yüksek metobolik aktivite gösteren hücre mitoz için hazırlanmaya başlar. Süspanse halinde olan hücreler katı yüzeye 37 ^{o}C'de 2 saat içersinde yapışırlar ve 24 saat içersinde hücreler artık yüzeye tamamen yapışmış ve yapısal şekillerini oluşturmuşlardır (Balows vd., 1991). Embriyonal dokulardan hazırlanan hücreler 24 saat içersinde yüzeye yapışarak karekteristik şekillerini gösterirlerken, yetişkin insan kökenli hücreler bu aşamayı daha uzun sürede tamamlarlar. Örneğin; maymun böbrek hücresi ve epitel hücresinin yüzeye yapışma süresi kısa iken, dana ve tavşan böbrek hücresinde ise bu süre biraz daha uzundur.

2.3.1.3 Çoğalma Fazı

Hücreler katı bir yüzeye yapıştıktan birkaç saat sonra çoğalma fazına girerler. Çoğalma fazında istisnayi durumlar dışında her hücreden 2 hücre meydana gelir. Kromozom formasyonu olmadan nukleusun ve bunun hemen ardından sitoplazmanın ikiye bölünmesi amitoz çoğalma olarak adlandırılır. Bu tip çoğalma genellikle az olmakla beraber in vitro çoğalan hücrelerde oldukça sık görülür.

Mitoz çoğalma en sık görülen replikasyon şeklidir. Kromozomlar bölünme olmadan önce ikiye ayrılır ve yavru hücreler diploid sayıda kromozom taşırlar. Normal hücrelerde bulunan iki çift kromozom diploid, eğer üç çift ise triploid, dört çiftse tetraploid, dört çiftten daha fazla ise heteroploid olarak isimlendirilir. Bazen hücreler de bipolar bölünmeler yerine kanser hücrelerinde olduğu gibi multipolar bölünmeler meydana gelebilir. Hücreler bazen de normal diploid kromozom sayısı yerine anomali olarak nitelendirilen aneuploid şeklinde çoğalır. Örneğin HeLa hücrelerinde tesadüfü kromozom sayıları aneuploidi olarak nitelendirilir. Aneuploid predominanttır ve bu tip hücrelerin nesilden nesile meydana gelme olasılığı kültürü yapılan hücrelerde yüksektir. Burada stabilite büyük bir olasılıkla genetik faktör tarafından etkilenmiştir. Normal yetişkin dokularından alınıp üretilen hücrelere göre tümörlü dokulardan alınıp üretilen hücreler daha az stabildir. Ama yinede bu kesin bir kural değildir.

2.3.1.4 Dejenerasyon Fazı

İn vitro kültürü yapılan ve çoğaltılan hücreler besiyeri içersinde ki gerekli maddelerin kullanılması sonucunda azalması ya da ortamda aşırı toksik katobolitlerin birikmesi sonucunda bir süre sonra dejenere olurlar.

2.3.2 Hücre Kültürünün Hazırlanması

2.3.2.1 Eksplant Metodu

Eksplant metodu ile primer hücre kültürü hazırlanırken önce dokular küçük küçük parçalara ayrılır ve kültür şişesine yerleştirilir. Bu metot Harrison tarafından ilk kez 1907 yılında tanıtılmıştır. Harrison burada normal kurbağa embriyosunun sinir dokularını kullanmıştır. 1951 yılında Gey ve arkadaşları insan servikal kanserinde hücre kültürü başlatmış ve HeLa dizisini üretmişlerdir. Küçük doku örnekleri için özellikle eksplant metodu uygundur. Dışa göç eden ilk hücreler fibroblast hücreler olup ondan sonra epitelyal hücreler gelmektedir. Dışarıya alınan doku parçasının kenarında oluşacak hücre proliferasyonunu uyarmak bu metodun temel amacıdır. Bu metodu fibroblast benzeri hücre kültürleri ve ayrıştırılamayan dokulardan hazırlanacak hücre kültürleri için kullanmak oldukça elverişlidir. Eksplant metodu ile genç donörlerden alınarak yapılan primer hücre kültürlerinde başarı oranı oldukça yüksektir. İlk 24 saat içersinde pek çok eksplant kültüründe hücreler çoğaldığı halde, bazı kültürlerde 10 güne kadar hiçbir değişiklik gözlenmeyebilir (Lenette ve Schmidt, 1979; Baker ve Breach, 1980; Pelczar vd., 1993; Boyd, 1995; Doyle vd., 1995).

Eksplant kültürü yapılırken özellikle; doku parçalarını boyutsal olarak büyüklüğü ile birlikte hazırlanış aşamalarına, çoğaldıkları yüzeye yapışmalarına ve uygun kültür besiyerinin seçimine dikkat edilmelidir. Doku parçalarını büyüklüğü 1–3 mm^3 arasında olmalıdır. Çünkü küçük doku parçalarının sahip olduğu hücre sayısı azdır. Buna karşılık büyük doku parçalarında ise hem besiyerindeki besleyici maddelerin dokuya difüzyonunda meydana gelebilecek zorluklar, hem de toksik metobolitlerin dokudan atılması sırasında doğabilecek sorunlar sebebiyle nekrotik alanlar gelişebilir. Bütün bu nedenlerden dolayı küçük ya da büyük doku parçalarıyla başarılı sonuçlar elde edilemez. Dokuların kesilmesi sırasında dokunun ezilmemesine ve yırtılmamasına dikkat edilmelidir. Düzgün kenarlı kesilmiş dokular elde edebilmek için küçük, keskin makas vb. aletlerin kullanılması gerekir. Burada organ kültürleri için her zaman muntazam kenarlı dokuların çıkartılması önemli olacaktır diye bir şey söz konusu değildir. Çünkü hücre çoğalmasını muntazam olmayan kenarlar uyarırlar. Bu nedenle de hazırlama safhasında kesinlikle ezilme ve oluşabilecek zedelenmelerden kaçınılmalıdır. Çünkü bu ezilme ve zedelenmeler hücre gelişimini ve canlılığını engelleyebilir. Dokuların bir plazma pıhtısı üzerine yerleştirilebilmesi ile sıkıca yüzeye bağlanması sağlanabilir. Bazı metotlarda ise dokunun kapiller hareketle yüzeye tutunmasını sağlamak amacıyla kullanılan besiyerinin hacmi kısıtlanır. Kültürlerin başarılı sonuçlar verebilmesi için besiyerlerine serum eklenmesi gerekir. %10 veya %20 fetal serumlu besiyerleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Eksplant metoduna nazaran primer kültürlerin yapımında tek veya küçük hücre grupları elde edildiğinde genellikle daha hızlı hücre çoğalması elde edilir. Fiziksel veya enzimatik metotlar dokulardan tek tek veya grup olarak hücreler elde edebilmek için kullanılır. Kullanılacak hücrenin özelliğine bağlı olarak uygulanacak metot seçilir (Gürtürk, 1977; Koneman vd., 1992; Alberts vd., 1994; Doyle vd., 1995).

2.3.2.2 Fiziksel Ayrıştırma

Fiziksel metotların kullanımı hücrelerin birbirine veya stromaya gevşek bağlandığı dokular için oldukça uygundur. Fiziksel ayrıştırmaya 1958 yılında Lasforgues ve Ozzelo'nun, 1975 yılında ise Lasforgues'un kullandıkları meme kanser dokularında hücre ayrıştırma örnek olarak gösterilebilir. Fiziksel ayrıştırma metoduna göre önce kültür besiyerinde donör dokusu parçalara ayrılır. Daha sonra dökülen hücreler sedimantasyon yöntemiyle filtre edilerek toplanır. Lechner tarafından insan neonatal prostatik epitelinden tek sıralı hücre kültürlerinin elde edilmesi için benzer bir yöntem kullanılmıştır. Bazı organlarda primer kültürler için gerekli sayıda hücrenin elde edilmesi perfüzyon metodu ile sağlanır. Bu metotla primer

hepatosit kültürleri ve sıçanların pankreas adacıklarının hücre kültürleri hazırlanmaktadır. Perfüzyonla ayrıştırmaya verilen bu iki örnek buna paralel olarak fizyolojik tuzlu su ile perfüzyon aşamasında ya da bunu takiben enzimatik ayrışma aşamasını da kapsar. Kısa süreli kültür gerektiren durumlarda ve karyolojik çalışmalarda sedimantasyon için bırakılan ve kısa zamanda lökosit açısından zengin çöküntüler ile sonuçlanan venöz kan rutin olarak kullanılır. Burada bahsedilen örneklerden de anlaşılabileceği gibi fiziksel hücre ayrıştırma metotları bir veya birden fazla aşamadan oluşur. Doku kesilir ya da parçalar ayrılır, perfüze edilir veya mekanik olarak parçalanır. Hücreler filtrasyon, sedimantasyon ya da santrifüj ile toplanır (Lenette ve Schmidt, 1979; Berquist, 1981; Balows vd., 1991).

2.3.2.3 Enzimatik Ayrıştırma

Donör dokusundan hücreleri ayrıştırmak için kullanılan metotların temel prensibi hücrelere zarar vermemesidir. Enzimatik ya da diğer kimyasal metotlar çok değişik türde ki donör dokularından hücrelerin ayrıştırılabilmesi için kullanılır. Özellikle enzimatik aktivite ayrıştırma tekniğinin önemli bir parçasıdır. Ayrıştırma işleminin ilk basamağı donör dokusunun 1-3 mm^3 'lük parçalara ayrılması ile başlar. Bu işlem uygulanırken hem enzimatik aktivasyonun etkileyebileceği maksimum yüzey alanı elde edilebilmeli, hem de mümkün olabildiğince hücreler zarar görmeden dokunun parçalanması sağlanır. Parçalanmış dokular kan ve hücre kalıntılarının temizlenmesi için dengeli tuz solüsyonları ile yıkanır ve uygun konsantrasyonda ki enzim solüsyonuna aktarılarak karıştırılır. Her sistem için enzim konsantrasyonu ve karıştırma hızı deneysel yollarla belirlenmelidir (Berquist, 1981; Freshney, 1987; Koneman vd., 1992; Doyle vd., 1995).

Enzimlerin hücrelere verdiği zararın azaltılmasını sağlamak amacıyla tek bir enzim periyodu yerine kısa ve fazla sayıda enzimle karıştırma periyodu tercih edilmelidir. Bu aşamadan sonra primer kültürü başlatmak için toplanan hücreler uygun hücre üretme besiyeri ilavesi ile inkübasyona bırakılır.

Tripsin, kollagenaz, hiyaluronidaz, DNaz, pronaz, dispaz ya da bu enzimlerin değişik kombinasyonları primer hücre kültürünün hazırlanmasında en sık kullanılan enzimlerdir (Ustaçelebi, 1991; Akan, 1994; Doyle v.d., 1995). Dokuların ayrıştırılması için çok saf olmayan enzim preparatları tercih edillir. Memeli pankreasından elde edilen bir preparat olan tripsin içerisinde tripsin ve tripsinojenin yanı sıra önemli miktarlarda kemotripsin, kemotripsinojen, elastaz, amilaz, DNaz ve RNaz bulunur (Hodges ve Livingston, 1973; Lenette ve Schmidt, 1979).

Hücreler en iyi şekilde tripsin ve pronaz ile ayrıştırılabilir. Ancak bu enzimler hücrelere zarar verebilir. Clostridium Histolyticum'un kollagenaz preparatı belirli tip dokuların ayrıştırılmasında yaygın olarak kullanılır. Hücreler için daha az zararlı olan kollegenaz ve dispaz tam olmayan bir ayrışma sağlar. Hiyaluronidaz ve kollagenaz hücreler arası bağ dokusunu sindirmek amacıyla birlikte kullanılır. Kollegenazın çalışması için Ca^{+2} iyonu gereklidir. Bu nedenle Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonları ya tek başına ya da etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)'e bağlı olarak ortama eklenir. Doku ayrışmasında çalışılacak hücrelerin birbirlerine veya donör dokusuna nasıl bağlandıklarının bilinmesi kullanılacak uygun enzimin seçilebilmesi açısından önemlidir. En uygun ayrıştırma koşullarını belirlemek için mümkün olduğu kadar çok kontrollü deneylerin yapılması gerekir (Freshney, 1987; Balows vd., 1991; Alberts vd., 1994).

2.3.3 Kültürleri Yapılan Hücrelerin Üretilmesi

Hücre kültürleri genellikle embriyonik dokulardan hazırlanır. Çünkü erişkin dokuya göre embriyonik doku daha uzun süre yaşatılır ve çoğaltılır. Bunun nedeni de büyük bir olasılıkla prekürsör ya da kök hücrelerinin varlığına, diferensiyasyonun ise daha düşük düzeyde olmasına bağlıdır. Embriyonik hücre dizileri MRC-5 ve bir diğer insan embriyonik akciğer fibroblast en yaygın kullanılan hücre kültürleridir. Epitelyuma (nöronlar ve endokrin doku) göre mezodermal hücrelerin (fibroblast, endotelyum ve miyoblast) kültürünü yapmak daha kolaydır (Freshney, 1986, 1987; Doyle vd., 1995).

Çoğalmayan diferensiye hücrelerinin yüksek oranda olması, genellikle erişkin dokularının daha düşük üreme oranına sahip olması ile sonuçlanır. Erişkin dokular daha organize yapı gösterir ve bunun sonucunda zor ayrışır. Başlangıç aşamasında kültürün gelişmesi ve çoğalması daha uzun zaman alırken, kültürün hayat süresi daha kısadır. Ayrıca erişkin dokularında endojen virüslerin olma ihtimalinin yüksek olması bu dokulardan yapılacak hücre kültürleri için bir dezavantaj sağlar (Koneman vd., 1992).

Hücrelerin içersinde ya da üzerinde üretildiği ortamlar; tek tabakalı hücre kültürünün üretildiği plastik veya cam şişe şeklinde katı bir yüzey olabileceği gibi, yarı katı veya süspansiyon hücre kültürünün üretildiği kollagen veya agar jel içerisinde sıvı bir ortamda olabilir. Hücrelerin çoğu proliferasyon için bir yüzey üzerinde yayılır. Hücrelerin yüzeyde fazla üremesi, yüzeyde yetersiz yayılması ya da yüzeye zayıf yapışmasına bağlı olarak hücre proliferasyonu inhibe olur. Hücrelerin üremesi için gerek duydukları yüzey yapışmasına tutunma bağımlılığı (anchorage dependent) denir. Transformasyona uğrayan hücreler

çoğunlukla yüzeyden ayrılıp bulundukları ortamda serbest hale geçerler. Bu hücreler; süspansiyon halindeki besiyerinde, agar gibi yarıkatı olan bir besiyerinde ya da süspansiyon ve agar gibi yarıkatı besiyerlerinin birlikte kullanıldığı sistemlerde üretilirler (Lenette ve Schmidt, 1979; Finegold ve Baron, 1986; Freshney, 1986, 1987).

Kültürü yapılan hücreler içerisinde bulundukları kap ya da şişe gibi katı bir yüzeye yapışarak veya besiyeri içersinde hücre süspansiyonu olacak şekilde iki türlü üretilebilir. Bunlardan yüzeye yapışarak üreyen hücrelerin kültürüne "stasyoner kültürler", süspansiyon halinde üreyen hücrelerin kültürüne de "süspansiyon kültürler" denir (Gürtürk, 1977; Murray vd., 1995).

Stasyoner kültürlere tek tabakalı hücre kültürü anlamına gelen monolayer hücre kültürü de denir. Uygun bir yüzeye yapışmış ve bu yüzeyde çoğalmış olan tüm hücre kültürleri için bu terim kullanılır. Stasyoner kültürler sabit kültür ve döner kültür olmak üzere iki şekilde yapılır. Şişe ya da tüpün sadece bir yüzeyinde üretilen hücre kültürü stasyoner kültürdür. Döner kültürler ise kendi ekseni etrafında dönen silindir şeklindeki şişe ya da tüplerde hazırlanır. Bu teknik ile şişe ya da tüpün bütün yüzeyinde hücre kültürü gelişmektedir. Genellikle fazla miktarda hücrenin gerekli olduğu durumlarda döner kültürler kullanılır.

Transforme olmayan normal hücreler bir yüzeye yapışarak çoğalırlar ve süspansiyon şeklinde üremezler. Bu hücrelerin üremeleri hücre yoğunluğunu artırarak tek tabaka haline gelmeleri halinde durur. Trasnforme olmayan normal hücreler kontakt inhibisyon denen fenomene karşı hassastır. Buna karşılık transforme hücrelerin kontakt inhibisyon fenomeni yoktur ve bu hücreler daha farklı bir çoğalma yolu izlerler. Bu transforme hücreler tek tabakalı durumdan çok tabakalı (multilayer) duruma geçerler ve teorik olarak devamlı çoğalabilirler. Transforme hücreleri süspansiyon kültürler halinde fazla miktarlarda üretmek mümkündür (Ustaçelebi, 1991; Akan, 1994; Murray vd., 1995).

Süspansiyon kültürleri tripsinizasyona ihtiyaç duymadan hücrelerin devamlı yenilenebilmelerini ve ekonomik olarak çok miktarda hücre ve virüs üretimini sağlar.

Primer kültürler hücrelerin direk organizmadan alınan taze organ ve dokulardan izole edilerek üretilmesi ile elde edilir. Subkültür veya pasaj ise hücrelerin bir kaptan diğer bir kaba aktarılarak üretilmeleri anlamına gelir. Primer hücreler orjin aldıkları hücrenin karyotipini en çok 9–10 subkültüre kadar korurlar. Oysa ki devamlı hücre kültürü sürekli pasajlanarak sürdürülebilir ve bu nedenle de virüs izolasyonu ve identifikasyonu için viroloji laboratuvarlarında en sık kullanılan hücre dizileridir (Koneman vd., 1992).

2.4 Kültürde Hücrelerin Gelişimini Etkileyen Faktörler

Kültür ortamında ki hücrelerin gelişimi birçok temel faktöre bağlıdır.

2.4.1 Sıcaklık

Hücre kültürü için optimal sıcaklığın sağlanmasında hücrelerin izole edildiği kaynağın sıcaklığı göz önünde bulundurulmalıdır. Hücreler 45 ºC sıcaklıkta birkaç saat içersinde ölürlerken, 42 ºC sıcaklıkta 12–24 saat yaşayabilirler. İnsan deri hücrelerinden hazırlanan kültürler ise 37 ºC'den daha az bir sıcaklığa ihtiyaç duyarlar. Bunun yanında balık hücrelerinden hazırlanan kültürler 20 ºC sıcaklıkta ürerler.

Birçok hücrenin çoğalabilmesi için gerekli olan sıcaklık 36,5–38 ºC'dir. Hücrelerin 20–25 ºC sıcaklıklarda üremeleri yavaşlar. +4 ºC ise hücreler bölünmeleri gecikmiş ama yapıları zarar görmemiş olarak muhafaza edilebilir. Eğer hücreler donma noktasına kadar soğutulursa oluşan buz kristallerinden dolayı parçalanır. Düşük ısılarda oluşan bu buz kristallerini önlemek için besiyerine gliserol veya dimetil sülfoksit (DMSO) gibi koruyucu maddeler ilave edilir ve hücreler kademeli olarak dondurularak –70 ºC 'de ya da daha düşük sıcaklıklarda aylarca saklanabilir (Kuchler, 1977).

2.4.2 Osmatik Basınç

Memeli hücrelerinde osmotik basınç 7.6 atmosfer (300 mosm)' dir. Bu değer 300 mosm+%10 olduğunda hücrelerde herhangi bir hasar meydana gelmez. Osmatik şoklara süspansiyon kültürler daha dayanıksızdır. Besiyerlerinin osmololitesinin ölçümü için osmometre kullanılır (Kuchler, 1977).

2.4.3 Hidrojen İyonu Konsantrasyonu (pH)

Kültüre edilen hücrelerin üremesi; kültür pH'sını tampon ilavesi ile yaklaşık olarak 7.00 dolaylarında tutulmasına, besiyerinin değiştirilmesine ya da her iki etkene de bağlıdır. Bu iki etken göz önünde bulundurulmazsa hücreler birbirinden ayrılır ya da ölür. Sonuçta hücreler metabolik bir dejenarasyona uğrarlar. Memeli hücreleri pH: 6.8–7.6 arasında yaşayabilmelerine rağmen optimum pH:7.1–7.5 arasındadır (Hoffmann ve Simonsen, 1989). Kültürlerin pH'sı HEPES (N-2-hidroksi etilpiperazin N-2 etansulfonik asit) ve sodyum hidroksit ilavesi ile ya da bikarbonat tamponunun CO_2 ile desteklenmesi ile ayarlanır. Kültür besiyerlerinin çoğunda pH'nın devamlı sabit kalabilmesi için bikarbonat tampon sistemleri (CO_2/HCO_3) kullanılır (Good vd., 1966). Bu besiyerlerinde $NaHCO_3$ ve CO_2 bulunur. Besiyerinde bulunan bu CO_2 hücrelerin metabolik ürünü olarak açığa çıkabilir ki bu durumda

kültür şişesinin kapağı sıkıca kapatılmalıdır veya CO_2'li atmosferi sağlamak amacıyla kullanılan CO_2'li etüvden kaynaklanabilir (Isenberg, 1992; Lenette ve Schmidt, 1979). Sodyum fosfat ve potasyum fosfat gibi fosfat solüsyonları kültür ortamındaki pH'nın kontrolü için kullanılan diğer tampon solüsyonlarıdır. Fakat bu fosfat tampon solüsyonlarının fizyolojik pH'yı tamponlama kapasiteleri oldukça azdır. Bu nedenle de sentetik bir tampon olan HEPES'in 10–25 mM konsantrasyonlarında besiyerine ilavesi pH dengesi için oldukça başarılı bulunmuştur. HEPES'in kullanılan bu konsantrasyonları hücre ve virüsler için toksik değildir. HEPES kullanımında ortamda CO_2 ile zenginleştirilmiş atmosfer gerekmemektedir. HEPES'in bu özelliği başta petri kutuları içinde yapılan hücre kültürleri olmak üzere tüm açık hücre kültürlerinin nemlendirilmiş ortamda inkübasyonunu sağlar. Bütün bunların sonucun da pH stabilitesi için HEPES haricinde ki tüm tamponlar önemini yitirmiştir. Bir organik tampon olan Tris (hidroksimetil) amino metanın etkisi zayıf bulunmuştur (Baker ve Breach, 1980; Doyle vd., 1995).

2.4.4 Diğer Organik İyonlar

Hücre kültüründe hücrelerin gelişmeleri açısından Na^+, K^+, Mg^{+2}, Ca^{+2}, Fe, HCO_3, PO_4 ve SO_4 önemli iyonları oluştururlar. Bu iyonların hücre içi ve hücreler arası sıvıda çeşitli fonksiyonları vardır. Ca^{+2} iyonu hücrenin stoplazmasının gelişiminde rol alırken, K^+ iyonu hücre zarının potansiyeli için önemlidir (Garay, 1982).

Plazma membranının önemli bir kısmını kalsiyum oluşturur. Ca^{+2} iyonu hücre zarında proteinler ve diğer anyonlarla birlikte bulunmuştur. Ca^{+2} iyonunun büyük bir kısmı glikokaliks olarak adlandırılan ve eksternal bir kılıf olan ekstraselüler glikoprotein tabakası içinde bulunmaktadır. Ca^{+2}'un % 90'ından fazlası plazma membranının bütünlüğü bozulmadan HeLa hücrelerinden EDTA ve Tripsin karışımıyla uzaklaştırılabilir. Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonları hücrelerin cam ve plastik gibi katı bir yüzeye yapışmasında önemli rol oynarlar. Çünkü bu iyonlar eksternal matriks ile negatif yüzey arasında köprü görevi yaparlar (Borle ve Loveday, 1968).

Magnezyum, kofaktör olarak hücreler içersinde enzimatik reaksiyonlarda görev yapar. Bunun yanı sıra ribozomların bütünlüğünün devamı içinde magnezyum çok önemlidir.

2.4.5 Temel Metabolitler

1. Karbonhidratlar: Glukoz enerji kaynağı olarak kültür ortamında mutlaka bulunması gereken bir metabolittir. Fruktoz, mannoz, galaktoz ve bunların fosfatları glukoz yerine konulabilir (Alberts vd., 1994).

2. Gazlar: Kültürler için gerekli olan gazlar O_2 ve CO_2'dir. CO_2 kültürde tampon görevi yapar. Bu nedenle de CO_2 bulunmadığı zaman hücre üremesi durur. Hücre kültürü için CO_2 çok önemli bir faktördür ve CO_2 'siz yaşayabilen kültür yoktur.

3. Aminoasitler: Kültür ortamında mutlaka bulunması gereken esansiyel metabolitler sistin, tirozin, metiyonin ve fenil alanin gibi temel aminoasitlerdir. Bunun yanı sıra hücrelerin enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılan ve nükleik asit sentezinde de rolü olan glutamine ihtiyacı vardır (Alberts vd., 1994).

4. Vitaminler: Hücrelerin çoğalmaları için paraaminobenzoik asit, folik asit, piridoksin (piridoksal), B_6, B_2, B_1 (thiamin) olmak üzere B grubu vitaminleri gereklidir. Bu vitaminlerin çoğu metabolizma için gerekli olan koenzimlerinin temel yapısını oluşturur. Kültürde gerekli olan diğer vitaminlerin ise besiyeri içersine konulan serumdan karşılanabileceği düşünülür. Ancak düşük hücre yoğunluklarının kullanıldığı klonlama çalışmalarında besiyerinde serum bulunsa da vitamin ilavesi gerekli olabilir (Alberts vd., 1994).

5. Proteinler ve Peptidler: Protein ve peptidlerin hücre için in vitro fonksiyonları tam olarak belli olmamakla birlikte α Fetiun, fibronektin, LETS (Large External Transformation Substrate) ve CSP (Cell Surface Protein-Hücre Protein Yüzeyi) gibi bazı proteinlerin hücrelerin cam gibi katı bir yüzeye yapışmasını sağlaması, hücrelerin çoğalmasını hızlandırması ve bazı tampon görevleri olduğu bilinmektedir. Bazı proteinlerin mineraller, yağ asitleri ve hormonlar için taşıyıcı görevleri vardır. Bir protein olan transferin demiri bağlayarak daha az toksik olmasını sağlarken, α2-makro globulin tripsini inhibe eder (Freshney, 1986; Alberts vd., 1994).

2.4.6 Destekleyici Proteinler

Hücreler destekleyici metabolitler olmadan da canlılığını sürdürebilirler. Ancak destekleyici metabolitler varlığında hücre kültürünün potansiyeli tam olarak açığa çıkar.

1. Aminoasitler: Ekim ortamına glisin eklenmesi büyük fayda sağlar. Eğer ekim için gerekli olan hücre sayısı çok az ise ortama serin ve prolin aminoasitleri eklenmelidir.

2. Vitaminler: Spesifik işlemler için kültür ortamında vitaminlerin bulunması gerekir. Örnek verilecek olunursa kirpikli silindirik epitel kültüründe kirpikli yapıyı görebilmek için ortama A vitamini koymak gerekir.

3. Nükleozitler: Kültür ortamına eklenmediklerinde hiçbir olumsuz etki olmamasına karşılık, nükleozitler ortama eklendiklerinde kültürün potansiyel gücü tam olarak ortaya çıkmaktadır.

4. Peptidler ve Ara Maddeler: Aminoasitler arasındaki dengesizliği gidermek başlıca görevleridir. Doğal pıhtı serumu normal seruma göre hücre proliferasyonunu daha çok arttırır. Bunun nedeni daha çok pıhtılaşma esnasında trombositlerden (plateletlerden) salınan polipeptid olabilir. Mitojenik aktivite gösteren polipeptid gruplarından biri olan plateletlerden elde edilen büyüme faktörü (PDGF-Platelet Derived Growth Factor) büyük bir olasılıkla serumdaki majör büyüme faktörüdür. PDGF fibroblast ve glia hücrelerinin çoğalmasını uyarır (Frehsney, 1987).

2.4.7 Hormonlar

Hücreler üzerinde değişik etkilere sahip olan hormonların metabolik yollarda ki temel rolünü tanımlamak oldukça zordur. İnsülin glukoz ve aminoasitlerin hücrelere alımını kolaylaştıran özelliği ile mitojenik bir etkiye sahiptir. Üreme faktörü 1 ve üreme faktörü 2 gibi insüline benzeyen bazı büyüme faktörleri hücre yüzeylerindeki insülin reseptörlerine bağlanarak benzer etki gösterirler. Serumlar içerisinde özellikle fetal serumda bulunan büyüme hormonu somatomedinlere bağlı olarak mitojenik etkiye sahip olur. Serum içersinde değişik oranlarda bulunan hidrokortizon hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlayarak hücre proliferasyonu arttırır. Fakat hidrokortizon yüksek hücre yoğunluğunda sitostatik olabilir ve hücre differensiyasyonunu stümüle edebilir. Kültür için serum içersinde bulunan diğer hormonlarda gerekli olabilir (Freshney, 1987; Alberts vd., 1994; Doyle vd., 1995).

2.4.8 Enzimler

Hücrenin organizasyonunu sağlayan birinci tip enzimler, hücrenin ihtiyacı olsa da olmasa da yaptığı enzimlerdir. Hücrenin ortama adaptasyonlarını sağlayan ikinci tip enzimler ise hücrenin ihtiyacı olduğu zaman sentez ettiği enzimlerdir (Alberts vd., 1994).

2.5 Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

Hücrelerin in vitro şartlarda üretilmeleri ve subkültürlerinin yapılabilmelerinin bulunmasıyla bu alanda geliştirilen çalışmalar hücrelerin üretilebilmesi daha uygun besiyerlerinin

sağlanması ve embriyo ekstraktları, protein hidrolizatları lenfe benzer besiyerlerinin hazırlanmasına yönelmiştir (Baker ve Breach, 1980; Freshney, 1987; Balows vd., 1991).

Çok çeşitli hücre tipleri için modife edilmiş birçok sentetik besiyeri geliştirilmiştir. Hücre kültür laboratuvarında en çok kullanılan sentetik besiyeri Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 'dur. EMEM'un bir modifikasyonu olan Dulbecco's Minimum Essential Medium kullanılan daha zengin diğer bir besiyeridir. Basit bir besiyeri; dengeli tuz solusyonu, temel aminoasitler, vitaminler ve diğer besleyici maddelerden oluşur. Besiyeri içerisine hücrelerin gelişmeleri ve çoğalmaları için %5–10, hücrelerinin en düşük seviyede aktivitelerini sürdürüp canlılıklarının devamı için ise %2 oranında hayvan serumu ilave etmek yeterli olmaktadır (Finegold ve Baron, 1986; Isenberg, 1992; Murray vd., 1995).

Medium 199 ve Raswall Park Memorial Institute (RPMI) hücre kültür laboratuvarlarında kullanılan diğer önemli besiyerleridir. Bu besiyerlerinin tümü ticari olarak satılmaktadır. Daha çok steril bir şekilde satın alınmaktadır. Bu besiyerleri toz halde ticari olarak satılmakla birlikte bunların steril bir şekilde hazırlanmaları oldukça zordur. Besiyerlerini steril etmek için 0.22 μm olan filtre sistemlerinden faydalanır (Bank, 1973; Anchordoguy vd., 1991; Balows vd., 1991; Isenberg, 1992).

2.5.1 EMEM (Eagle's Minimum Esential Medium)

Hücrelerin üremesi ve devamlılığının sağlanması kullanılan temel bir besiyeridir. BSS (Balanced salt solution-Dengeli tuz solüsyonu) veya HBSS (Hank's BSS) içerisinde 12 temel aminoasit, 7 temel vitamin, glikoz, tuz, bikarbonat tampon sistemi ve fenol red bulunur. Bu besiyerlerinin ticari olarak 1x ve 10x solüsyonu temin edilebilir ve bu besiyeri uzun süre saklanabilir. Bu besiyerinde glutamin bulunmaz. Bu besiyerine kullanılmadan önce serum, sodyum bi karbonat ve glutamin gibi maddeler katılmalıdır. Hücre kültürleri için L-glutamin temel bir aminoasittir. L-glutamin besiyerine final konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde eklenir. Sıvı haldeki besiyerlerinde L-glutamin bulunmazken toz haldeki besiyerlerinde genellikle bulunur. Ayrıca hücre kültürlerine bağlı olarak besiyerlerinde L-glutamin konsantrasyonu arttırılabilmektedir. Ticari olarak satılan besiyerlerinde hücrelerin üremeleri için gerekli olan aminoasit ve vitaminler bulunmaktadır. Bazı özel çalışmalar için gerekli olduğu durumlarda ticari olarak temin edilen aminoasit karışımları besiyerlerine eklenebilir (Finegold ve Baron, 1986; Isenberg, 1992).

2.5.2 Serum

Albumin, globulin, üreme uyarıcıları ve üreme inhibitörlerinin bulunduğu serum son derece zengin bir kaynaktır. Hücrelerin gelişmesi için önemli olan komponentler serumda α-globulin fraksiyonunda yer alır. Serumda hücrelerin üremesini stimüle eden insülin, glukokortikoidler (hidrokortizon, deksametazon) ve tiroid hormonları gibi hormonal faktörler ile hücrelerin yüzeye tutulmasını ve yayılmasını sağlayan fibronektin, fetuin gibi proteinler, kortizol, hormonlar, Fe^{+2}, Zn^{+2}, Cu^{+2} gibi mineraller, prostoglandinler, kolesterol ve linoleik asit gibi lipitleri taşıyan albumin ve trasferrin benzeri proteinler bulunur. Serumda DNA sentezini ve hücre bölünmesini stimüle eden fibroblast üreme faktörü ve epidarmal üreme faktörü gibi faktörler bulunur. Ayrıca serumun tripsin aktivitesini inhibe etmesi, bakteri toksinleri gibi bazı inhibitör bileşiklerin detoksifikasyonu ve hücre mebranından substratların transportu gibi görevleri vardır (Doyle vd., 1995; Murray vd., 1995).

Hanks gibi dengeli tuz solüsyonları içersine sadece serum, laktalbumin hidrolizat ya da diğer bileşenler eklendiğinde hücre üremesini sağlarlar. Serumda esansiyel aminoasitler, nükleikasit prekürsörleri, hormonlar ve yağ asitleri bulunur. Serum hücrelerin ayrıştırılması için kullanılan proteazları da inhibe eder. Hücre üremesi için genellikle %5–15 konsantrasyonlarda, tek tabakalı hücre kültürlerinin devamı için ise %0-2 konsantrasyonlarda fetal ya da yeni doğan buzağı serumu kullanılır. İnsan, dana ve at serumu en fazla kullanılan serumlar arasındadır. Zor üreyen hücreler için Fetal Sığır Serumu (FCS) kullanılması tavsiye edilir. FCS yüksek oranlarda biyotin ihtiva eder. EMEM gibi bazı besiyerlerinde biyotin olmadığından dolayı FCS kullanımı uygun olur (Baker ve Breach, 1980).

Doku kültürlerine eklenen serumlar mikoplazma kontaminasyonu açısından en önemli kaynaktır. Bu nedenle serumların kullanılmadan önce sitotoksik etkileri yönünden kontrolünün yapılması gerekmektedir. Satın alınacak hazır serumlar hücreleri üretmesi yönünden test edilmelidir. Serumlar -70 ºC'de saklanmalıdır (Freshney, 1987; Shalaby, 1991; Isenberg, 1992).

Hücrelerin gelişimleri için besiyerlerine % 7,5–10 FBS (Fetal Bovin Serum) eklenirken, metabolik aktivitelerinin devamı için ise %2 oranında FBS yeterlidir. Genellikle kullanılan serumlar insan veya hayvan serumu olmakla birlikte tercih edilen FBS' dur. Erişkin serumlarında hücrelerin çoğalmalarını önleyen birçok enfeksiyöz ajan bulunabileceğinden dolayı tercih sebebi olmayabilir. Ayrıca hayvan serumu kullanılacaksa hayvan genç ve sağlıklı olmalıdır. Serumdaki bazı maddeler ısıtılarak inaktive edilir. Ticari olarak temin edilebilen ve hormonlar ve matriks proteinleri gibi serum yerine geçebilen bazı maddelerin

kullanılmasıyla besiyerlerine eklenmesi gerekli olan FBS'un miktarı azaltılabilir. Sonuçta bu maddelerin kullanılması FBS'un kullanılmasından daha ekonomiktir. İn vitro şartlarda organ ve hücre fonksiyonlarını düzenleyen endokrin faktörleri saptamak ve antikor purifikasyonu için ucuz ve pratik olan serumsuz kültürleri kullanmak oldukça avantaj sağlar. Serumlu besiyerlerinin kullanımının ise sahip olduğu bazı dezavantajları vardır. Serumun yapısında zamanla bozulmalar olabilir ve serumlar en fazla bir yıl saklanabilir. Eğer birden fazla hücre tipi kullanılacaksa bunların her biri için farklı serum gerekebilir. Buda çok sayıda serumun aynı anda saklanması anlamına gelir. Sonuçta aynı anda birden fazla serum tipinin kullanılması bazı problemler yaratabilir. Serumlu besiyerlerinin kullanımının bir dezavantajı ise serumda hücrelerin üremesi üzerine inhibitör etkileri tam olarak bilinmeyen birçok maddenin bulunmasıdır (Freshney, 1987; Isenberg, 1992).

2.5.3 Hepes

Hücre kültürü besiyerinde sıklıkla kullanılan bir organik tampondur. Sodyum bikarbonatın pH'yı tamponlama kapasitesi sınırlı olduğundan dolayı içersinde hem HEPES, hem de sodyum bikarbonat bulunan besiyerleri sadece HEPES bulunan besiyerlerinden daha etkili olarak tamponlanmışlardır. Besiyerlerine meydana gelebilecek pH değişimlerini durdurmak amacıyla final konsantrasyon 10–25 mM HEPES ilave etmek yeterli olacaktır. Kullanılan sodyum bikarbonat ve HEPES konsantrasyonları besiyerinin çeşidine göre değişmektedir. Eğer CO_2 kullanılacaksa o zaman besiyerinde HEPES'in konsantrasyonu sodyum bikarbonatın konsantrasyonunun iki katından daha fazla olmalıdır. Hem açık, hem de kapalı kültür kapları için HEPES ilave edilmiş besiyerleri kullanılabilmektedir (Baker ve Breach, 1980; Freshney, 1987; Isenberg, 1992; Doyle vd., 1995).

2.5.4 De-İyonize Su

Besiyerleri ve besiyerlerine eklenecek olan maddeler sterilize edilmiş de-iyonize su ile hazırlanır. Başarılı bir kültür sistemi için kültürde kullanılacak suyun minerallerinin olmaması gerekir. Laboratuvarlarda suyun de-iyonizasyonunda ve distilizasyonunda problem olmaması gerekir (Freshney, 1986,1987).

2.5.5 Dengeli Tuz Solüsyonu (Balanced Salt Solution; BSS)

İster HBSS (Hank's BSS), isterse EBSS (Earle's BSS) olsun BSS inorganik tuzlar ve sodyum bikarbonat tampon sisteminden oluşur. BSS'ler temel besiyeri içersinde fizyolojik şartlarda osmotik basınç ve pH'nın devam ettirilebilmesi için izotonik çözeltiler olarak kullanılır. Hatta

BSS viral transport besiyerinde diluent ve komponent olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Sodyum bikarbonat tamponlayıcı görevinin olmasının yanında besleyici görevi de vardır ve birçok hücre içinde gereklidir. BSS glukozda bulunmaktadır. HBSS'li besiyerlerinde sodyum bikarbonat düşük miktarlarda bulunur ve kapalı sistemler için kullanılır. Yani burada kültür şişesinin ağzı sıkıca kapatılmalıdır. Açık sistemlerde ise içerisinde yüksek dozda sodyum bikarbonat bulunan EBSS besiyerleri kullanılır. Burada kültür şişesinin kapağı gevşek bırakılır ve bu kültürler % 5'lik CO_2'li ortamlarda inkübe edilmelidir. CO_2'li ortamlarda inkübasyon sırasında kültür kapları kapaklarının gevşek bırakılmaları dikkat edilmesi gereken önemli bir noktadır (Freshney, 1987; Isenberg, 1992).

2.5.6 Fenol Red

Hücre kültürü besiyerlerinde pH indikatörü olarak BSS içersinde 10–20 mg/lt fenol red konulmalıdır. Hücre soylarının çoğu açık pembe renkli pH:7.2–7.4'deki besiyerlerinde ürerler. Hücrelerin gelişmesi ve çoğalması sonucunda kültür besiyerinin rengi pembeden (pH:7,4) portakal (pH:7.00) ya da sarımsı bir renge (pH:6,5) döner. Bu renk değişimi aşırı derecede asit üretimi sonucunda oluşur. Bu durumda kültürlerin üzerine ya yeni besiyeri konulmalı ya da hücrelerin pasajlanması gerekir. Kültür besiyerleri genelde mavimsi kırmızı (pH.7,6) ya da mor (pH: 7,8) rengi aldığında alkalileşmiştir. Bu durumda ya tamponlama sistemi çalışmamaktadır ya da hücre metabolizmaları uygun değildir. Öyleyse yapılması gereken derhal kültür besiyerinin değiştirilmesidir. Ayrıca besiyerlerinde kullanılan indikatörler kültüre edilmiş hücrelerin gelişiminin makroskobik olarak incelenmesine olanak sağlamaktadır (Lenette ve Schmidt, 1979; Doyle vd., 1995).

2.5.7 Antibiyotikler

Kültür ortamındaki bakteri ve mantar kontaminasyonunu önlemek için besiyerine antibiyotikler ilave edilir. Kontaminasyon amaçlı kullanılan antibiyotikler antibakteriyel ajanlar ve antimikotikler olmak üzere iki grup altında incelenebilir. Bakteri ve mantar kontaminasyonunu kontrol edebilmek amacıyla hücre kültürü besiyerine antibakteriyal ve antimikrobiyal ajanlar katılmalıdır. Genellikle kültürlerde antimikrobiyal ajanların çeşitli kombinasyonları kullanılır. Bu antimikrobiyal kombinasyonlar steril olarak ticari şartlarda temin edilebilir. Ancak burada antimikrobiyal ajanların hücreye olabilecek toksik etkilerinide göz ardı etmemek gerekmektedir. Örneğin doku kültürlerinde penisilin kullanımı bakterilerin L-formunun ortaya çıkmasına neden olur (Baker ve Breach, 1980;Koneman vd., 1992; Doyle vd., 1995). Antibiyotik kullanımında bir başka dezavantaj ise bakteri veya mantar

infeksiyonunu baskılayarak, kültürde kronik ya da latent bir infeksiyonun sürmesine neden olmaktadır. Antimikrobiyal ajanlar dokulardan hücrelerin ayrıştırılması esnasında ya da klinik numunelerin kültüre inokulasyonu gibi yüksek kontaminasyon riski olan durumlarda kesinlikle kullanılmalıdır. Ancak hücre kültürlerinin subkültürleri esnasında antimikrobiyal ajanların kullanımından kaçınılmalıdır. Böyle durumlarda mikrobiyal risk aseptik teknikler kullanılarak ortadan kaldırılmalıdır. Sonuçta mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için yüksek oranlarda antibiyotik kullanılmamalıdır. Laboratuvarlarda gelişigüzel antibiyotik kullanımı da önlenmelidir. Aksi taktirde bakteri ve mikoplazmaların direçli suşları oluşabilir. Sıklıkla geniş spektrumlu antibiyotiklerin streptomisin, penisilin ve amfoterisin B (fungizone) ya da gentamisin, ampoterisin B ve Nystatin (10U/ml) kombinasyonları kullanılmaktadır (Baker ve Breach, 1980). Laboratuvarlar da antibiyotikler koruyucu ajanlar olarak kullanılmaktadır. Rutin olarak kullanılan antibiyotiklerin kullanımına kontamine olan kültürlerin tespiti için zaman zaman ara verilmelidir.

1. Penisilin: Hücre kültür besiyerine 0.2-1.5 unit/ml oranında konulan penisilin Gram pozitif bakterilerinin çoğunun üremesini durdurur. Gram negatif bakterilerin üremesinin durması için ise daha yüksek konsantrasyonlarda penisiline ihtiyaç vardır. Hücre kültür besiyerine 50 unit/ml penisilin konulması Gram negatif bakterilerinin üremesini durdurur. Kontaminasyon varlığında ise hücre kültür besiyerine 100 unit/ml penisilin G konulması tavsiye edilir. Eğer penisilinin besiyerinde yüksek dozda kullanılması gerekiyorsa, o zaman penisilin 37 ºC'de 2 gün inkübasyon ile inaktive edilir. Penisilin solüsyonları 0.22µm'lik nitroselüloz filtrelerden geçirilerek steril edilir (Baker ve Breach, 1980; Doyle vd., 1995).

2. Streptomisin: Streptomisin sülfat ve dihidrostreptomisin Gram negatif bakterilerin üremelerini etkin bir şekilde baskılar. Bu nedenle hücre kültürlerine hücrelerin üremesini engellemeyecek oranlarda eklenmesi tavsiye edilir. Etkin bir koruma için mililitreye 100 mg streptomisin sülfat yada dihidrostreptomisin katılması yeterlidir. Hücre kültürlerinde streptomisin sülfatın yarılanma ömrü 4 gün iken, dihidrostreptomisin 37 ºC'de aylarca stabil olarak kalabilir. Bu antibiyotik solüsyonu da penisilin solüsyonunda olduğu gibi filtrasyonla steril edilir (Baker ve Breach, 1980; Doyle vd., 1995).

3. Gentamisin: Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin üremelerini önleyen gentamisin hücre kültürlerinde oldukça kullanılan bir antibiyotiktir. Gentamisin aynı zamanda hücre kültürleri için büyük bir problem teşkil eden mikoplazma kontaminasyonu içinde koruyucu bir antibiyotiktir. Gentamisin solüsyonu otoklavda steril edilebilir. Gentamisinin tavsiye

edilen kullanma konsantrasyonu 50–100 mg/ml' dir ve en az 15 gün 37 ºC' de etkinliğini korur (Doyle vd., 1995).

4. Diğer antibiyotikler: Kültür besiyerinin mililitresi başına klorotetrasiklin hidroklorid solüsyonundan 5 mg ilave edilirken, kanamisin ve polimiksin B solüsyonlarından 10 mg ilave etmek yeterlidir. Klorotetrasiklin hidroklorid solüsyonu 100x olarak hazırlanır ve kullanılacağı zaman 99 ml kültür besiyerine 1 ml eklenir. Aynı şekilde kanamisin ve polimiksin B solüsyonlarıda 100x olarak hazırlanır ve kullanılacağı zaman 99 ml kültür besiyerine 1 ml eklenir. Kültür besiyerinde vankomiksin kullanılacaksa mililitre başına 100 mg ilave edilir.

5. Antimikotikler: Fungizone sıvı besiyeri içersinde çözünmüş olan ampoterisin B'nin sodyumdeoksikelat kompleksidir. Fungizone birçok maya ve mantarın üremelerini etkili bir biçimde baskılar. Fungizone ilk defa 1958 yılında Hempehill ve arkadaşları tarafından maya ve küf mantarlarının üremesini inhibe etmek amacıyla kullanılmıştır. Fungizone kültürde hücrelerin üremesini engellemeyecek konsantrasyonlar da kullanılması tavsiye edilir. Kültür besiyerinin mililitresi başına 20 μg konulan fungizone hücrelere zarar vermeksizin maya ve küf mantarlarının üremelerinin önler. Kültür besiyeri içersinde 37 ºC' de çok yavaş bir şekilde inaktive olan fungizonenin yarılanma ömrü 4 gün civarındadır.

2.6 Besiyerleri ve Hücre Kültürlerine Mikrobiyal Kontaminasyon Açısından Çeşitli Kontrol Testlerinin Uygulanması

Birçok mikroorganizma besiyerleri ve hücre kültürlerinde kontaminasyona neden olabilir. Hücrelerin izole edildiği dokular, serumlar, besiyerleri ve çözeltiler, çalışan kişiler ve çevre kontaminasyona neden olan kaynakları oluşturur. Bakteri ve mantarın neden olabileceği kontaminasyonu kontrol etmek amacıyla şu aşamalar uygulanır.

1. Yeni hazırlanmış besiyerinin antibiyotik ilavesi yapılmadan önce %2–5 kadarı alınıp oda ısısında veya 35 °C de 7 gün inkübasyona bırakılır.

2. Bu örneklerden 1 ml alınarak thioglycollate'lı buyyon ve sabouraud'un sıvı besiyerine (SLM) inoküle edilir. Bunu yanı sıra kanlı agar, sabouraud agar ve deoxycholate agar besiyerlerine de bu örneklerden ekim yapılır.

3. Eğer hücre kültürünün kontaminasyonundan şüpheleniliyorsa hücreler besiyerinden uzaklaştırılarak süspansiyon inokulum gibi kullanılır.

4. Ekimi yapılan SLM tüplerinin bir kısmı oda sıcaklığında inkübe edilirken, bir kısmı da 35 °C de inkübe edilmelidir. Ekimi yapılan thioglycollate'lı buyyon tüpleri ve kanlı agar plakları ise sadece 35 °C de inkübe edilmelidir. Tüm kültürlerin 14 gün boyunca her gün takibi yapılmalıdır (Armstrong, 1973; Boyd, 1981; Balows vd., 1991).

Mikoplazmalar karekteristik olarak hücre duvarları olmayan çok küçük (0.25-1.0 μm) mikroorganizmalardır. Mikoplazmalar hücre kültürü açısından çok büyük problem teşkil ederler. Laboratuvar şartlarında çalışma sırasında veya kültür besiyerlerinin bir tamamlayıcısı olarak kullanılan serumlar içersinde oldukça fazla bulunabilen mikoplazmalar kontaminasyona neden olabilirler. Mikoplazmalar bazen kültür besiyerinde hiçbir değişikliğe yol açmayarak kendini belli etmezken, bazen de hücrelerde sitopatojenik etkiler oluşturabilir.

Mikoplazmalar hücresel çevreye oldukça iyi adapte olurlar. Bu nedenle de mikoplazmayı kontrol etmede kullanılan kültür metotları tam olarak güvenilir değildir. Bunun sonucunda bu kültür metotlarına ek olarak morfolojik metotlar ve daha çok tercih edilen biyokimyasal metotlar mikoplazmayı tespit etmede kullanılmalıdır (Epstein vd., 1973).

2.7 Hücre Kültürlerinde Kullanılan Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Günümüzde modern laboratuvarlarda kullanılan etkili ve önemli kriyoprezervasyon yöntemleri hücrelerin sıvı azotta (-196 ºC'de) dondurularak saklanması temeline dayanır. Hücrelerin dondurulmaları ve çözülmeleri esnasında hücre içerisinde buz kristallerinin oluştuğu ve osmatik basıncın hücreler üzerinde öldürücü etkisi olduğu bilinmektedir. Dimetil sülfoksid (DMSO) ve gliserol gibi kriyoprotektif maddelerin kullanılmasıyla birlikte uygun bir dondurma ve çözme metodunun izlenmesi hücrelerde meydana gelebilecek hasarı en aza indirmektedir (Valeri, 1975; Fahy vd., 1984,1986; Heaton vd., 1984; Haris vd., 1994; Muldrew, 1994).

Hücrelerin kriyoprezervasyonunda en başarılı sonuçlar dakikada hızı 1 ºC'de soğutma yapabilen programlı dondurma cihazları kullanılarak alınmıştır (McGann, 1979).

Hücrelerin kriyoprezervasyonunun yararları arasında elde edilmesi zor olan primer ve devamlı hücrelerin kontaminasyon ya da bozulmasını engelleyerek saklanabilmesi, Hep–2, HeLa ve WI–38 gibi diğer hücrelerden çok daha fazla kontaminasyona duyarlı hücre dizilerinin bozulmadan devamlılığının sağlanabilmesi sayılabilir. Hayvan hücrelerinin kriyoprezervasyonunda alınan en başarılı sonuçta uygulanan teknoloji rutin olarak

kullanılmaktadır. Hücrelerin -130 ºC'nin altındaki bir sıcaklıkta bozulmadan saklanabilmesi mümkün olmaktadır (Lenette ve Schmidt, 1979; McGann, 1979).

Hücrelerin istenildiği her zaman bulunamaması ve bundan ötürüde kullanılamamasından kaynaklanan problemler, pratik olarak kolay yapılabilen in vitro üretilen kültür hücrelerinin dondurularak saklanması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Kültür hücrelerinin dondurularak saklanmasında kullanılan ilk teknik, sığırcılıkta uygulanan sperm hücrelerinin kriyoprezervasyonunda olduğu gibi hücre süspansiyonuna bir kriyoprotektan maddenin katılmasıyla yapılmıştır (McGann, 1978; Lenette ve Schmidt, 1979; Storey ve Mommsen, 1994).

1954 yılınsa Schere ve Hoogasian HeLa ve L-Strain mouse fibroblast devamlı hücre kültürlerinin saklama besiyerlerine gliserol katarak -60 ºC ve -70 ºC'lerde saklanabileceğini göstermişlerdir. Araştırıcılar -25 ºC'den -70 ºC'ye hücrelerin direkt olarak konulduğunda, oluşan bu sıcaklık farkından hücrelerin ciddi olarak etkilenmeyeceğini ispatlamışlardır. Hücreler -190 ºC' de tüm biyokimyasal reaksiyonları tamamen durduğu için sıvı azot içerisinde daha iyi şartlar da ve uzun sürelerde saklanmaktadır (Ustaçelebi, 1991; Rowley vd., 1994; Storey ve Mommsen, 1994).

Daha sonraki yıllarda birçok hücre çeşidi için uygun bir kriyoprotektan madde olan DMSO keşfedilmiştir. DMSO hücre dışına ve hücre içine oldukça hızlı bir şekilde diffüze olabilmektedir. Bu özellikte hücre prezervasyonu için oldukça önemlidir. Bu sayede dondurma işlemleri sırasında hücre hasarına neden olabilecek osmotik şok en aza indirilmektedir. DMSO çok etkin bir kriyoprotektan madde olup, özellikle fibroblast benzeri hücreler ve lenfositler başarılı bir şekilde dondurulmaktadır (McGann ve Farrant, 1976; McGann vd., 1988; Anchordoguy vd., 1991).

Eğer hücreler kriyoprotektan maddeler konulmadan dondurulacaksa 0 ºC'den -25 ºC sıcaklığa çok yavaş bir hızda geçiş yapılmalıdır. Çünkü hücreler hızlı bir şekilde dondurulduğu taktirde hücrelerin intraselüler sıvısı donacak ve geniş çapta buz kristalleri oluşacaktır. Bu geçiş fazı da fiziksel olarak hücre membranlarının patlamasına ve hücre ölümlerine yol açmaktadır. Diğer yandan da hücrelerin yavaş dondurulması sırasında hücrelerdeki nükleer yapı hücre dışındaki sıvı faz gibi aşırı şekilde soğur. Bu da hücre içinden suyun çekilmesiyle beraber aşırı derece de tuz konsantrasyonlarının oluşmasına neden olur. Bunun için kullanılan kriyoprotektan maddeler hücre içine hızlı bir şekilde diffüz ederek su dengesini koruyarak tuz oluşumunu engeller. Sonuçta hücreler osmotik şoktan kurtulmuş olur. Kısaca özetlemek

gerekirse kriyoprotektan maddeler dondurma ve çözme işlemleri sırasında suyu bağlayarak hücre içerisindeki elektrolit miktarını ve mevcut suyun buz kristallerine dönüşmesini azaltır (McGann vd., 1976; Manzur, 1977; Anchordoguy vd., 1987).

Hücreler -70 ºC'de dondurma cihazları kullanılarak kısa sürelerde muhafaza edilebilir. Hücreler sıvı azot içersinde (-196 ºC) veya azot buharında (-120 ºC) da saklanabilirler. Kullanılan sıvı azot soğutucuları sadece çok düşük bir sıcaklık ortamı sağlamakla kalmayıp aynı zamanda bu mekanik soğutucular muhafaza edilmesi zor olan örneklerin uzun yıllar saklanabilmesine olanak sağlarlar. Tüm bu işlemler sırasında iki önemli noktaya dikkat edilmelidir. Bunlardan birincisi kriyoprezervasyon sırasında kapakları iyi kapanmayan kriyotüplerin içine sızan azotun meydana getirebileceği tehlikedir. Bu şekilde olan bir kriyotüpün çözülmesi sırasında, kriyotüpün içinde hapsedilen azotun buharlaşması sonucunda meydana gelebilecek patlama çalışan kişilerde yaralanmaları neden olabilir. Bütün bunlar göz önünde bulundurularak örnekler sıvı azot içinde saklanmaya uygun tüplere konmalıdır. Bunun için her 1 ºC'de yaklaşık $32x10^{-7}$ mm civarında genleşebilen borosilikatı tüpler kullanılmalıdır. Bu tüpler kapakları kapatıldıktan sonra % 0.1'lik metilen mavisi ile doldurulmuş beher içerisinde +4 ºC'de 30 dakika tutulmalıdır. Bu tutulan süre kriyoprotektan maddenin süspansiyonda dengelenmesi açısından oldukça önemlidir. Kriyotüpler metilen mavisi bulunan beher içerisinde +4 ºC'de 30 dakika bekletildikten sonra soğuk çeşme suyu ile yıkanır. Tüpler tamamen kurutulduktan sonra dondurma işlemine başlanır. Bunun yanı sıra kapakları yanlış kapatılmış tüpler bu süre sonunda kolayca tespit edilebilir. Çünkü hatalı kapatılmış tüplerin içinin mavi renk aldığı görünür ve bu mavi boyanmış tüpler kullanılmaz. Bu şekildeki tüpler kesinlikle azot tankına güvenlik açısından konmamalıdır (Kuchler, 1977; Freshney, 1986; Storey ve Mommsen, 1994; Wolfe vd., 1994; Doyle vd., 1995).

2.7.1 Dondurulmuş Hücrelerin Çözünmesi

Sıvı azot tankından çıkarılan kriyotüpler daha önceden hazırlanmış olan 37 ºC de su banyosuna direk olarak daldırılır ve kolayca erimesi için çalkalanır. Çözünme olayı yaklaşık olarak 40–60 saniye içerisinde gerçekleşir. Su banyosundan çıkarılan kriyotüplerin etrafı %70'lik alkol ile iyice silinir. Kriyotüpün kapağı açıldıktan sonra içindeki çözünmüş hücre süspansiyonu, pastör pipeti veya bir şırınga yardımıyla alınarak pH'sı 7,2 olan ve içersinde % 10 FCS bulunan hücre üretme besiyerine konulur. Kriyoprotektan maddenin ortamdan atılması için kültürün besiyeri ertesi gün değiştirilmelidir. Ya da kriyotüpteki hücre süspansiyonu bir santrifüj tüpüne aktarılarak üzerine hücre canlılığı açısından oldukça önemli olduğu için bekletmeden 10 ml kadar üretme besiyeri konulur ve santrifüj edilir. Üstteki sıvı

uzaklaştırılır. Altta kalan hücre çökeltisi hücre besiyeri ile süspanse edilerek inkübasyona bırakılır (Freshney, 1986; Doyle vd., 1995).

2.7.2 Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi

Tripan mavisi ve Erythrocin B gibi ölü hücrelerin boyanmasını sağlayan boyalar aracılığıyla süspansiyondaki hücrelerin canlılığı tespit edilir. Erythrocin B ile yapılan boyamalarda mikrobiyal üreme ve çökeltiler daha çabuk görülebilmektedir. Erythrocin B ile boyama da kullanılan standart bir yöntem olmamakla beraber şu şekilde yapılır. Eğer dondurulmuş hücrelerin boyanıp sayılmaları düşünülüyorsa o zaman krotüpündeki hücre örneğinin % 5'inin alınarak boyanması tavsiye edilir. Bu işlem iki adımda gerçekleşir. Hücreler boyama solüsyonuyla çeşitli oranlarda sulandırılır. 100 ml PBS içerisinde 100 mg Erythrocin B çözülerek 1 M NaOH ile pH 7.2–7.4'e ayarlanır. Doğru ve kolay bir sayım için final yoğunluk 0,3-2x106 hücre/ml olmalıdır. Sayma işlemi hücre süspansiyonuyla boyanın karıştırılmasından 1–5 dakika sonra yapılmalıdır. Bir örnekten birkaç kez boyama yapılarak sayım yapmak daha doğru ve emin sonuçlar verecektir (Gürtürk, 1977).

2.7.3 Dondurma İşleminde Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

Donmuş kriyotüpleri çözerken mutlaka eldiven ve koruyucu gözlük takılmalıdır. Patojen örnekler içeren tüpler kapalı kaplarda çözülmelidir. Meydana gelebilecek tüp patlamalarını önlemek için tüpler çözülmeden 24 saat önce sıvı azot içinden alınarak azot buharına konulmalıdır. Başarılı bir kriyoprezervasyonun yapılabilmesi için hücre tiplerine göre önemli olan epidermal üreme faktörü ya da interlökinler gibi faktörlere dikkat edilmesi gerekir. Kültürlerde hücrelerin tekrar canlandırma sırasında bir kısmı ölmektedir. Ayrıca hücre miktarındaki artışa bağlı olarak meydana gelen toksik ürünlerin birikmesiyle de hücrelerin ölümünde artma olabileceği unutulmamalıdır (Manzur, 1984).

Hücrelerin çözülmesi sırasında solüsyondan CO_2'in ayrılmasıyla pH problemi ortaya çıkabilmektedir. Hücre membranları daha çok alkali pH' da bozulabilir. Çözme esnasında oluşan ve geniş çapta hücre ölümlerine yol açabilen alkali pH problemi hücrelerin kriyoprezervasyonu esnasında solüsyona yüksek oranlarda serum katılmasıyla çözülebilir. Başka alternatif çözüm ise hücreleri kriyoprotektan ve serum karışımı içerisinde dondurularak saklamaktır. Sonuçta stabil bir pH için ortamda yüksek protein konsantrasyonu sağlanmalıdır (Bank, 1973; Bryant ve Wolge, 1992).

Kriyoprezervasyonda daha çok taze olarak hazırlanmış dondurma karışımları tercih edilir. Ticari kaynaklardan temin edilen DMSO kullanılmadan önce 0.22 μm fitrelerden geçirilerek steril edilir. Kullanılacak DMSO miktarları cam kaplara konularak –20 °C saklanır. Bu olay DMSO'in oksidasyon problemini ortadan kaldırmaktadır. İnsan promyelocytic leukemia hücre soyu HL 60'da olduğu gibi differensiyasyona neden olan durumlarda DMSO yerine gliserol kullanılmalıdır (Lovelock ve Bishop, 1959; Valeri, 1975; McGann vd., 1976; Pincet vd., 1994).

2.7.4 Sıvı Azot Tankları

Sıvı azot soğutucuları azot tüketimi, saklama kapasiteleri ve kullanım kolaylığı dikkate alınarak seçilmelidir. Azot tüketimi açısından dar ağızlı azot tankları genellikle daha ekonomiktir. Fakat kullanım açısından geniş modeller daha uygundur. Kriyotüpler sıvı azot içersinde daldırılarak ya da azot buharında saklanabilir. Kriyotüpleri azot buharında saklamak hatalı kapatılmış tüplerin içersine sıvı azotun girmesi önlendiği için patlama tehlikelerinin ortadan kaldırmaktadır. Fakat kriyotüplerin uzun süreli azot buharında saklamak bazı dezavantajlara neden olur. Tankın bir yerden bir yere rahatlıkla götürülebilmesi için hareketli bir taban, azot seviyesini gösteren bir alarm sistemi, büyük tanklar için tankın kullanılmasında büyük kolaylık sağlayan raf sistemi gibi yardımcı aksesuarlar çalışmalarda oldukça kolaylıklar sağlamaktadır. Tanktaki azot seviyesini tespit etmek amacıyla kullanılan otomatik alarm sistemi kullanılsa da yine de düzenli olarak bir çubuk daldırılarak azot seviyesi kontrol edilmelidir. Çünkü elektronik göstergeler bazen kullanıcıyı yanıltabilmektedir (Freshney, 1987; Doyle vd., 1995).

3. POLİMERLER

Polimerler büyük moleküllerden oluşan maddelerdir. Polimer molekülünü oluşturmak üzere birbirleriyle kimyasal bağlarla bağlanan küçük moleküllere monomer denir. Polimerin yapı birimleri monemere eşittir. Makromolekül denilen bir polimer molekülünde bu yapı birimlerinden yüzlerce, binlerce, bazen daha fazlası birbirine bağlanır. Ancak polimerin çoğu genellikle 5.000-250.000 molekül ağırlığı bölgesinde bulunur. Bir monomer, yeni bağlar oluşturan herhangi bir reaksiyon ile bir polimere dönüştürülebilir. Bu işlem polimerizasyon olarak adlandırılır (Baysal, 1981).

Polimerler doğal ya da yapay olabilir. Kauçuk, deri, yün, pamuk ve selüloz doğal polimerlere örnek olarak verilebilir. Doğal polimerik maddeler kullanımları sırasında birçok problemin ortaya çıktığı görülmüştür. Bu nedenle doğal polimerler yerlerini zamanla modifiye edilmiş doğal polimerlere bırakmıştır. Doğal polimerlerin modifikasyonu ile elde edilen polimerlere yarı sentetik polimerler denir. Buna örnek olarak doğal selülozdan elde edilmiş rejenere selüloz ve diğer selüloz türevleri gösterilebilir. Yapay polimerlere örnek olarak bine yakın etilen molekülünün bir zincir biçiminde birleşmesiyle oluşan polietileni $(-CH_2CH_2)_n$, benzer yapıda ama daha sert bir madde olan polipropileni $(-C_3H_6-)_n$, en eski ve yaygın plastik madde olan polivinil klorürü $(-CH_2CHCI-)_n$ sayabiliriz (Pişkin E, 1987).

3.1 Polimerlerin Sınıflandırılması

3.1.1 Kimyasal Bileşimlerine Göre

Polimerler kimyasal bileşimlerine göre iki sınıfa ayrılabilirler.

a- Organik polimerler; yapılarında başta karbon atomu olmak üzere hidrojen, oksijen, azot ve halojen atomlarını bulundururlar. Eğer polimer zinciri üzerinde dizili atomların hepsi aynı türden ise bu polimerlere “homozincir”, farklı atomlar ise “heterozincir” polimerler olarak adlandırılırlar. Bir atomun polimer ana zinciri üzerinde yer alabilmesi için, öncelikle en az iki değerlikli olması gerekir. Örneğin hidrojen ve halojenler bu nedenle ana zincir üzerinde yer alamazlar.

b- İnorganik polimerler; organik polimerler kadar yaygın olarak kullanılmazlar ve ana zincire karbon atomu yerine periyodik cetveldeki 4-5. grup elementlerinden Si, Ge, B, P ve diğerleri ile homozincir veya heterozincir oluşturur.

3.1.2 Yapılarına Göre

Polimerler yapılarına görede sınıflandırılabilirler. Tek bir monomer birimin tekrarlanmasıyla oluşan polimerler "homopolimer" adını alır. Örneğin etilen grubun tekrarlandığı polietilen bir homopolimerdir. Eğer polimerler iki monemerin karışımından oluşuyorsa "kopolimer" adını alırlar. Kopolimerler, ilgili monomer karışımlarını polimerleştirme ya da polikondensazyonuna dayanan kopolimerleştirme işlemleriyle elde edilir. Kopolimerleştirme işlemlerinde temel birkaç maddeden pek çok malzemenin üretilmesi nedeniyle kopolimerlerin büyük bir önemi vardır. Kopolimerleri dört grup altında toplayabiliriz (Şenvar, 1986).

1. Rastgele kopolimer: İki ayrı monomer molekülleri rastgele dizilmiştir.

– A – A – B –A – B – A – B – B –

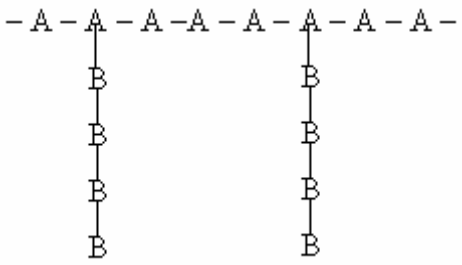
2. Ardışık kopolimer: İki ayrı monomerin molekülleri dönüşümlü olarak sıralanmıştır.

– A – B – A –B – A – B – A – B –

3. Blok kopolimer: Bir monomerin molekülleri blok halinde birbirine bağlı olup, bu zincire öteki monemerin zinciri bağlanmıştır.

– A – A – A –A – B – B – B – B –

4. Aşı kopolimeri: Bir polimerin uzun zincirine öteki monomerin zinciri bağlanmıştır.



3.1.3 Isıya Karşı Davranışlarına Göre

Polimerler işleme şekillerine bir başka ifadeyle ısıya ve çözücülere karşı gösterdikleri davranışa göre iki grup altında incelenirler.

a- Termoplastikler (ısıl plastikler) terimi ısı etkisi altında eriyen yada en azından biçimlendirilecek derecede yumuşayan polimerler için kullanılır. Isı ve basınç altında yumuşar, akarlar ve böylece çeşitli formlarla şekillendirilebilirler. Bunlar doğrusal yapıdadırlar. Tekrar tekrar eritilip şekillendirilebilirler. Ayrıca uygun çözücülerde çözünebilir ve çeşitli formlara dönüştürülebilirler.

b- Termosetler (ısıl dengeli plastikler) ise çapraz bağlı polimerlerdir. Bu çapraz bağlanma etkisi ısıtma suretiyle olur ve böylelikle sert, rijit kütleler halindeki termoset plastikler elde edilmiş olur. Bu işlem tersinir değildir. Dolayısıyla çözünmez ve erimez polimerlerdir. Bir kere şekillendirildikten sonra tekrar çözmek veya eritmekle şekillendirilemezler.

3.1.4 Fiziksel Durumlarına Göre

Polimerler fiziksel durumlarına göre de sınıflandırılabilirler. Örneğin "amorf", "yarı kristalin", "kristalin", "elastomer" polimerlerinden söz edilebilir. Amorf polimerlerde polimer zincirleri gelişigüzel şekilde birbirlerinin içine girmiş yün yumakları şeklindedir. Kristalin polimerik yapılarda polimer zincirlerinin tamamı belli bir düzene girmiş veya kristallenmiştir. Yarı kristalin polimerlerde ise polimerik yapının bazı bölümleri kristalin, diğer bölümleri amorf yapıdadır.

3.2 Polielektrolitler

Polielektrolitlerin teorisinin izahı ilk olarak 1951 yılında Fuoss tarafından hazırlanan derlemede yayınlanmıştır. Polimerler iyon içeriğine göre polielektrolitler ve poliamfolitler olarak iki gruba ayrılabilirler. Polielektrolitler ana zincirine bağlı halde katyonik veya anyonik grupları içerirken, poliamfolitler katyonik ve anyonik grupların her ikisinde de bulundurur. Polielektrolit terimi kovalent olarak bağlı anyonik veya katyonik grupları ve bu gruplara bağlı "counter" iyonları olan polimer sistemleri için kullanılmaktadır (Şekil 3.1) (Dautzenberg vd., 1994). Tüm monomerlerinde aynı işaretli yüklere sahip polielektrolitlere homopolielektrolit adı verilmektedir.

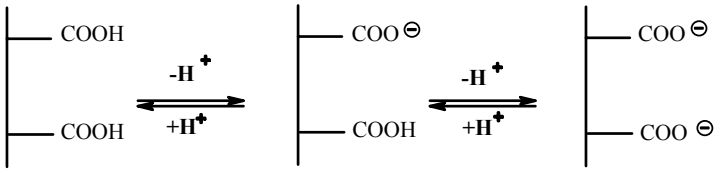
(a) (b)

Şekil 3. 1(a) Polivinilpiridinyum, (b) sodyum polistiren sülfonat (Dautzenberg vd., 1994)

Eğer, uygun sayıda iyonik grup herhangi bir kimyasal yapının polimer zincirine kovalent olarak bağlanır ve oluşan çözelti uygun bir pH'da suda çözünür hale getirilirse, teorik olarak bir polielektrolit elde edilebilir. Polielektrolitler genelde bir katılma veya kondenzasyon

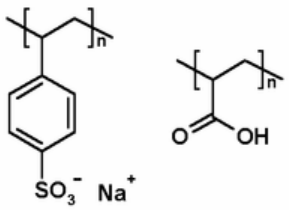
polimerleşme reaksiyonlarıyla elde edilebilir. Ayrıca polielektrolit yapıdaki pektin gibi anyonik polisakkaritler ve çok sayıda proteinler doğadan edinilebilir. Nişasta ve selüloz gibi noniyonik doğal polimerler kimyasal modifikasyonla polielektrolite dönüştürülebilir. Polifosfatlar ve polisilikatlar da inorganik polielektrolitler olarak sayılabilir (Dautzenberg vd., 1994).

Polielektrolitler, her bir tekrarlayan birimi (monomeri) bir elektrolit grup taşıyan polimerlerdir. Bu elektrolit gruplar sulu çözeltilerde dissosiye olup polimeri yüklü hale getirirler (Şekil 3.2). Polielektrolitlerin özellikleri hem elektrolitlere (tuzlar) hem de polimerlere benzemektedir ve bazen polituzlar olarak adlandırılmaktadırlar. Sulu çözeltileri, tuzlar gibi elektriği iletir ve polimerler gibi viskozdur. Polipeptidler, proteinler, DNA gibi çoğu biyolojik molekül polielektrolit formundadır.



Şekil 3. 2 Poli(akrilik asit)in sulu çözeltideki dissosiyasyonu

Polimere bağlı anyonik ve katyonik gruplar güçlü ve zayıf asitler ve bazlar olarak ikiye ayrılabilir. Kuvvetli bir polielektrolit, çözeltide tüm iyonlarına ayrışabilir. Bunun aksine, zayıf bir polielektrolit tüm iyonlarına ayrışamaz. Bu sebeple, zayıf polielektrolitler çözelti içinde tamamen yüklü değildirler ve pH değiştirilerek üzerlerindeki yük dağılımı ayarlanabilir.



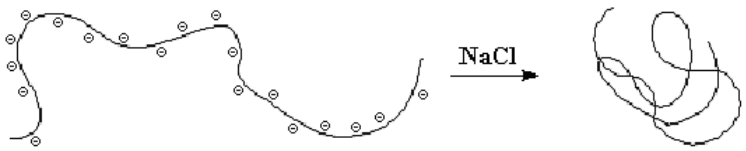
Şekil 3. 3 İki sentetik polielektrolitin kimyasal yapısı.

Soldaki yapı poli(sodyum stiren sülfonat) (PSS) ve sağdaki ise poli(akrilik asit) (PAA). Her ikisi de negatif yüklü polielektrolitlerdir. PSS kuvvetli bir polielektrolitken PAA zayıf bir polielektrolittir.

İyonik grubun asit ve baz kuvvetlerinin yanında polimer zinciri boyunca uzanan bitişik anyonik ve katyonik yükler arasındaki ortalama uzaklık polielektrolit davranışının tayininde önemli bir parametredir

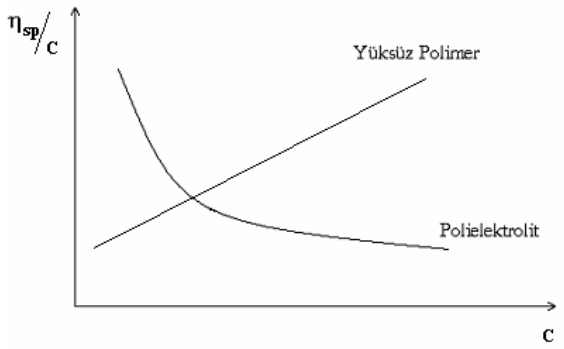
Çözünürlük ve yapı oluşumunda düşük molekül ağırlıklı "counter" iyonların türünün çözeltideki tüm sistemin özellikleri üzerinde güçlü bir etkisi vardır. Bu iyonların önemini anlamak için şu örneği verebiliriz: poli(diallildimetilamonyum) polikatyonunun klorürlü hali suda kolayca çözünürken, iyodürlü hali daha zor çözünür (Dautzenberg vd., 1994).

Herhangi bir polimerin konformasyonu polimerin yapısına ve çözeltiyle ilişkisine bağlıdır. Çözelti içindeki yüksüz bir lineer polimer zinciri rastgele yumak konformasyonu gösterirken, lineer polielektrolit üzerindeki yükler birbirini iter (Coulomb itmesi) ve eksi yüklerin birbirlerini itmesini azaltıcı en uygun konformasyon olan uzanmış halde bulunmaya eğilim gösterir (Şekil 3.4). Bu düzenleme, polielektrolit çözeltilerinin viskozitesinin yükselmesine yol açar. Ortamın pH'ı da zayıf polielektrolitlerin özelliklerini etkiler. Çünkü iyonik grupların dissosiyasyon derecesi ve polielektrolitin yük yoğunluğu değişir (Dautzenberg vd., 1994).



Şekil 3. 4 Çözeltiye tuz ilavesi sonucu polielektrolit zincirinin yumak konformasyonunu alması

Polielektrolitlerin bir başka özelliği ise polimerlerde konsantrasyon arttıkça viskozite artarken, polielektrolitlerde konsantrasyon azalırken viskozitenin artmasıdır. Bunun nedeni azalan konsantrasyon ile (-) veya (+) yüklerinin birbirlerini itmeleri ve polielektrolitin şişmesidir (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5 Yüksüz polimerlerde ve polielektrolitlerde viskozite-derişim ilişkisi

Ortamın pH' ına göre (-) veya (+) yük taşıyan polielektrolitler amaca uygun olarak metal iyonları ile iyon koordinasyon bağıyla yada çeşitli makromoleküller ile elektrostatik etkiyle bağlanıp suda çözünen veya çözünemeyen polikomplekslerin oluşumunu sağlar.

1970'li yılların başlarında immünologların ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bazı sentetik polielektrolitlerin (PE) immün cevabına kuvvetli etkisi aydınlatılmış ve sentetik PE' lerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu tespit edilmiştir. Çünkü PE' lerin sentezi ve modifikasyonu daha basittir, istenilen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek olasıdır, suda iyi çözünürler ve bilinen yapılarda çeşitli komplekslerini sentezlemek mümkündür. PE' lerin molekül ağırlığı, polimerleşme derecesi ile orantılıdır. Polimerleşme derecesinin artması istenilen kompleksin oluşumunu destekleyici yönde etki eder ve polimer ile bağlanma miktarlarında artış gözlenir. Bunun yanı sıra kompleksi çözmesi de polimerleşme derecesine yani, polimerin uzunluğuna bağlıdır (Mustafaev, 1996).

Polielektrolitlerin kullanım alanları incelendiğinde en önemlilerinden biri, belirli geçirgenliği ve seçiciliği olan yarı- geçirgen zarların yapımıdır (Zezin ve Eltsefon, 1976; Sato vd., 1979). Bu zarlar deniz suyu tuzunun ayrılması işlemi için ters osmoz olarak kullanılabilir. Biyomedikal alanda ise, bu zarlar biyolojik kan sıvılarının (kan, idrar) ultrafiltrasyonu, hemodiyaliz için yapay böbrek ve hemoksijenasyon için yapay karaciğer olarak kullanılır.

Polielektrolit komplekslerini iki şekilde inceleyebiliriz.

3.2.1 Doğal Polielektrolit Kompleksleri

Doğal polielektrolit kompleksleri canlı organizmada geniş bir uygulama alanına sahiptir ve canlı organizmaların değişiminde büyük rol oynamaktadır. Doğada kendiliğinden oluşan polielektrolit komplekslerinin incelenmesi, yapay polielektrolit kompleksleri oluşturulması

bakımından çok önemlidir. Hücre çekirdeğinde nükleoproteitler şeklinden bulunan nükleik asit kompleksleri veya hücre duvarının yapısını oluşturan peptidoglikanlar doğal PE kompleksler arasında sayılabilir.

Nükleik asit komplekslerinin en çok incelenmiş kısmı, (+) yüklü proteinler ve polipeptidlerle, (-) yüklü DNA veya RNA'nın yapmış olduğu komplekslerdir. Bu komplekslere deoksiribonükleik proteitler (DNP) veya ribonükleik proteitler (RNP) denir. Kompleksler protein ligantlarının pozitif yüklenmiş amin grupları ile nükleik asitlerin negatif yüklü fosfat grupları arasındaki elektrostatik etkileşimlerden meydana gelmektedir.

Doğal polikomplekslerin yapılarının karakterini ve organizmadaki uyumunun mekanizmasını anlayabilmek için, in – vitro koşullarda doğal PE 'lerin model biyopolimerlerle kompleks oluşturması incelenebilir.

Literatürde nükleik asitlerin globular proteinlerle (SA, Lizozim, RNAaza) oluşturdukları çözünen kompleksleri araştırılmıştır (Goldwosser ve Putnam, 1950; Timasheff ve Kirkwood, 1953; Kretovich vd., 1958).

3.2.2 Yapay Polielektrolit Kompleksleri

Polielektrolitlerin proteinlerle reaksiyonlarının incelenmesi Morawetz, Stahmann, Katchalski ve diğer bilim adamlarının çalışmalarıyla başlamıştır. Özellikle BSA 'nın franksiyonsuz PAA ve Ba^{2+} varlığındaki çözünebilir kompleksler Morawetz tarafından incelenmiştir (Katchalski vd., 1954; Rice vd., 1954; Morawetz, 1952,1965). PE'lerin proteinlerle su ortamında kompleks oluşturması genel olarak reaksiyona giren bileşenlerin birbirlerine zıt yükler taşıması ilkesine dayanmaktadır. Aynı yüklü protein ve polimerlerin birbirine bağlanmasında ise zıt yüklü geçiş metal iyonları ile iyon – koordinasyon bağı oluşturulur.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, serum albumin (SA), ortamın pH' ının proteinin izoelektrik noktasından daha düşük olduğu zaman, anyonik polielektrolitler olan poliakrilik asit (PAA) veya polimetakrilik asit (PMAA) veya polietilenin ile suda çözünmeyen kompleksler verirler.

3.3 Poliamfolitler

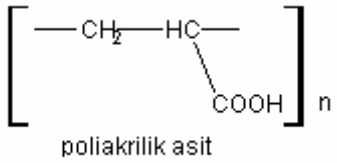
Anyonik ve katyonik grupların her ikisininde kovalent olarak bağlı bulunduğu makromoleküller ise poliamfolitler olarak adlandırılırlar. Protein yapılı poliamfolitler doğada bol miktarda bulunurlar ve sentetik yollarla da elde edilebilirler. Poliamfolitlerin izoelektrik

noktalarında molekül üzerindeki net yük toplamı sıfıra eşittir (Higgs ve Joanny, 1991; Merle, 1987).

Poliamfolitlerin yapı özellikleri anyonik ve katyonik monomer birimleri arasındaki coulombik çekme kuvvetleri tarafından yönlendirilmektedir. Anyonik ve katyonik grupların molar oranı birbirine yaklaşmaya başladıkça coulombik etkileşimler globular konformasyona neden olurlar ve birçok durumda deiyonize suda çözünmezler (Higgs, 1991; Merle, 1987).

3.4 Poliakrilik Asit

Akrilik asit (CH_2=CH-COOH) zehirli, renksiz, çok keskin kokulu, deriyi aşındırıcı etkisi olan bir sıvı maddedir. Çok kolay polimerize olabilen bu madde su, alkol, eter ve birçok çözücüde oldukça kolay çözünür. Kaynama noktası 140.9 ^{o}C, erime noktası 12.1 ^{o}C, yoğunluğu ise 20 ^{o}C de 1.052 g/cm^3'tür (Willey, 1964). Şekil 3.6 poliakrilik asidin kimyasal yapısı.



Şekil 3. 6 Poliakrilik asidin kimyasal yapısı [1]

Poliakrilik asidin çözünürlüğünü etkileyen birçok parametre vardır ki bunlar deney şartları, dallanma derecesi, molekül ağırlığı, çapraz bağlanma, ortamdaki diğer çözünen maddeler olarak sayılabilir. Akrilik asidin homopolimeri suda kolaylıkla çözünebilir ve sıcaklık artışıyla poliakrilik asidin çözünürlüğü de artar (Hawley,).

Akrilik asidin kolaylıkla polimerize olma özelliğinden dolayı koruyucu olarak bu olayı engelleyici maddelerle saklanabilir. Yaygın olarak kullanılan inhibitörler mono metil eter hidrokinon (MEHQ), bakır ve bakır tuzları ve metilen mavisidir. İnhibitörler olmadığı taktirde akrilik asit ısı, ışık gibi etkenlerle yarım veya bir saat gibi bir sürede polimerize olur. Bunun için inhibitörsüz akrilik asit bu süre içinde kullanılmalıdır. Aksi taktirde kontrol edilmemiş akrilik asit monemerinin polimerizasyonu ile son derece sert polimer oluşur. Polimerler kendi monemerlerinde çözünmezler. Eğer monemer inhibitörsüz ise bu durumda küçük miktarlarda monemerler hazırlanarak bunları çok çabuk kullanmak gerekir (Sandler ve Karo, 1977).

3.4.1 Poliakrilik Asidin Özellikleri

3.4.1.1 Çözünürlük

Poliakrilik asidin kurutma işlemi çapraz bağlanmayı önleyecek kadar hafif şartlarda yapılırsa, polimer suda kolaylıkla çözünür. Aksi taktirde polimer yüksek sıcaklıklarda tamamen kurutulmuşsa çözünürlüğü oldukça azalır. Poliakrilik asit nemli havaya bağlı kalırsa nemi hızla absorbe eder. Çizelge 3.1 de poliakrilik asidin çeşitli çözücülerdeki çözünürlüğü görülmektedir. Buradaki sonuçlar bulunurken 25 ^{o}C 'de 10 ml çözücüye 0.1-0.2 gr polimer ilave edilip çözünüp çözünmediği tespit edilmiştir (Willey, 1964).

Çizelge 3. 1 25 ^{o}C 'de Poliakrilik Asidin Çözünürlüğü

Çözücü	Poliakrilik Asit
Su	Çözünür
Dioksan	Çözünür
Etanol	Çözünür
Metanol	Çözünür
Aseton	Çözünmez
Benzen	Çözünmez
Etileter	Çözünmez

3.4.1.2 Viskozite

Poliakrilik asidin iyonlaşmadığı ortamda, örneğin 1,4-dioksan içinde çözündürülürse, indirgenmiş viskozite konsantrasyon ile doğru orantılı olarak değişir. Poliakrilik asit 1,4-dioksan yerine, onun iyonlaştığı su gibi bir ortamda çözündürülürse indirgenmiş viskozite seyreltme ile düşme göstereceği yerine artma gösterir. Polimer çözeltisinde yapılan seyreltmeler sonunda indirgenmiş viskozite değerinde, düşme yerine görülen yükselme polielektrolit etkisi olarak tanımlanabilir. (Polielektrolit: Konsantre polimer çözeltisi içinde her bir polimer molekülü diğer polimer molekülleri ile sıkıca çevrilidir ve ortam molekülün iç ve dışı ile aynıdır. Çözelti seyreltildiğinde ise moleküller genişler ve birbirinden ayrılır.) Ortama 0.1-0.5 N konsantrasyonunda 1:1 tuzlarının (NaCl, KBr) eklenmesiyle polielektrolit etki giderilebilir. Polimerin molekül ağırlığı düşükse eklenecek miktarın az olması yeterlidir.

Ayrıca poliakrilik asidin çözündüğü konsantre tuz çözeltisinin de viskozite etkisi üzerinde etkisi vardır ve tuz çözeltisinin konsantrasyonu artarsa moleküller büzülür. Böylece indirgenmiş viskozitede düşme görülür. Aynı düşme tuz konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda da görülür (Willey, 1964).

3.4.1.3 Polimerin Çökme Sıcaklığı

Poliakrilik asidin çözünürlüğü konsantrasyon, sıcaklık ve nötralizasyon ile karışık bir şekilde değişir. Bu faktörlerin etkileri çökme veya kritik çözelti sıcaklığı (Tp) şeklinde düşünülebilir. Polimer çözeltisinin sıcaklığının yükselip alçalmasına göre Tp sıcaklığını, çözeltinin ya tam bulanık hale geldiği yada bulanıklığını tamamen kaybettiği sıcaklık olarak tanımlayabiliriz. Poliakrilik asidin çözünürlüğü sıcaklığın azalmasıyla düşer. Fakat poliakrilik asidin molekül ağırlığı ve konsantrasyonu düşükse ve tuz yada mineral asitleri bulunduruyorsa sıcaklık düştüğünde çözünürlüğünde azalma görülmez. Poliakrilik asidin 1-,4-dioksan'daki çözünürlüğü sıcaklığın artmasıyla düşer. Bu olay hidrojen bağı olan bileşiklerde görülebilir (Willey, 1964).

3.4.1.4 Polielektrolit Etkisi

Poliakrilik asit belirtildiği gibi polielektrolit etki gösterir. Suda veya diğer polar çözücülerde poliakrilik asit makro iyonlara ayrılır. Bir makroiyonda (+) ve (-) iyonlar bulunur ve bu iyonlar arasındaki elektrostatik kuvvetler sonsuz seyreltik çözeltide kaybolmaz. Konsantrasyon düştükçe iyonlar arasındaki bu elektrostatik kuvvetler ve buna bağlı makroiyonun genişleme özelliği artar. Aynı zamanda bu genişleme makroiyonun yüzeyinin artmasıyla da artar. Makroiyonların oluşturduğu moleküler yapıdaki iyonların birbirini itmesi sonucunda dışa büyüyen bir bobin halini almasıyla sonuçlanır. Bobinin dışa büyümesinin sebebi aynı yüklü iyonların birbirini itmesinden dolayıdır. Böylece dışa büyüyen bobinin çapı artarak, ortamın yoğunluğu da artar. Makroiyonlardaki itmeyi engelleyecek ve onların bu itmesini tam tersine birbirlerine çekme kuvvetine dönüştürecek maddeler katılarak, seyreltme sonucu viskozite artmasına neden olan polielektrolit giderilebilir ve bu maddelerde çeşitli tuz çözeltileridir (Harry vd., 1942).

3.4.2 Kullanıldığı Yerler

Poliakrilik asitler karbopol, karbomer vb. birçok ticari isimle karşımıza çıkarlar. Poliakrilik asit viskozite arttırıcı olarak doğal veya yapay latekslerin kaplanmasında, tutkallar, plastik boyalar ve kağıt yaprakların renklendirilmesinde, kağıt ve tekstil malzemelerinin dayanıklılığının arttırılmasında, derinin tabaklanmasında, inorganik pigmentlerin dağılmasında kullanılmaktadır (Willey, 1964). Kozmetikte kremler, losyonlar ve saç malzemeleri için kıvamlaştırıcı ve parlatıcı olarak kullanılır. Bunun yanı sıra ev ürünleri ve farmösetik preparatlarda da kullanılır.

Yapılan bazı çalışmalarda poliakrilik asidin adjuvant, antitrombojenik madde ve ilaç salınımlarında taşıyıcı olarak kullanılmakta olduğunu göstermiştir. Normalde toksik olan PAA zincirine, NIPAAm ünitelerinin katılmasıyla toksisitesi azaltılmaktadır (Mustafaev vd., 1998).

Mevcut çalışmalar, in – vitro koşullarda sentetik bir polielektrolit olan PAA ve Cu^{2+} komplekslerinin sudaki çözeltilerinin protein karışımlarında radyasyon etkisine maruz bırakıldıklarında, belli dozlara kadar gerek polimer gerekse de protein moleküllerinin bozulmadan direnç gösterdiklerini bildirmiştir ve PAA ve PAA – Cu^{2+} örneklerinin kan hücrelerini radyasyondan koruma özelliği taşıdığı gösterilmiştir (Mustafaev vd., 1998).

Nano boyutlu metal parçacık ve organik polimerlerin kompozitleri büyük bir ilgi çekmektedir. Bu kompozitler, metal ve polimerlerin yararlı özelliklerini bir araya getirmenin yanı sıra bir çok yeni karekteristik özelliğin oluşmasınıda sağlarlar. Xiangling Xu ve arkadaşları, poliakrilik asit- metal nano kompozitlerini içinde metal iyonları (Ag^{+}, Cu^{2+}, Ni^{2+} gibi) olan akrilik asit monemer çözeltilerinin γ ışınları ile ışınlanması sonucu oluşturmuşlardır. İnorganik polimer nano kompozitler hazırlamada kullanılan metot gelecek vaat eden bir yöntem olarak düşünülmektedir (Xu vd., 1998).

Göz için yapılan ilaçların göz içine iyi bir şekilde absorplanabilmeleri için, tedavide aktif rol oynayan maddelerin daha uzun süreli göz tabakasında bulunabilmeleri üzerine deneyler yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada ayrı ayrı kullanılan polimerler mukoz tabakayla bağ kurarak göz yüzeyinde çözünür, kolloidal ve partikül halde bulunan materyali yakalayabilmektedir. Bu çalışmada kullanılan polimerlerden biride poliakrilik asittir. (Greaves ve Wilson, 1993).

4. APOPTOZ

Apoptoz organizmada görevini tamamlamış ya da hasara uğramış hücrelerin çevre hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan, genetik olarak kontrol edilen programlanmış bir hücre ölümüdür. Selim ve malign tümörlerde proliferasyon ve hücre dönüşümünde kritik bir rol oynamakta olup, mitozun aksine iyi bir prognostik bulgudur. Apoptozda hücre içi veya dışı kaynaklı ölüm sinyalleri ve hücre ölüm reseptörü veya mitokondri yoluyla apoptotik mekanizma aktive olur ve sonuçta DNA kırılması meydana gelir. Apoptotik hücreler apoptotik cisimlere ayrılarak çevre hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptoz p53, Bcl-2 gibi bazı onkogenler tarafından regüle edilir (Cotran, 2000).

Proglamlanmış bir hücre ölümü olan apoptozda intrinsik bir intihar programı harekete geçmekte ve hücre sistematik olarak tahribata uğramaktadır. Nispeten kontollü bir olay olan apoptozda, çevredeki diğer doku ve hücrelere zarar verebilecek olan parçalayıcı enzimler ve diğer unsurlar çok az miktarda salgılanmaktadır. Bütün yüksek canlılarda apoptoz embriyogenez, gelişme, hemostaz, iskemi, toksisite ve neoplazik değişiklikler sırasında, rejenerasyon ve tamir olaylarında, organların büyüklüklerinin korunması ve organların patofizyolojisinde kritik öneme sahiptir (Kinloch vd., 1999).

Apoptoz Yunanca'da apo(ayrı) ve ptosis(düşmek) kelimelerinden oluşan ve ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie adlı patologlar tarafından 1972 yılında kullanılan bir terimdir. 1983 yılında Duke ve arkadaşları jel elektoforezi ile apoptozda endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına neden olduğunu göstermesi ile hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiş ve apoptoz ile ilgili çalışmalar hızlanmıştır. Apoptoz hasta ve gerekmeyen hücrelerin kontrollü ve genetik olarak kontrol edilen bir mekanizma ile çevre hücrelere zarar verilmeden yok edilme olayıdır. Apoptoz fizyolojik durumlardaki hücre ölümü olsa da bazı patolojik etkenlerle de ortaya çıkabilir, hücre bütünlüğünü bozarak nekroza neden olan her durum hücre hala yaşıyorsa apoptozla sonuçlanabilir (Kerr vd., 1972; Wyllie ve Duvall, 1992).

4.1 Organizmada Hücre Ölümünün Mekanizmaları

Organizmada yaşamakta olan hücreler nekroz ve apoptoz olmak üzere iki farklı yolla ölürler. Bu iki mekanizma karakteristik, morfolojik ve biyokimyasal özellikleriyle birbirinden ayırt edilebilir. Apoptozu nekrozdan ayıran en önemli özellikler apoptozda hücrelerin toplu olarak değil teker teker ölmesi, aktif protein sentezinin gerekmesi, fagositoz sırasında proteolitik enzimlerin ortaya yayılmaması, hücre zarının ve organellerin bütünlüklerinin korunması ve inflamatuar bir yanıt oluşmamasıdır (Bosman vd., 1996). Apoptoz elektron mikroskobik

çalışmalarda TUNEL (+) karakteristiklere sahiptir. Hücresel şişme yoktur. Hücre içi Ca^{++} miktarları düşüktür. DNA da internükleozomal tam kırılma ve mitokondiride etkilenme meydana gelir. Apoptoz ölüm reseptörleri ile indüklenebilir.

4.2 Organizmada Apoptotik Hücre Ölümünün Gözlendiği Durumlar

Embriyonal ve fötal dönemde, özellikle sinir sisteminin ve immün sistemin normal gelişiminde apoptoz önemli görev almaktadır. Bu, sinir sisteminin gelişim sırasında oluşan çok fazla sayıdaki nöronların hedef sayıya indirilmesi, aksonları hedeflerine ulaşmayan nöronların ortadan kaldırılarak nöronlarla hedef organlar arasında oluşan bağlantı hatalarının onarılması, immün sistemde oluşan fazla ve otoreaktif hücrelerin ortadan kaldırılarak bunların embriyoya ve fetüse zararının engellenmesi şeklinde olur (Mountz ve Zhou, 2001).

Apoptoz erişkinlerde hormonal yetmezliğe bağlı organ gerilemelerinde, özellikle mensturasyonda endometriyal hücre yıkımı, menopozda over folliküllerinin atrezisi, laktasyon sonrasında meme bezi gerilemesinde rol oynamaktadır (Wyllie ve Duvall, 1992).

Proliferasyona uğrayan hücre topluluklarında rol oynayarak dokulardaki hücre homeostazının sağlanmasında, tümörlerin regresyona gittikleri dönemlerde de apoptoz görülmektedir. Ayrıca T ve B lenfositlerdeki sitokin yetersizliğinde hücreler apoptozla ortadan kaldırılabilmektedir. Pankreas, parotis ve böbrek gibi organlarda kanal tıkanıklıklarına bağlı gelişen atrofilerde, viral hepatit gibi çeşitli viral hastalıklarda, hücrelerdeki hasarlanma durumlarında (ısı, radyasyon, antikanser ilaçlar, hipoksi vb.) ve yaşlılıkta apoptoz izlenmektedir (Wyllie ve Duvall, 1992; Mountz ve Zhou, 2001).

4.3 Apoptozda Biyokimyasal Değişiklikler

Hücrelerde apoptoza yol açan bir tek mekanizma olmamakla birlikte pek çok hücre tipinde erken apoptozda sitoplazma da iyonize kalsiyumun arttığı izlenmiştir (Staunton, 1998). Apoptozda en önemli biyokimyasal olay endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile DNA'nın kırılmasıdır. Bu enzim Ca^{++} ve Mg bağımlı olduğundan aktivasyonu için hücre içi kalsiyumun artması gerekmektedir. Enzim DNA'yı 200 baz çiftlik parçalara ayırarak kırılmalar oluşturur ve jel elektroforezinde merdiven paterninin oluşmasına yol açar. Buna karşılık nekrozda çok sayıda endonükleaz enzimi aktive olduğundan DNA düzensiz parçalanarak merdiven paterni oluşmaz (Carson ve Rbiero, 1993). Apoptozda transglutaminaz aktivitesi artarak apoptoza giden hücrenin zarı değişikliğe uğrar ve proteolize dirençli hale gelir. Bununla birlikte hücre içi çapraz bağların artması ile hücre içeriği dışarıya çıkmaz ve

inflamatuar cevap oluşmaz. Değişen zar yapısı çevre hücrelerin apoptotik hücreyi tanımasına olanak tanıdığından hücreler fagosite edilir (Melino, 1994). Apoptozun varlığı elektron mikroskopi, agaroz jel elektroforez, DAPI boyama, flowsitometri ve in situ işaretleme teknikleri ile gösterilebilir. Bugün için en sık kullanılan in situ işaretleme tekniği TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferasemediated dUDP-biotin nick and labeling) adı verilen parçalanmış DNA kırıklarının tespitini sağlayan yöntemdir (Gavrieli, 1992). Tepkime oldukça özgündür ve sadece apoptotik çekirdekler boyanır. Yöntem polideoksinükleotid polimerinin sentezini takiben DNA'nın 3'-OH uçlarına özgün olarak bağlanması üzerine dayanır. Sinyaller avidin-peroksidaz sistemi ile çoğaltılır ve ışık mikroskobu ile görülebilen klasik histokimyasal belirlenmesi olanaklı hale gelir. (Gavrieli Y vd., 1992; Negoescu vd., 1999). Apoptoza gidecek olan bir hücrenin erken evrede gösterilmesi ise son yıllarda tanımlanan M30 fare monoklonal antikorları ile yapılan immün enzim köprü tekniği ile olabilmektedir (Sung vd., 1991).

4.4 Apoptozda Hücre Ölümünün Aşamaları

Çizelge 4. 1 Apoptozu engelleyen proteinler

Antiapopitotik Proteinler	*Proapopitotik Proteinler*
Bcl-2	BAX
BclxL	BAK
Bcl-w	BAD
Mcl-1	Bcl-xS
c-Abl	p 53
Rb	c-Fos, c-Jun

4.4.1 Apoptozun Başlatılması

Bir hücrede apoptozun başlaması için öncelikle genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir hücre içi veya hücre dışı sinyal gelmelidir. Hücreler için gerekli olan çevre hücrelerden ve ekstrasellüler matriksten gelen yaşam sinyalleri ve büyüme faktörleri düzenli ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptoza giderler. Bu sinyallerin kesilmesi ile apoptozun nasıl başladığı tam olarak bilinmemesine karşın büyüyen hücrelerde bir çekilme olduğunda hücrelerin metabolizmalarında ani bozulmalar ve hücre siklusunda duraklamalar olduğu hücre kültürlerinde gözlenmiştir (Mountz ve Zhou, 2001).

Bazı sitokinler hücre zarındaki reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler. Apoptozda görevli membran reseptörleri içinde en önemli grup tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) ailesidir. Bir kısmı apoptoz oluştururken bir kısmı

proliferasyona neden olan bu reseptör ailesi içerisinde, apoptoz oluşturan Fas ve TNFR 1 reseptörleri uyarıldığında prokaspaz 8'i aktifleştirerek apoptoza neden olur (Jones ve Gores, 1997; Mountz ve Zhou, 2001).

Ayrıca bu ölüm reseptörlerinin aktivasyonu dışında hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınları gibi dış etkenler de DNA hasarı oluşturarak apoptoz oluştururlar. DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} seviyesindeki artış, hücre içi pH'sında düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları gibi hücre içinden gelen sinyaller de hücreyi apoptoza götüren merkezi ölüm sinyallerini oluşturabilirler (Mountz ve Zhou, 2001).

4.4.2 Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu

İç ve dış sinyallerle hücre içindeki bir grup proteaz aktive olur ki bunlara kaspaz (caspase= cysteine-containing aspartate specific proteases) adı verilmektedir. Kaspazlar başlatıcı ve sonlandırıcı olmak üzere ikiye ayrılırlar. Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığıyla, iç sinyaller ise mitokondri aracılığıyla başlatıcı kaspazları, aktive olan başlatıcı kaspazlar da zincirleme olarak diğer kaspazları aktive ederler (Mountz ve Zhou, 2001). İç sinyallerle oluşan apoptozda mitokondri önemli rol oynar. Sinyaller dış mitokondri zarında geçirgenlik artışına neden olurlar. Mitokondri dış zarının geçirgenliğini bazı proteinler ayarlamaktadır ki bunların en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir. Bu gruptaki proteinlerin bir kısımı antiapoptotik bir kısmı proapoptotiktir (Çizelge 4.1).

Bcl-2 proteini antiapoptotiktir ve mitokondri dış membranına ve apoptoz proteaz aktive edici faktör 1 (apaf 1) e tutunmuştur. Hücrenin içinden alınan apoptotik sinyaller apaf 1'in mitokondriden ayrılmasına neden olur, bu ayrılma dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırır. Bu geçirgenlik artışı, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom c'nin sitozole çıkmasına yol açar. Sitokrom c'nin sitoplazmada apaf 1, kaspaz 9 ve ATP ile birleşmesi ile oluşan apoptozom, sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3'ü aktive ederek apoptoza neden olur (Gobe vd., 1999).

Hücrede iç veya dış nedenlerle DNA hasarı oluştuğunda aktive olarak apoptoza neden olabilen genlerden en önemlisi p53 genidir. İnsan tümörlerinin yarısından fazlasında mutasyona uğradığı saptanan bu genin kanser oluşumunu önlemede önemli rol oynadığı kabul edilmektedir. Normalde inaktif durumda bulunan p53 geni hücrenin geç G 1 fazında kalarak S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre siklusu durdurularak oluşmuş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. p53 geni DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler ile DNA hasarı tamir edilirse hücrenin siklusundaki blok ortadan kalkar.

Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa bu gen bax proteinini aktive ederek mitokondri aracılığıyla hücrenin apoptoza giderek ölümünü sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılır **(**Mountz ve Zhou, 2001; Feri ve Kroemer, 2001). Bir hücrede hücre içi bcl-2/bax oranı hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğine karar vermede son derece önemlidir. Eğer bax fazla ise hücre apoptoza gidecektir, bcl-2 fazla ise apoptoz inhibe olacaktır.

4.4.3 Hücrede Oluşan Biyokimyasal ve Morfolojik Değişiklikler:

4.4.3.1 Biyokimyasal Değişiklikler

Sonlandırıcı kaspazlar aktive olduktan sonra sitoplazmada ve çekirdek içinde hedef proteinleri yıkarlar.

4.4.3.2 DNA Kırıklarının Oluşumu

Hedef proteinlerden biri olan DNA endonükleaz ile çapraz bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren Ca^{++}- Mg^{++} bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur. Kırıklar nükleozomların arasından mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılma oluşur (Sheikh ve Fornace, 2000).

4.4.3.3 Hücre İskeletinin Yıkılması

Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan proteindir. Aktin filamentlerının yıkımı ile hücre normal şeklini kaybeder (Sheikh ve Fornace, 2000).

4.4.3.4 Hücre Membranı Değişiklikleri

Kaspazların etkisiyle hücre zarının asimetrisi bozulur. Plazma zarının iç yüzündeki fosfatidilserin yer değiştirerek zarın dış yüzüne yerleşir. Ayrıca bazı apoptotik hücreler hücre zarlarında thrompospondin adlı adheziv bir glikoprotein ve bazı hücrelerin adhezyon molekülleri (ICAM 3)'i içerirler. Bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilip fagositozlarını sağlarken, transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerinde oluşan çapraz bağlanmalar membranların parçalanmasını ve apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlarlar (Mountz ve Zhou, 2001).

4.4.3.5 Morfolojik Değişiklikler

Hücreler özelleşmiş yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülüp büzüşürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organellerin birbirine yaklaştığı gözlenir. Membranlar bütünlüklerini korurlar. Organeller ise genelde sağlamdır, bazen ribozomlarda çökme izlenebilir. Sitoplazmada yüzeye paralel olarak yerleşmiş olan mikroflaman kümeleşmeleri ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar. Morfolojik olarak en önemli değişiklikler nukleusta izlenir. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak değişik şekil ve büyüklükte çöker. Elektron mikroskobik incelemede kromatinin yoğun granüler yarımay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği gözlenir. Çekirdekte hücre gibi büzüşür ve bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nükleer porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar (Mountz ve Zhou, 2001).

Apoptoz hematoksilen-eozin ile boyanmış kesitlerde ışık mikroskobunda da izlenebilir. Hücreler koyu eozinofilik sitoplazmalı, bir veya birkaç parçalı piknotik çekirdekli olarak görünür. Çekirdek, kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle hilal veya yarımay şeklinde izlenebilir. Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara ayrılır. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimler meydana gelir (Mountz ve Zhou, 2001).

4.4.4 Fagositoz

Apopitotik cisimler çevredeki parenkim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokulardan temizlenirler.

5. HÜCRE HATLARI VE HÜCRELERDE TOKSİSİTENİN GÖSTERİLMESİ

5.1 Hücre Hatları

Toksisite incelemeleri in vitro olarak hücre hatları kullanılarak yapılmaktadır. Çalışmada iki tür hücre hattı kullanıldı. Bunlar MCF 7 ve L-929 hücre hatlarıdır.

MCF 7 insan adenokarsinomu kaynaklıdır. Östrojen pozitiftir. İnvaziv değildir. Hücreler monolayer olarak büyür. Her 2-6 gün de bir tripsin-EDTA ile pasajlanarak subkültürleri yapılabilir. $0.1\text{-}0.2x10^5$ hücre/cm^2 de olacak şekilde ekim yapılır. 37 ^{o} C'de %5 CO_2 ortamında büyür.

L 929 fare fibroblast hücresidir. Monolayer olarak büyür. Subkültürü yapılırken sadece tripsin kullanılır. Yüzey kaplaması olduysa haftada 2-3 kez pasajlanarak subkültürleri yapılabilir. $1x10^6$ hücre/cm^2 de olacak şekilde ekim yapılır. 37 ^{o} C'de %5 CO_2 ortamında büyür (2).

5.2 Hücrelerde Toksisitenin Gösterilmesi

5.2.1 MTT testi

MTT testi indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir (Mossman, 1983). Hücre canlılığını ve üremesini ölçen bu yöntemin, diğer sitotoksik test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir olması, uygulamasının kolay, hızlı ve sayılabilir olması avantaj olarak belirtilmiştir.

İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan, daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için çok sık kullanılan pratik bir yöntemdir (Mosmann, 1983; Alley vd., 1988). MTT yöntemi ile bir hücre topluluğunda ki canlı hücrelerin oranı kalorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Arjan ve arkadaşları, MTT test yönteminin sitotoksisitenin belirlenmesinde kullanışlı, hassas ve hızlı bir metod olduğunu, ayrıca radyoaktif izotop kullanmaya gerek kalmadığını belirtmişlerdir (Loosdrecht vd., 1991). Wilson ve arkadaşları, MTT'den üreyen formazonun yoğunluğunun direkt olarak yaşayan hücrelerin sayısıyla bağlantılı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu yöntemi, kanserli hastaların tedavisinde kullanılan ilaçlar üzerinde denemişler ve elde ettikleri klinik sonuçların, MTT sonuçlarıyla paralel olduğunu belirtmişlerdir (Wilson vd.,1990).

Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondirinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon frajil bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağımlıdır.

MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir (Alley vd., 1988). Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir. (Abe ve Matsuki, 2000). Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır.

Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır.

5.2.2 Tripan Mavisi Testi

Tripan mavisi gibi ölü hücrelerin boyanmasını sağlayan boyalar aracılığıyla süspansiyondaki hücrelerin canlılığı tespit edilir. Hücre canlılığı, bu boyaların % 0,9' luk tuzlu suda hazırlanmış solüsyonlarının hücre süspansiyonuna eklenmesi sonucunda çok küçük hacimdeki hücre süspansiyonunun içerdiği canlı hücrelerin toma lamı gibi bir hemositometre aracılığıyla mikroskop yardımıyla sayılmasıyla belirlenir. Tripan mavisinin (% 0.5–1) solüsyondaki proteinlere olan affinitesi canlı olmayan hücrelere olan affinitesindan daha yüksektir. Eğer hücre süspansiyonundaki serum miktarı % 1'den fazla ise bu metodun doğruluğu azalabilir (Gürtürk, 1977).

Boya ile hücre süspansiyonu 1:1 oranında karıştırılır ve 37 ^{o}C'de 5 dakika tutulur. Daha sonra toma lamında mikroskopta sayılır. Canlı hücreler tripan mavisi boyasını geçirmez. Hücre membranının herhangi bir nedenle zarar görmesi halinde söz konusu boya hücre içeriğine girer ve stoplazmayı boyar. Bu durumda mikroskobik incelemede canlı hücreler parlak ve şeffaf renkte, ölü hücreler ise mavi olarak boyanır (Brain vd., 1996).

5.2.3 DAPI

Memeli hücreleri meydana gelen hücresel hasarı ortadan kaldırmak için apoptoza giderler. DAPI boyası ile boyanan bütün hücrelerin çekirdekleri floresan mikroskobi incelemesinde mavi görüntü vermektedir (Jack, vd., 2002). Yuvarlak lameller üzerine ekilen hücreler büyüyüp çoğaldıktan ve etkisi incelenecek ajanla muamele edildikten sonra morfolojik olarak gözlemlenen hücre ölümünü daha iyi karekterize edebilmek için 4,6-diamidino 2 phenylindole (DAPI) ile boyanır ve floresan mikroskopta incelenir. DAPI çift zincirli DNA ile floresan kompleks oluşturur. DAPI ile kromotin yoğunlaşması ve nükleer fragmanları içeren apoptotik cisimciklerin oluşması gibi apoptotik hücre ölümünün tipik morfolojileri gözlenir. Florasan mikroskopla apoptotik hücrelerin morfolojik değişimleri incelenerek sayım yapılır. Apoptotik değer rastgele seçilmiş bir alanda apoptotik hücre sayısı total hücre sayısı ile karşılaştırılarak elde edilen yüzde oranı olarak hesaplanır ve bu değer birbirinden bağımsız 3 deney ortalamasını temsil eder (Hendzel vd., 1998).

6. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

6.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

6.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- ELISA
- Etüv
- pH Metre (İnolab WTW Level 1)
- Hassas Terazi (Precisa XB 220A)
- Kaba Terazi (Precisa BJ 6100D)
- Santrifüj (Hettich ZENTRIFUGEN – EBA20)
- Vorteks (Heidolph REAX top)
- Bidistile Su Cihazı
- Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (Heidolph MR 3001)
- Laminar-Hava Akışlı Kabin
- İnkübatör (37 ^{o}C %5 CO_2'li)
- Ters Mikroskop
- - 45 ^{o} C Derin Dondurucu
- Sıvı Azot Tankı
- Otoklav

6.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 6. 1 Deneyde kullanılan sarf maddeler

MADDE ADI	ÜRETİCİ FİRMA	KATALOG NO
Poliakrilik Asit (PAA)	Aldrich	523925
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Riedel de Haen	06203
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck	100314
Azot Gazı (N_2)	BOS	-
DMEM	Sigma	D5546
Nutrient Mixture F-12	Sigma	N6658
L-Glutamin	Biological Industries	03-020-IC
Penisilin-Streptomisin (PEST)	Biological Industries	03-031-IC
Fetal Sığır Serumu	Seromed	S0115
Tripsin EDTA	Biological Industries	03-051-5B
DMSO	Sigma	D2650
Sodyum Klorür (NaCl)	Atabay	AT091-950
Potasyum Klorür (KCl)	Carlo Erba	360107
Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4)	Riedel de Haen	81890
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)	Riedel de Haen	8210A
DAPI	Serva	18860
Metanol	Sigma-Aldrich	34860
Tripan Mavisi		
Tripsin	Biochrom	L 2103
EDTA	Merck	
Kapatma Solüsyonu (Aqueos Mount)	AML	060
Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (MT	Sigma	M5655-1G
DMSO	Ambresco	231

6.2 Deneyde Kullanılan Çözeltiler

6.2.1 1x PBS Çözeltisinin Hazırlanması

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Na_2HPO_4 1,44 g

KH_2PO_4 0,24 g

olacak şekilde tartım yapıldı. 900 ml deiyonize suda çözündürüldü. pH 7.4 olacak şekilde ayarlandı. Son hacim 1 litreye deiyonize su ile tamamlandı. Otoklav da 1 atm basınçta 121 ^{0}C' de 20 dakika steril edildi.

6.2.2 1x Tripsin Solüsyonunun Hazırlanması

Tripsin 62,5 mg tartıldı. 50 ml 1x PBS içinde çözündürüldü. Önce 0,45 µl' lik filtreden ve daha sonra 0,22 µl'lik filtreden geçirilerek steril edildi.

6.2.3 Medyumun Hazırlanması

DMEM ve F12 birebir oranında karıştırıldı. Fetal Sığır Serumu % 10 olacak şekilde eklendi.

6.2.4 Hücre Dondurma Medyumu

%80 Fetal Sığır Serumu ve %20 Dimetil Sülfoksit olacak şekilde 5 ml dondurma medyumu hazırlandı. Daha sonra kullanılmak üzere küçük hacimlerde bölünerek -20 ^{0}C' de saklandı.

6.2.5 MTT Solüsyonunun Hazırlanması

Bir falkon tüpüne 5mg/ml olacak şekilde 25 mg MTT tartıldı ve 5 ml 1xPBS ile vorteks ile karıştırılarak çözündürüldü. Önce 0,45 µl' lik filtreden ve daha sonra 0,22 µl'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Hazırlanan bu MTT solüsyonu +4 ^{o} C de karanlık ortamda bir ay kadar saklanabilir. Kullanılacağı zaman istenilen konsantrasyon ve hazırlanacak miktarda bu stoktan alınıp kültür medyumu eklenerek deneylere uygulanır.

6.3 PAA' nın Konsantrasyonunun Hesaplanması

Deneylerde MA:100.000 olan ve ticari olarak satın alınan %35 g/ml PAA kullanıldı.

6.3.1 Son Konsantrasyon 50 mg/ml PAA' nın Hazırlanması

%35'lik (g/ml) PAA kullanıldığından dolayı 100 ml' de 35 g PAA bulunacaktır. Buna göre

son konsantrasyonu 50 mg/ml olan PAA ‘dan 50 ml hazırlamak için;

1 ml de	50 mg PAA
50 ml de	x

x = 2.500 mg PAA gerekli

35,0 g	100 ml de
2,5 g	x

x = 7,142 ml PAA

% 35’ lik PAA’dan 7,142 ml alınıp 35 ml 1x PBS eklenerek 48 saat çözünmesi için manyetik karıştırıcıya konuldu. pH 7.00 olacak şekilde ayarlandı. Son hacim 50 ml olacak şekilde 1x PBS ile tamamlandı. Önce 0,45 µl’ lik filtreden ve daha sonra 0,22 µl’lik filtreden geçirilerek steril edildi.

6.3.2 Son Konsantrasyon 0,5 mg/ml PAA’ nın Hazırlanması

Son konsantrasyon 50 mg/ml PAA olarak hazırlanan çözeltiden steril şartlar altında 100 µl alınarak 9.9 ml 1xPBS içerisinde çözündürüldü.

6.4 Hücre Kültürü

6.4.1 Nitrojen Tankında Kriyoprezervasyonu Yapılmış Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Nitrojen tankından çıkarılan kriyo tüp içerisindeki hücreler akan musluk suyu altında hafif olarak sallamak kaydıyla kısa sürede çözünür hale getirildi. Laminar kabin içerisinde steril şartlar altında 15 ml’lik bir santrifüj tüpüne 5 ml %10 FCS içeren DMEM-F12 medyumu konularak hücreler aktarıldı ve oda ısısında 1000 rpm’de 5 dak sanrifüj edildi. Üstteki sıvı kısım atıldı. Pellet süspanse hale getirilerek toma lamında sayım yapıldı. 25 cm^2’lik flasklara 7,5 ml % 10 FCS’lu DMEM-F 12 medyumu konularak üzerine $1x10^5$ hücre eklendi. Flaskın kapağı hafif açık bırakılarak 37 °C’ de %5 CO_2’li inkübatör de inkübasyona bırakıldı.

6.4.2 Hücre Kültürünün Tripsinizasyonu

İnkübasyon sonrası hücrelerle kaplanan flask içerisindeki besiyeri dökülerek flask yüzeyi 1xPBS ile yıkandı ve 1 ml tripsin ilave edilerek 5-10 dakika inkübatör de bekletildi. Yüzeyden ayrılan hücreler 5 ml PBS ile bir falkon tüpe aktarıldı. Oda ısısında 1.000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan hücre pelleti resüspende edildi.

6.4.3 Hücrelerin Sayılması

Toma lamı, üzerinde üçlü çizgilerle birbirinden ayrılmış 16 büyük kareden oluşan yivler bulunan özel mikroskop lamıdır. Her büyük karenin alanı 1 mm^2 'dir. Lam üzerine konulan sıvının derinliği 0.1 mm'dir. Sonuçta her büyük kare üzerindeki sıvı hacmi 10^{-4} ml' dir.

1 x 1 x 0.1 = 0.0001 cm^3 = 0.0001 ml (10^{-4} ml)

Toma lamanın alt ve üst kısmındaki iki adet büyük 16 karedeki hücreler sayılıp aritmetik ortalamalar alındı. Daha sonra aşağıdaki formül ile istenilen dilüsyon yapıldı.

$$\text{Dilüsyon Miktarı} = \frac{\text{Başlangıçtaki Dilüsyon İçin Katılan Miktar} \times \text{Ortalama Sayılan Hücre Sayısı} \times \text{10.000 (Sabit)}}{\text{ml. de İstenilen Hücre Sayısı}}$$

Örneğin ml'de 100.000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu elde etmek istiyoruz. Toma lamının bir tarafındaki 16 karede sayılan hücre sayısı 60, diğer tarafındaki hücre sayısı 40 olsun. Başlangıçtaki hücre pelleti 5 ml üretme besiyeri ile dilüye edilmiş olsun. Buna göre;

Ortalama hücre sayısı = 60 + 40 = 50

Dilüsyon miktarı = (5 x 50 x 10.000) / 100.000 = 25

Hücre pelleti üzerine toplam 25 ml olacak şekilde besiyeri konulursa her ml'de 100.000 hücre olacaktır. Buna göre başlangıçta 5 ml olan hücre süspansiyonuna 20 ml üretme besiyeri ilave edilmelidir.

6.4.4 Hücrelerin Dondurulması

Hücreler tripsinize edildikten sonra elde edilen hücre süspansiyonundan 1.000.000 hücre olacak şekilde hücreler alınarak, 150 µl dondurma medyumu içersinde dondurma tüpüne konuldu. Tüpler hücre dondurma kabına yerleştirilerek 1 saat +4 °C 'de, 2 saat -20°C 'de, gece boyu –45 °C 'de kaldıktan sonra sıvı nitrojen tankına kaldırıldı.

6.4.5 Farklı Hücre Hatlarının Adaptasyonunun Sağlanması

Çalışmalarımızda kullandığımız hücre hatlarımızdan MCF 7 hücre hattı İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümünden, L-929 hücre hattı ve X63AG8.653 (fare miyoloma) hücre hattı ise Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümünden temin edilmiştir.

6.4.6 MCF 7 Hücrelerinin Laboratuvar Kültürünün Hazırlanması

İstanbul Bilim Üniversitesinde 10.08.2006 tarihinde dondurulmuş ve nitrojen tankında muhafaza edilen kriyo tüp içersindeki MCF 7 hücreleri, içerisinde azot bulunan taşıma tankına yerleştirilerek uygun şartlar altında 25.12.2006'da laboratuvara getirildi. Hücrelerin bulunduğu kriyo tüp +4 ºC'lik soğuk odada bulunan nitrojen tankına kaldırıldı.

Kültür edilmek üzere 27.12.2006' da nitrojen tankından çıkarılan kriyo tüp içersindeki MCF 7 hücreleri çözündürülerek %10 FCS içeren DMEM-F12 medyumu içersinde sanrifüj edildi. Pellet 10 ml %10 FCS içeren DMEM-F12 medyumu ile süspanse edilip 25 cm^2'lik flaska aktarıldı. Flask 37 ºC'de %5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırıldı. Flasktaki hücrelerin flask yüzeyini kaplaması 9 gün boyunca her gün ters mikroskopta incelenerek takip edildi. Tüpün dibinde kalan 50 µl hücre süspansiyonu toma lamı ile sayıldı. Kültürün 48. saatinde flaskın içersindeki medyum atılarak yeni 10 ml %10 FCS içeren DMEM-F12 eklendi ve hücreler kültüre devam etti. Kültürün 7. gününde flask içersindeki medyum tekrar atılarak üzerine 10 ml %10 FCS içeren DMEM-F12 konularak kültüre devam etti. Kültürün 9. günü tamamen yüzey kaplaması olduktan sonra kültür tripsinize edildi. Bu hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak toma lamında sayım yapıldı. Sayım yapmış olduğumuz 10 ml'lik hücre süspansiyonunun 3.5'ar ml'si yeni birer 25 cm^2'lik flasklara aktarıldı. Bu iki flaskın üzerine 6.5 'ar ml %10 FCS içeren DMEM-F12 konuldu. Flasklar 37 ºC'de %5 CO_2 inkübatöre kaldırıldı ve 24 saat sonra mikroskobik olarak incelendi.

6.4.7 L-929 Hücrelerinin Laboratuvar Kültürünün Hazırlanması

L-929 hücreleri, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarında 30.04.2007 tarihinde nitrojen tankından çıkarılarak 37 ºC su banyosunda çözündürülüp medyuma aktarılarak santrifüj edildi. Hücre pelleti 5 ml medyumda süspanse edilerek ekim yapıldı. Burada kullanılan medyum DMEM/HAM'S F12 (Biochrom F4815) 'dir. Bu medyumun içerisine kullanılmadan önce %15-20 FCS, %1 L-Glutamin, 2x penisilin-streptomisin, 50µg/ml Gentamisin, %1 Hepes konulur. Bu kültür laboratuvara, flask tamamen medyum ile doldurulup ağzı sıkıca kapatılarak oda ısısı şartlarında getirildi ve bir gece bu koşullar altında bekletildi. Sonuçta flask kültürü 18-20 saat inkübatör ortamından uzak kaldı. Hücreler laboratuvara geldiğinde ters mikroskopla mikroskobik olarak incelendi. Flask içersinde 5 ml medyum bırakılarak arta kalan fazla medyum bir falcon tüp içersine daha sonra hücrenin adaptasyonluğu açısından kullanılmak üzere konuldu. Flask 1 gece inkübatörde kaldıktan sonra tekrar mikroskobik inceleme yapıldı. Sonrasında hücreler EDTA'sız tripsin ile tripsinize edildi. Hücre pelleti 5 ml flask üzerinden alınan medyum ve 5

ml %10 FCS içeren DMEM-F12 medyum ile süspanse edilerek 5'er ml olacak şekilde 2 flaska ekim yapıldı. 48 saatlik inkübasyondan sonra mikroskobik olarak incelendi. Daha sonra flasktaki hücreler EDTA'sız tripsinle yüzeyden kaldırılarak toma lamı ile sayım yapıldı. Sayımdan sonra bir flask içersine 2.5 ml kendi medyumu ve 2.5 ml %10 FCS içeren DMEM F12 konuldu. Üzerine 300.000 L-929 hücresi ekildi ve inkübatöre kaldırıldı. Kalan hücreler ise 150 µl dondurma medyumu içersinde kriyo tüplere aktarılarak 1 saat + 4 ºC'de, 2 saat – 20 ºC'de, bir gece -45 ºC'de kaldıktan sonra nitrojen tankına kaldırıldı. Ekim yapılan flasktaki hücreler ise 48 saat sonra mikroskobik olarak incelendi.

Hücreler dondurulduktan 15 gün sonra nitrojen tankından çıkarılarak kültüre edildi. Bir flaska 2.5 ml hücrelerin kendi medyumu ve %10 FCS içeren 2.5 ml DMEM F12 konularak 300.000 L-929 hücresi ekildi. Başka bir flaska da 5 ml %10 FCS içeren DMEM F12 konularak üzerine 300.000 L-929 hücresi ekildi ve mikroskobik olarak incelenerek her iki flaskta 48 saat inkübatöre kaldırıldı. 48 saat sonra tekrar mikroskobik inceleme yapıldı. Flasklardaki hücreler tripsinizasyon işlemi uygulanarak sayıldı.

6.4.8 X63AG8.653 Hücrelerinin Laboratuvar Kültürünün Hazırlanması

X63AG8.653 hücreleri de L-929 hücreleri gibi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarında nitrojen tankından 30.04.2007 tarihinde çıkarılarak çözündürülüp sonrasında medyum içersinde santrifüj edildi ve pellet flaska ekildi. Bu hücrelerde de kullanılan medyum DMEM/HAM'S F12 (Biochrom F4815) 'dir. Kullanılmadan önce içersine %15-20 FCS, %1 L-Glutamin, 2x penisilin-streptomisin, 50µg/ml Gentamisin, %1 Hepes konulur. Bu kültür laboratuvara, inkübatörde ki 8 saatlik bir inkübasyon sonrasında flaskın içersinin tamamen medyum ile doldurulup ağzı sıkıca kapatılarak buz kalıpları konulmuş strofor kap içersine yerleştirilerek getirildi ve bir gece bu koşullar altında +4 ºC 'de bekletildi. Mikroskobik inceleme sonrasında kültür içersinde süspanse olan hücreler tüplere aktarılarak santrifüj edildi. Üst sıvı hücrelerin adaptasyonluğunu sağlamak için sonradan kullanılmak üzere bir falkon tüpte toplandı. Pellet ise 10 ml ayrılan medyumda süspanse edilerek 2 ayrı flaska aktarıldı ve 24 saat sonra mikroskobik inceleme yapıldı. Hücrelerin pasajlanması için medyum içersinde süspanse olan hücreler bir tüpe toplanarak santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı. Pellet 5 ml santrifüj sonrası saklanan medyum ve 5 ml %10 FCS içeren DMEM-F 12 medyum ile süspanse edilerek 5'er ml olacak şekilde 2 flaska ekim yapıldı. 48 saatlik inkübasyonun mikroskobik incelemesi yapıldı. Flasktaki hücreler pasaj için santrifüj yapılarak toma lamı ile sayım yapıldı.

Flask içersine 2.5 ml kendi medyumu ve 2.5 ml %10 FCS içeren DMEM-F12 konuldu. Üzerine 300.000 X63AG8.653 hücresi ekildi. Kalan hücreler ise 150 µl dondurma medyumu içersinde kriyo tüplere aktarılarak 1 saat +4 ºC'de, 2 saat – 20 ºC'de, bir gece -45 ºC'de kaldıktan sonra nitrojen tankına kaldırıldı. Ekim yapılan flasklardaki hücreler 48 saat sonra mikroskobik olarak incelendi. X63AG8.653 hücreleri dondurulduktan 15 gün sonra nitrojen tankından çıkarılarak kültüre edildi. Bir flaska 5 ml kendi medyumu ve başka bir flaska da 5 ml %10 FCS içeren DMEM-F12 konularak üzerine 300.000 X63AG8.653 ekilerek mikroskobik olarak incelendi ve her iki flaskta 48 saat inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon sonrası mikroskobik olarak tekrar incelenen hücreler santrifüj yapılarak sayıldı.

6.5 Laboratuvarda Çeşitli Hücre Hatlarından Kriyobankın Oluşturulması

İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümünden getirilen MCF 7 ile Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümünden getirilen L-929 ve X63AG8.653 hücre hatlarının öncelikle laboratuvarımızda kültür devamlılığının olabilmesi için uygun şartlar altında adaptasyonluğu sağlandı. Daha sonrasında da deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere istediğimiz zaman elimizde yeterli sayıda hücre bulunması amacıyla hücrelerin pasajları yapılarak uygun şartlarda kriyo tüplerde dondurma işlemi uygulandı. Dondurulan kriyo tüplerdeki hücrelerin özelliklerini kaybetmeden uzun süreler saklanabilmesi için nitrojen tanklarına kaldırıldı.

6.6 Çeşitli Hücre Kültürlerinde Kriyoprezervasyon

Kriyoprezervasyon için kültüre ettiğimiz MCF 7 hücrelerini kullandık. Kriyoprezervasyon işlemi için kriyotank, strofor kutu, kapaklı santrifüj tüp standı olmak üzere 3 farklı dondurma kabı kullanıldı. Kriyoprezervasyondan önce ve sonra hücrelerin toplam sayısı, canlı ve ölü hücre sayısı tripan mavisi boyası kullanılarak tespit edildi.

Flask içersinde MCF 7 hücreleri üreyip tüm yüzeyi kapladıktan sonra tripsinize edildi. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı atıldı ve hücre pelleti süspanse hale getirildi. Kriyoprotektan madde olarak %20 DMSO ve %80 FCS içeren dondurma medyumunda ml'de 1.10^6 hücre olacak şekilde karıştırılan hücre süspansiyonu 1.5 ml'lik kriyo tüplerine konuldu. Daha sonra hücrelerin kriyoprezervasyonu için 3 farklı kutu ile dondurma metodu uygulandı. Sonuçta aynı flaskta büyütülüp çoğaltılan hücreler tripsinize edilip hücre pelleti elde edildikten sonra, aynı dondurma medyumu ile karıştırılıp, aynı sayılarda aynı özellikteki tüplere konuldu. Bu noktadan sonra tüplerin bir kısmı kriyotanka, bir kısmı strofor kutuya, bır

kısmı da kapaklı santrifüj tüp standına yerleştirildi. Daha sonra bu 3 kutuda kapakları kapatılarak 1 saat + 4 ºC'de, 2 saat - 20 ºC'de, 1 gece - 45 ºC'de bekletildikten sonra nitrojen tankına kaldırıldı.

Nitrojen tankında 45 gün muhafaza edilen kriyotüpler içindeki hücreler çözündürülerek hücre sayıları ve canlılıkları tespit edildi. Daha sonra 5 ml %10 FCS içeren DMEM-F12 medyumu içinde santrifüj edildi. Pellet süspanse edildikten sonra sayım yapıdı. Sayım sonrası 7.5 ml %10 FCS içeren DMEM-F12 medyumu flasklara konularak üzerine her bir kriyo tüpünden 150.000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonundan eklendi. Kültür flaskları 37 ºC'de %5 CO_2 içeren inkübatöre kültüre edilmek üzere kaldırıldı. Hücrelerin adezyonları, morfolojileri ve gelişmeleri ters mikroskopla düzenli olarak her gün takip edildi.

6.7 Deneysel Çalışmalarda Kullanılacak Hücre Sayısının Çeşitli Plaklarda Optimizasyonu

Bu çalışma deney aşamasında mililitre başına kullanmamız gereken standart hücre sayısını belirlemek amacıyla yapıldı.

Deney için 96 kuyucuklu mikroplak kullanıldı. Her bir kuyucuğa olması istenilen hücre sayısı kadar hücre 100 µl DMEM-F12-%10 FCS medyumun içersine konularak ekim yapıldı. Mikroplakta her bir hücre sayısı için 5 ayrı kuyucuğa ekim yapıldı ve ters mikroskop ile 7 gün yüzey kaplaması takibi yapıldı**.**

6.8 PAA'nın Toksisitesinin MCF 7 ve L 929 Hücrelerinde İncelenmesi

6.8.1 MTT Deneyinin Yapılışı

Bir falkon tüp içerisine 10 ml %10 FCS içeren DMEM-F12 konuldu ve üzerine 1. 105 /ml hücre eklendi. İyi bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra 96 kuyulu mikroplakların 48 kuyucuğunun her birine bu süspansiyondan 100 µl konuldu. Mikroplak 37 °C de %5 CO2 'li inkübatörde 48 saat kültüre olması için inkübasyona bırakıldı. 48 saat kaplama sonucunda değişik konsantrasyonlarda ki toksik etkisi incelenecek olan poliakrilik asit kuyucuklara eklendi. Hücresiz olarak medyum ile poliakrilik asidin etkileşiminin değerlendirilebilmesi için; yine her biri 4'er kuyucuk olacak şekilde medyum ile bu deneyde kullanılan farklı konsantrasyonlarındaki poliakrilik asit miktarları hücre ekilmeyen boş kuyucuklara eklendi. Mikroplak 24 saat 37 °C 'de %5 CO2 'li inkübatörde tekrar inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra hücreler ters mikroskopta incelenerek meydana gelen sitopatolojik değişiklikler tespit edildi ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı. 30 µg MTT/ 50 µl medyumda olacak şekilde

hazırlandı ve her kuyucuğun medyumunun üzerine bu hazırlanan MTT'den 50 µl eklendi. Kültüre edilen bu mikroplak 24 saat 37 °C de %5 CO2 'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası mikroskobik incelemeyle hücreler üzerinde meydana gelen formazan kristal oluşumuna bakıldı. Hücreler üzerinde oluşan bu formazan kristaller DMSO ile oda ısısında 1 saat inkübe edilerek çözündürüldü. Bunun için mikroplak kuyucuklarındaki 100 µl hücreli, hücresiz PAA'lı kültür medyumu ve 50µl MTT solüsyonunu üzerine 150 µl DMSO eklendi. DMSO ile inkübasyonun sonucunda mikroplak ELİSA ile 570 nm de okutuldu ve sonuçlar hesaplandı.

6.8.2 Tripan Mavisi Boyası İle Hücre Canlılığının Tespiti

Flaskta kültüre olan hücreler tripsinlenerek sayım yapıldı. 24 kuyucuklu pleytin her bir kuyusuna 500 µl %10 FCS içeren DMEM-F 12 medyumu konuldu. Üzerine 50.000 hücre ekildi. Pleyt 37°C de %5 CO_2 'li inkübatörde 48 saat kültüre olması için inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyondan sonra poliakrilik asidin incelenecek olan konsantrasyonları kuyucuklara eklendi ve pleyt etkileşim için 24 saat 37 °C de %5 CO_2 'li inkübatöre kaldırıldı. Poliakrilik asidin hücreler üzerinde 24 saatte medyana getirdiği değişiklikler ters mikroskopla incelendi. Mikroskobi incelemesi sonunda kuyucuklardaki medyum atılarak PBS ile yıkandı ve 100 µl tripsin eklenerek 5-10 dakika inkübatörde bekletildi. Yüzeyden kalkan hücreler 900 µl DMEM-F12-%10 FCS eklenerek eppendorph tüplere aktarıldı. Başka bir tüpe 50 µl bu hücre süspansiyonundan ve 50 µl tripan mavisi eklendi. 2-3 dakika beklendikten sonra toma lamında ışık mikroskobunda sayım yapıldı. Sayım sonucunda içlerine tripan mavisini almayan hücreler canlı, içlerine tripan mavisini alan hücreler ölü hücre olarak kabul edildi.

6.8.3 Hücre Kültüründen Etken Dozun Hesaplanması

Mikroplak kuyularındaki PAA ile muamele edilmiş hücreler ters mikroskopta morfolojik olarak tespit edilip, MTT ile formazan kristallerinin oluşumu gözlenip, DMSO ile bu kristaller çözündürülüp ELİSA 570 nm ile okutuldu. Her bir PAA konsantrasyonu için ayrı ayrı uygulanan 4 farklı kuyucuklardan elde edilen sonuçların ortalaması alındı. Ayrıca her bir farklı PAA konsantrasyonu için hücresiz kuyulardan elde edilen sonuçlarında ortalaması alındı. Hücreli kuyuların ortalama değerinden hücresiz kuyuların ortalama değeri çıkarılarak elde edilen değer aşağıdaki formüle uygulanarak % canlılık hesaplandı. Elde edilen bu sonuçlarla çizilen grafiğin eğrisinden hücre kültürünün %50 sini inhibe eden etken doz (EC_{50}) hesaplandı.

24 kuyucuklu plakta PAA ile muamele edilmiş hücreler ters mikroskopta morfolojik olarak tespit edilip, tripsinize edildikten sonra tripan mavisi boyası uygulanarak canlı ve ölü hücreler toma kamarası ile sayıldı. Aşağıdaki formülle kullanılarak % canlılık hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Deney}}{\text{Kontrol}} \times 100$$

6.8.4 DAPI ile Apoptoz Tayini

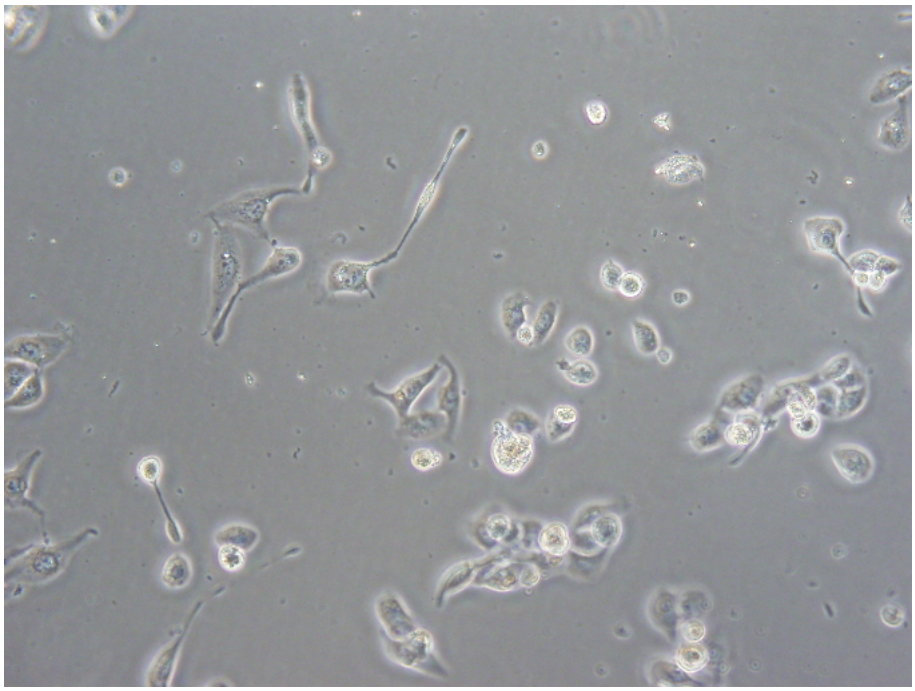
Flaskta kültüre edilen hücreler yüzey kaplamasını tamamladıktan sonra deneyde kullanılmak üzere tripsinize edilerek sayılır. Steril lameller 6 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğuna yerleştirilir. Lameller üzerinde 50.000 hücre olacak şekilde ekim yapılır. Hücrelerin lamele yapışması için 20 dakika inkübatörde inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası kuyucuklara 2 ml %10 FCS içeren DMEM-F12 konulur ve inkübatöre kaldırılır. Ekim yapıldıktan 2 gün sonra hücrelere istenilen konsantrasyonlarda poliakrilik asit eklenir ve 24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda lamellerin bulunduğu kuyularda ki medyumlar atılıp, kuyular PBS ile yıkanır ve ardından lameller üzerindeki hücreler 500 µl metanol ile 5 dakika – 20 º C de fikse edilir. Metanol kuyulardan uzaklaştırılarak tamamen kuyucukların kuruması için 20 dakika kadar oda ısısında beklenir. Kuruma tamamlandıktan sonra kuyular tekrar PBS ile yıkanır. PBS uzaklaştırldıktan sonra nükleer boyanma için 15 dakika 4,6-diamidino 2 phenylindole (DAPI) (0,1 µg/ml PBS) ile oda sıcaklığında kültür kabinin de karanlıkta bekletilir. DAPI kuyucuklardan uzaklaştırılarak 3 kez PBS ile kuyucuklar yıkanır. Temiz lamlar hazırlanır. Bu lamların üzerine birer damla saklama medyumu damlatılır. Lameller bu lamların üzerine ters olarak kapatılır. Fluoresan mikroskopta UV filtresi ile değerlendirme yapılır.

7. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

7.1 Çeşitli Hücre Hatlarının Laboratuvarda Adaptasyonu

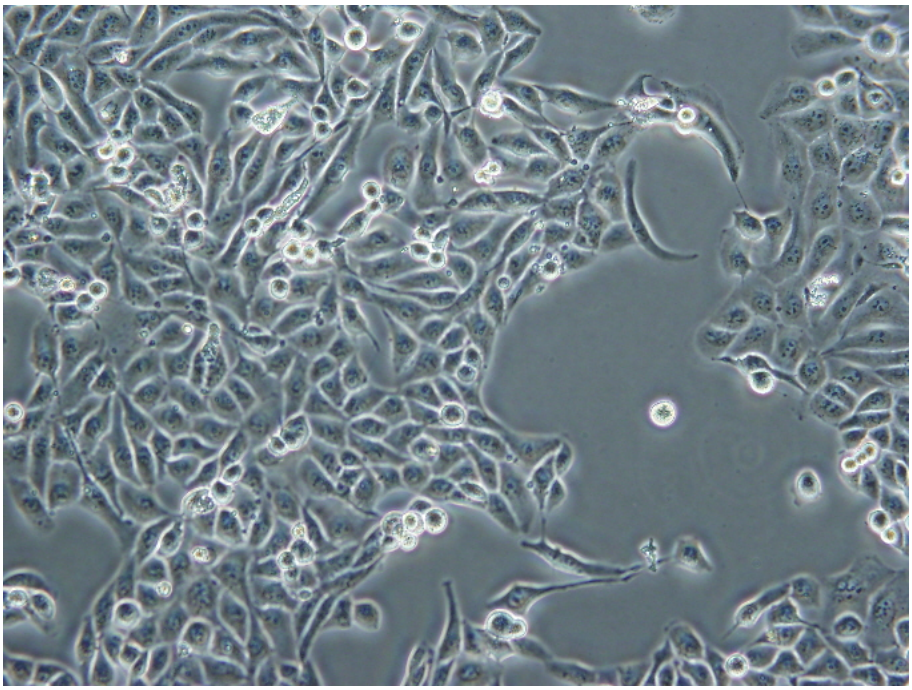
7.1.1 MCF 7 Hücrelerinin Laboratuvarda Adaptasyonu

Toma lamı ile sayım sonucunda flaska ml de 10.000 MCF 7 hücresi ekildi ve 24 saat sonra hücrelerin durumu mikroskobik olarak incelendi (Şekil 7.1).



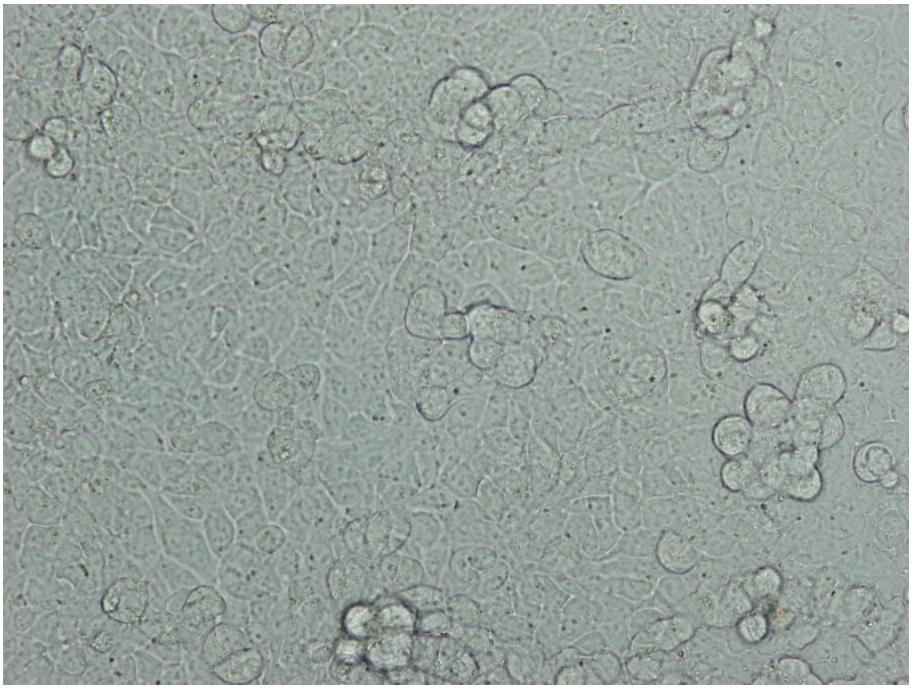
Şekil 7. 1 MCF 7 hücrelerinin 24 saat sonraki mikroskobik görüntüsü (20x).

Ekim yapıldıktan 48 saat sonra hücreler mikroskopta tekrar incelendiğinde; flask içersindeki hücrelerin büyük bir çoğunluğunun yüzeye yapıştığı ve az bir kısmının ise yüzen ölü hücreler olduğu tespit edildi. MCF 7 hücreleri kültürün 7. gününde flask yüzeyini yaklaşık olarak % 60-70 kapladı (Şekil 7.2).



Şekil 7. 2 MCF 7 hücrelerinin 7. gündeki mikroskobik görüntüsü (20x).

MCF 7 hücreleri kültürün 9. gununde flask yüzeyini tamamen tek tabaka olarak kapladı. Flaskın bazı kısımlarında ise ikinci katman oluşmaya başladı (Şekil 7.3).



Şekil 7. 3 MCF 7 hücrelerinin 9. gündeki mikroskobik görüntüsü (40x).

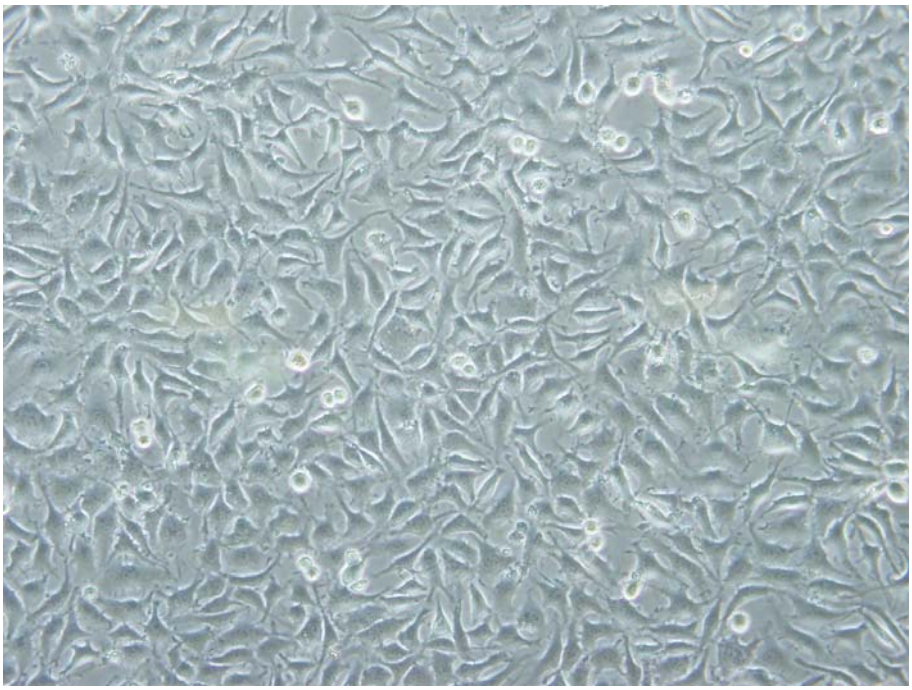
Sonuçta kültürün tripsinizasyonunun ardından yapılan sayımda 10.000 MCF 7 hücresi ekilen 25 cm^2'lik flaskın yüzeyinin tamamen kaplanması sonucunda 2.200.000 hücre elde edildi.

Sayımı yapılan bu hücre süspansiyonunun ikiye bölünerek tekrar ekimi yapıldığında, hücre sayısının fazla olmasından dolayı, 24 saat sonra mikroskop incelemesinde hücrelerin flask yüzeyini kapladıkları ve sağlıklı oldukları tespit edildi.

Böylece İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesinden laboratuvara getirilen MCF 7 hücreleri, yaklaşık 10 günlük bir adaptasyon sürecinden sonra, oluşturulan optimum şartlar altında istenilen miktarlarda üretildi. MCF 7 hücreleri kültüre konulduktan sonra her gün düzenli olarak kontrol edildi ve birinci pasaja ait hücrelerin flask yüzeyini yaklaşık 9 günde kapladığı gözlendi. Sonuçta ilk kez olarak Y.T.Ü Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültür Laboratuvarında devamlı hücre kültürü elde edilmiş oldu ve ileri ki çalışmalarda çeşitli amaçlarla kullanıldı.

7.1.2 L-929 Hücrelerinin Laboratuvarda Adaptasyonu

L-929 hücreleri 37 ºC ve %5 CO_2 'li inkübatörde 8 saatlik bir inkübasyon sonrasında 25 cm^2'lik flask yüzeyini yaklaşık % 80 kapladı. Flaska ekilen ve inkübasyon sonrası inkübatör ortamından 18-20 saat kadar uzak kalan L-929 hücreleri mikroskobik olarak incelendiğinde; hücrelerin yüzey uzantılarının biraz azaldığı ve bundan dolayı morfolojilerinde farklılık olduğu gözlendi. Flask yüzeyinde yüzen ölü hücre yoktu ve kültür medyumunun rengi de normaldi. İnkübatörde 24 saatlik bir inkübasyonun ardından hücrelerin durumu mikroskobik olarak tekrar incelendiğinde sağlıklı olduğu ve yüzey kaplaması yaptığı tespit edildi. Tripsinize edilen hücreler tekrar iki flask halinde ekilip 48 saat sonra incelendiğinde; hücrelerin yüzey kaplaması yaparak sağlıklı olduğu tespit edildi (Şekil 7.4). Sayım yapıldığında toplam 1.000.000 hücre/ml'de olduğu bulundu.



Şekil 7. 4 L 929 hücrelerinin 48 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x)

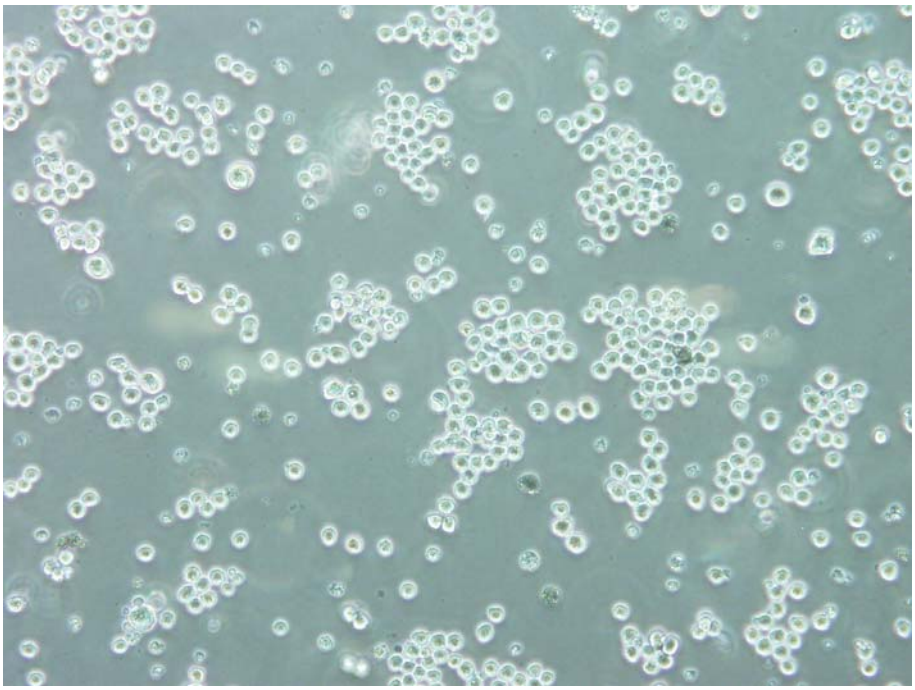
Sayım yapıldıktan sonra tekrar ekim yapılan flasktaki hücreler 48 saat sonra incelendiğinde hücrelerin yüzeyi kapladıkları ve sağlıklı oldukları gözlemlendi. Dondurulduktan 15 gün sonra nitrojen tankından çıkarılarak hücrenin kendi medyumu ve laboratuvarda kullandığımız medyum karışımı ile ayrı ayrı ekim yapılan L-929 hücrelerinin durumu inkübasyon öncesi mikroskopta incelendiğinde, hücrelerde herhangi bir anormallik gözlemlenmedi. 48 saatlik inkübasyon sonrası mikroskobik incelemesinde ise her iki flaskta da yüzey kaplaması olduğu ve flasklar arasında L-929 hücrelerinin morfolojileri ve yüzey kaplaması açısından herhangi bir fark olmadığı gözlemlendi. Sayım yapılarak; kendi medyumu ile çoğalan flaskta 1.750.000 hücre /ml de, laboratuvarda kullanılan %10 FCS içeren DMEM-F12 medyumu ile çoğalan flaskta 1.800.000 hücre /ml de olduğu tespit edildi.

Bütün bu işlemler sonucunda Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü laboratuvarından getirilen L-929 hücrelerinin laboratuvarımızda kültürünün devamlılığı için gerekli olan adaptasyonu sağlandı ve nitrojen tankında daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere uygun koşullarda çoğaltılarak muhafaza edildi.

7.1.3 X63AG8.653 Hücrelerinin Laboratuvarda Adaptasyonu

Flaska ekilen ve yaklaşık 8 saatlik inkübasyon sonrası inkübatör ortamından 18-20 saat kadar uzak kalan X63AG8.653 hücreleri mikroskobik olarak incelendiğinde; hücrelerin

morfolojilerinde bir farklılık gözlemlenmedi ve kültür medyumunun rengi de normaldi. Pasajlanan hücrelerin inkübatörde 24 saatlik bir inkübasyonu sonucunda tekrar incelendiğinde hücrelerin sağlıklı olduğu ve yüzeyde birikerek çoğaldığı tespit edildi. Pasajlanarak tekrar ekim yapılan ve 48 saat sonra incelenen hücrelerin çoğalarak yüzeyde biriktiği ve sağlıklı olduğu tespit edildi (Şekil 7.5). Yapılan sayım sonrasında toplam 1.500.000 hücre/ml'de bulundu.



Şekil 7. 5 X63AG8.653 hücrelerinin 48 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x)

Tekrar pasajlanan ve 48 saat sonra incelenen kültürde hücrelerin yüzeyde çoğalarak kümeler halinde biriktiği ve sağlıklı oldukları gözlemlendi.

Nitrojen tankından çıkarılarak kendi medyumu ve laboratuvarda kullandığımız medyum ile kültüre edilen hücreler ekimin hemen sonrası mikroskop ile incelendiğinde herhangi bir anormallik gözlemlenmedi. 48 saat sonra tekrar incelendiğinde her iki flasktada yüzeyde hücreler kümeler halinde çoğaldı ve flasklar arasında X63AG8.653 hücrelerinin morfolojileri ve çoğalmaları açısından herhangi bir fark gözlemlenmedi. Sayım yapıldı ve kendi medyumu ile çoğalan flask ile laboratuvarda kullanılan %10 FCS içeren DMEM-F12 medyumu ile çoğalan flasktaki hücreler arasında büyük bir fark belirlenmedi.

Yapılan bu işlemler sonucunda Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarından getirilen X63AG8.653 hücrelerininde L-929 ve MCF 7

hücrelerinde olduğu gibi laboratuvarda kültürünün devamlılığı için gerekli olan adaptasyonu sağlandı ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere uygun koşullarda çoğaltılarak nitrojen tankında saklandı.

Tüm bu deneyler sonucunda; 5 ay gibi kısa bir süreçte nitrojen tankında 40 adet MCF 7 kriyo tüp, 7 adet L-929 kriyo tüp ve 10 adet X63AG8.653 kriyo tüp bulunmaktadır. Y.T.Ü Biyomühendislik Bölümünde deneysel çalışmalarda kullanılacak hücre hatlarının sağlanabilmesi için MCF 7, L-929 ve X63AG8.653 olmak üzere 3 farklı hücre hattından toplam 57 kriyo tüp olmak üzere hücre hattı ve kriyo tüp sayısı hızla artan bir kriyobank oluşturulmuştur.

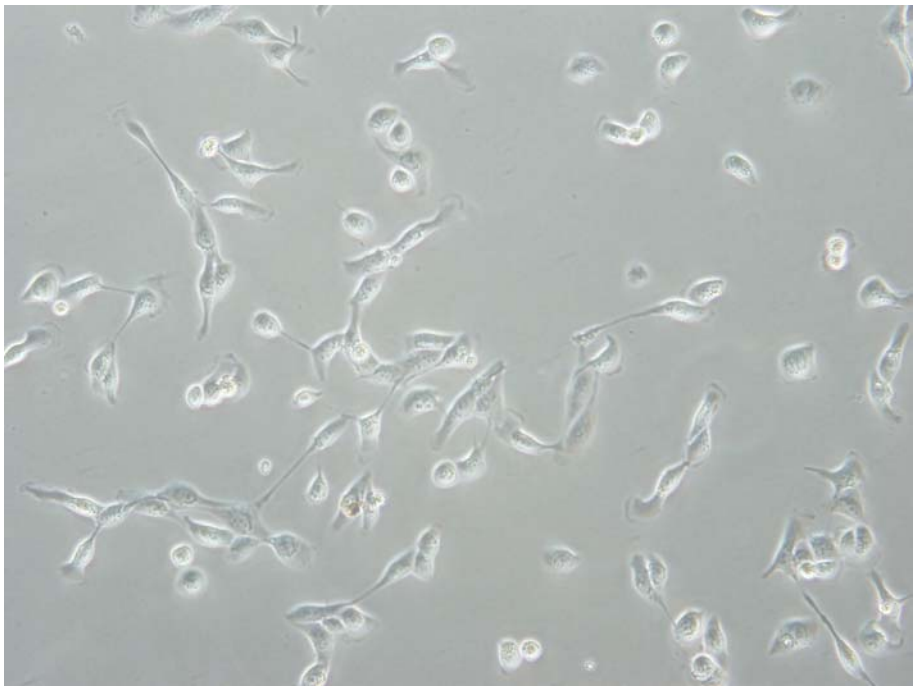
7.2 Hücre Kültürlerinde Saptanan Kriyoprezervasyon

Çizelge 7. 1 Dondurma öncesi, dondurma sonrası ve kültür sonrası MCF 7 hücrelerinin sayısı

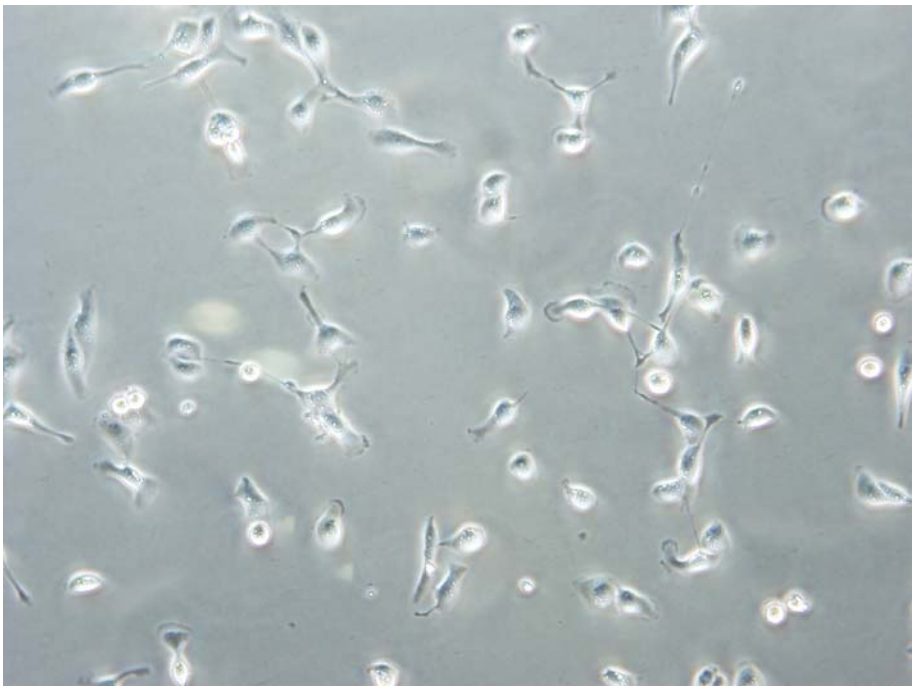
ml/hücre sayısı	Kriyo tank	Strofor kutu	Santrifüj tüp standı
Dondurma öncesi	1.000.000	1.000.000	1.000.000
Dondurma sonrası	900.000	850.000	700.000
Kültür sonrası	12.000.000	15.000.000	18.000.000

3 ayrı dondurma kabı ile dondurulmuş kriyo tüplerdeki MCF 7 hücreleri sayım yapıldıktan sonra, 3 ayrı flaska 150.000 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saatlik inkübasyon sonucunda yapılan mikroskobik incelemede; kriyo tank ve strofor kutu ile dondurulduktan sonra ekim yapılan flasklardaki MCF 7 hücrelerinin yüzeye yapıştığı, yüzey uzantılarını verdiği, her alanda 4-5 ölü hücre olduğu ve yüzey kaplaması olmadığı tespit edilirken, santrifüj tüp standı ile dondurulduktan sonra ekim yapılan hücrelerin de yüzeye yapıştığı ve yüzey uzantılarının olduğu gözlenmiştir. Fakat burada hücrelerin morfolojileri farklı görünmektedir (Şekil 7.6, 7.7, 7.8). 48 saatlik inkübasyon sonucunda yapılan incelemede ise 24 saatliğe benzer bir görünüm olmakla beraber hücre sayısında biraz artma olmuştur.

Şekil 7. 6 Kriyo tankında dondurulduktan sonra kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 24 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x).

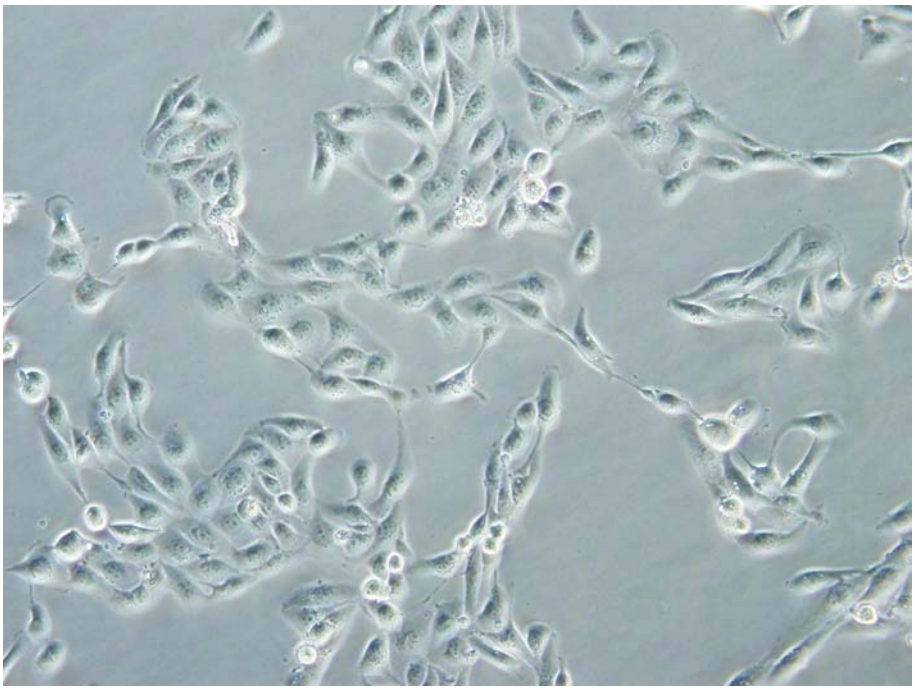


Şekil 7. 7 Strofor kutuda dondurulduktan sonra kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 24 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x).

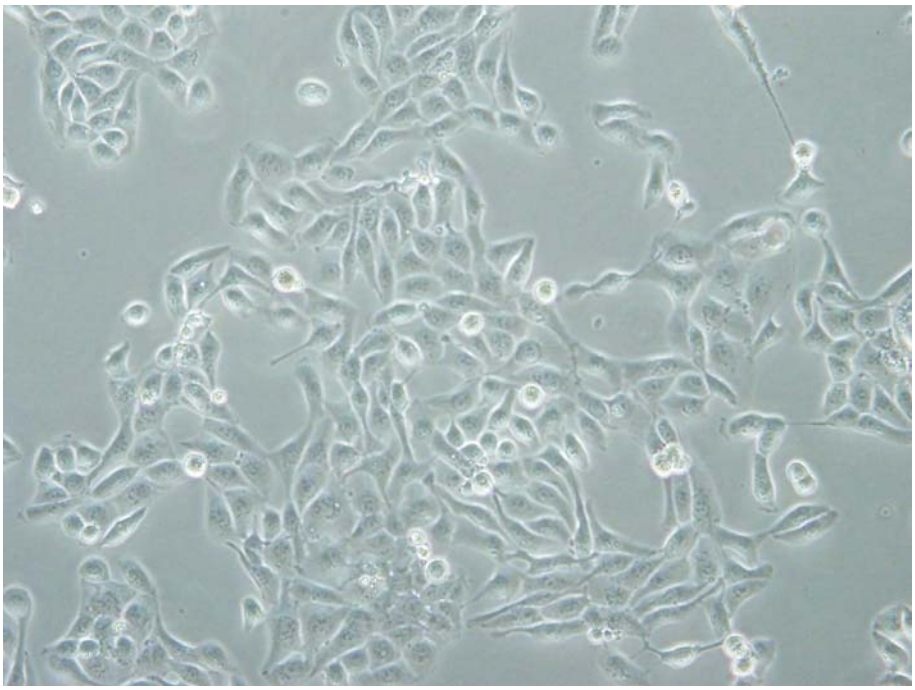


Şekil 7. 8 Santrifüj tüp standında dondurulduktan sonra kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 24 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x).

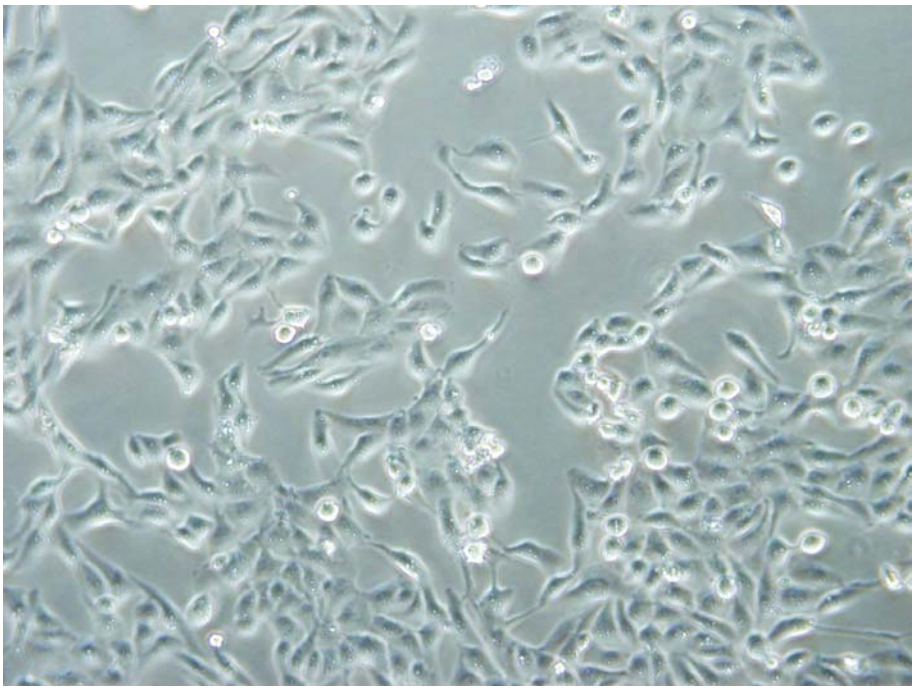
72 saatlik inkübasyon sonrası yapılan incelemede; kriyo tank ile dondurulduktan sonra ekim yapılan flasktaki MCF 7 hücreleri sağlıklı olup yaklaşık %40 yüzey kaplaması ve her alanda 5-6 ölü hücre olurken, strofor kutu ile dondurulduktan sonra ekim yapılan flasklardaki MCF 7 hücreleri sağlıklı olup yaklaşık %50 yüzey kaplaması ve her alanda 3-4 ölü hücre olduğu tespit edilmiştir. Santrifüj tüp standı ile dondurulduktan sonra ekim yapılan hücrelerin ise yaklaşık %60 yüzey kaplaması ve her alanda 5-6 ölü hücre olduğu tespit edilmiştir. Fakat burada hücrelerin morfolojik olarak daha farklı olduğu, normal MCF 7 morfolojisine göre daha büyük ve yüzey uzantılarının daha uzun olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 7.9, 7.10, 7.11).



Şekil 7. 9 Kriyo tankında dondurulduktan sonra kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 72 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x).



Şekil 7. 10 Strofor kutuda dondurulduktan sonra kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 72 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x).



Şekil 7. 11 Santrifüj tüp standında dondurulduktan sonra kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 72 saatlik mikroskobik görüntüsü (20x).

6 günlük inkübasyon sonucunda yapılan mikroskobik incelemede; kriyo tank ile dondurulduktan sonra ekim yapılan flasktaki MCF 7 hücreleri sağlıklı olup yaklaşık %90 yüzey kaplaması ve her alanda 5-6 ölü hücre olurken, strofor kutu ile dondurulduktan sonra ekim yapılan flasklardaki MCF 7 hücreleri sağlıklı olup yaklaşık %95 yüzey kaplaması ve her alanda 7-8 ölü hücre olduğu tespit edilmiştir. Santrifüj tüp standı ile dondurulduktan sonra ekim yapılan hücrelerin ise yaklaşık %95 yüzey kaplaması olurken hücrelerin morfolojik olarak daha büyük ve farklı olduğu tespit edilmiştir.

Aynı şartlar altında 3 farklı dondurma kutusu ile yapılan hücrelerin kriyoprezervasyonunda, 6 günlük kültür takibinde yapılan mikroskobik incelemeler sonucunda hücrelerin çözündürüldükten sonraki canlılık yüzdesi, kültür sırasındaki yüzey kaplaması, kültürde hücrelerin morfolojisi ve kültür sonrası elde edilen hücrelerin canlılığı açısından değerlendirildiğinde ilk kez ticari olarak laboratuvarlarda kullanılan kriyotank yerine strofor kutunun kullanılabileceği belirlendi.

7.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılacak Hücre Sayısının Saptanması

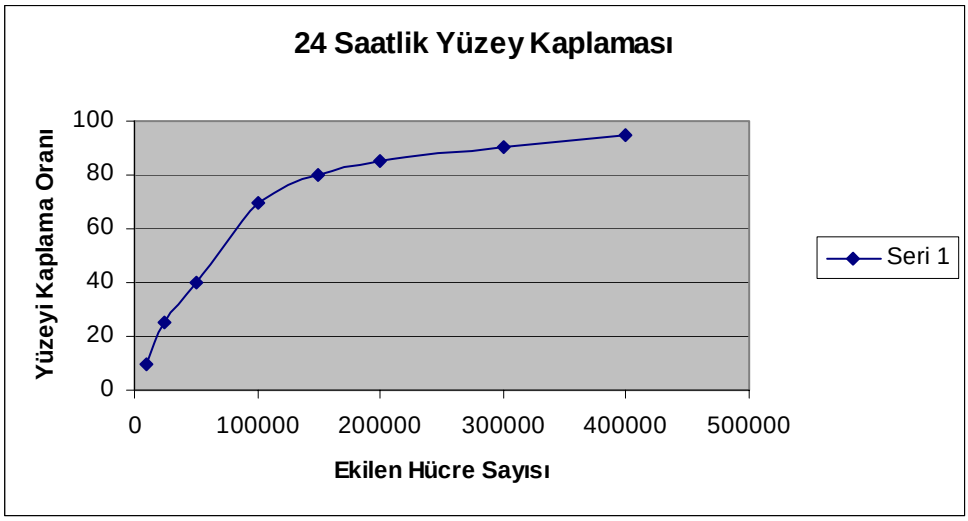
Deney için 96 kuyulu mikroplağa ekilen hücrelerin durumu kültürün 24. saatinde ters mikroskopla incelenmiştir: Buna göre; ml de 400.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklar da hücreler bütün kuyucuğun yüzeyini kaplarken, arada çok az boşluklar vardır.

Kuyucuklarda yaklaşık % 95 yüzey kaplaması olurken % 50 oranında ikinci katman oluşmuştur. Oluşan bu ikinci katman kuyucukların orta kısımlarındadır. ml de 300.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda ise hücreler kuyucuğun yaklaşık % 90'ını kaplarken kuyucuğun orta kısımlarında ikinci katman oluşmuştur. ml de 200.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda hücreler kuyucuğun yaklaşık % 85'ini kaplamıştır ve orta kısımda yine 2. katman oluşmuştur. Fakat oluşan bu ikinci katman öncekiler kadar geniş değildir. ml de 150.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda hücreler kuyucuğun yaklaşık % 80'ini kaplamış ve orta kısımda oluşan katmanın büyüklüğü daha da azalmış durumdadır. ml de 100.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda hücreler kuyucuğun yaklaşık % 70'ini kaplarken, boşluklar genelde kuyucuğun yan kısımlarındadır. Ayrıca 2. katman da oluşmamıştır. ml de 50.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda hücreler genel de kuyucuğun kenarlarına yapışmış, yaklaşık % 40 oranında yüzeyi kaplamış ve 2. katman oluşmamıştır. ml de 25.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda ise hücreler tüm alana yayılarak tek tek yapışmış durumdadır. Hücre uzantıları az olup çok fazla kümeleşme söz konusu değildir ve yüzey kaplaması yaklaşık %25'dir. ml de 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda hücreler kuyularda ekildiği gibi dururken hücre sayısı da azdır. ml de 5000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda her alanda 7-8 hücre vardır, hücreler yuvarlak formdadır ve uzantıları oluşmamıştır. ml de 1000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda hücreler tek tek yapışmış ve kuyularda çok az hücre vardır (Çizelge 7.2).

Çizelge 7. 2 Mikroplak kuyularına ekilen hücre sayısı ve yaklaşık yüzeyi kaplama yüzdeleri

Ekilen Hücre Sayısı	Kuyucuğu Kaplama Oranı
1000	0
5000	0
10.000	10
25.000	25
50.000	40
100.000	70
150.000	80
200.000	85
300.000	90
400.000	95

Çizelge 7. 3 Mikroskobik inceleme ile belirlenen 24.saatte ki yüzey kaplama eğrisi



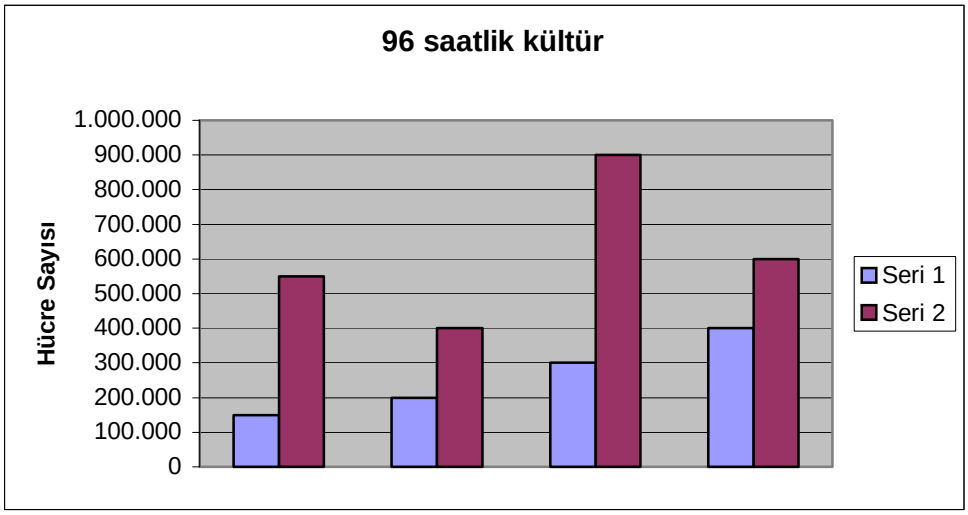
Kültürün 48. saatinde mikroskobik incelenmelerine göre; ml de 400.000 ve 300.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklar da hücreler bütün kuyucuğun yüzeyini kaplarken, arada çok çok az boşluklar vardır. ml de 200.000 ve 150.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda ise hücreler kuyucuğun yüzeyini kaplamış, fakat boşluklar biraz daha fazladır. ml de 100.000, 50.000 ve 25.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda hücre sayısına paralel olarak yüzeyde kaplama meydana gelmiştir. ml de 10.000, 5000 ve 1000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda belirgin bir yüzey kaplaması olmamıştır.

Kültürün 96. saatinde hücrelerin mikroskobik incelenmelerine göre; ml de 400.000, 300.000, 200.000 ve 150.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklar da hücreler bütün kuyucuğun yüzeyini kaplamıştır. ml de 100.000, 50.000 ve 25.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda hücre sayısına paralel olarak yüzeyde kaplama devam ederken, ml de 10.000, 5000 ve 1000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda belirgin bir yüzey kaplaması olmamıştır.

Çizelge 7. 4 96.saatte yüzeyi tamamen kaplayan kuyularda ki hücrelerin sayısı

Kuyucuklara Ekilen ml/Hücre Sayısı	Kültürün 96. Saattindeki Hücre Sayısı
400.000	600.000
300.000	900.000
200.000	400.000
150.000	550.000

Çizelge 7. 5 96.saatte hücrelerin sayı grafiği



Kültürün 7. gününde yapılan incelemelere göre de; ml de 100.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda hücreler kuyucukların yaklaşık % 90'ını kaplamış olup boşluklar genelde kuyucuğun yan kısımlarındadır. Ayrıca yüzeyi kaplayan kısımlarda ikinci katman oluşmuştur. ml'de 50.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda hücreler kuyucukların yaklaşık % 60'ını kaplamış olup, yüzeyi kaplayan kısımlarda genelde ikinci katman oluşmuştur. ml'de 25.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda hücreler kuyucukların yaklaşık % 50'sini kaplamış olup, yüzeyi kaplayan kısımlarda ikinci katman oluşmuştur. ml de 10.000, 5000 ve 1000 hücre olacak şekilde ekim yapılan kuyucuklarda belirgin bir yüzey kaplaması olmamıştır.

Bu deney sonucunda 5 günlük deneysel çalışmalarda kullanılacak hücre sayısı ; bir haftalık zaman diliminde kuyucuğun yaklaşık olarak tamamını kaplayan ve 5 günlük zaman diliminde ikinci katmanın fazla oluşmadığı 100.000 hücre/ml de olarak karar verildi.

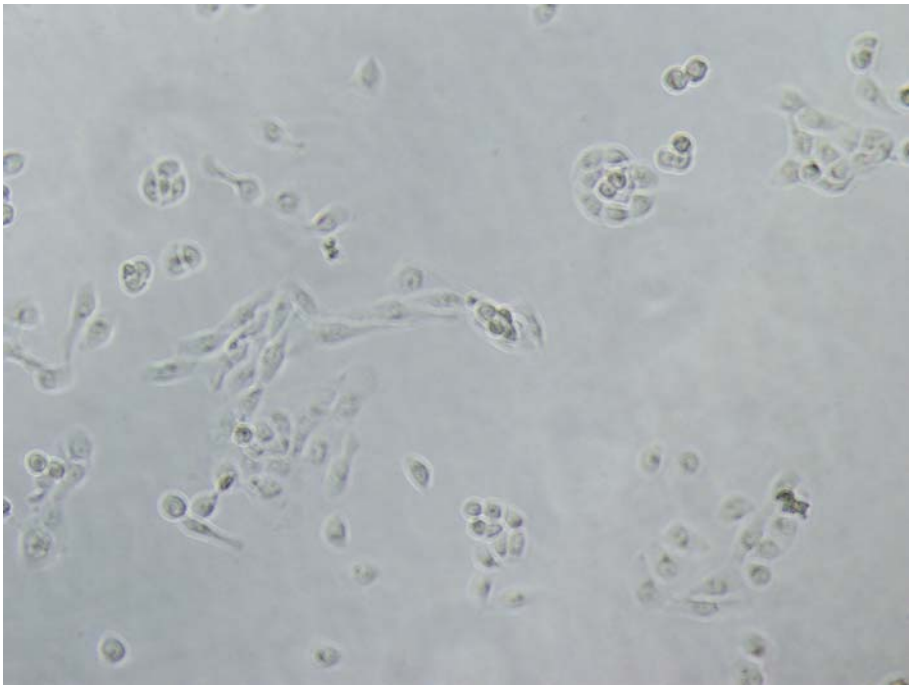
7.4 Poliakrilik Asidin (pH: 2.5) Farklı Konsantrasyonlarının MCF 7 Hücreleri Üzerinde Etkisi

Mikroplağın (96) kuyularına ekilen MCF 7 hücrelerinin 37 °C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 48 saatlik inkübasyonu sonucunda morfolojik durumları ters mikroskopta incelendi. İnceleme sonucunda hücrelerin kuyucuk yüzeylerini eşit miktarda kapladıkları tespit edildi. Hücreler genel sahip oldukları morfolojik görünümdedir ve kuyucuğun yüzeyinde yüzen ölü hücre yoktur.

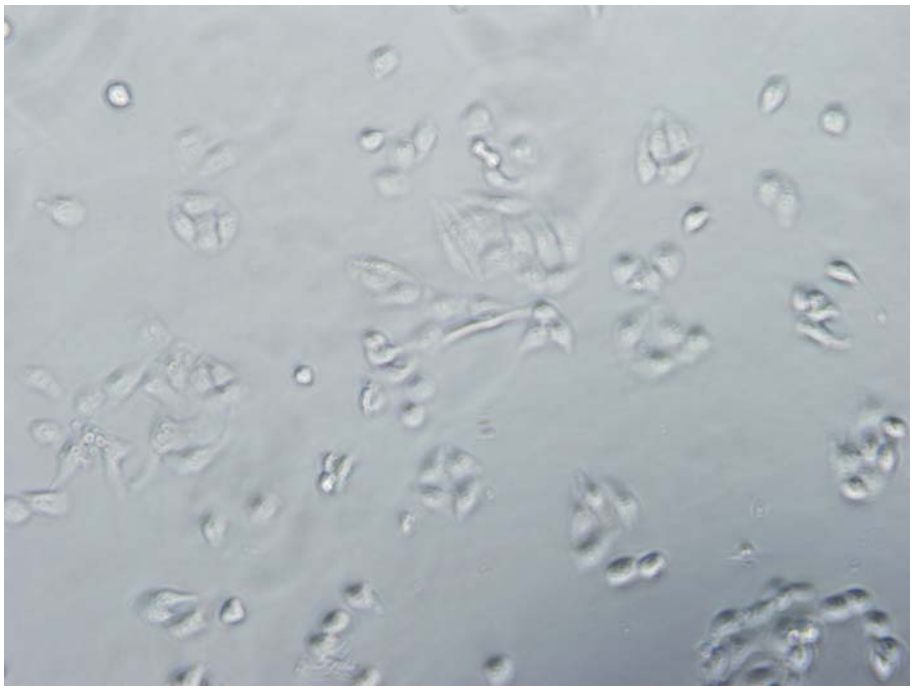
Yapılan bu mikroplak kültür deneyinde pH'sı 2.5 olan PAA'nın değişik konsantrasyonlarının (Son konsantrasyon 20 mg/ml, 15 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,005 mg/ml poliakrilik asit olacak şekilde) MCF 7 hücreleri üzerinde etkisi incelendi. Deneyde her bir PAA konsantrasyonu için mikroplağın 5 ayrı kuyusu kullanıldı. Ayrıca mikroplağın 5 kuyusuna PAA eklenmedi ve bu kuyular kontrol grubu olarak değerlendirildi.

7.4.1 Morfolojik İnceleme

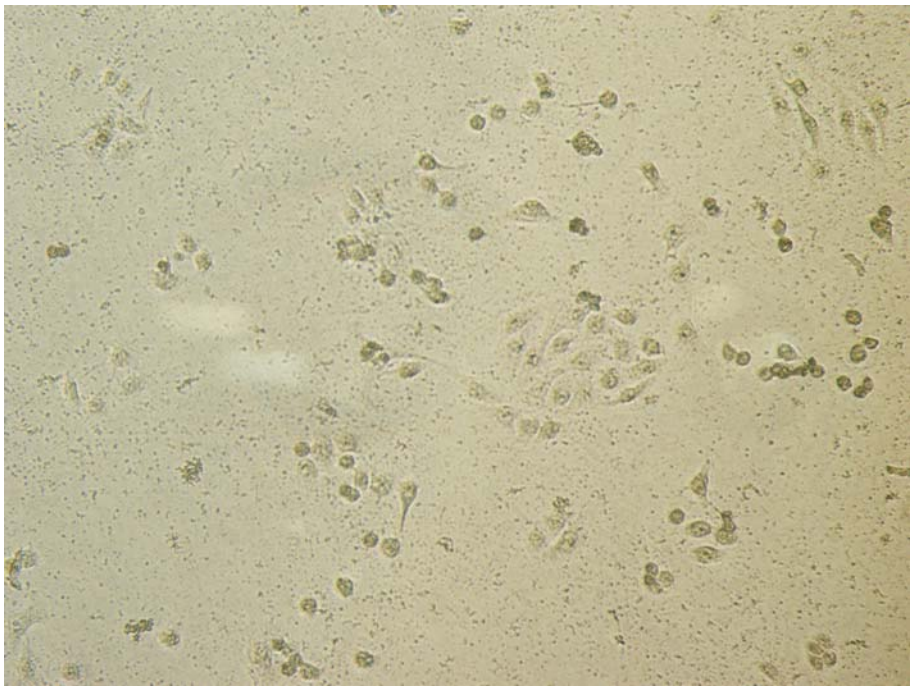
Poliakrilik asidin MCF 7 hücrelerine ilave edilmesinden yaklaşık 1 saat sonra hücrelerin durumu mikroskobik olarak incelendi. Kontrol grubu olan kuyularda ki hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı olduğu gözlenirken, 20 mg/ml ile 5 mg/ml arasındaki PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücrelerin üzerini, PAA'nın bir tabaka gibi örttüğünü ve bulanık şekilde bir yoğunluk olduğu gözlendi. Hücrelerin parlaklığının kaybolduğu, görünümün net olmadığı ve morfolojik olarak atipik hale dönüştüğü tespit edildi. Ayrıca kültür medyumunun rengide açılarak sarıya döndü. 2 mg/ml ile 0.005 mg/ml arasındaki PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücrelerin ise kontrol grubundaki hücreler gibi sağlıklı olduğu gözlemlendi (Şekil 7.12, 7.13, 7.14). Kültürün 24. saatinde hücreler tekrar mikroskobik olarak inceldiğinde elde edilen bulguların ilk bir saatlik gözlemlerdekine benzer olduğu görüldü (Şekil 7.15, 7.16, 7.17).



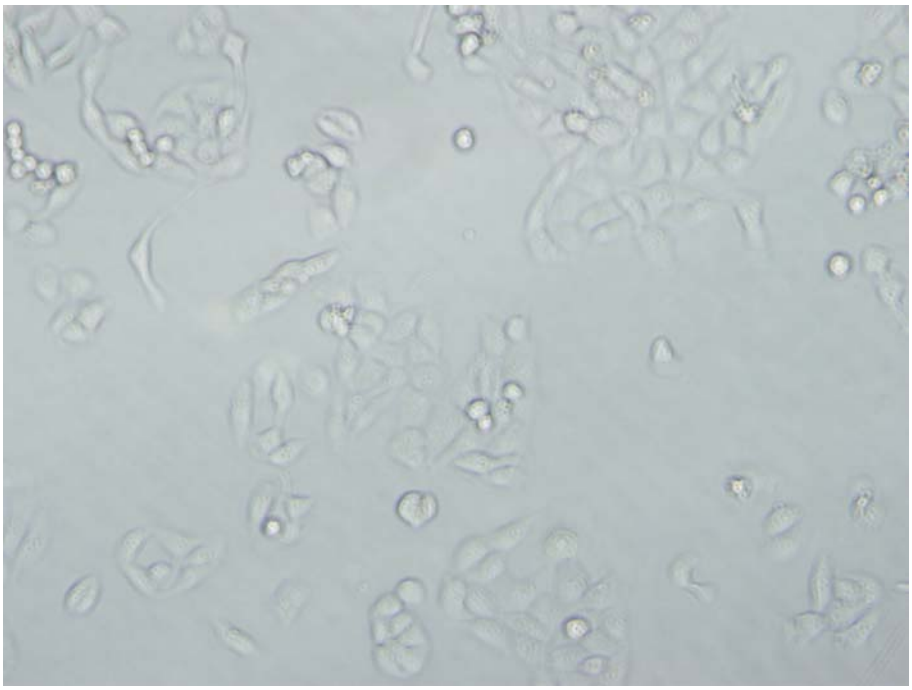
Şekil 7. 12 Kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin mikroskobik incelenmesi (20x).



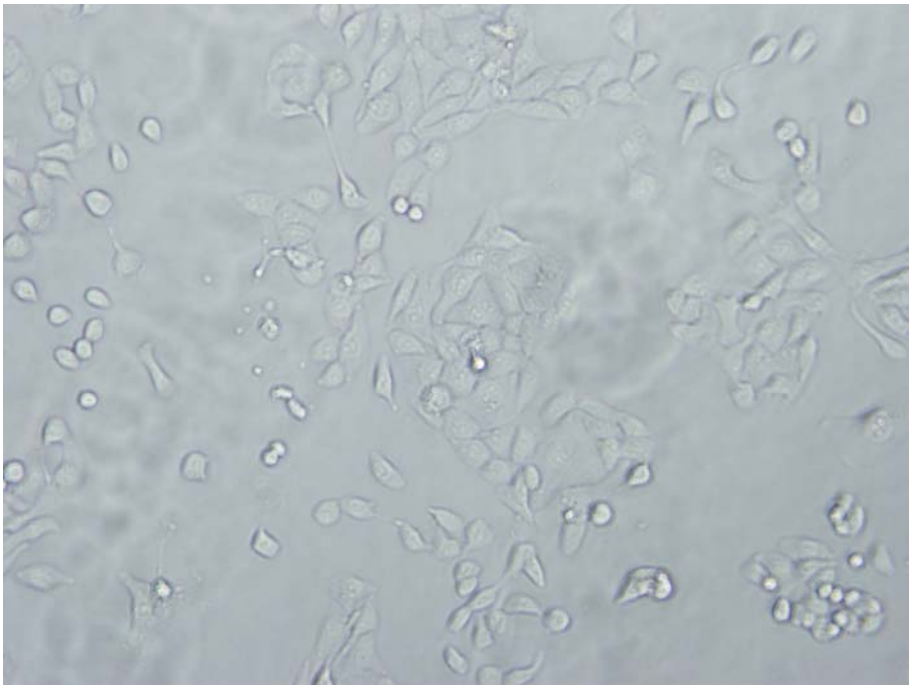
Şekil 7. 13 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 2.5) ‘nın 1 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x).



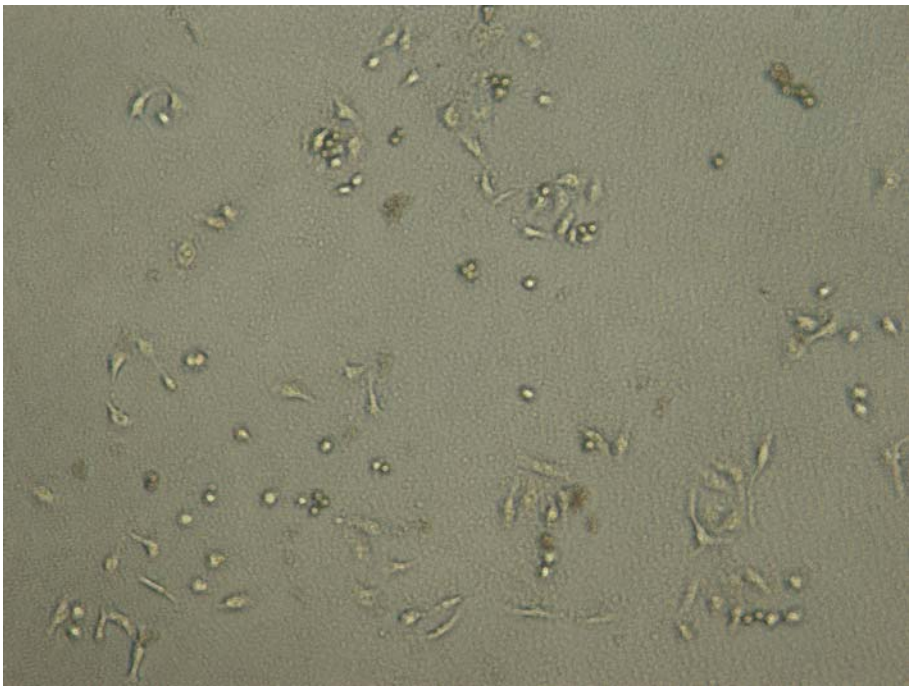
Şekil 7. 14 Son konsantrasyon 20 mg/ml PAA (pH:2.5)’nın 1 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x).



Şekil 7. 15 Kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin mikroskobik incelenmesi (20x).



Şekil 7. 16 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 2.5) ‘nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x).



Şekil 7. 17 Son konsantrasyon 20 mg/ml PAA (pH:2.5)'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x).

7.4.2 Poliakrilik Asidin (pH:2.5) MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini

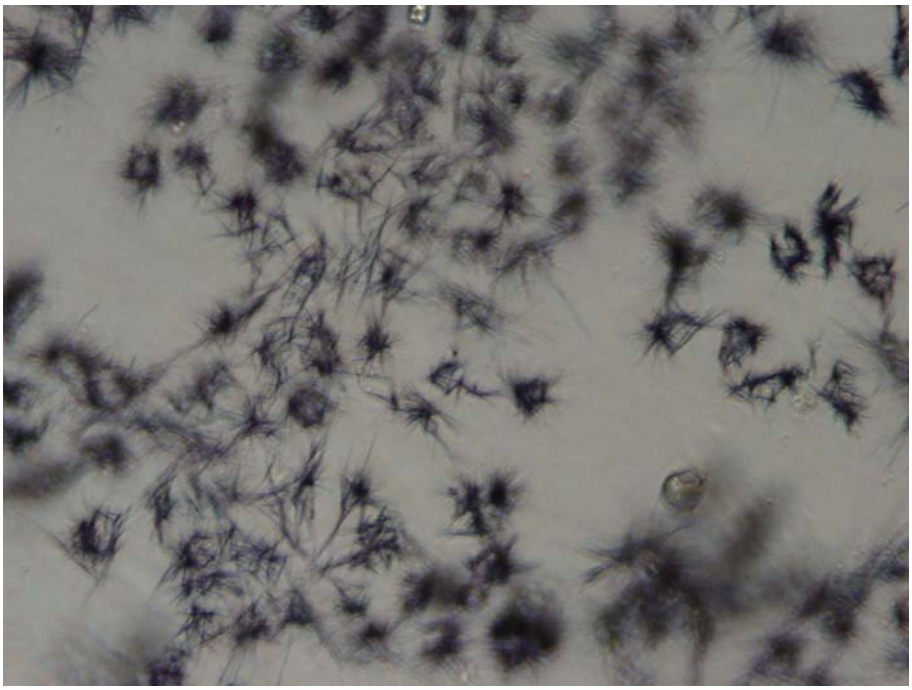
7.4.2.1 Morfolojik İnceleme

Morfoloji için; deneysel çalışmalar bölümünde bahsedildiği konsantrasyonda hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa eklendikten 1 saat sonra, hücrelerin MTT ile etkileşmesi sonucu meydana gelen değişiklikler mikroskobik olarak incelendi. İnceleme sonucunda içerisine mavi-mor renk alarak boyanan hücreler pozitif (+) olarak değerlendirilirken, mavi-mor renk almayan hücreler ise negatif (-) olarak gösterildi (Çizelge 7.6).

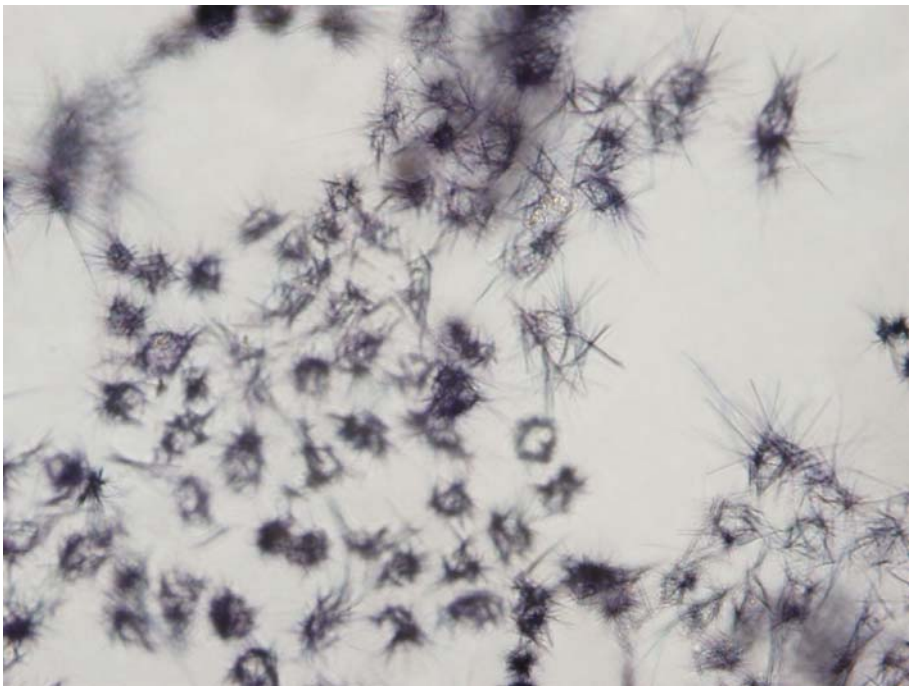
Çizelge 7. 6 Farklı konsantrasyonlardaki PAA ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin 1 saatlik MTT ile etkileşimi

MCF 7 Hücrelerine Uygulanan PAA Konsantrasyonları	MCF 7 Hücrelerinin MTT İle Etkileşimi
Kontrol	(+)
0,005 mg/ml PAA	(+)
0,01 mg/ml PAA	(+)
0,05 mg/ml PAA	(+)
0,1 mg/ml PAA	(+)
0.5 mg/ml PAA	(+)
2 mg/ml PAA	(-)
5 mg/ml PAA	(-)
10 mg/ml PAA	(-)
15 mg/ml PAA	(-)
20 mg/ml PAA	(-)

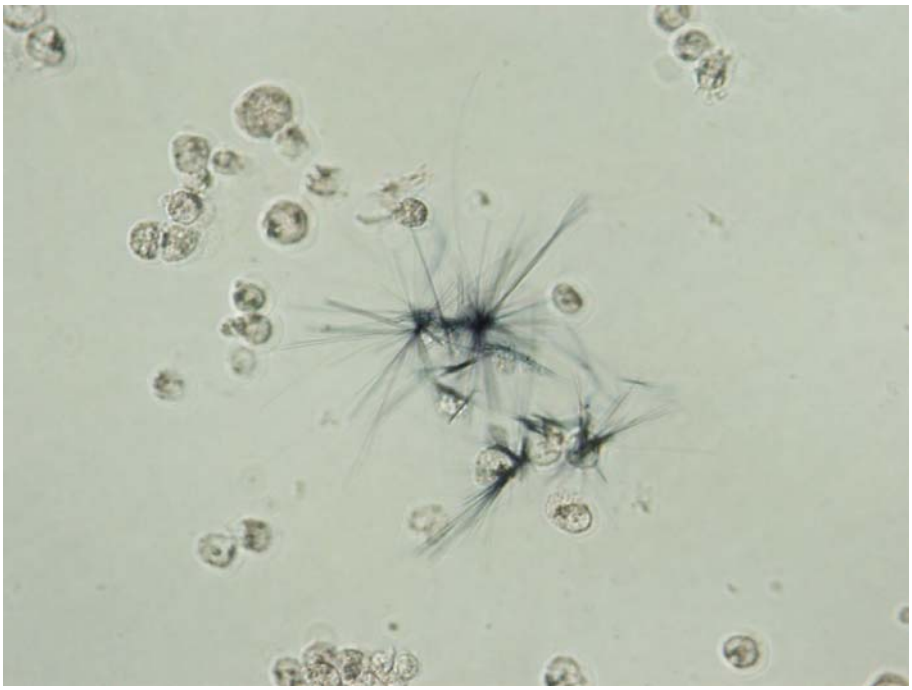
Poliakrilik asit ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinde, MTT ile etkileşimi sonucu 24 saat sonra meydana gelen değişiklikler ve formazan kristal oluşumu ters mikroskopla incelenerek değerlendirildi. Kontrol grubu olan kuyucuklarda ki hücreler üzerinde formazan kristalleri oluştu. Formazan kristali oluşturmayan tek tek ölü hücreler gözlendi. Buna karşılık 20 mg/ml ile 5 mg/ml arasındaki PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücreler üzerinde formazan kristalleri gözlemlenmedi. Bulanık görünüm ve ölü hücreler izlendi. 2 mg/ml PAA ile muamele edilmiş kuyucuklarda ki hücreler üzerinde ise yok denecek kadar az formazan kristalleri gözlenirken, kristal oluşturturmamış ölü hücreler çok daha fazla yoğunluktadır. 0.5 mg/ml ile 0.005 mg/ml arasındaki PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücreler üzerinde kontrol grubundaki kuyulara benzer şekilde formazan kristalleri gözlenirken, yine kontrol gubuna benzer fakat biraz daha fazla sayıda kristal oluşturmamış ölü hücreler vardır (Şekil 7.18, 7.19, 7.20, 7.21).



Şekil 7. 18 Kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelemesi (40x).



Şekil 7. 19 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 2.5) ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (40x).



Şekil 7. 20 Son konsantrasyon 2 mg/ml PAA (pH: 2.5) ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (40x).

Şekil 7. 21 Son konsantrasyon 20 mg/ml PAA (pH: 2.5) ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu (formazan kristali oluşmamıştır) mikroskobik incelenmesi (40x).

7.4.3 Poliakrilik Asidin (pH:2.5) MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin EC_{50}'ye Göre Saptanması

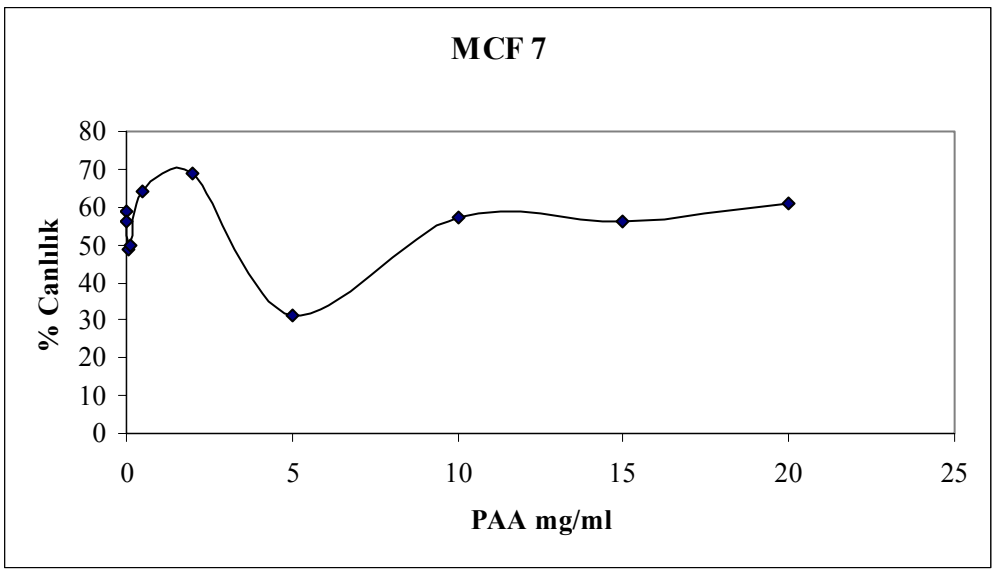
Mikroplaktaki kuyucuklara DMSO eklenmesi ile çözünen formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimi ELİSA da 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Kontol ve her bir farklı PAA konsantrasyonu için ayrı ayrı uygulanan 5 kuyucuğun ortalamaları alınarak materyal metod bölümünde bahsedilen formülden yararlanılarak % canlılık hesaplandı (Çizelge 7.7).

Çizelge 7. 7 Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA'nın MCF 7 hücreleri üzerindeki % canlılık oranları

PAA (mg/ml)	% canlılık	A 570 nm
0,005	59	0,454
0,01	56	0,428
0,05	49	0,375
0,1	50	0,385
0,5	64	0,495
2	69	0,527
5	31	0,241
10	57	0,437
15	56	0,429
20	61	0,468

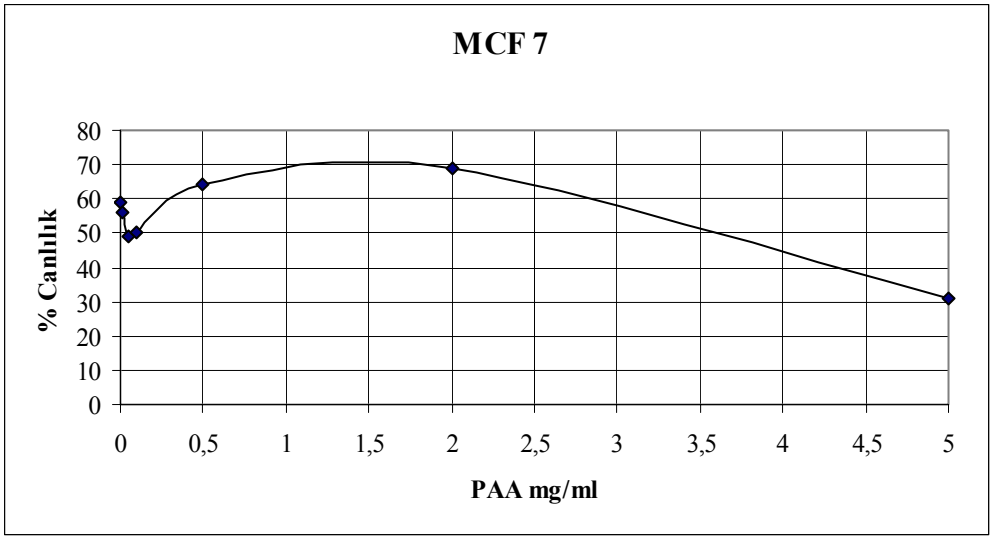
Çizelge 7.7 deki sonuçlar kullanılarak MCF 7 hücrelerinin poliakrilik asit konsantrasyonuna bağlı % canlılık grafiği çizildi (Çizelge 7.8).

Çizelge 7. 8 Farklı konsantrasyonlarda ki PAA'nın MCF 7 hücrelerindeki % canlılığı



Bu çizelge 7.8'den yaralanılarak MCF 7 hücrelerinin %50 'sine etki eden poliakrilik asidin EC_{50} değeri saptandı (Çizelge 7.9). Buna göre poliakrilik asidin EC_{50} değeri 3.6 olarak belirlendi.

Çizelge 7. 9 PAA'nın MCF 7 hücrelerinde % canlılık eğrisi



Yapılan bu deneysel çalışmada pH:2.5 olan PAA'nın farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücreleri üzerinde toksik etkisi morfolojik olarak incelenmiş ve MTT yöntemi ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda çizilen grafikle EC_{50} değeri belirlenmiştir. Buna göre pH: 2.5 da PAA'nın MCF 7 hücrelerinde EC_{50}= 3.6'dır. PAA'nın farklı pH ortamında toksik etkisinin incelenmesi farklı sonuçların elde edilmesine neden olmuştur. pH:2.5 te düşük konsantrasyonlarda PAA'nın hücreler üzerinde morfolojik olarak toksik bir etkisi gözlemlenmezken, yüksek konsantrasyonlarda hücreler tamamen deforme olmuştur. pH:2.5 'da PAA'nın 5 ile 25 mg/ml konsantrasyonlarında uygulanan hücrelerin morfolojik olarak tamamen deforme olması ve bu nedenle MTT ile etkileşimi sonucunda hiç kristal oluşturmamasına rağmen ELISA ölçümü sonucunda canlılık değerinin yüksek çıktığı tespit edilmiştir. Bu durum MTT yöntemiyle toksisite incelenmesinde pH değerinin ve polimer özelliğinin, MTT ve DMSO etkileşimi açısından önemli olduğunu göstermektedir. PAA'nın pH değerinin 2.5 olmasından dolayı kültür ortamının medyum rengi sararmıştır ve bu durum asidik ortamda PAA'nın etkisi ile hücrelerin morfolojik olarak daha fazla deforme olduğunu ortaya koymaktadır.

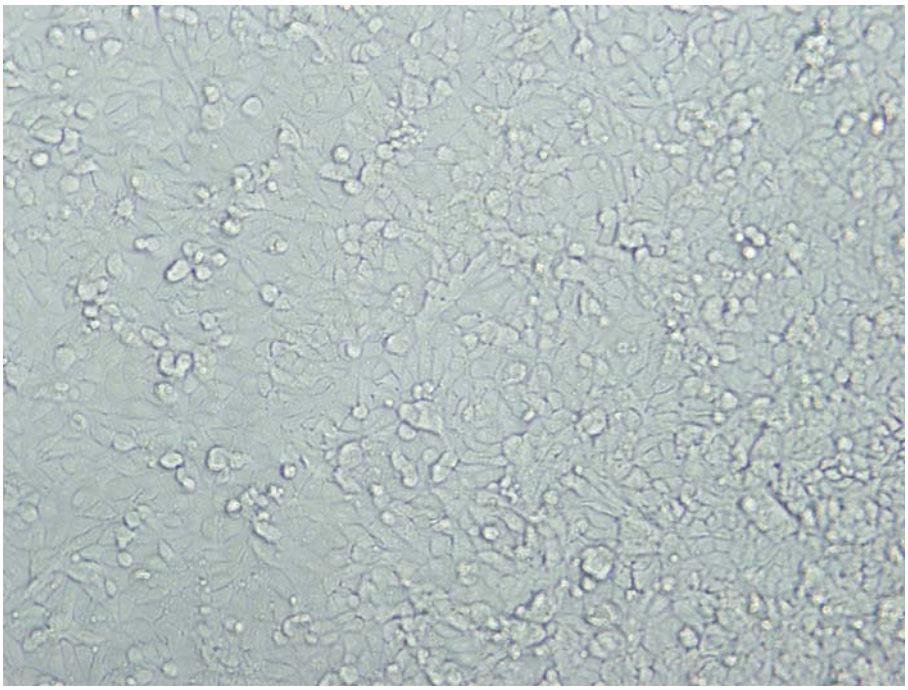
7.5 Poliakrilik Asidin (pH:7.00) Farklı Konsantrasyonlarının MCF 7 Hücreleri Üzerinde Etkisi

96 kuyucuklu mikroplakta kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda morfolojik durumları ters mikroskopta incelendi. Genel morfolojik görünüme sahip hücreler kuyucuk yüzeylerini %80-90 oranlarında kaplamıştır ve kuyucukta yüzen ölü hücre yoktur.

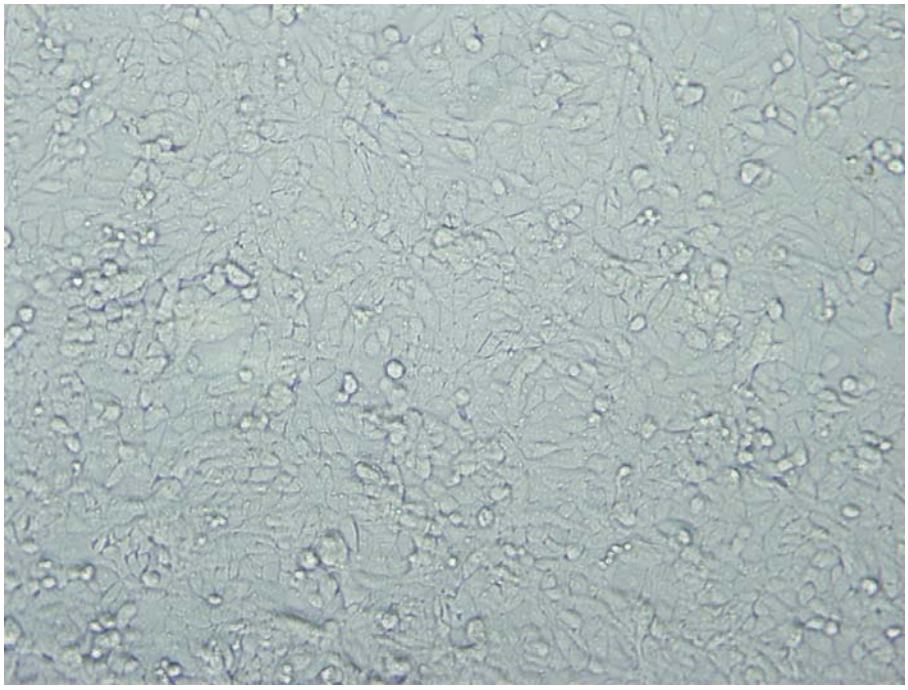
Bu mikroplak kültür deneyinde ise pH'sı 7.00 olan PAA'nın değişik konsantrasyonlarının (Son konsantrasyon 25 mg/ml, 20 mg/ml, 15 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.005 mg/ml poliakrilik asit olacak şekilde) MCF 7 hücreleri üzerinde etkisi incelendi. Deneyde her bir PAA konsantrasyonu için mikroplağın 4 ayrı kuyusu kullanıldı. Ayrıca mikroplağın 4 kuyusuna PAA eklenmedi ve bu kuyular kontrol grubu olarak değerlendirildi.

7.5.1 Morfolojik İnceleme

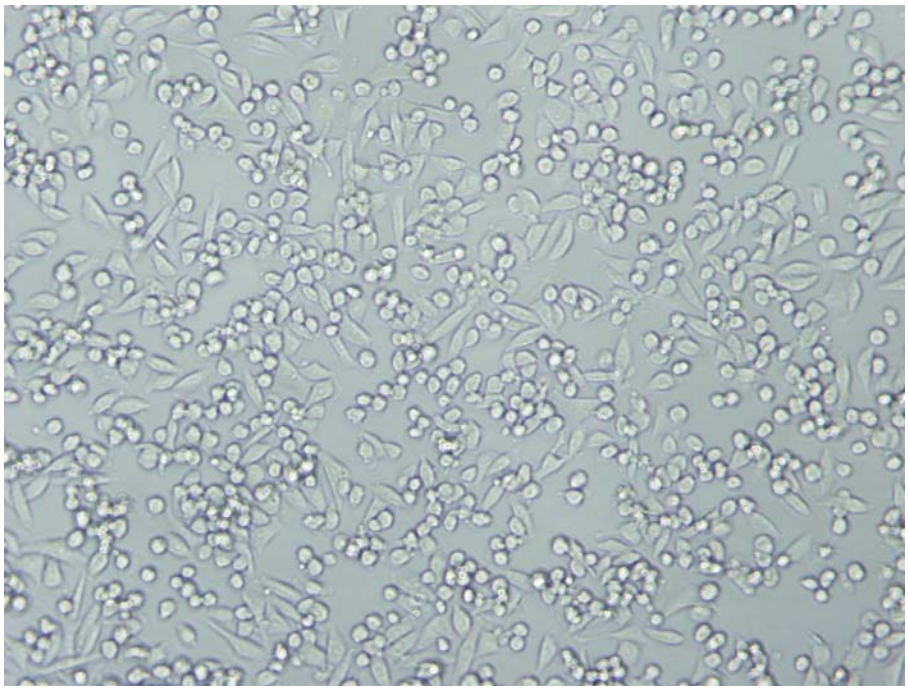
Poliakrilik asidin MCF 7 hücrelerine ilave edilmesinin ardından inkübatöre kaldırılan mikroplağın kuyucuklarındaki hücrelerin durumu 24 saat sonra mikroskobik olarak incelendi. İncelemeler sonucunda kontrol grubu olan kuyularda ki hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı olduğu gözlenirken, 25 mg/ml ile 5 mg/ml arasındaki PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücrelerde deformasyon gözlendi. Hücrelerin küçüldüğü, yüzey uzantılarını kaybettiği ve yuvarlak formda olduğu, yüzey kaplamasının azaldığı ve parlaklığının kaybolduğu morfolojik olarak tespit edildi. Fakat kuyucuklarda yüzen hücre yoktur ve hepsi yüzeye yapışık durumdadır. 4 mg/ml ile 2 mg/ml PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ise fazla sayıda bulunan yuvarlak hücrelerin arasında normal morfolojiye sahip hücrelerin olduğu gözlemlenirken, 1 mg/ml PAA konsantrasyonunu içeren kuyularda normal morfolojiye sahip hücrelerin daha fazla sayıda olduğu belirlendi. 0.5 mg/ml ile 0.005 mg/ml arasındaki PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücrelerin ise kontrol grubundaki hücreler gibi sağlıklı olduğu gözlemlendi (Şekil 7.22, 7.23, 7.24, 7.25).



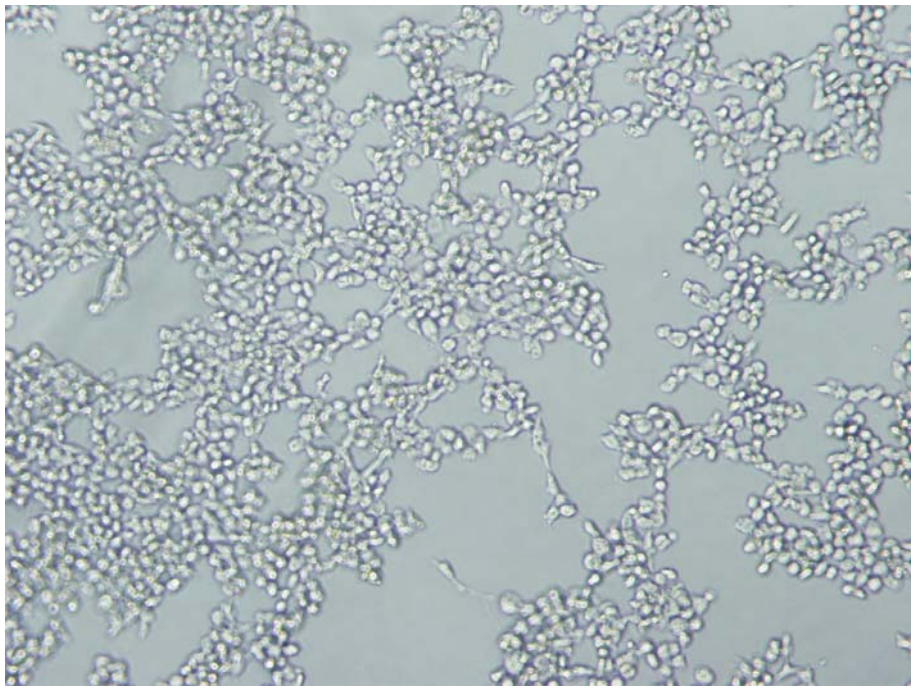
Şekil 7. 22 Kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin mikroskobik incelenmesi (20x).



Şekil 7. 23 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 7.0) ‘nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x).



Şekil 7. 24 Son konsantrasyon 2 mg/ml PAA (pH:7.0)'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x).

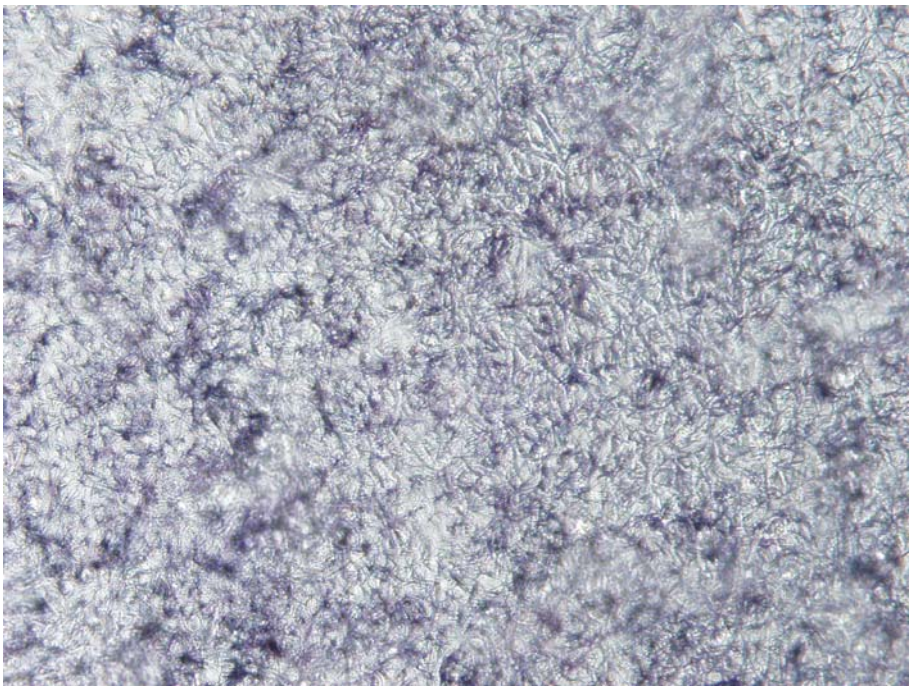


Şekil 7. 25 Son konsantrasyon 20 mg/ml PAA (pH:7.0)'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x).

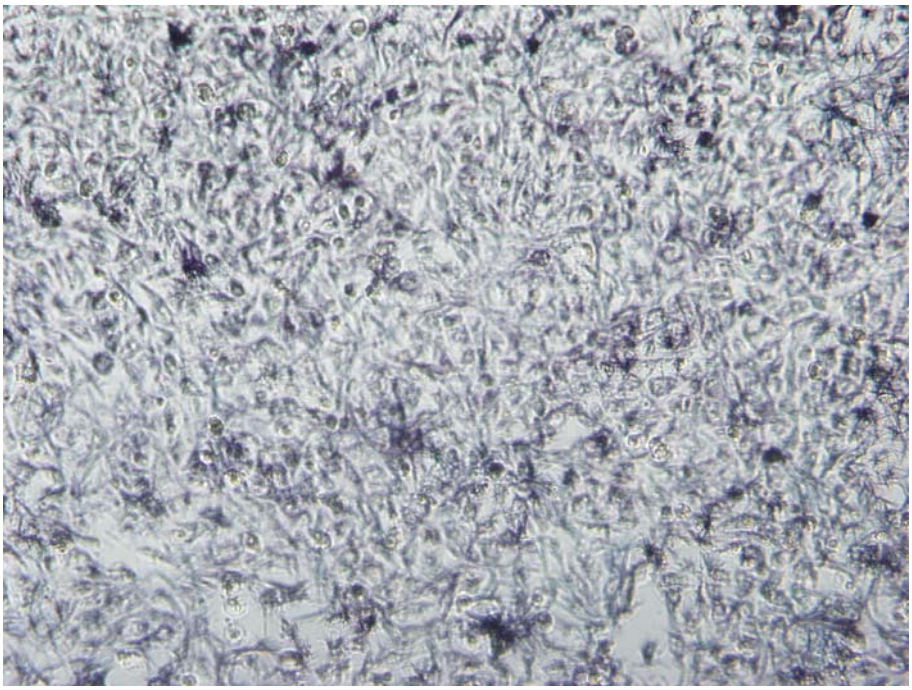
7.5.2 Poliakrilik Asidin MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini

7.5.2.1 Morfolojik İnceleme

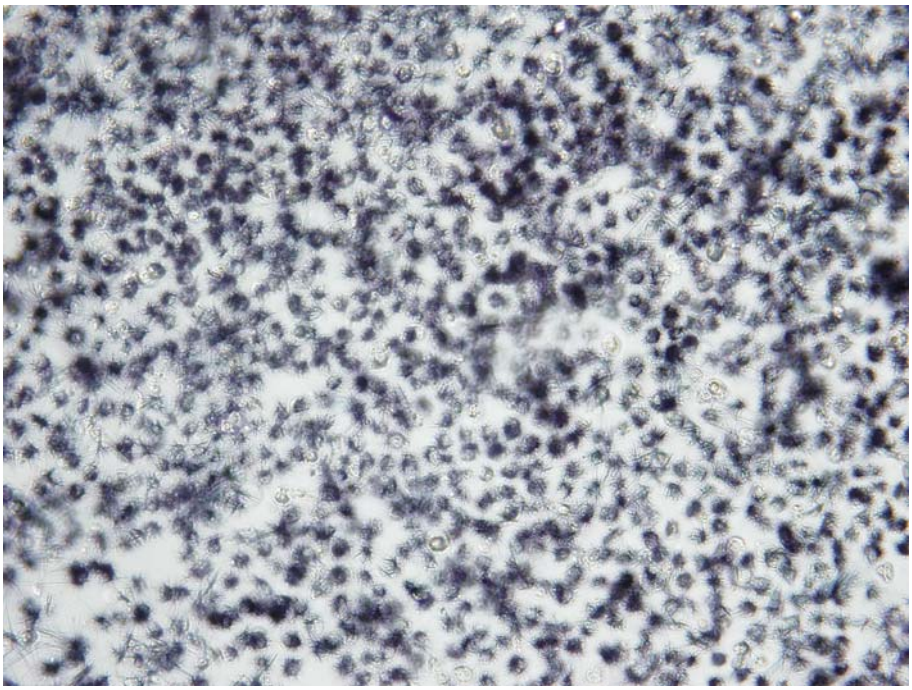
Deneysel çalışmalar bölümünde bahsedildiği konsantrasyon da hazırlanan MTT solüsyonundan tüm kuyucuklara (hücreli ve hücresiz olmak üzere) eklendikten 24 saat sonra, hücrelerin MTT ile etkileşmesi sonucu meydana getirdiği değişiklikler ve formazan kristal oluşumu ters mikroskopla incelenerek değerlendirildi. Kontrol grubu olan kuyucuklarda yoğun bir şekilde hücreler üzerin de formazan kristalleri oluştu. 25 mg/ml ile 5 mg/ml arasındaki PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücreler üzerinde formazan kristalleri azalan konsantrasyona paralel sayıda artarak tüm kuyularda oluştu. Sonuçta 25 mg/ml PAA konsantrasyonu uygulanan kuyularda her alanda 8-10 hücre üzerinde formazan kristal oluşumu gözlenirken (kristal oluşmamış ölü hücre sayısı çok fazla), 5 mg/ml PAA konsantrasyonu uygulanan kuyularda üzerinde formazan kristalleri oluşmuş hücre sayısı yaklaşık olarak tüm hücrelerin yarısı kadardır. 4 mg/ml ile 2 mg/ml PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ise hücreler üzerinde oluşmuş formazan kristallerinin daha fazla olduğu gözlemlenirken, 1 mg/ml PAA konsantrasyonunu içeren kuyularda hücrelerin üzerinde oluşan formazan kristalleri kontrol kuyularını andırmakla birlikte, kontrol kuyularına göre daha fazla kristal oluşturmamış ölü hücreye sahiptir. 0.5 mg/ml ile 0.005 mg/ml arasındaki PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücreler üzerinde kontrol grubundaki kuyulara benzer şekilde formazan kristalleri gözlenirken, yine kontrol gubuna benzer fakat biraz daha fazla sayıda kristal oluşturmamış ölü hücreler vardır (Şekil 7.26, 7.27, 7.28, 7.29). Medyum ve çeşitli konsantrasyonlarda ki PAA medyum karışımlarının bulunduğu kuyularda MTT eklendikten sonra mikroskobik olarak herhangi bir şey gözlemlenmedi. Ancak hücresiz olan bu kuyularda ki solüsyon renginde MTT eklendikten sonra biraz gözle görünen renk açılması oldu.



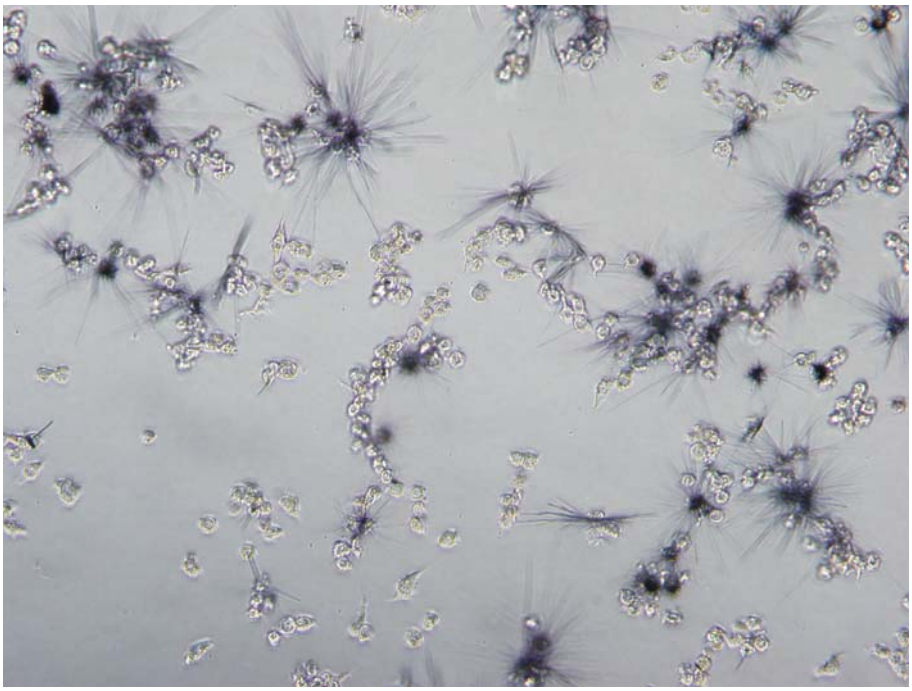
Şekil 7. 26 Kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x).



Şekil 7. 27 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 7.0) ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x).



Şekil 7. 28 Son konsantrasyon 2 mg/ml PAA (pH: 7.0) ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x).



Şekil 7. 29 Son konsantrasyon 20 mg/ml PAA (pH: 7.0) ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x).

7.5.3 Poliakrilik Asidin (pH:7.0) MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin EC_{50}'ye Göre Saptanması

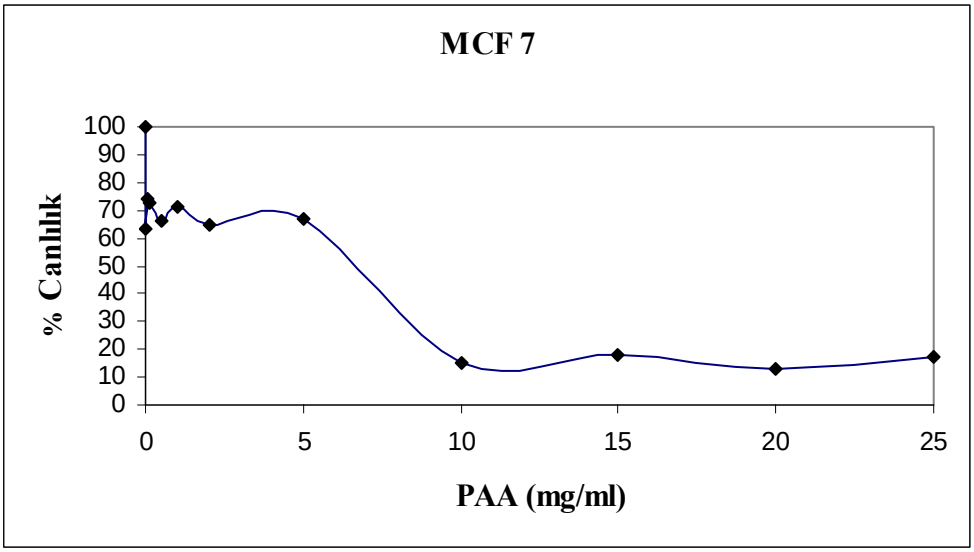
Mikroplaktaki kuyucuklara DMSO eklenmesi ile çözünen formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimi ve poliakrilik asit ile kültür medyumunun oluşturduğu renk değişimi ELISA da 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Kontrol ve her bir farklı PAA konsantrasyonu için ayrı ayrı uygulanan 4 kuyucuğun ortalamalarından, hücresiz kuyucukların farklı konsantrasyonlarda ki poliakrilik asit medyum karışımı 4 kuyucuğunun ortalaması çıkarılarak materyal metod bölümünde bahsedilen formülden yararlanılarak % canlılık hesaplandı (Çizelge 7.10).

Çizelge 7. 10 Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA'nın MCF 7 hücreleri üzerindeki % canlılık oranları

PAA (mg/ml)	% Canlılık	A 570 nm
0	100	0.881
0.005	63	0.562
0.05	74	0.66
0.1	73	0.652
0.5	66	0.589
1	71	0.632
2	65	0.574
5	67	0.596
10	15	0.137
15	18	0.158
20	13	0.118
25	17	0.152

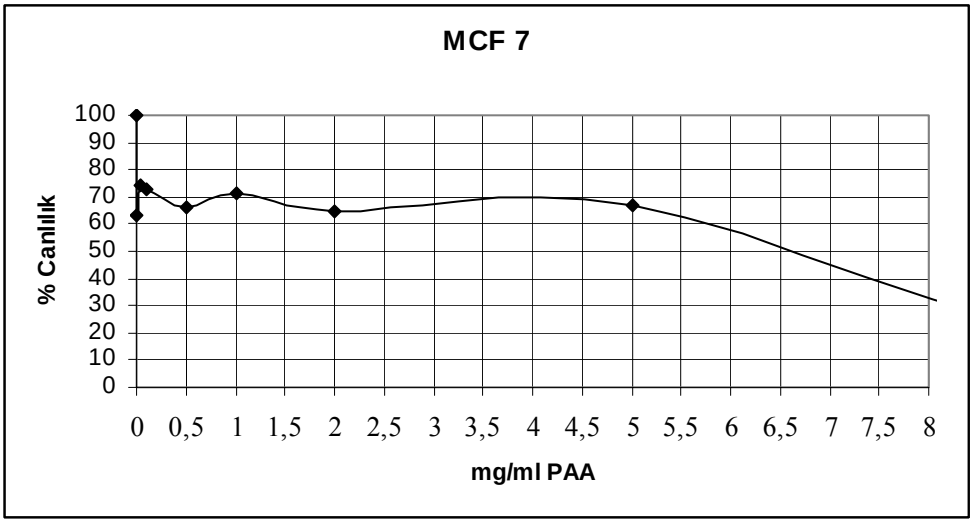
Çizelge 7.10 daki sonuçlar kullanılarak MCF 7 hücrelerinin poliakrilik asit konsantrasyonuna bağlı % canlılık grafiği çizildi (Çizelge 7.11).

Çizelge 7. 11 Farklı konsantrasyonlarda ki PAA'nın MCF 7 hücrelerindeki % canlılığı.



Bu çizelge 7.11'den yaralanılarak MCF 7 hücrelerinin %50 'sine etki eden poliakrilik asidin EC_{50} değeri saptandı (Çizelge 7.12). Buna göre poliakrilik asidin EC_{50} değeri 6.6 olarak belirlendi.

Çizelge 7. 12 Farklı konsantrasyonlarda ki PAA'nın MCF 7 hücrelerindeki % canlılık eğrisi



Yapılan bu deneysel çalışmada pH:7.0 olan PAA'nın farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücreleri üzerinde toksik etkisi morfolojik olarak incelenmiş ve MTT yöntemi ile elde edilen sonuçlardan çizilen grafikle EC_{50} değeri belirlenmiştir. Buna göre pH: 7.0 da PAA'nın MCF 7 hücrelerinde EC_{50}=6.6'dır. PAA'nın 5 ile 25 mg/ml konsantrasyonlarında uygulanan hücrelerin morfolojik olarak deforme olduğu gözlenmiş ve PAA'nın konsantrasyonundaki azalışa göre oluşan formazan kristal sayısında artış olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak 5 mg/ml PAA ile muamele edilmiş hücrelerde 25 mg/ ml PAA ile muamele edilmiş hücrelere göre daha fazla formazan kristali oluşmuştur. Mikroskobik olarak gözlemlediğimiz bu formazan kristal oluşumu ELISA ile ölçülerek % canlılık olarak hesaplanmıştır. Burada morfolojik olarak gözlemlediğimiz 5 mg/ml PAA'da hücreler deforme olmasına rağmen oluşturduğu formazan kristali ile canlılığını kaybetmediği gösterilmiştir.

MCF 7 hücre kültür deneylerinde farklı pH değerlerine sahip PAA'nın toksisitesinin incelenmesi sonucunda elde edilen bilgiler göstermiştir ki; PAA'nın hücrelerde toksik etkisi ortamın pH'sına bağlı olarak değişmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda PAA'nın pH:2.5'te hücreleri tamamen deforme ettiği ve bu nedenle formazan kristali oluşmadığı gözlemlenirken, pH:7.0'da hücreleri tamamen deforme etmediği ve buna bağlı olarakta kristal oluşumunun gerçekleştiği belirlenmiştir. MCF 7 hücrelerinde PAA'nın pH'ya bağlı olarak EC_{50} değeri

pH:2.5'te 3.6 iken, pH:7.0'da 6.6 'dır. Buna göre polimerlerle yapılan çalışmalarda sadece incelenecek olan polimerin pH'sının değil aynı zamanda kültüründe pH'sı dikkate alınmasının önemli olduğunu göstermektedir.

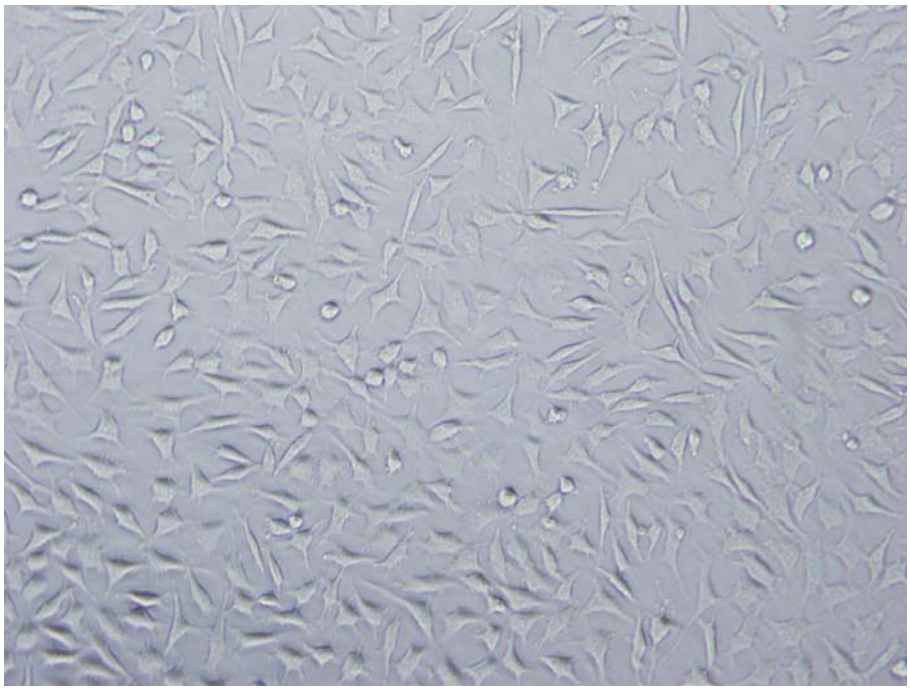
7.6 Poliakrilik Asidin (pH: 7.00) Farklı Konsantrasyonlarının L-929 Hücreleri Üzerinde Etkisi

Mikroplak kuyucuklarına ekilen L-929 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda morfolojik durumları ters mikroskopta incelendiğinde; hücrelerin kuyucuk yüzeylerini eşit miktarda kapladıkları tespit edilirken, hücreler genel sahip oldukları morfolojik görünümdedir.

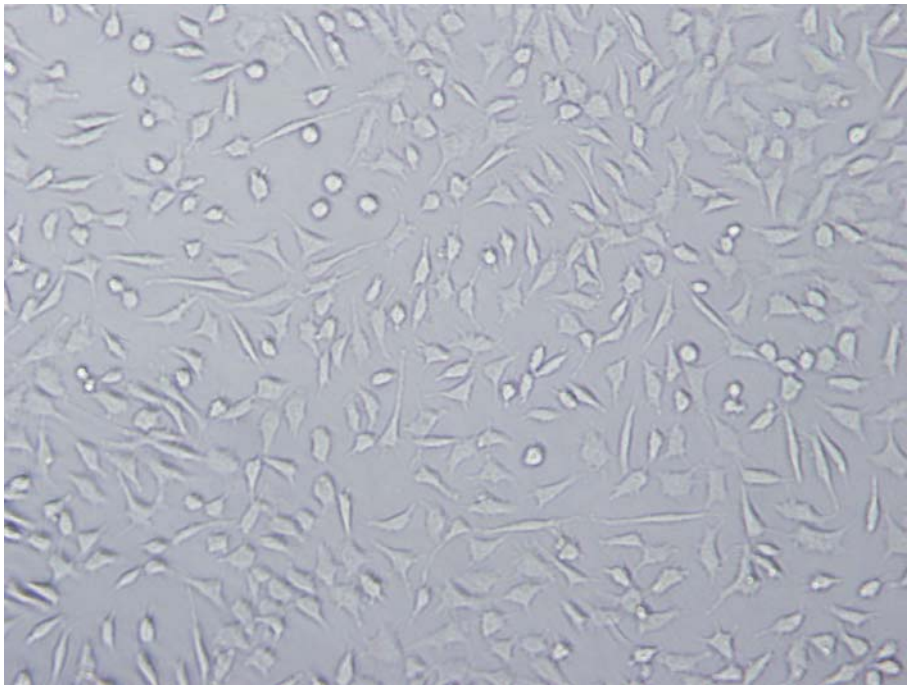
Yapılan bu mikroplak kültür deneyinde pH'sı 7.0 olan poliakrilik asidin değişik konsantrasyonlarının (Son konsantrasyon 25 mg/ml, 20 mg/ml, 15 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.005 mg/ml PAA olacak şekilde) L-929 hücreleri üzerinde etkisi incelendi. Deneyde her bir PAA konsantrasyonu için mikroplağın 4 ayrı kuyusu kullanıldı. PAA eklenmeyen mikroplağın 4 kuyusuda kontrol grubu olarak değerlendirildi.

7.6.1 Morfolojik İnceleme

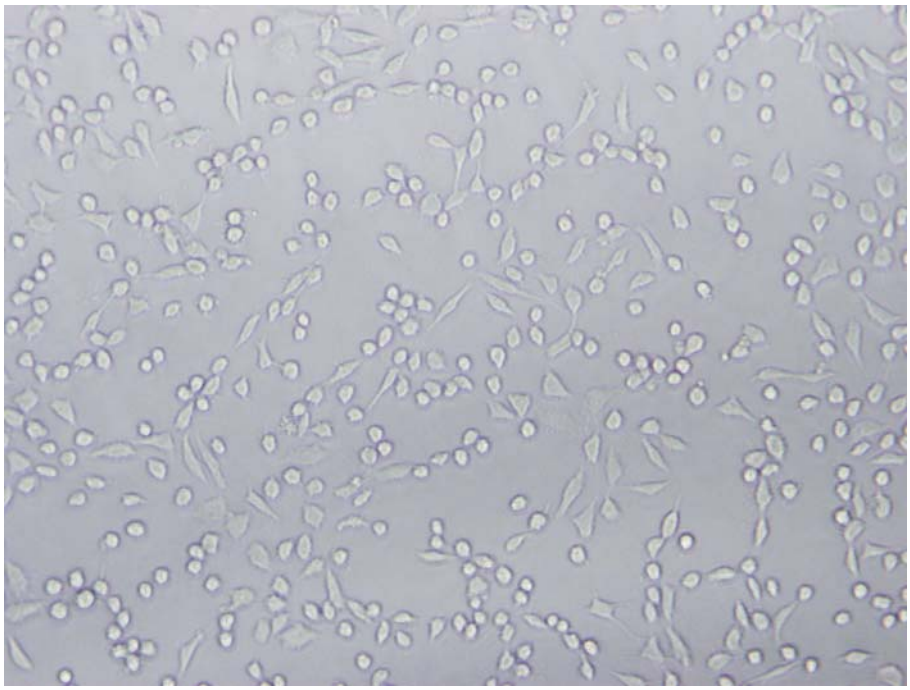
Poliakrilik asidin L-929 hücrelerine ilave edilmesinden yaklaşık 1 saat sonra hücrelerin durumu mikroskobik olarak incelendi. Kontrol grubu olan kuyularda ki hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı olduğu gözlenirken, 25 mg/ml ile 5 mg/ml arasındaki PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücrelerin küçüldüğü, yüzey uzantılarını kaybettiği ve yuvarlak formda olduğu, yüzey kaplamasının azaldığı morfolojik olarak tespit edilmiştir. Bazı alanlarda 1-2 tane normal morfolojide ki hücrelere andıran hücreler görülmüştür. 2 mg/ml PAA olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ise fazla sayıda bulunan yuvarlak hücrelerin arasında normal morfolojiye sahip hücrelerin olduğu gözlemlenirken, 1 mg/ml PAA konsantrasyonunu içeren kuyularda normal morfolojiye sahip hücrelerin sayısının daha da fazla olduğu belirlendi. 0.5 mg/ml ile 0.005 mg/ml arasındaki PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücrelerin ise kontrol grubundaki hücreler gibi sağlıklı olduğu gözlemlendi (Şekil 7.30, 7.31, 7.32, 7.33).



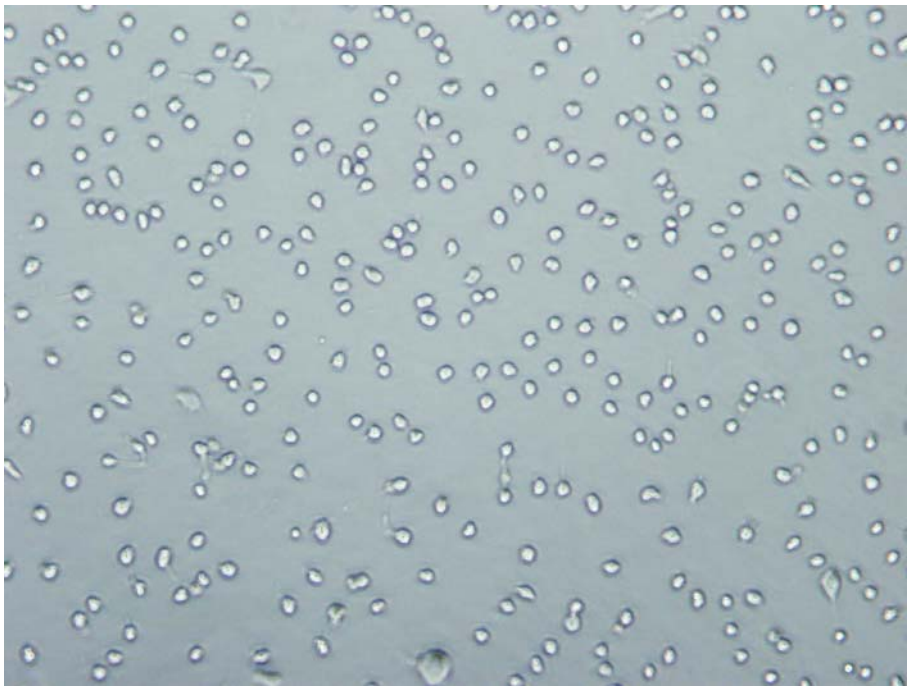
Şekil 7. 30 Kontrol grubu L-929 hücrelerinin mikroskobik incelenmesi (20x).



Şekil 7. 31 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 7.0) ‘nın 1 saatlik inkübasyonu sonucu L-929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x)



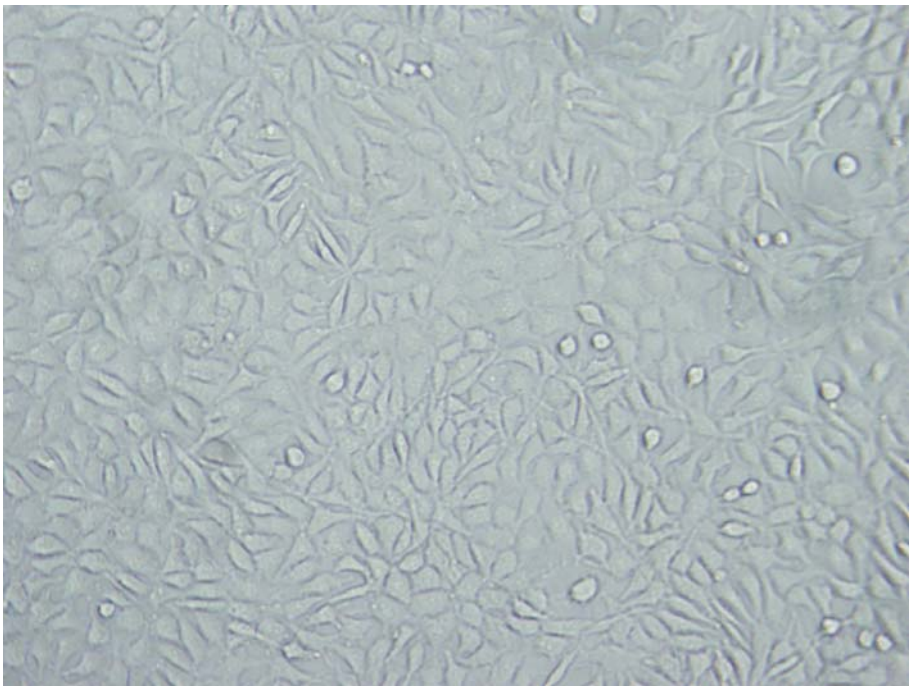
Şekil 7. 32 Son konsantrasyon 2 mg/ml PAA (pH: 7.0) ‘nın 1 saatlik inkübasyonu sonucu L-929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x)



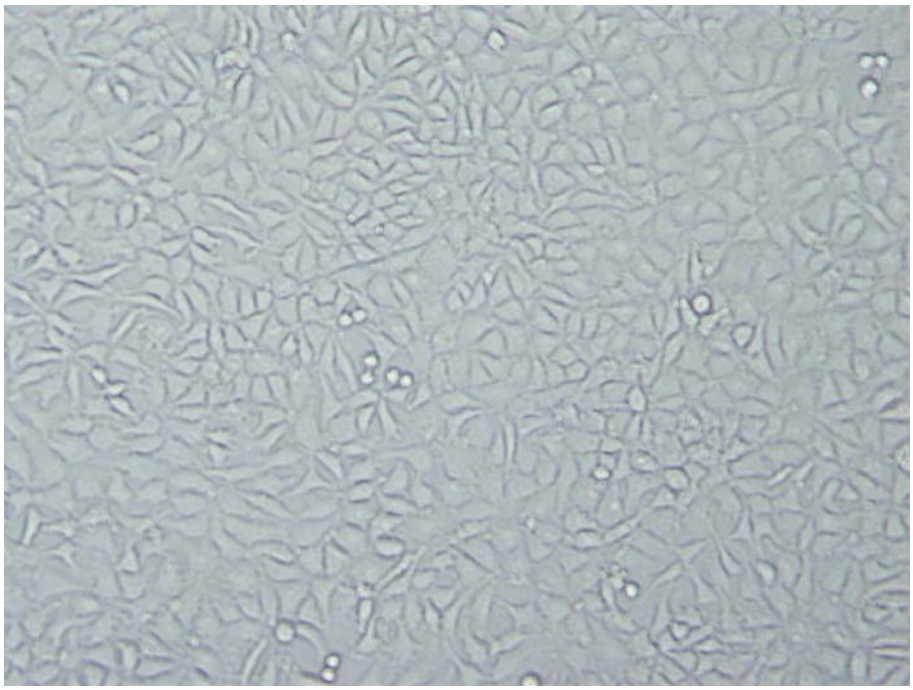
Şekil 7. 33 Son konsantrasyon 25 mg/ml PAA (pH: 7.0) ‘nın 1 saatlik inkübasyonu sonucu L-929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x)

24 saat sonra mikroplağın kuyucuklarındaki hücreler tekrar mikroskobik olarak incelendi. Kontrol grubu olan kuyularda ki hücreler kuyuların tamamen yüzeyini kaplarken morfolojik

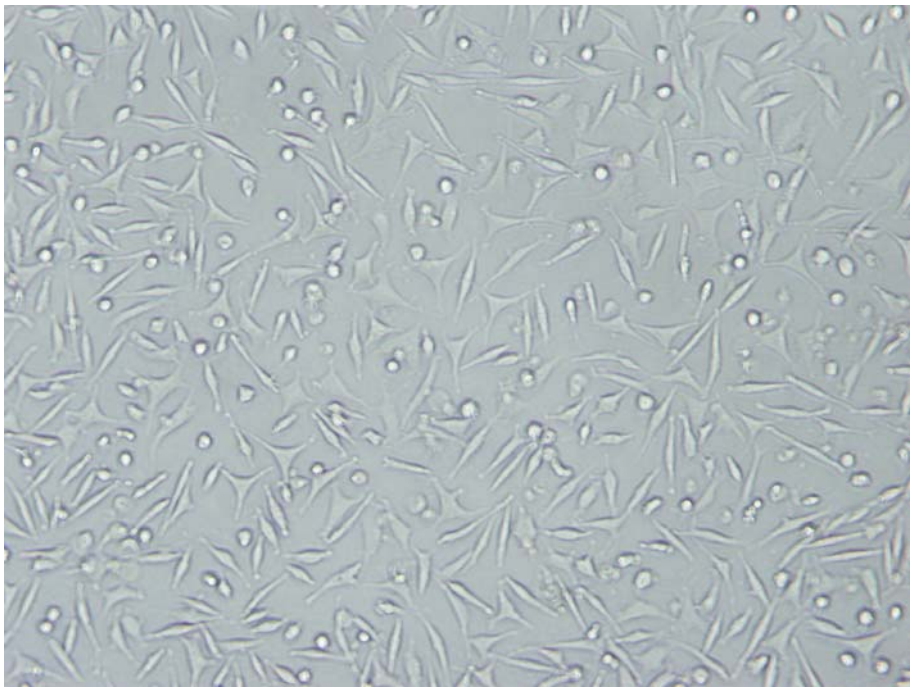
olarak da sağlıklı olduğu gözlendi. 25 mg/ml ile 5 mg/ml arasındaki PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücrelerin 1.saatte olduğu gibi küçüldüğü, yüzey uzantılarını kaybettiği ve yuvarlak formda olduğu, yüzey kaplamasının azaldığı morfolojik olarak tespit edilirken, aynı zamanda hücre içeriğinin hücre membranının kenarında toplandığı ve bazı hücrelerin membranlarının parçalandığı tespit edilmiştir. 2 mg/ml PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ise fazla sayıda bulunan yuvarlak hücrelerin arasında normal morfolojideki hücreleri andıran ve yüzey uzantılarına sahip hücre sayısının 1. saattekine göre daha fazla sayıda olduğu gözlemlenmiştir. 1 mg/ml PAA konsantrasyonunu içeren kuyularda ise normal morfolojiye sahip hücrelerin kontrol grubu hücrelerini andıracak şekilde arttığı gözlendi. 0.5 mg/ml ile 0.005 mg/ml arasındaki PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücrelerin ise 24. saatte de kontrol grubundaki hücreler gibi sağlıklı olduğu gözlemlendi (Şekil 7.34, 7.35, 7.36, 7.37).



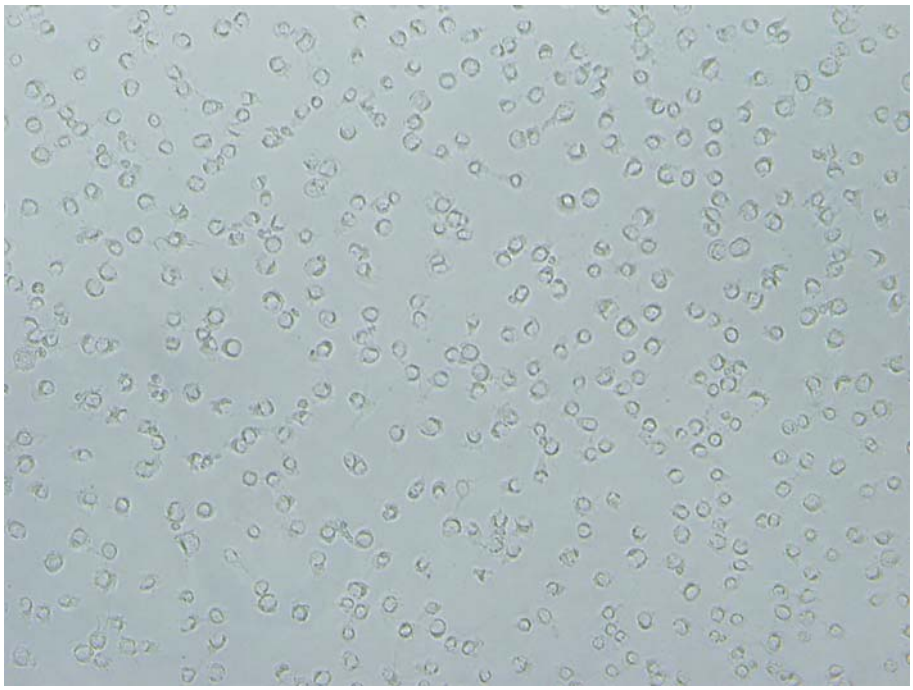
Şekil 7. 34 Kontrol grubu L-929 hücrelerinin mikroskobik incelenmesi (20x)



Şekil 7. 35 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 7.0) ‘nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu L-929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x)



Şekil 7. 36 Son konsantrasyon 2 mg/ml PAA (pH: 7.0) ‘nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu L-929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x)



Şekil 7. 37 Son konsantrasyon 25 mg/ml PAA (pH: 7.0) ‘nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu L-929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x)

7.6.2 Poliakrilik Asidin L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini

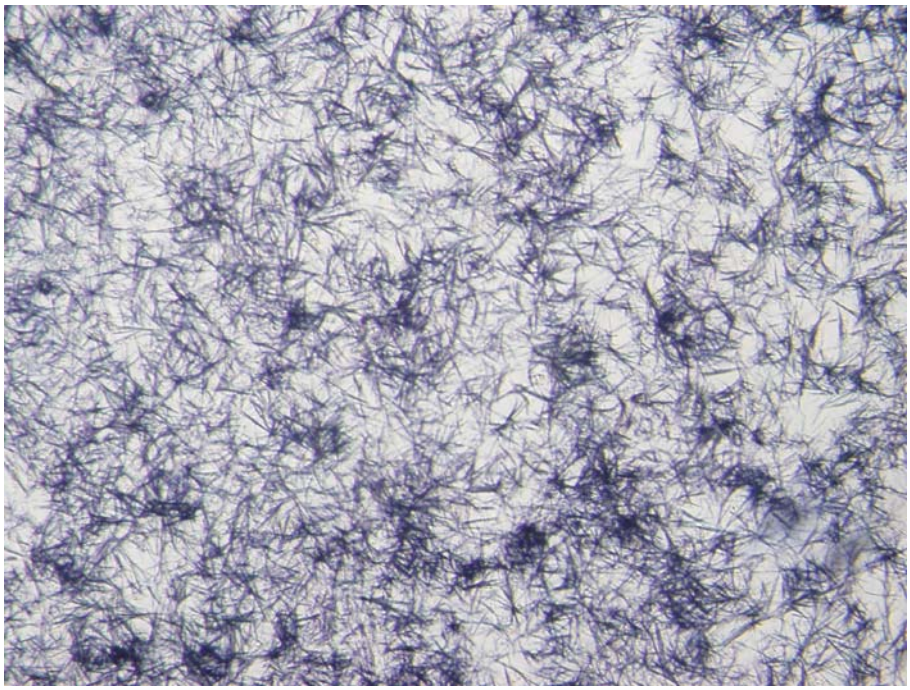
7.6.2.1 Morfolojik İnceleme

Deneysel çalışmalar bölümünde bahsedildiği konsantrasyonda hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa eklendikten 1 saat sonra hücrelerin MTT ile etkileşmesi sonucu meydana gelen değişiklikler mikroskobik olarak incelendi. İçerisine mavi-mor renk alarak boyanan hücreler pozitif (+) olarak değerlendirilirken, mavi-mor renk almayan hücreler negatif (-) olarak gösterildi (Çizelge 7.13).

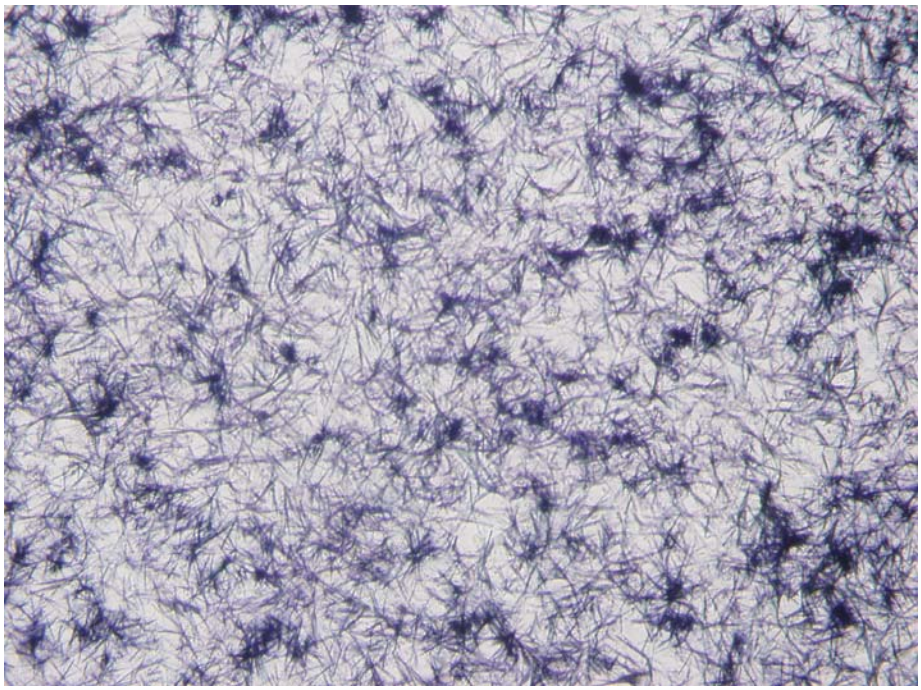
Çizelge 7. 13 Farklı konsantrsayonlardaki PAA ile muamele edilmiş L-929 hücrelerinin 1 saatlik MTT ile etkileşimi

L-929 Hücrelerine Uygulanan PAA Konsantrasyonları	MCF 7 Hücrelerinin MTT İle Etkileşimi
Kontrol	(+)
0,005 mg/ml PAA	(+)
0,01 mg/ml PAA	(+)
0,05 mg/ml PAA	(+)
0,1 mg/ml PAA	(+)
0.5 mg/ml PAA	(+)
2 mg/ml PAA	(+)
5 mg/ml PAA	(+)
10 mg/ml PAA	(-)
15 mg/ml PAA	(-)
20 mg/ml PAA	(-)
25 mg/ml PAA	(-)

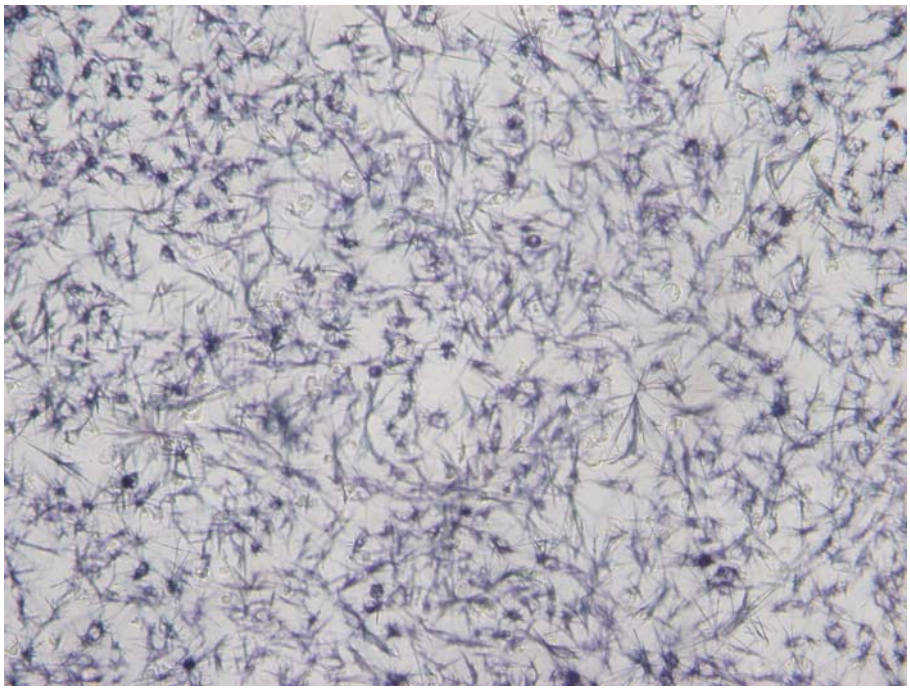
Poliakrilik asit ile muamele edilmiş L-929 hücrelerinde, MTT ile etkileşimi sonucu 24 saat sonra meydana gelen değişiklikler ve formazan kristal oluşumu mikroskobik olarak değerlendirildi. Kontrol grubu olan kuyucuklarda ki hücreler üzerinde formazan kristalleri oluşurken, kristal oluşturmayan tek tek ölü hücreler gözlendi. 25 mg/ml ile 5 mg/ml arasındaki PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücreler üzerinde formazan kristalleri azalan konsantrasyona paralel sayıda artarak tüm kuyularda oluştu. Sonuçta 25 mg/ml PAA konsantrasyonu olan kuyularda her alanda 5-6 hücre üzerinde formazan kristal oluşumu gözlenirken (kristal oluşmamış ölü hücre sayısı çok fazla), 5 mg/ml PAA konsantrasyonu uygulanan kuyularda formazan kristalleri oluşturmuş hücre sayısı yaklaşık olarak tüm hücrelerin %30'u kadardır. 2 mg/ml PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ise hücreler üzerinde oluşmuş formazan kristallerinin yoğunluğunun arttığı gözlemlenirken, 1 mg/ml ile 0.005 mg/ml PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücrelerin kontrol grubundaki hücrelere benzer yoğunlukta formazan kristalleri oluşturduğu gözlendi (Şekil 7.38, 7.39, 7.40, 7.41). Medyum ve çeşitli konsantrasyonlarda ki PAA medyum karışımlarının bulunduğu kuyularda MTT eklendikten sonra mikroskobik olarak herhangi farklılık gözlenmezken, hücresiz olan bu kuyularda ki solüsyon renginde MTT eklendikten sonra biraz gözle görünen renk açılması oldu.



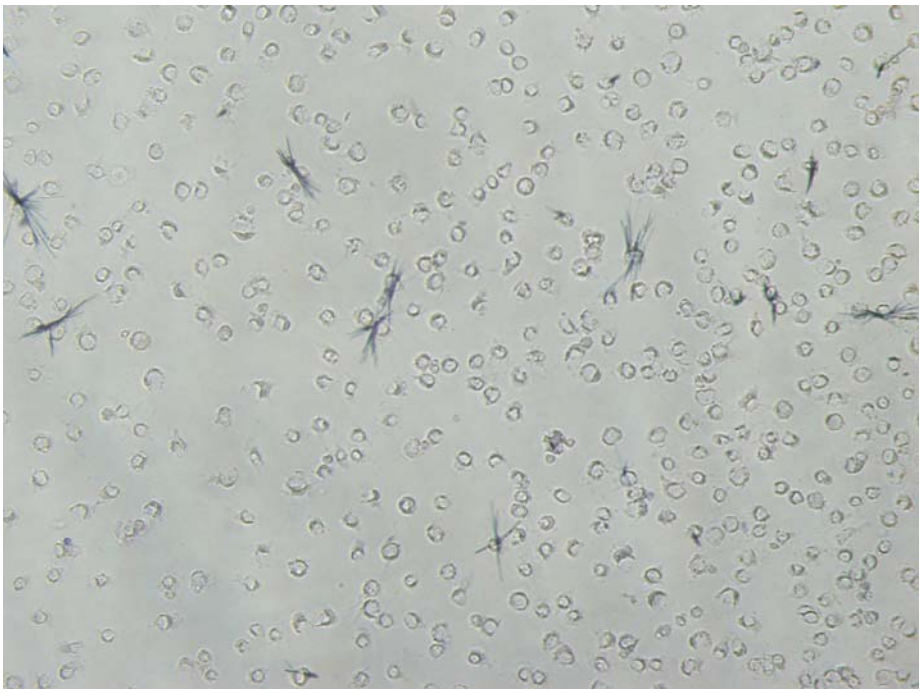
Şekil 7. 38 Kontrol grubu L-929 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x).



Şekil 7. 39 Son konsantrasyon 0,005 mg/ml PAA (pH: 7.0) ile muamele edilmiş L-929 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x).



Şekil 7. 40 Son konsantrasyon 2 mg/ml PAA (pH: 7.0) ile muamele edilmiş L-929 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x).



Şekil 7. 41 Son konsantrasyon 25 mg/ml PAA (pH: 7.0) ile muamele edilmiş L-929 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu meydana getirdiği formazan kristallerinin mikroskobik incelenmesi (20x).

7.6.3 Poliakrilik Asidin L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin EC_{50}'ye Göre Saptanması

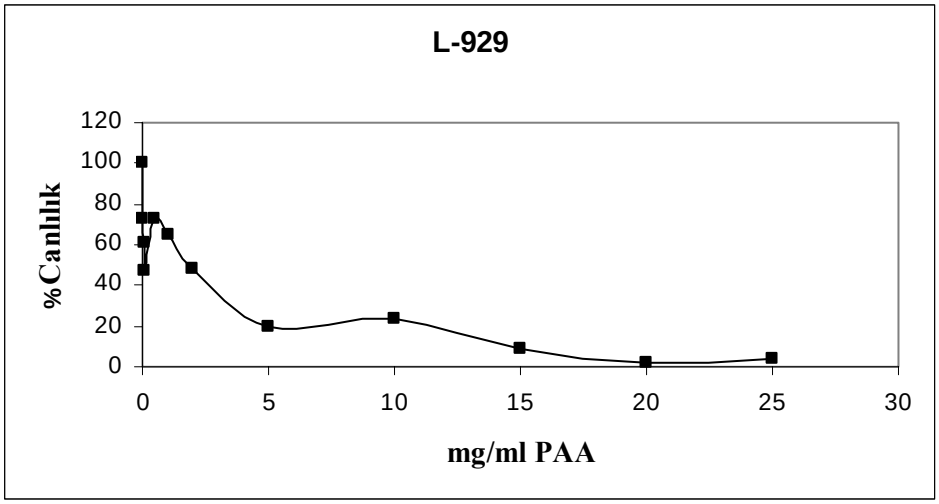
Mikroplaktaki kuyucuklara DMSO eklenmesi ile çözünen formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimi ve poliakrilik asit ile kültür medyumunun oluşturduğu renk değişimi ELISA da 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Kontrol ve her bir farklı konsantrasyon için ayrı ayrı uygulanan 4 kuyucuğun ortalamalarından, hücresiz kuyucukların farklı konsantrasyonlarda ki poliakrilik asit medyum karışımı 4 kuyucuğunun ortalaması çıkarılarak materyal metod bölümünde bahsedilen formülden yararlanılarak % canlılık hesaplandı (Çizelge 7.14).

Çizelge 7. 14 Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA'nın L-929 hücreleri üzerindeki % canlılık oranları

PAA (mg/ml)	% Canlılık	A 570 nm
0	100	0,627
0,005	73	0,458
0,05	61	0,380
0,1	47	0,293
0,5	73	0,457
1	65	0,408
2	48	0,304
5	19	0,122
10	23	0,147
15	9	0,055
20	2	0,013
25	4	0,023

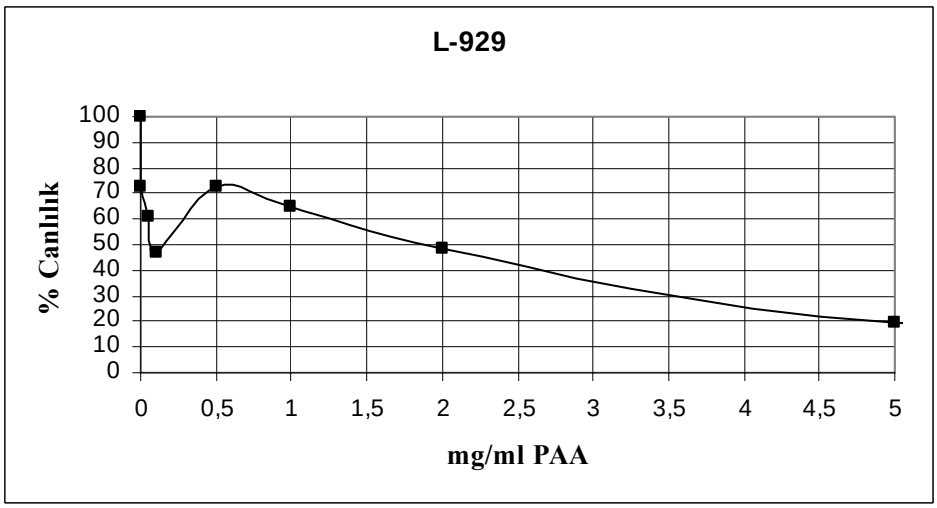
Çizelge 7.14 daki sonuçlar kullanılarak L-929 hücrelerinin poliakrilik asit konsantrasyonuna bağlı % canlılık grafiği çizildi (Çizelge 7.15).

Çizelge 7. 15 Farklı konsantrasyonlarda ki PAA'nın L-929 hücrelerindeki % canlılığı



Bu çizelge 7.15'dan yaralanılarak L-929 hücrelerinin %50 'sine etki eden poliakrilik asidin EC_{50} değeri saptandı (Çizelge 7.16). Buna göre poliakrilik asidin EC_{50} değeri 1.8 olarak belirlendi.

Çizelge 7. 16 PAA'nın L-929 hücrelerinde % canlılık eğrisi



Bu deneysel çalışmada da pH:7.0 olan PAA'nın farklı konsantrasyonlarının L-929 hücreleri üzerinde ki toksik etkisi morfolojik olarak incelenmiş ve MTT yöntemi ile elde edilen sonuçlardan çizilen grafikle EC_{50} değeri belirlenmiştir. Buna göre pH: 7.0 da PAA'nın L-929 hücrelerinde EC_{50}= 1.8'dir. PAA'nın 25 ile 5 mg/ml arasında uygulanan konsantrasyonlarında hücrelerin morfolojik olarak tamamen deforme olduğu (parçalanan hücreler) gözlenmiş ve PAA'nın yüksek konsantrasyonlarında yok denecek kadar az formazan kristali oluştuğu belirlenmiştir. Mikroskobik olarak gözlemlediğimiz bu formazan kristal oluşumu ELISA ile

ölçülerek % canlılık olarak hesaplanmıştır. Az kristal oluşumuna paralel olarak, hesaplanan EC_{50} değerine göre L-929 hücrelerinde PAA'nın düşük konsantrasyonlarında toksik olduğu söylenebilir.

7.7 Poliakrilik Asidin (pH:7.0) MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Tripan Mavisi Boyası Kullanılarak Tayini

24 kuyucuklu pleyte ekilen MCF 7 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda morfolojik durumları incelendiğinde hücrelerin kuyucukları kapladığı, normal morfolojik görünümde olduğu ve kuyucuğun yüzeyinde yüzen ölü hücre olmadığı izlendi.

Bu pleyt kültür deneyinde pH'sı 7.00 olan poliakrilik asidin değişik konsantrasyonlarının (Son konsantrasyon 20 mg/ml, 10 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml PAA olacak şekilde) MCF 7 hücreleri üzerinde toksik etkisi incelendi. Deneyde kontrol ve her bir konsantrasyon için 4 ayrı kuyucuk değerlendirildi.

7.7.1 Morfolojik İnceleme

Poliakrilik asidin MCF 7 hücrelerine ilave edilmesinden 24 saat sonra hücrelerin durumu mikroskobik olarak incelendiğinde, kontrol grubu olan kuyularda ki hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı olduğu gözlenirken, %80 yüzey kaplaması olmuştur ve her alanda 1-2 yüzen ölü hücre vardır. 20 mg/ml ile 10 mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücrelerde deformasyon gözlendi. Hücrelerin küçüldüğü, yüzey uzantılarını kaybettiği ve yuvarlak formda olduğu, yüzey kaplamasının azaldığı ve parlaklığının kaybolduğu morfolojik olarak tespit edilmiştir. Ayrıca kuyucuklarda yüzen hücre sayısı çok fazladır. 10 mg/ml PAA bulunan kuyucukların tek farkı hücre sayısının 20 mg/ml'ye göre daha fazla olmasıdır. 4 mg/ml ile 2 mg/ml PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ise fazla sayıda bulunan yuvarlak ve küçülmüş hücrelerin arasında normal morfolojiye sahip hücrelerin olduğu gözlemlenirken, 2 mg/ml de 4 mg/ml'ye oranla hücre sayısı daha fazladır. Ayrıca bu konsantrasyonlarda da her alanda 7-8 yüzen hücre vardır. Buna bağlı olarakta yüzey kaplaması kontrole göre daha azdır. 0.01 mg/ml PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücrelerin ise kontrol grubundaki hücreler gibi sağlıklı olduğu gözlemlendi.

7.7.2 Tripan Mavisi İle Boyanma

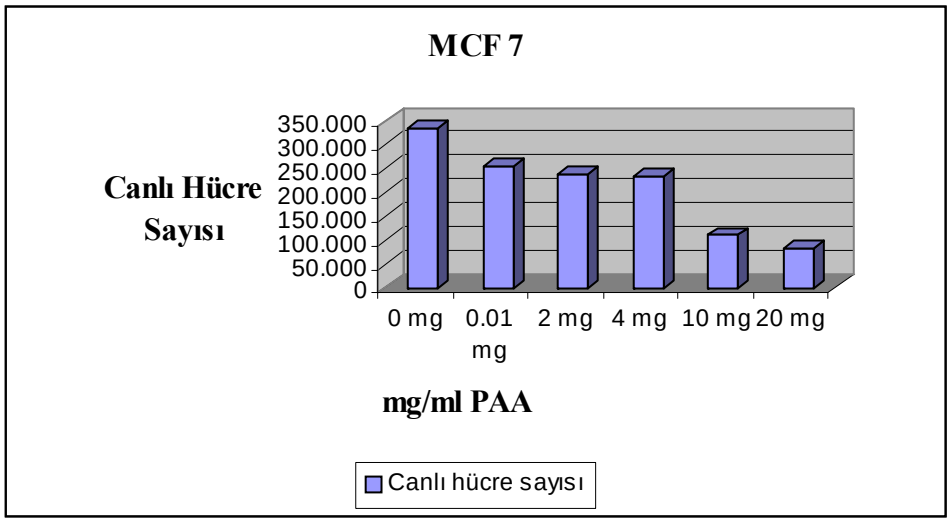
Poliakrilik asit ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinde 24 saat sonra meydana gelen değişiklikler sonrasında hücreler, deneysel çalışmalar bölümünde bahsedildiği gibi tripan

mavisi boyası ile boyanarak toma lamında ışık mikroskobu ile sayıldı. Tripan mavisini içine alarak mavi görünen hücreler ölü hücre olarak kabul edilirken, tripan mavisini içine almayan ve şeffaf, parlak görünen hücreler ise canlı hücre olarak kabul edildi. Kontrol grubu olan kuyularda hücreler fazla sayıda olduğu ve morfolojik olarak deforme olmadığı için tripan ile sayım sonucunda canlı hücre sayısı fazladır. 20 mg/ml ile 10 mg/ml poliakrilik asit konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda hücrelerin sayısı deformasyondan dolayı azdır. Bu nedenle tripan mavisi ile boyanması sonucunda canlı hücre sayısı az bulunmuştur. Ölü hücre sayısının da az bulunmasının nedeni boyama işlemi sırasında yapılan tripsinizasyon ve yıkamalar esnasında yüzeyden kalkan ölü hücrelerin kuyucuklardan uzaklaştırılmasıdır. 4 mg/ml, 2 mg/ml, 0.01 mg/ml poliakrilik asit konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda sağlıklı hücrelerin sayısı daha fazla olduğu için tripan mavisi ile boyanma sonucunda daha fazla sayıda canlı hücre sayılmıştır (Çizelge 7.17).

Çizelge 7. 17 Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA'nın MCF 7 hücreleri üzerindeki etkisinin tripan mavisi boyanması sonucu hesaplanan canlı ve ölü hücre sayısı ile % canlılık oranları

PAA Konsantrasyonu	% Canlılık	Canlı hücre sayısı	Ölü hücre sayısı
0 mg	100	335.000	30.000
0.01 mg	76	255.000	50.000
2 mg	70	237.000	10.000
4 mg	69	232.000	30.000
10 mg	32	110.000	17.000
20 mg	25	83.000	23.000

Çizelge 7. 18 Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA'nın MCF 7 hücreleri üzerindeki etkisinin tripan mavisi ile sayılması sonucu hesaplanan canlı hücre sayısı.



Hücre canlılığını değerlendirmede kullanılan yöntemlerden biri olan tripan mavisi ile boyama sonucunda elde edilen bulgular MTT sonuçlarını destekleyerek, PAA'nın farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücreleri üzerindeki toksik etkisini göstermiştir.

7.8 Poliakrilik Asidin L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Tripan Mavisi Boyası Kullanılarak Tayini

24 kuyucuklu pleyte ekilen L-929 hücrelerinin 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 48 saatlik inkübasyonu sonucunda morfolojik durumları ters mikroskopta incelendi. Hücrelerin kuyucukları kapladığı izlendi. Hücreler genel sahip oldukları morfolojik görünümdedir ve kuyucuğun yüzeyinde yüzen ölü hücre yoktur.

Yapılan bu pleyt kültür deneyinde de pH'sı 7.00 olan PAA'nın değişik konsantrasyonlarının (Son konsantrasyon 20 mg/ml, 10 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml PAA olacak şekilde) L-929 hücreleri üzerinde toksik etkisi incelendi. Deneyde kontrol ve her bir konsantrasyon için 4 ayrı kuyucuk değerlendirildi.

7.8.1 Morfolojik İnceleme

Poliakrilik asidin L 929 hücrelerine ilave edilmesinin ardından mikroplak 37° C de %5 CO_2'li inkübatöre kaldırıldı. 24 saat sonra mikroplağın kuyucuklarındaki hücrelerin durumu mikroskobik olarak incelendi. Bu incelemeler sonucunda kontrol grubu olan kuyularda ki hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı olduğu gözlenirken, her alanda 1-2 yüzen ölü hücre vardır. 20 mg/ml ile 10 mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücrelerde deformasyon gözlendi. Hücrelerin küçüldüğü, yüzey uzantılarını tamamen kaybettiği ve yuvarlak formda olduğu, tamamına yakınının yüzen hücre olduğu tespit edildi. 4 mg/ml ile 2 mg/ml PAA konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ise fazla sayıda bulunan yuvarlak ve küçülmüş hücrelerin arasında normal morfolojiye sahip hücrelerin olduğu gözlemlenirken, 2 mg/ml de 4 mg/ml'ye oranla hücre sayısı daha fazladır. Ayrıca bu konsantrasyonlarda da her alanda 7-8 yüzen hücre vardır. Buna bağlı olarakta yüzey kaplaması az olmuştur. 0.5 mg/ml ile 0.005 mg/ml poliakrilik asit konsantrasyonları olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda ki hücrelerin ise kontrol grubundaki hücreler gibi sağlıklı olduğu gözlemlendi.

7.8.2 Tripan Mavisi İle Boyanma

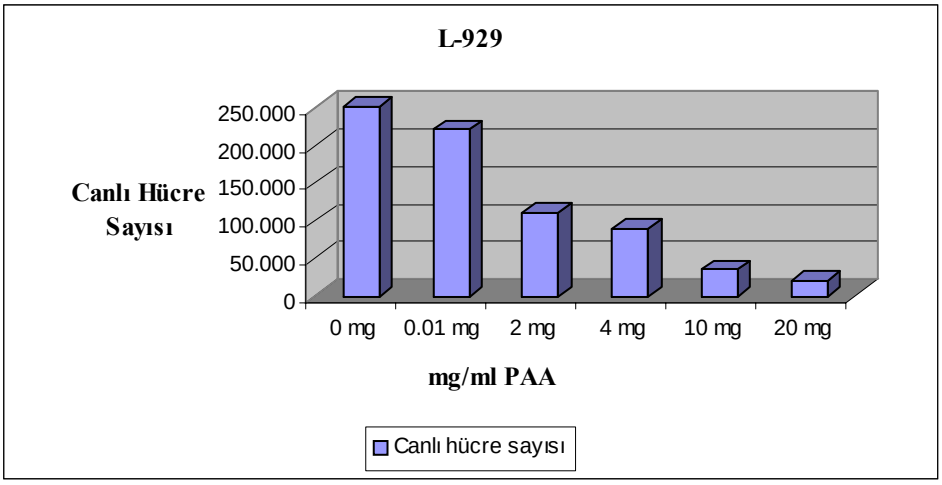
Poliakrilik asit ile muamele edilmiş L-929 hücreleri 24 saat sonra deneysel çalışmalar bölümünde bahsedildiği gibi tripan mavisi boyası ile boyanarak toma lamında ışık

mikroskobu ile sayım yapıldı. Tripan mavisini içine alarak mavi görünen hücreler ölü hücre olarak kabul edilirken, tripan mavisini içine almayan ve şeffaf, parlak görünen hücreler ise canlı hücre olarak kabul edildi. Kontrol grubu olan kuyularda hücreler fazla sayıda olduğu ve morfolojik olarak deforme olmadığı için tripan ile sayım sonucunda canlı hücre sayısı fazladır. 20 mg/ml ile 10 mg/ml poliakrilik asit konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda hücrelerin sayısı hücrelerin deformasyon olmasından dolayı azdır. Bu nedenle tripan mavisi ile boyanması sonucunda canlı hücre sayısı çok az bulunmuştur. 4 mg/ml, 2 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml poliakrilik asit konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda sağlıklı hücrelerin sayısı daha fazla olduğu için tripan mavisi ile boyanma sonucunda daha fazla sayıda canlı hücre sayılmıştır (Çizelge 7.20).

Çizelge 7. 19 Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA'nın L-929 hücreleri üzerindeki etkisinin tripan mavisi boyanması sonucu hesaplanan canlı ve ölü hücre sayısı ile % canlılık oranları

PAA Konsantrasyonu	% Canlılık	Canlı hücre sayısı	Ölü hücre sayısı
0 mg	100	250.000	5.000
0.01 mg	88	220.000	13.000
2 mg	45	110.000	11.000
4 mg	36	90.000	10.000
10 mg	14	35.000	0
20 mg	8	20.000	0

Çizelge 7. 20 Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda ki PAA'nın L-929 hücreleri üzerindeki etkisinin tripan mavisi boyanması sonucu hesaplanan canlı hücre sayısı



Tripan mavisi ile boyama sonucunda elde edilen bulgular MTT sonuçlarını destekleyerek, PAA'nın farklı konsantrasyonlarının L-929 hücreleri üzerindeki toksik etkisini göstermiştir.

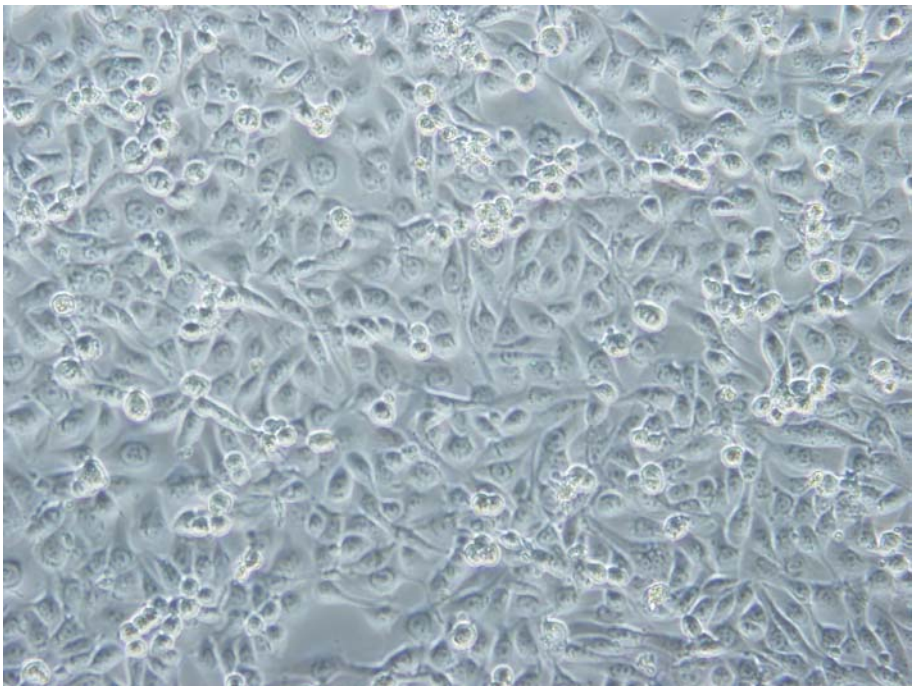
7.9 Poliakrilik Asidin Değişik Konsantrasyonlarının MCF 7 Hücreleri Üzerinde Apoptoz Etkisinin DAPI ile Belirlenmesi

Lameller üzerine ekilen MCF 7 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda morfolojik durumları ters mikroskopta incelendiğinde, lamellerin orta kısmında yoğun hücre kaplaması gözlenirken, lamellerin kenar kısımlarına doğru kaplamanın daha az olduğu izlendi. Ancak lameller üzerinde ikinci hücre tabakası oluşmamıştır. Hücreler genel sahip oldukları morfolojik görünümdedir ve kuyucuğun yüzeyinde yüzen ölü hücre yoktur.

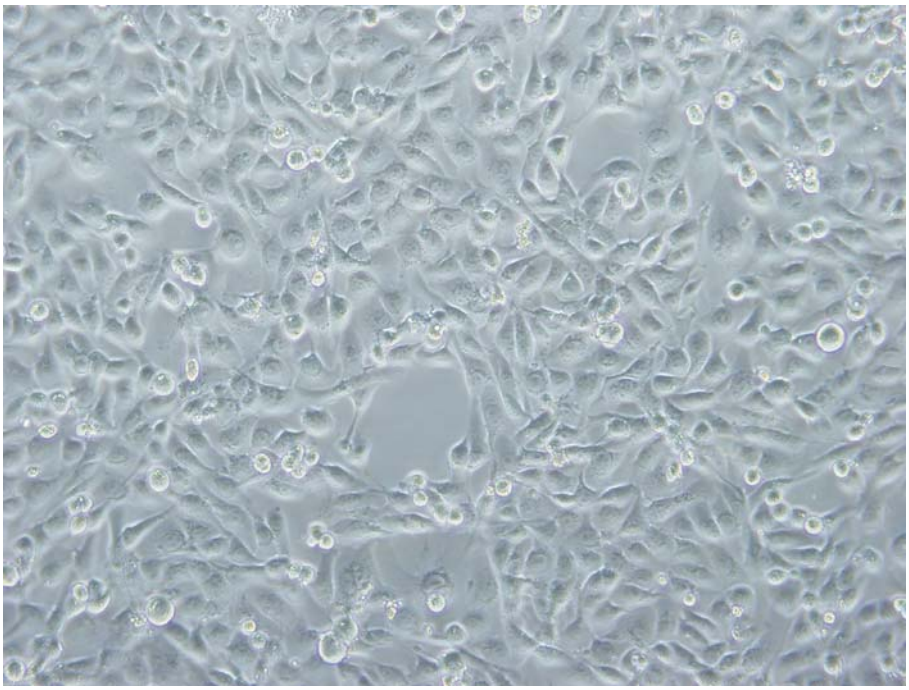
Bu lamel kültür deneyinde pH'sı 7.00 olan poliakrilik asidin değişik konsantrasyonlarının (Son konsantrasyon 10 mg/ml, 4 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.005 mg/ml PAA olacak şekilde) MCF 7 hücreleri üzerinde apoptoz etkisi incelendi. Deneyde her bir PAA konsantrasyonu için 2 ayrı lamel kültürü kullanıldı. Ayrıca 2 lamel kültürüne poliakrilik asit eklenmedi ve bu lameller kontrol grubu olarak değerlendirildi.

7.9.1 Morfolojik İnceleme

Poliakrilik asidin MCF 7 hücrelerine ilave edilmesinden 24 saat sonra, pleytte bulunan lameller üzerindeki hücrelerin morfolojik durumu mikroskobik olarak incelendi. İncelemeler sonucunda kontrol grubu olan lamellerde ki hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı olduğu, lamelin ekilen kısmında %100 kaplama olurken kenar kısımlarına doğru hücrelerin azaldığı gözlendi. 10 mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda lamellerde ki hücrelerde deformasyon gözlendi. Hücrelerin küçüldüğü, yüzey uzantılarını kaybettiği, yuvarlak formda olduğu, yüzey kaplamasının azaldığı ve hücrelerin %90'ının yüzen ölü hücreler olduğu morfolojik olarak tespit edilmiştir. 4 mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda lamellerde ki hücrelerde fazla sayıda bulunan küçülmüş, yuvarlak hücrelerin arasında normal morfolojiye sahip hücrelerin olduğu gözlemlenirken, her alanda 8-10 adet yüzen hücre olduğu tespit edildi. 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.005 mg/ml olacak şekilde PAA konsantrasyonunu içeren kuyularda lamellerde ki hücrelerinde kontrol grubundaki hücreler gibi sağlıklı olduğu gözlemlendi (Şekil 7.42, 7.43, 7.44, 7.45).



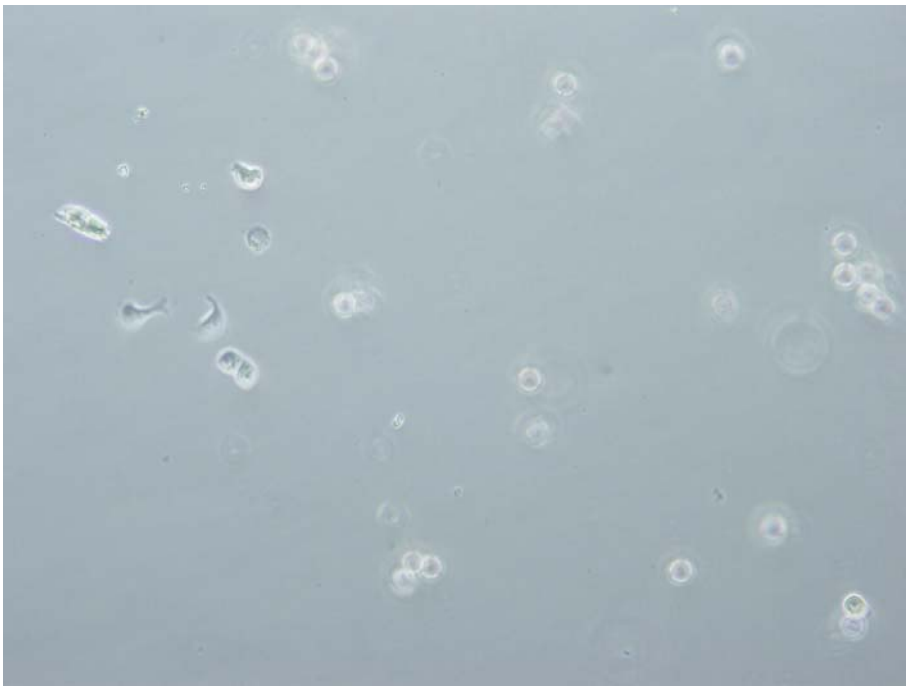
Şekil 7. 42 Lameller üzerinde kültüre edilen kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin mikroskobik görüntüsü (20x).



Şekil 7. 43 Lameller üzerinde kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 0.005 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş mikroskob

ik görüntüsü (20x).

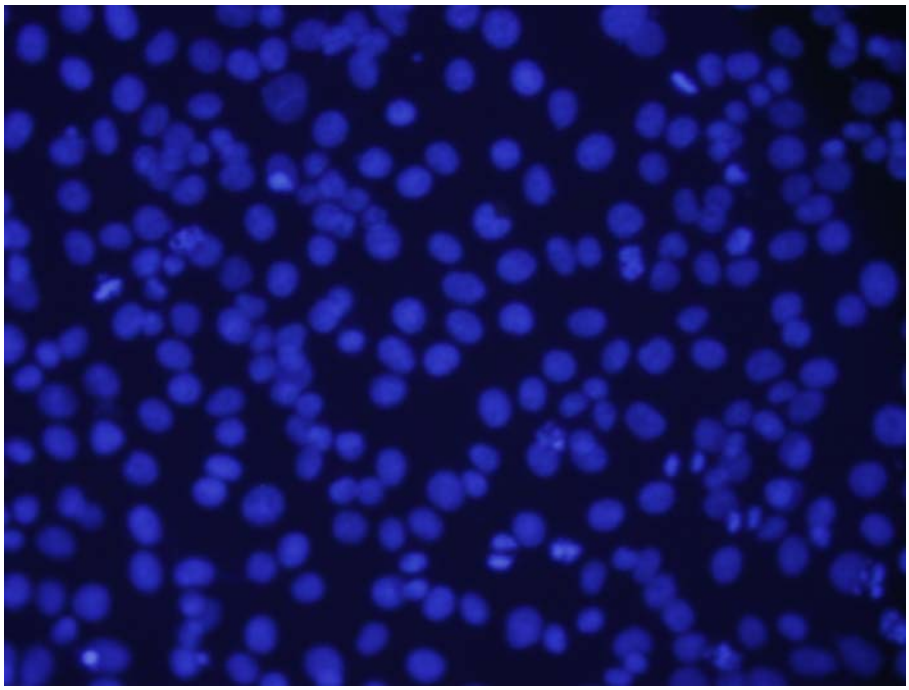
Şekil 7. 44 Lameller üzerinde kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 4 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş mikroskobik görüntüsü (20x).



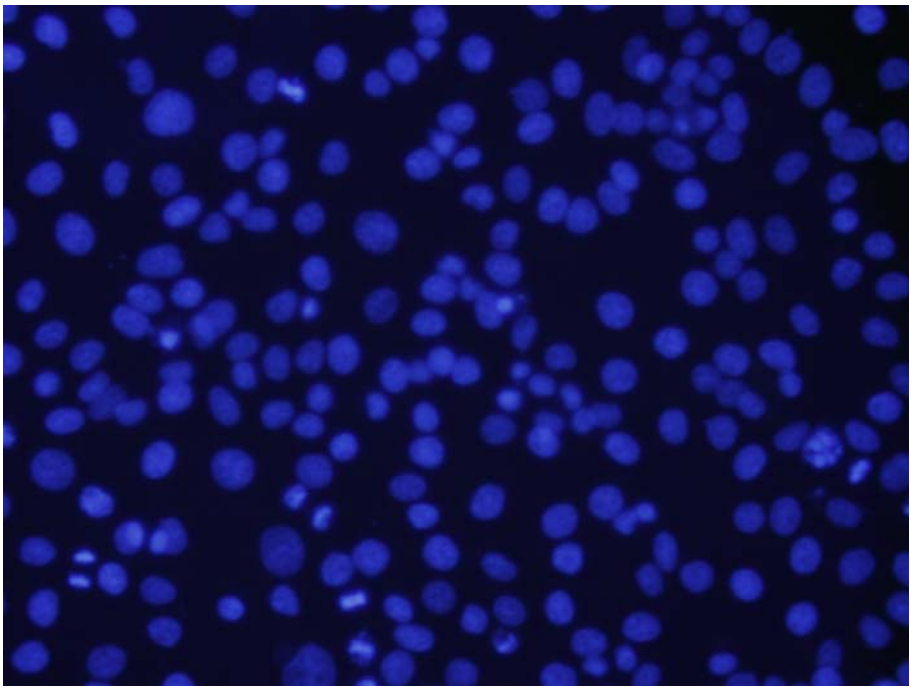
Şekil 7. 45 Lameller üzerinde kültüre edilen MCF 7 hücrelerinin 10 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş mikroskobik görüntüsü (20x).

7.9.2 Nükleer Boyanma

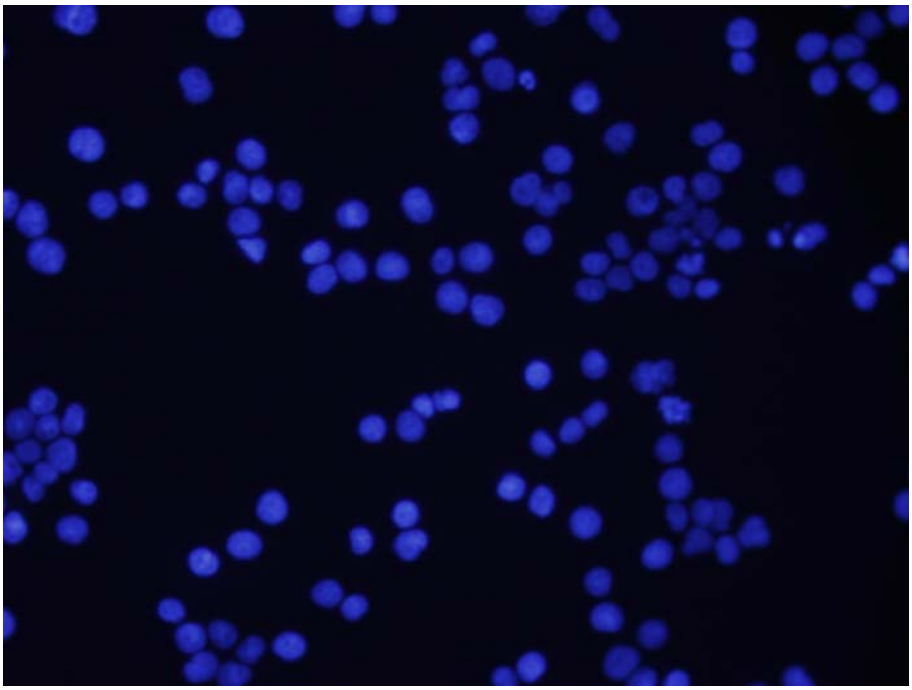
Poliakrilik asit ile muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinde 24 saat sonra meydana gelen değişiklikler, deneysel çalışmalar bölümünde bahsedildiği konsantrasyonda DAPI ile nükleer boyanma sonucunda UV filtrede mikroskobik olarak incelendi. Kontrol grubu olan lamellerde, hücreler fazla sayıda olduğu ve morfolojik olarak deforme olmadığı için DAPI ile boyanan nukleusların sayısı çoktur. Bununla beraber nukleusler eşit büyüklüktedir, yer yer küçülmeler vardır. Çok sayıda hücre bölünmesi gözlemlenmiştir. Apoptotik cisimciğe rastlanılmamıştır. 10 mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda lameller üzerindeki hücrelerin sayısı hücrelerin deformasyon olmasından dolayı azdır. Bu nedenle DAPI ile boyanan nukleus sayısı da azdır. Nukleuslar kontrole göre büzülmüş, küçülmüş ve deforme olmuştur. Ayrıca tüm alanda 8-10 adet apoptotik cisimciklere rastlanılmıştır. 4 mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda lameller üzerindeki hücrelerin sayısı daha fazla olduğu için DAPI ile boyanan nukleus sayısı da daha fazladır. Nukleuslarda daha çok yarım ay şeklinde büzülmeler ve küçülmeler izlenmiş, apoptoza giden hücre sayısı da daha az olarak gözlemlenmiştir. Bu konsantrasyon da tüm alanda 3-4 adet apoptotik cisimcik tespit edildi. 0.5 mg/ml, 0,1 mg/ml ile 0,05mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda lameller üzerindeki hücrelerin nukleusları ise kontrol grubu hücrelerin nukleusları gibidir. Kontrolden farklı olarak 1-2 apoptotik cisimcik gözlendi. 0.005 mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda lameller üzerindeki hücrelerin nukleusları da kontrol grubundaki hücrelerin nukleuslarına benzerken, burada kontrolden farklı olarak küçülen nukleuslar daha fazla gözlendi. Apoptotik cisimciğe rastlanılmadı (Şekil 7.46, 7.47, 7.48, 7.49).



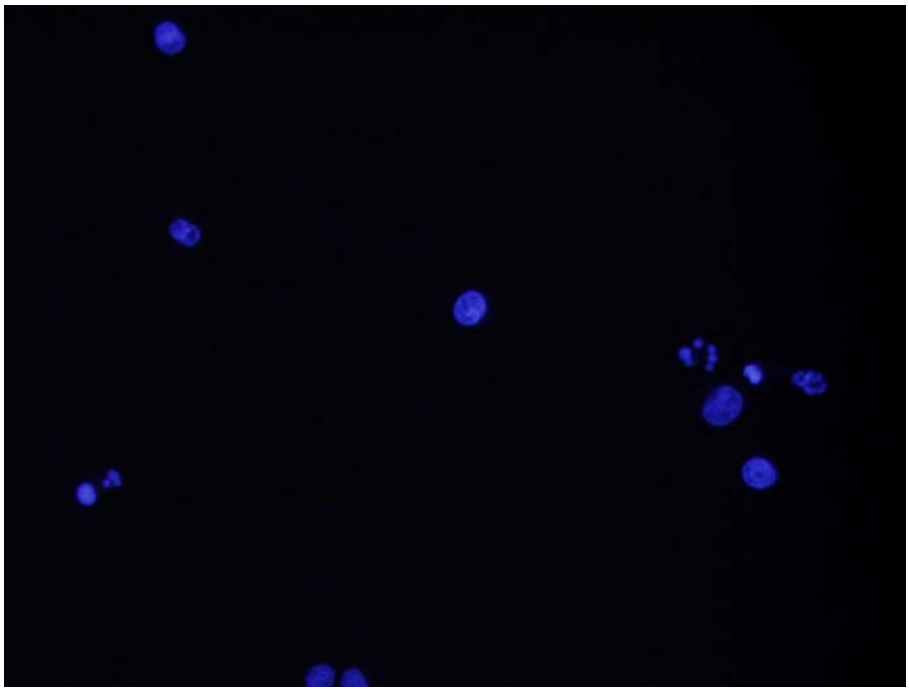
Şekil 7. 46 Kontrol grubu MCF 7 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x).



Şekil 7. 47 Son konsantrasyon 0.005 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x).



Şekil 7. 48 Son konsantrasyon 4 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x).



Şekil 7. 49 Son konsantrasyon 10 mg/ml poliakrilik asit (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş MCF 7 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x)..

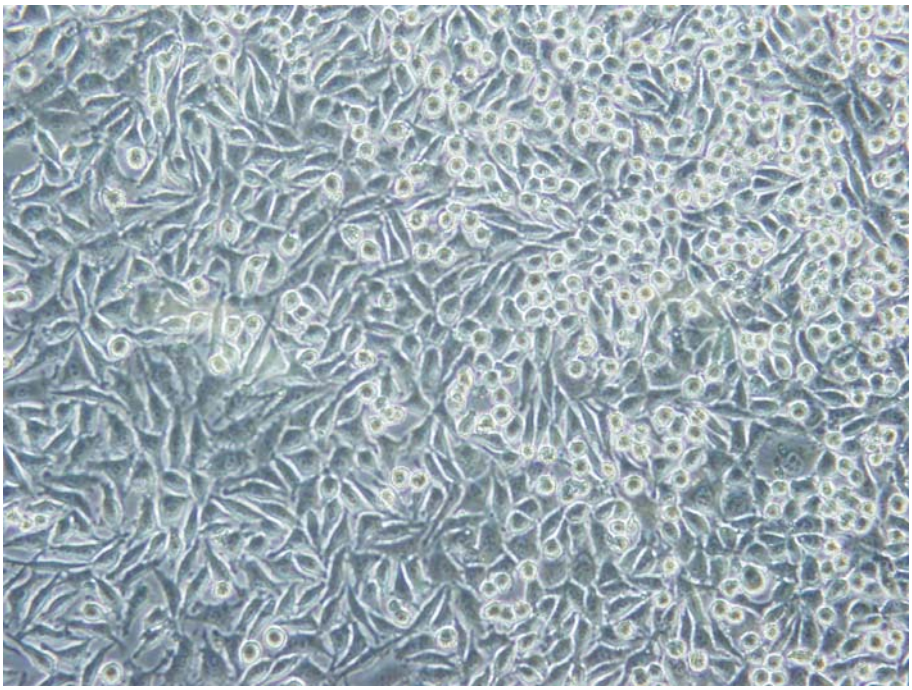
7.10 Poliakrilik Asidin Değişik Konsantrasyonlarının L-929 Hücreleri Üzerinde Apoptoz Etkisinin DAPI İle Belirlenmesi

6 kuyucuklu pleytin kuyucuklarındaki lameller üzerine ekilen L-929 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda morfolojik durumları incelendiğinde lamellerin orta kısmında yoğun kaplama görülürken, lamellerin kenar kısımlarına doğru kaplamanın daha az olduğu izlendi. Lameller üzerinde ikinci hücre tabakası oluşmazken, hücreler genel sahip oldukları morfolojik görünümdedir ve kuyucuğun yüzeyinde yüzen ölü hücre yoktur.

Yapılan bu deneyde pH'sı 7.00 olan PAA'nın değişik konsantrasyonlarının (Son konsantrasyon 10 mg/ml, 4 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.005 mg/ml PAA olacak şekilde) L-929 hücreleri üzerinde apoptoz etkisi incelendi. Deneyde her bir PAA konsantrasyonu için 2 ayrı lamel kültürü kullanıldı. Ayrıca 2 lamel kültürüne poliakrilik asit eklenmedi ve bu lameller kontrol grubu olarak değerlendirildi.

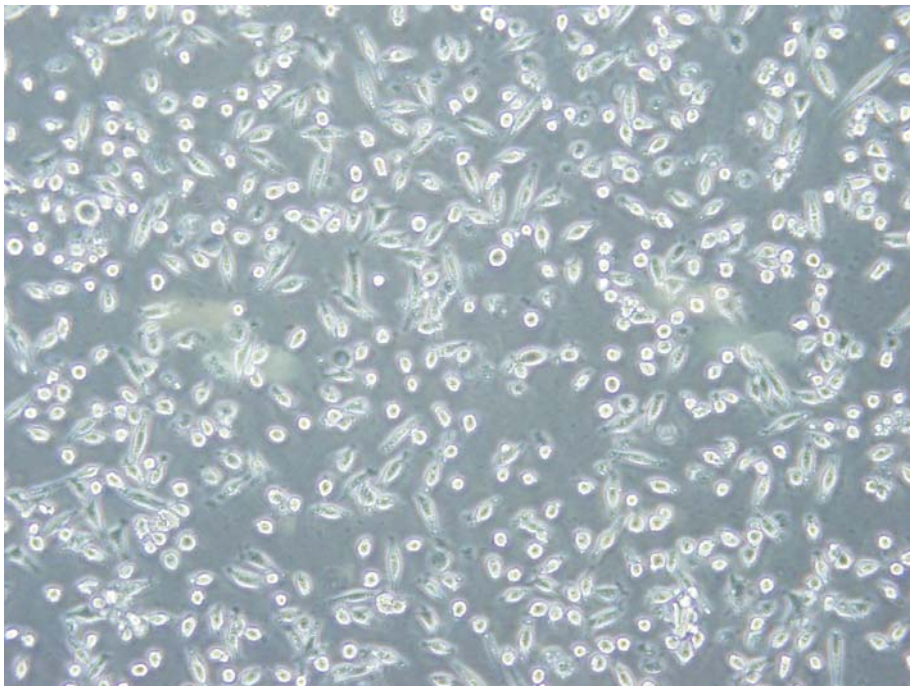
7.10.1 Morfolojik İnceleme

Poliakrilik asidin L-929 hücrelerine ilave edilmesinden 24 saat sonra yapılan incelemede; lameller üzerindeki kontrol grubu hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı olduğu, lamelin ekilen kısmında %100 kaplama olurken kenar kısımlarına doğru hücrelerin azaldığı gözlendi. 10 mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda lamellerde ki hücrelerde deformasyon gözlendi. Hücrelerin küçüldüğü, yüzey uzantılarını tamamen kaybettiği, yuvarlak formda olduğu, yüzey kaplamasının olmadığı ve hücrelerin tamamına yakınının yüzen ölü hücreler olduğu morfolojik olarak tespit edilmiştir. 4 mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda lamellerde ki hücrelerde fazla sayıda bulunan küçülmüş, yuvarlak hücrelerin arasında normal morfolojiye sahip hücrelerin olduğu gözlemlenirken, her alanda yüzen hücre olduğu da tespit edildi. 0.5 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.005 mg/ml olacak şekilde PAA konsantrasyonunu içeren kuyularda lamellerde ki hücrelerinde kontrol grubundaki hücreler gibi sağlıklı olduğu gözlemlendi (Şekil 7.50, 7.51, 7.52, 7.53).

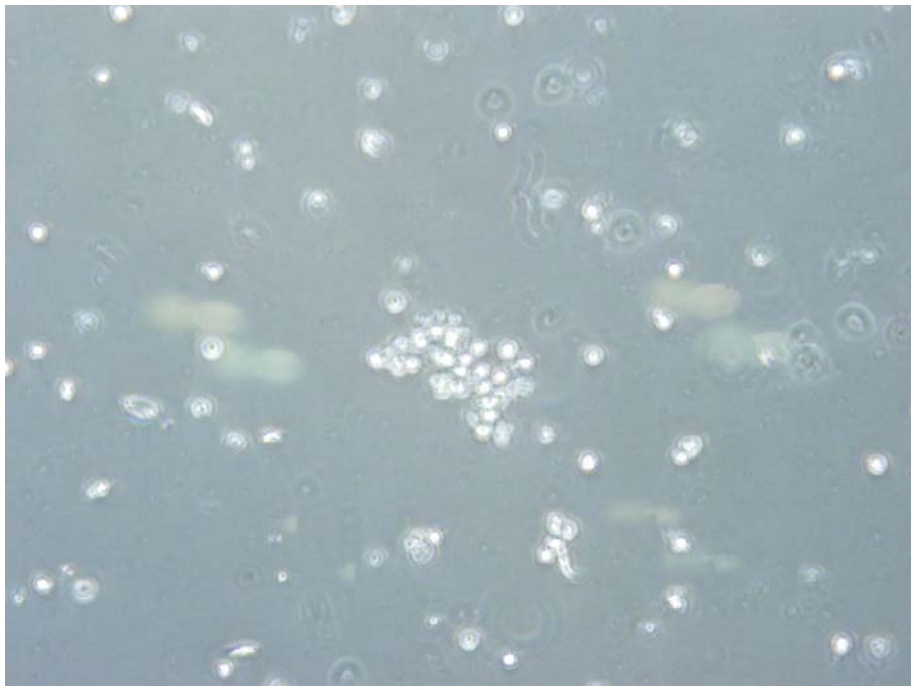


Şekil 7. 50 Lameller üzerinde kültüre edilen kontrol grubu L-929 hücrelerinin mikroskobik incelenmesi.

Şekil 7. 51 Lameller üzerinde kültüre edilen L-929 hücrelerinin 0.005 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş mikroskobik görüntüsü.



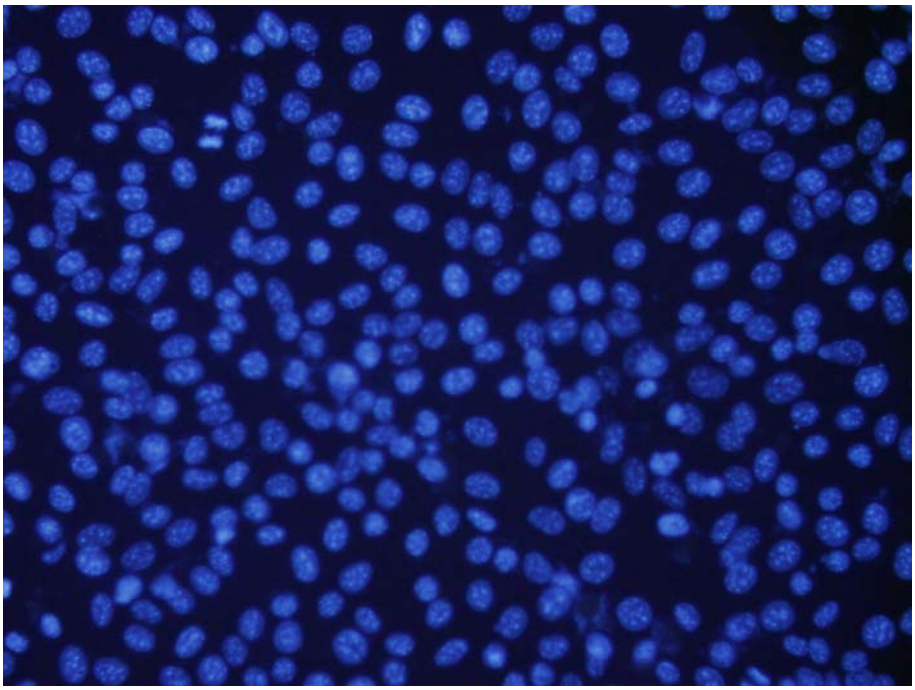
Şekil 7. 52 Lameller üzerinde kültüre edilen L-929 hücrelerinin 4 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş mikroskobik görüntüsü.



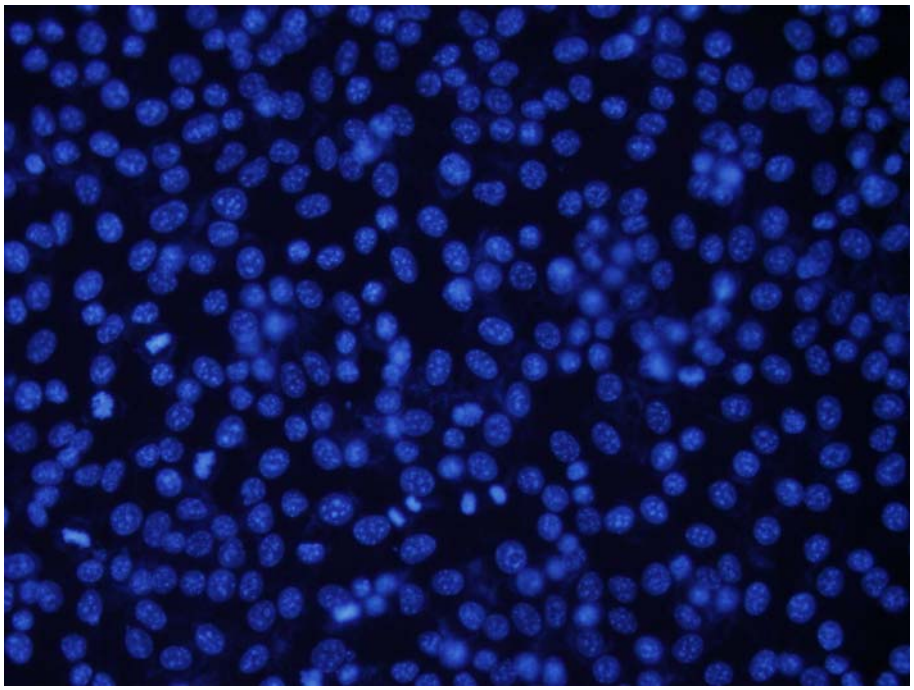
Şekil 7. 53 Lameller üzerinde kültüre edilen L-929 hücrelerinin 10 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş mikroskobik görüntüsü.

7.10.2 Nükleer Boyanma

Poliakrilik asit ile muamele edilmiş L-929 hücrelerinde 24 saat sonra meydana gelen değişiklikler deneysel çalışmalar bölümünde bahsedildiği konsantrasyonda hazırlanan DAPI ile nükleer boyanma sonucunda UV filtrede mikroskobik olarak incelendi. Kontrol grubu olan lamellerde, hücreler fazla sayıda olduğu ve morfolojik olarak deforme olmadığı için DAPI ile boyanan nukleusların sayısı çoktur. Bununla beraber nukleusler eşit büyüklüktedir, yer yer küçülmeler vardır. Hücre bölünmeleri gözlemlenmiştir. 1 adet apoptotik cisimciğe rastlanılmıştır. 10 mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan kuyularda lameller üzerindeki hücrelerin sayısı hücrelerin tamamen deformasyon olmasından dolayı çok azdır. Bu nedenle DAPI ile boyanan nukleus sayısı da çok azdır. Nukleuslar kontrole göre büzülmüş, küçülmüş ve deforme olmuştur. Hücre sayısı çok az olduğu için fazla inceleme olanağı olmamıştır. 4 mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan lameller üzerindeki hücrelerin sayısı daha fazla olduğu için DAPI ile boyanan nukleus sayısı da daha fazladır. Nukleuslarda daha çok yarım ay şeklinde büzülmeler ve küçülmeler izlenmiş, tüm alanda 4 adet apoptotik cisimcik gözlemlenmiştir. 0.5 mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan lameller üzerindeki hücrelerin nukleusları yarım ay şeklinde küçülmüş, hücre içerikleri belirginliğini kaybetmiş, 3-4 apoptotik cisimcik gözlenmiştir ve bu konsantrasyonda bölünme aşamasındaki nukleuslara rastlanılmamıştır. 0.005 mg/ml PAA konsantrasyonu olacak şekilde eklenmiş olan lameller üzerindeki hücrelerin nukleusları da kontrol grubundaki hücrelerin nukleuslarına benzerken, burada kontrolden farklı olarak küçülen nukleuslar daha fazla gözlemlendi ve tüm alanda 2-3 apoptotik cisimciğe rastlanıldı (Şekil 7.54, 7.55, 7.56, 7.57).

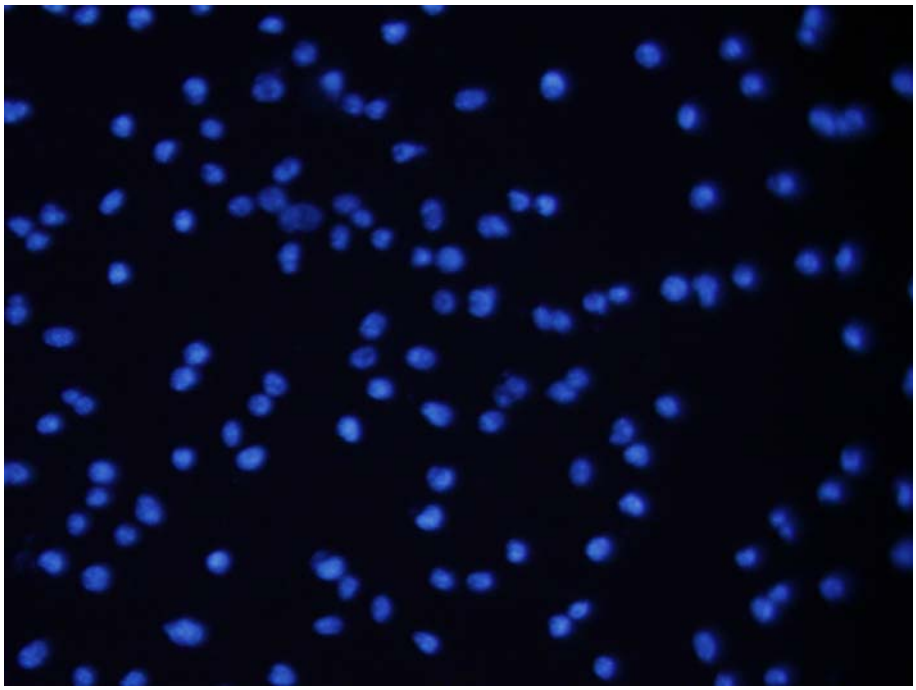


Şekil 7. 54 Kontrol grubu L-929 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x).

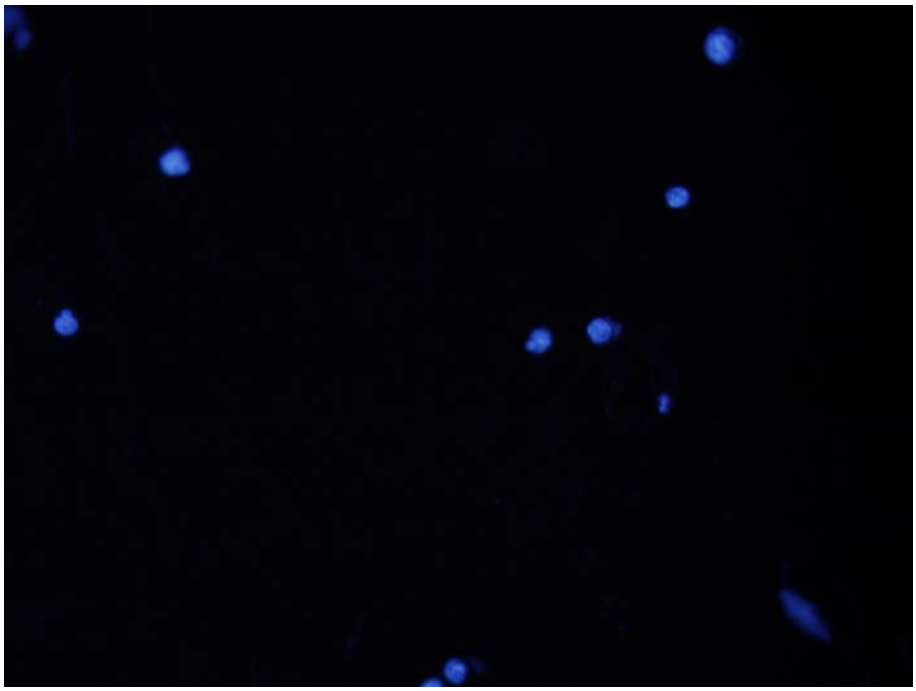


Şekil 7. 55 Son konsantrasyon 0.005 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş L-929 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x).

.



Şekil 7. 56 Son konsantrasyon 4 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş L-929 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x).



Şekil 7. 57 Son konsantrasyon 10 mg/ml PAA (pH:7.00) ile 24 saat muamele edilmiş L-929 hücrelerinin DAPI ile boyanan nukleuslarının floresan mikroskopta UV filtre ile incelenmesi (40x).

Sonuçta morfolojik olarak gözlemlediğimiz hücre ölümünü daha iyi karekterize edebilmek için MCF 7 ve L-929 hücreleri DNA'ya spesifik bir boya olan DAPI ile boyanarak floresan mikroskopta incelendi. DAPI çift zincirli DNA ile floresan kompleks oluşturdu. Kontrol hücreleri sağlıklı hücre morfolojisi gösterirken, PAA'nın farklı konsantrasyonlarında kromotin yoğunlaşması ve nükleer fragmanları içeren apoptotik cisimcikler oluşması gibi apoptotik hücre ölümünün tipik morfolojik belirtileri gözlendi. Hücrelerde apoptoza özgü nukleusta küçülmeler meydana geldi.

Hücre kültürü çalışmalarının tıp, biyoloji gibi birçok bilim alanında uygulanılmasıyla bu alanda çok büyük aşamalar sağlanmıştır. Hücre kültürlerinin viral aşıların hazırlanması, hastalığın tanısı için kanserli doku kültürlerinin yapılması, ilaçların aktivitelerinin ve toksik etkilerinin çalışılması gibi çeşitli alanlarda kullanılması kültür çalışmalarının ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle öncelikle Y.T.Ü Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarında ilk kez MCF 7 ve L-929 hücrelerinin kültür adaptasyonluğu sağlanmış ve devamlı kültürleri elde edilmiştir. Bu hücrelerin kriyoprezervasyonunun sağlanmasında optimal şartlar belirlenmiş ve laboratuvarda deneysel çalışmalarda kullanılacak hücrelerin yeterli miktardaki kriyobankı oluşturulmuştur. Ayrıca laboratuvarda polimerlerin toksik etkisinin hücre kültürlerinde incelenmesi amacıyla çalışmalarda kullanılacak MTT, tripan mavisi ve DAPI yöntemlerinin uygulanması otutturulmuştur.

Yapılan deneysel çalışmalar; poliakrilik asidin toksik etkisinin incelenmesi ve EC_{50} değerinin tayin edilmesinde farklı pH ortamının ve farklı hücrelerin kültürlerinin önemli rol oynadığını göstermektedir. Aynı hücre hattına ait kültürlerde farklı EC_{50} değerlerinin ortaya çıkması, polimerlerle yapılan çalışmalarda sadece incelenecek olan polimerin pH'sının değil aynı zamanda kültüründe pH'sının dikkate alınmasının önemli olduğunu vurgulamaktadır. MCF 7 hücrelerinde PAA'nın pH:2.5'te EC_{50} değeri 3.6 iken, pH:7.0'da EC_{50} değerinin 6.6 olduğu tespit edilmiştir. Poliakrilik asidin pH:7.0 değerinde MCF 7 hücreleri ile yapılan bu çalışma sonuçları aynı zamanda MCF 7 hücrelerinin PAA'nın toksisitesinin tayin edilmesinde uygun bir model olduğunu göstermektedir. Böylece bu çalışmalar ilk kez PAA'nın toksik etkisinin incelenmesinde MCF 7 hücre kültürünün iyi bir model oluşturabileceğini ortaya koymaktadır.

L-929 hücre kültüründe farklı PAA (pH:7.0) konsantrasyonları (MCF 7 hücrelerine uygulanan) ile yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilen sonuçlar L-929 hücrelerinin EC_{50} değerinin (MCF 7 hücrelerinin EC_{50} değerinden farklı olarak) 1.8 olduğu tespit edilmiştir. MCF 7 hücrelerine göre L-929 hücrelerinin PAA'ya daha duyarlı olması bu hücrelerin biyolojik özelliğine bağlı olabileceğini göstermektedir. Meme kanser hücrelerinin insana özgü

hücreler olması yapılan çalışmaların ileride hastalarda uygulanması açısından değerini daha da arttırmaktadır.

Başka bir toksisite tayin etme metodu olan tripan mavisi boyama yöntemi ile MCF 7 ve L-929 hücrelerinde PAA'nın toksisitesiyle ilgili elde edilen sonuçlar MTT testi ile tespit edilen sitotoksik etki sonuçlarına benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

MCF 7 ve L-929 hücre kültürlerinde PAA'nın toksik etkisinin incelenmesinde hücre çekirdeğinde meydana gelen apoptotik değişiklikleri belirlenmek amacıyla DAPI yöntemi uygulandı. Artan konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonunun azaldığı ve apoptotik özelliklerin gözlendiği hücre ölümünün gerçekleştiği belirlendi. Nukleusta daralma, kromotin yoğunlaşması, nukleusun böbrek şeklini alması, apoptotik cisimciklerin oluşması gibi apoptozun karekteristik özellikleri gözlendi. Hücre canlılığının belirlenmesinde hücre çekirdeğinde meydana gelen patolojik değişiklikleri yansıtan bu DAPI sonuçları MTT ve tripan mavisi boyama metodu ile elde edilen diğer hücre canlılık sonuçlarını desteklemektedir.

Elde edilen bu sonuçlar biyopolimerlerin toksisitesinin tayin edilmesinde kültürde kullanılacak hücre hattının seçilmesinde bir standartizasyonunun olmadığını gösterir. Bu nedenle herhangi bir polimerin veya onun oluşturulan konjugatının toksisitesinin incelenmesinde; bu polimerin veya konjugatının uygulanacağı biyojik alanlar göz önünde bulundurularak hücrelerin kültür modelleri seçilmelidir. Ayrıca biyopolimerlerin toksisitesinin tayin edilmesinde kullanılan kültür sisteminin de standartizasyonu yapılmalıdır.

.

KAYNAKLAR

Abe K. ve Matsuki N., (2000), "Measurement of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenytetrazoliumbromide (MTT) Reduction Activity and Lactate Dehydrogenase Release Using MTT", Neurosci Res, 38:325-329.

Akan, E., (1994), "Özel ve Genel Virolji", Saray Medikal Yayıncılık, 75-82, İzmir.

Akovalı G., (1984), "Temel ve Uygulamalı Polimerler", Ankara.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M,. Roberts K. ve Watson JD., (1994), "Molecular Biology of The Cell", Garlan Publishing Inc, USA, 156-62.

Alley M.C., Scudiero D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L., Abbott B.J, Mayo J.G., Shoemaker R.H. ve Boyd M.R., (1988), "Feasibility of Drug Screening With Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay", Cancer Res, 48:589-601.

Anchordoguy T.J., Cecchini C.A., Crowe J.H. ve Crowe L.M., (1991) "Insights into The Cryoprotective Mechanism of Dimethyl Sulfoxide for Phospholipid Bilayer", Cryobiology, 28:467-73.

Anchordoguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F. ve Crowe J.H., (1987), "Modes of Interaction of Cryoprotectants with Membrane Phosphopids During Freezing. Cryobiogy", 24:324-31.

Armstrong D., (1973), "Contamination in Tissue Cultrure", Academic Pres, 51-63, New York.

Baker F.J. ve Breach M.R., (1980), "Medical Microbiology Techniques", 259-62, 324-29, Great Britain.

Balows A., Hausler J.R., William J., Kenneth L., Herrman Henry D., Isenberg H. ve Shadomy J., (1991), "Manuel Clinical Microbiology", 137-39, USA.

Bank H., (1973) "Visualization of Freezing Damage. II. Structural Alterations During Warming", Cryobiology, 10:157-70.

Baysal B, (1981), "Polimer Kimyası", Ortadoğu Teknik Üniversitesi Yayınları, Ankara

Berquist L.M., (1981), "Microbiology for The Hospital Environment", p:216-222, USA.

Borle A.B. ve Loveday J., (1968), "Effects of Temperature, Potassium and Calcium on The Electrical Potential Difference in HeLa Cells", Cancer Res, 28:2401-405.

Bosman F.T., Visser B.C. ve Ooveren J.V., (1996), "Apoptosis: Pathophysiology of Programmed Cell Death", Path Res Pract, 192: 676-683.

Boyd R.F. ve Hoerly B.G., (1981), "Basic Medical Microbiology", 49-57, USA.

Boyd R.F., (1995) "Basic Medical Microbiology", Little Brow and Company, 397-400, USA.

Brain W., Kangro M. ve H. O., (1996), "Virology Methods Manual", 35-37.

Carson D.A. ve Rbiero J.M., (1993), "Apoptosis and Disease", The Lancet, 341: 1251-1254.

Clereq E. De ve Somer P.De, (2002), "Protective Effect of İnterferon and Polyacrylic Acid İn Newborn Mice İnfected With A Lethal Dose Of Vesicular Stomatitis Virüs, Life Sciences,

7:925-933

Cotran R.S., Kumar V. ve Collins T., (2000), "Pathologic Basis of Disease", WB Saunders Company, 1173-1211 Philadelphia.

Dautzenberg, H., Jaeger, W. ve Kötz, J., (1994), "Polyelectrolytes: Formation, Characterization, and Application", Hanser Publishers, Munich.

Doyle A., Griffiths J.B. ve Newell D.G., (1995), "Cell and Tissue Culture", Laboratory Procedures.John Wiley and Sons Ltd, 3A:1.1,4C:1.1-4D:1.1, England.

Epstein C.J., Epstein W.L., Betlach M. ve Abbo Halbasch G., (1973), "Detection of Mycoplasma Contamination in Cultured Human Fibroblasts- Comparison of Biochemical and Microbiological Techniques", 79:343-49.

Fahy G.M., (1986), "The Relevance of Cryoprotectant Toxicity to Cryobiology", Cryobiology, 23:1-13.

Fahy G.M., MachFarlane D.R., Angell C.A.A. ve Meryman H.T., (1984), "Vitrification as an Approach to Cryopreservation", Cryobiology, 21:407-26.

Farrugia A., Shea N., Knowles S., Holdsworth R., Piouronowski H., Portbury D. ve Romeo A., (1993), "Cryopreservation of Red Blood Cells: Effect of Freezing on Red Cell and Residual Lymphocyte Immunogenecity", J Clin Pathol, 46:742-45.

Feri K.F. ve Kroemer G., (2001), "Mitocondria-The Suicide Organelles", Bio Essays, 23: 111-115.

Finegold S.M. ve Baron E.J.,(1986), "Diagnostic Microbiology", The C V Mosby Company, 643-46, USA.

Freshney R.I., (1986), "Animal Cell Culture", 13-33, 71-8, England.

Freshney R.I., (1987), "Culture of Animal Cells", Alan R. Liss, Inc, 15-47, 57-84, 107-26 , USA.

Garay R.P., (1982), "Inhibition of The Na/K Cotransport System by cAMP and Intracellular Ca^{+2} in Human Red Cells", Biochim Biophys Acta, 688:786-92.

Gavrieli Y., Sherman Y. ve Ben-Sasson S.A., (1992) "Identification of Programmed Cell Death in Situ Via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation", J Cell Biol, 119: 493-501.

Gavrieli Y., Sherman Y. ve Ben-Sasson S.A., (1992)," Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation", J Cell Biol; 119: 493-501.

Ghavamzadeh R., Haddadi-Asl V. ve Mirzadeh H., (2004). "Bioadhesion and Biocompatibility Evaluations Of Gelatin And Polyacrylic Acid As A Crosslinked Hydrogel İn Vitro.", J Biomater Sci Polym Ed., 15(8):1019-31.

Gobe G., Zhang X.J. ve Cuttle L., (1999), "Bcl-2 Genes and Growth Factors in The Pathology of İschemic Acute Renal Failure", Immunol Cell Biol, 77: 279-286.

Goldwosser E. ve Putnam W., (1950), J.Phys.Colloid Chem., v.54, p.79.

Good N.E., Winget G.D., Winter W., Conndly T.N. ve Singh R.M.M., "Hydrogen Ion Buffers for Biological Research", Biochemistry, (1966), 5: 467-77.

Greaves J.L ve Wilson C.G., (1963), "Treatment of Diseases of The Eye with Mucoadhesive Delivery Systems", Advanced Drug Delivery Reviews, 11:349-383

Gürtürk S., (1977), "Virolji", Ankara Üniversitesi Basımevi, 64-73, Ankara.

Haris D.T., Shumacher M.J., Rychi S., Booth A., Acevedo A., Rubinstein P., Bard J. ve Boyse E.A., (1994), "Collection, Separation and Cryoprezervation of Umbilical Cord Blood for Use İn Transplantation", Bone Marrow Transplantation, 13: 135-43.

Harry R., Dittmer ve Strain E., "Polimerization of water Soluble Polymers", U.S. Patent 2, 289, 540, 1942.

Hawlwy G., "The Condensed Chemical Dictionary", Newyork.

Heaton A. ve Miripol J., (1984), "Aster R Use of Adsol Preservation Solution for Prolonged Storage of Low Viscosity AS-1 Red Blood Cells", Br J Haematol, 57:467-78.

Hendzel M.J., Nishioka W.K., Raybond Y., Allis C.D., Bazette-Jones D.P. ve Th'ng J. P, (1998) "J Biol Chem", 273:24470-24478.

Higgs, P.G. ve Joanny, J.F.,(1991), "8 Theory of Polyampholyte Solutions", J. Chem. Phys., 94, 2, 1543.

Hilgers L.A.Th., Nicolas I., Lejeune G., Dewil E. ve Strebelle M., (1998), "Alkyl-Esters of Polyacrylic Acid as Vaccine Adjuvants", Vaccine, 16: 1575-1581.

Hodges G.M., Livingston D. ve Franks L.M., (1973), "The Localization of Trypsin in Cultured Mammalian Cells", J Cell Sci., 12:887-907.

Hoffmann E.K. ve Simonsen L.O., (1989), "Membrane Mechanisms in Volume and pH Regulation in Vertebrate Cells", Physiol Rev, 69:315-82.

Hsiung G.D., (1973), "Diagnostic Virology", Yale University Pres, 147-53, USA.

Isenberg H.D., (1992), "Clinical Microbiology Procedures Handbook American Society for Microbiology", 8,19 1-8.20.20, USA.

Jack Melisa T., Woo Richard A., Hirao Atsushi, Cheung Alison, Mak Tak W. ve Lee W. K. Patrick (2002), "Chk2 is Dspensable for p53-Mediated G_1 Arrest but is Required for a Latent p53-mediated Apoptotic Response " M5G 2M9.

Jones B.A. ve Gores G.J., (1997), "Physiology and Pathophysiology of Apoptosis in Epithelial Cells of The Liver, Pancreas and İntestine", Am J Physiol, 273.

Katchalski E., Berger A. ve Neumann H., (1954), Nature, v.173, p.998

Kerr J.F.R., Willie A.H. ve Currie A.R., (1972) "Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide Ranging İmplications in Tissue Kinetics", Br J Cancer, 26: 239-257.

Kinloch R.A., Treherme J.M. ve Furness L.M., (1999), "The Pharmacology of Apoptosis" Trends Pharmol Sci, 20: 35-42.

Koneman W.E., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. ve Winn W.C., (1992), "Diagnostic Microbiology", J.B. Lippincot Company, 1010-16.

Kretovich V.L., Smirnova T.I. ve Frenkel S.Ya., (1958), Biyokimya, v.23, p.3124.

Kuchler R.J., (1977), "Biochemical Methods in Cell Culture and Virology", Dowden,

Hutchinson and Ross. Inc., 45-68, USA.

Lenette E.H. ve Schmidt N.J., (1979), "Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections", American Public Health Association, USA, 70,93.

Mazur P., (1977), "The Role of Intracellular Freezing in The Death of Cells Cooled at Supraoptimal Rates", Cryobiogy, 14:251-72.

McGann L.E. ve Farrant J., (1976), "Survival of Tissue Culture Cells Frozen By aTwo-step Procedure to-196^{o}C. II. Warming Date and Concentration of DMSO", Cryobiology, 13:269-73.

McGann L.E., (1978), "Differing Actions of Penetrating And Nonpenetrating Cryoprotective Agents", Cryobiology, 15;382-90.

McGann L.E., (1979), "OptimalTemparature Ranges for Control of Conding Rate", Cryobiology, 16:211-16.

McGann L.E., Stevenson M., Muldrew K. ve Schachar N., (1988), "Kinetics of Osmotic Water Movement in Chondrocytes Isolated From Articular Cartilage and Applications to Cryopreservation", J Orthop Res, 6:109-15.

Melino G., Annicchiarico-Petruzzelli M. ve Piedda L., (1994), "Tissue Transglutaminase and Apoptosis: Sense and Antisense Transfection Studies With Human Neuroblastoma Cells", Mol Cell Biol,; 14: 6584-6596.

Meltzer Y.L., (1972), "Water Soluble Polymers; Technology And Applications,".

Merle, Y., (1987), "Synthetic Polyampholytes. 5. Influence of Nearest-Neighbor İnteractions On Potentiometric Curves", H.Phys.Chem., 91, 3092-3098.

Morawetz H. ve Hughes W.L.J. (1952), "The İnteractionof Proteins with Synthetic Polyelectrolytes. I. Complexing of Bovine Serum Albumin", J. Phys. Chem., 56, 64-69.

Mossman T., (1983), "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay". J Immunol Methods, 65:55-63.

Mountz J.D. ve Zhou T., (2001), "Apoptosis and Autoimmunity. in: Kopman WJ, Ed. A Textbook of Rheumatology: Artritis and Allied Conditions", Lippincott-Williams&Wilkins.

Muldrew K., Hurting M., Novak K., Schachar N. ve McGann L.E., (1994), "Localization of Freezing Injury in Articular Cartilage", Cryobiology, 31-8.

Murray P.R., Baron E.J., Faller M.A., Tenover F.C. ve Yolen R.H., (1995), "Manual of Clinical Microbiology", ASM Press Washington D.C., USA, 158-64.

Mustafaev,M.I., Mustafaeva, Z., Bermek, E. ve Osada, Y.J., (1998), "New Amphiphilic Immunogens by Cu^{+2}-mediatedcomplexes of water-born Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) and Bovine Serum Albumin", Bioct. Compat.Polymers, 13, 33-49.

Mustafaev M., Bayülken S., Ergen E., Erkol A. Y. ve Ardagıl N., (2001) "Radiation Physics and Chemistry", 60 567-575.

Mustafaev M.I., (1996), "Biyopolimerler", TÜBİTAK-MAM, Gebze.

Mutsumi Y., Kyung-Ho R. ve Joerg L., (2007), "Short-Term Biocompatibility Of Biphasic Nanocolloids With Potential Use As Anisotropic İmaging Probes", Biomaterials 28 2446–2456.

Negoescu A., Lorimier P. Ve Labat-Moleur F., (1999), "In situ apoptotic labeling by the TUNEL method : Improvement and evaluation on cell preparations", . J Histochem Cytochem38:1177-83.

Pelczar M.J., Chan E.C.S. ve Krieg N.R., (1993), "Microbiology", McGraw-Hill Inc, 167-70, USA.

Pişkin E., (1987), "Polimer Teknolojisine Giriş", Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara.

Rice R.V., Stahman M.A. ve AlbetyR.A.J.,(1954),Biol.Chem,v.209, p.1

Rowley S.D., Bensinger Q.I., Gooley T.A. ve Buckner C.D., (1994), "Effect of Cell Concentration on Bone Marrow and Peripheral Blood Stem Cell Cryopereservation", Blood, 83:2731-36.

Ryan K.J., (1994), "Medical Microbiology", Printice-Hall International Inc, USA, 231-32.

Sacco D., Bonneaux F. ve Dellacherie E.,(1988), "İnteraction of Hemoglobin With Dextran Sulphates and The Oxygen-Binding Properties of The Covalent Conjugates", Int. J. Biol. Macromol, 10, 305.

Sandler S.R. ve Karo W., (1977), "Polymer Synthesis", Volume 2, Academic Pres, Newyork.

Sato H., Meada M. ve Nakaj, M.A.A., (1979), "Polyelectrolyt", J. Appl. Polym. Sci., 23:1759.

Shalaby M.A., (1991), "Diagnostic Viroloy", Cairo University Faculty of Medicine, Cairo, 33-6.

Sheikh M.S., (2000), "Fornace Aj-Jr. Role of P53 Family Members in Apoptosis". J Cell Physiol, 182: 171-181.

Storey K.B. ve Mommsen T.P., (1994), "Effects of Temperature and Freezing on Hepatocytes Isolated From a Freeze-Tolerant Frog", The American Physiological Society, R1477-82.

Staunton M.J. ve Gaffney G., (1998), "Apoptosis. Basic concepts and potential significance in human cancer", Arch Pathol Lab Med; 122: 310-319.

Sung C.H., Schneider B.G. ve Agarwal N., (1991), "Papermaster DS, Nathans J. Functional Heterogenicity of Mutant Rhodopsins Responsible for Autosomal Dominant Retinitis Pimentosa", Proc Natl Acad Sci, 88: 8840-8844, USA.

Şenvar C., (1986), "Kimyasal Kinetik ve Makromoleküller", Marmara Üniversitesi Yayınları, İstanbul.

Tanodekaew S., Prasitsilp M., Swasdison S., Thavornyutikarn B., Pothsree T. ve Pateepasen R., (2004), "Preparation of Acrylic Grafted Chitin for Wound Dressing Application", Biomaterials, 25(7-8):1453-60.

Timasheff S. N. ve Kirkwood J. G., (1953), "Amer. Chem. Soc.", 75:547.

Ustaçelebi Ş., (1991), "Genetic Virology", Hacettepe Taş Kitapçılık, 37-75.

Valeri G.R., (1975), "Simplification Of The Methods for Adding and Removing Glycerol During Freezing-Preservation of Human Red Blood Cells With the High or Law Glycerol Methods: Biochemical Modification Prior to Freezing", Transfusion, 15:195-215.

Van de Loosdrecth A.A., Nennie E., Ossenkoppele G.J. ve Belen R.H., (1991), "Langenhuijsen and Macrophages in a Modified Calorimetric MTT Assay", a Methodological Study. J Immunol Methods, 141: 15-22.

Xu X., Yin Y., Ge X., Wu H., ve Zhang Z., (1998), "γ-Radiation Synthesis of Poly(acrylic acid)-Metal Nanocomposites", Materials Letters, 37:35-358.

Willey J., (1964) "Encylopedia of Polymer Science and Technology", İnterscience Publishers, Division of John Willey and Sons. Inc. Vol.1, Newyork.

Wilson J.K., Sargent J.M., Elgie A.W., Hill J.G. ve Taylor C.G., (1990), "A Feasibility Study of The MTT Assay for Chemosensitivity Testing in Ovarian Malignancy", Br J Cancer, 62:189-194.

Wolfe J., Yan Z. ve Pope J., (1994), "Hydration Forces and Membrane Stresses, Cryobiological Implication and A New Technique for Measurement", Biophys Chem, 49:51-8.

Wyllie A.H. ve Duvall H., (1992), "Cell death. In: McGee JOD, Iseacson PG, Wright M, eds. Oxford Textbook of Pathology", vol 1. USA, Oxford University Pres, 141-147.

Zezin A. B. ve Eltsefon B. S., (1976), "In Itogi Nauki, Chimiya, Technologiya Vysokomal Soedin", Mosco 10:96.

INTERNET KAYNAKLARI

[1]http://bilimselkonular.com/organik-kimya/karboksilli-asitler-ve-turevleri.html

[2]http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	09.12.1976	
Doğum yeri	İstanbul/Üsküdar	
Lise	1991-1994	Kadıköy Kazım İşmen Lisesi
Önlisans	1995-1997	İstanbul Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tibbi Laboratuvar Bölümü
Lisans	2000-2003	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik
Yüksek Lisans	2003-2007	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı

Çalıştığı Kurumlar

	1997-1998	Yedigen Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Araştırma Merkezi
	1998-2006	Kadir Has Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü
	2006-	İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü