

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİMERLERİN TOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİNDE
YENİ KÜLTÜR MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Tıbbi Biyolog Rabia ÇAKIR

**FBE Biyomühendislik Anabilim Dalından
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV (YTÜ)

İSTANBUL, 2008

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	vi
KISALTMA LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
ÖNSÖZ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Polimerler.....	2
2.1.1 Polimerlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılmaları	2
2.1.1.1 Polielektrolitler.....	3
2.1.1.2 Poliamfolitler.....	4
2.1.2 Polimerlerin Tıp ve Biyolojide Kullanımı	4
2.1.3 Tarihi Gelişimi	6
2.1.4 Poliakrilik Asit	8
2.1.5 Polietilen Glikol	10
2.2 Biyouyumluluk ve Toksisite Testleri	13
2.2.1 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum (MTT) Testi	16
2.2.2 Hücre Kültürleri Üzerinde Toksite Araştırmaları	16
2.3 Hücre Kültürü.....	17
2.3.1 Hücre Kültür Modelleri	17
2.3.2 Hücre Kültürü Tanım ve Yöntemleri.....	18
2.3.2.1 Eksplant Yöntemi ile Kültür Hücrelerinin Elde Edilmesi	19
2.3.2.2 Fiziksel Ayrıştırma Yöntemi ile Kültür Hücrelerinin Elde Edilmesi.....	19
2.3.2.3 Enzimatik Ayrıştırma Yöntemi ile Kültür Hücrelerinin Elde Edilmesi	20
2.3.3 Hücre Kültürü Yönteminin Temel Aşamaları.....	20
2.3.4 Kültürde Hücrelerin Gelişimini Etkileyen Faktörler	21
2.3.4.1 Sıcaklık	21
2.3.4.2 pH	21
2.3.4.3 İyon Konsantrasyonu	21
2.3.4.4 Temel Metabolitler	22
2.3.4.5 Hormonlar	22
2.3.4.6 Enzimler	22
2.3.5 Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerleri	22
2.3.6 Besiyerlerine eklenen katkı maddeleri.....	23
2.3.7 Kültürdeki Hücrelerin Gelişme Fazları	24
2.3.8 Hücrelerin Dondurularak Saklanması (Kriyoprezervasyon)	24

2.3.9	Hücre Kültür Çalışmalarının Uygulama Alanları	25
2.3.10	MCF-7 Hücre Serisi.....	25
2.3.11	L929 Hücre Serisi.....	26
2.4	<i>Leishmania</i> Protozoonları ve <i>Leishmania</i> Kültürünün Yapılması	27
2.4.1	<i>Leishmania</i> Protozoonları	27
2.4.2	Morfoloji ve Hayat Siklusu.....	27
2.4.3	Konak Memelide Hayatta Kalması	29
2.4.4	<i>Leishmania</i> Kültürü	30
2.5.	Amaç.....	34
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	35
3.1	DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	35
3.1.1	DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	35
3.1.2	DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri	36
3.1.3	Çözeltilerin Hazırlanması	37
3.1.3.1	1x PBS Tampon Hazırlanması	37
3.1.3.2	1x Tripsin solusyonu	37
3.1.3.3	DMEM/F12 Medyumunun Hazırlanması.....	37
3.1.3.4	Fenol Red İçermeyen DMEM/F12 Hazırlanması	37
3.1.3.5	RPMI 1640 Medyumunun Hazırlanması.....	37
3.1.3.6	Hücre Dondurma Medyumunun Hazırlanması	37
3.1.3.7	MTT Solüsyonunun Hazırlanması	37
3.1.3.8	MTT Reaksiyon Durdurucu Solüsyonun Hazırlanması	38
3.1.3.9	50 mg/ml ve 0,5 mg/ml Poliakrilik Asit (MA: 100,000 Da) Çözeltisinin Hazırlanması	38
3.1.3.10	50 mg/ml ve 0,5 mg/ml Poliakrilik Asit (MA: 30,000 Da) Çözeltisinin Hazırlanması	38
3.1.3.11	50 mg/ml ve 0,5 mg/ml Poliakrilik Asit (MA: 2,000 Da) Çözeltisinin Hazırlanması	39
3.1.3.12	50 mg/ml ve 0,5 mg/ml Polietilen Glikol (MA: 4,600 Da, MA:2,000 Da, MA:1,000 Da) Çözeltisinin Hazırlanması	39
3.2	Hücre Kültürü Teknikleri.....	39
3.2.1	Hücre Soyunun Açılması	39
3.2.1.1	MCF 7 ve L 929 Hücre Soyunun Açılması	39
3.2.1.2	Ep 39 Hücre Soyunun Açılması	39
3.2.2	Hücrelerin Çoğaltılması.....	40
3.2.2.1	MCF 7 ve L 929 Hücrelerinin Çoğaltılması	40
3.2.2.2	Ep 39 Hücrelerinin Çoğaltılması.....	40
3.2.3	Hücrelerin Pasajlanması	40
3.2.3.1	MCF 7 ve L 929 Hücrelerinin Pasajlanması.....	40
3.2.3.2	Ep39 Hücrelerinin Pasajlanması	40
3.2.4	Hücrelerin Sayılması	40
3.2.5	Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	41
3.2.5.1	MCF 7 ve L-929 Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması	41
3.2.5.2	Ep 39 Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması	41
3.3	Polimerlerin Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi	41
3.3.1	Polimerlerin MCF 7 ve L 929 Hücrelerindeki 48 Saatlik Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi	41
3.3.2	Polimerlerin Ep 39 Hücrelerindeki 48 Saatlik Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi	42

3.3.3	Polimerlerin Ep 39 Hücrelerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi	43
3.3.4	Polimerlerin Ep 39 Hücrelerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin Sayım Yöntemi ile İncelenmesi	44
3.4	Polimerlerin Toksik Etkisinin Ep 39 Hücrelerindeki Hareketliliğe Göre İncelenmesi	44
3.5	İstatistiki Analizler	44
4.	DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR	45
4.1	Polimerlerin Toksik Etkisinin MCF 7 Hücre Kültüründe İncelenmesi	45
4.1.1	Molekül Ağırlığı 100.000 Olan Poliakrilik Asitin MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	46
4.1.2	Molekül Ağırlığı 30,000 Da Olan Poliakrilik Asitin MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	49
4.1.3	Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Poliakrilik Asitin MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	52
4.1.4	Molekül Ağırlığı 4,600 Da Polietilen Glikolün MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	53
4.1.5	Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Polietilen Glikolün MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	58
4.1.6	Molekül Ağırlığı 1,000 Da Olan Polietilen Glikolün MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	61
4.2	Polimerlerin Toksik Etkisinin L-929 Hücre Kültüründe İncelenmesi	64
4.2.1	Molekül Ağırlığı 100,000 Da Olan Poliakrilik Asitin L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	66
4.2.2	Molekül Ağırlığı 30,000 Da Olan Poliakrilik Asitin L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	69
4.2.3	Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Poliakrilik Asitin L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	72
4.2.4	Molekül Ağırlığı 4,600 Da Olan Polietilen Glikolün L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	74
4.2.5	Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Polietilen Glikolün L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	77
4.2.6	Molekül Ağırlığı 1,000 Da Olan Polietilen Glikolün L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	80
4.3	Polimerlerin Toksik Etkisinin Ep39 Hücre Kültüründe İncelenmesi	82
4.3.1	Molekül Ağırlığı 100,000 Da Olan Poliakrilik Asitin Ep39 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	83
4.3.2	Molekül Ağırlığı 30,000 Da Olan Poliakrilik Asitin Ep 39 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	86
4.3.3	Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Poliakrilik Asitin Ep39 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	89
4.3.4	Molekül Ağırlığı 4,600 Olan Polietilen Glikolün Ep39 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	91
4.3.5	Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Polietilen Glikolün Ep39 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	94
4.3.6	Molekül Ağırlığı 1,000 Da Olan Polietilen Glikolün Ep39 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi	97
4.4	Polimerlerin 72 Saatlik Toksik Etkisinin Ep39 Hücre Kültüründe İncelenmesi ...	99
4.4.1	Molekül Ağırlığı 100,000 Da Olan Poliakrilik Asitin Ep39 Hücreleri Üzerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin İncelenmesi	101

4.4.2	Molekül Ağırlığı 30,000 Da Olan Poliakrilik Asitin Ep39 Hücreleri Üzerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin İncelenmesi	101
4.4.3	Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Poliakrilik Asitin Ep39 Hücreleri Üzerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin İncelenmesi	102
4.4.4	Molekül Ağırlığı 4,600 Olan Polietilen Glikolün Ep39 Hücreleri Üzerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin İncelenmesi	103
4.4.5	Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Polietilen Glikolün Ep 39 Hücreleri Üzerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin İncelenmesi	103
4.4.6	Molekül Ağırlığı 1,000 Da Olan Polietilen Glikolün Ep39 Hücreleri Üzerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin İncelenmesi	104
4.5	Polimerlerin Toksik Etkisinin Ep 39 Hücrelerinin (Promastigotların) Hareketliliğine Göre İncelenmesi.....	106
4.6	Sonuç	108
KAYNAKLAR.....		112
İNTERNET KAYNAKLARI.....		121
ÖZGEÇMİŞ.....		122

SİMGE LİSTESİ

Da	Dalton
g	Gram
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MA	Moleküler ağırlığı
°C	Santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

AIDS	Edinilmiş bağışık yetersizliği hastalığı
DMEM	Dulbecco'nun modifiye Eagle medyum
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EP39	Leishmania promastigot kültürü
ETDA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	Fetal sığır serumu
FCS	Fetal calf serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDS	Fetal dana serum
HCl	Hidrojen klorür
HEPA	Yüksek etkili partikül yakalayıcı
HEPES	N-2-hidroksi etilpiperazin N-2 etansulfonik asit
HPMA	N-(2-hidroksipropil) metakrilamid
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
L929	Fare fibroblast hücresi
MCF-7	İnsan meme kanser hücresi
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetilmethoksifenil)-2-(-4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid
NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ HPO ₄	Di sodyum hidrojen fosfat
NIPAA	N-izopropil akril amid
NNN	Novy-MacNeal ve Nicole medyum
PAA	Poliakrilik asit
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PEG	Polietilen glikol
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Polimer-ilaç, polimer-protein ve polimer-DNA konjugat sistemleri	5
Şekil 2.2	Poliakrilik asitin yapısı	8
Şekil 2.3	Polietilen glikolün yapısı	10
Şekil 2.4	Amastigot (a) ve promastigot (b) yapısı (Giemsa boyama).	27
Şekil 2.5	Leishmania hayat siklusu	28
Şekil 4.1	MCF 7 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü (MTT eklenmeden önce) (20x).	45
Şekil 4.2	MCF 7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu (24 saat inkübasyon sonrası, MTT eklendikten sonra)(20x).	46
Şekil 4.3	PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	47
Şekil 4.4	PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	47
Şekil 4.5	PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	48
Şekil 4.6.	PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	48
Şekil 4.7	PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	50
Şekil 4.8	PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	50
Şekil 4.9	PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	51
Şekil 4.10	PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	51
Şekil 4.11	PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	53
Şekil 4.12	PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	53
Şekil 4.13	PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	54
Şekil 4.14	PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	54
Şekil 4.15	PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	56
Şekil 4.16	PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	56
Şekil 4.17	PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	57
Şekil 4.18	PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	57
Şekil 4.19	PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	59
Şekil 4.20	PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	59
Şekil 4.21	PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	60
Şekil 4.22	PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik	

	etkisi (20x).....	60
Şekil 4.23	PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	62
Şekil 4.24	PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	62
Şekil 4.25	PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	63
Şekil 4.26	PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	63
Şekil 4.27	L-929 hücrelerinin 48 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü (MTT eklenmeden önce) (20x).	65
Şekil 4.28	L-929 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu (24 saat inkübasyon sonrası, MTT eklendikten sonra) (20x).....	65
Şekil 4.29	PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunda L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	66
Şekil 4.30	PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunda L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	67
Şekil 4.31	PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunda L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	67
Şekil 4.32	PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunda L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	68
Şekil 4.33	PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	69
Şekil 4.34	PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	70
Şekil 4.35	PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	70
Şekil 4.36	PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	71
Şekil 4.37	PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	72
Şekil 4.38	PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	72
Şekil 4.39	PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	73
Şekil 4.40	PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	73
Şekil 4.41	PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi incelemesi (20x).....	75
Şekil 4.42	PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi incelemesi (20x).....	75
Şekil 4.43	PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi incelemesi (20x).....	76
Şekil 4.44	PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi incelemesi (20x).....	76
Şekil 4.45	PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	77
Şekil 4.46	PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	78
Şekil 4.47	PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	78

Şekil 4.48	PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	79
Şekil 4.49	PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	80
Şekil 4.50	PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	80
Şekil 4.51	PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	81
Şekil 4.52	PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	81
Şekil 4.53	Ep39 hücrelerinin 48 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü (MTT eklenmeden önce) (20x).	82
Şekil 4.54	Ep 39 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu (24 saat inkübasyon sonrası, MTT eklendikten sonra) (20x).....	83
Şekil 4.55	PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	84
Şekil 4.56.	PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	84
Şekil 4.57	PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	85
Şekil 4.58	PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	85
Şekil 4.59	PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	86
Şekil 4.60	PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	87
Şekil 4.61	PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	87
Şekil 4.62	PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	88
Şekil 4.63	PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	89
Şekil 4.64	PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	89
Şekil 4.65	PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	90
Şekil 4.66	PAA'nın 0,1mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	90
Şekil 4.67	PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	92
Şekil 4.68	PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	92
Şekil 4.69	PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	93
Şekil 4.70	PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).....	93
Şekil 4.71	PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	95
Şekil 4.72	PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	95
Şekil 4.73	PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi	

	(20x).	95
Şekil 4.74	PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	96
Şekil 4.75	PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	97
Şekil 4.76	PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	97
Şekil 4.77	PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi(20x).	98
Şekil 4.78	PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).	98

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 4.1 PAA'nın (MA:100,000 Da) farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücrelerinin canlılığına etkisi	49
Çizelge 4.2 PAA'nın (MA:30,000 Da) farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücrelerinin canlılığına etkisi	52
Çizelge 4.3 PAA'nın (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücrelerinin canlılığına etkisi	55
Çizelge 4.4 PEG'in (MA:4,600 Da) farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücrelerinin canlılığına etkisi	58
Çizelge 4.5 PEG'in (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücrelerinin canlılığına etkisi	61
Çizelge 4.6 PEG'in (MA:1,000 Da) farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücrelerinin canlılığına etkisi	64
Çizelge 4.7 PAA'nın (MA:100,000 Da) farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi	69
Çizelge 4.8 PAA'nın (MA:30,000 Da) farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi	71
Çizelge 4.9 PAA'nın (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi	74
Çizelge 4.10 PEG'in (MA:4,600 Da) farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi	77
Çizelge 4.11 PEG'in (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi	79
Çizelge 4.12 PEG'in (MA:1,000 Da) farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinde canlılığına etkisi	82
Çizelge 4.13 PAA'nın (MA:100,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi	86
Çizelge 4.14 PAA'nın (MA:30,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi	88
Çizelge 4.15 PAA'nın (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi	90
Çizelge 4.16 PEG'in (MA:4,600) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi	94
Çizelge 4.17 PEG'in (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi	96
Çizelge 4.18 PEG'in (MA:1,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi	99
Çizelge 4.19 PAA'nın (MA:100,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi (72 saat)	100
Çizelge 4.20 Sayım yöntemi ile PAA'nın (MA:100,000 Da) konsantrasyonuna bağlı olarak Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi (72 saat)	100
Çizelge 4.21 PAA'nın (MA:30,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi (72 saat)	101
Çizelge 4.22 MTT yöntemi ile PAA'nın (MA:100,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinde canlılık etkisi (72 saat)	102
Çizelge 4.23 PEG'in (MA:4,600 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi (72 saat)	103
Çizelge 4.24 PEG'in (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi (72 saat)	104

Çizelge 4.25	MTT yöntemi ile PEG'in (MA:1,000 Da) konsantrasyonuna bağlı olarak Leishmania hücrelerinin canlılığına etkisi (72 saat)	105
--------------	--	-----

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim boyunca akademik bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, her an ilgi ve desteği ile yanımda olan, deneysel çalışmalarım boyunca beni yönlendirip, bana bilimsel bakış açısı kazandıran, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e; çalışmalarım boyunca aynı ilgi ve desteği gösteren, deneysel çalışmalarda gelişimime büyük desteği olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya; Biyomühendislik Bölümünde Yüksek Lisans yapmama vesile olan değerli bilim adamı rahmetli Prof. Dr. M. Mustafa AKDESTE'ye; tez yazım aşamasındaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Dilek T. BALIK'a, ayrıca Yüksek Lisans Eğitimim boyunca ders aldığım değerli hocalarım, Prof. Dr. Huriye KUZU, Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE, Yrd. Doç. Dr. Sevil DİNÇER ve Yrd. Doç. Dr. Sevil YÜCEL'e;

Hücre Kültür Laboratuvarındaki deneysel çalışmalarım boyunca gösterdikleri hoşgörü ve anlayışlarından ve tez yazım aşamasındaki desteklerinden dolayı laboratuvar arkadaşlarıma;

Tezin yazım, basım aşamasında ve her konuda yardımları ile yanımda olan sevgili Hakan KOÇ ve Burcu YÜCEL'e; manevi desteğinin yanı sıra, tezin yazımında yardımcı olan sevgili ablam Şehri ÇAKIR'a;

Hayatımın her anında destek ve şefkatini esirgemeyen, sevgili babam Muharrem ÇAKIR, sevgili annem Güler ÇAKIR ve çok sevgili ablalarıma;

Bu teze emeği geçen herkese,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER

Polimerlerin Toksisitesinin İncelenmesinde Yeni Kültür Modelinin Geliştirilmesi

ÖZET

Tıbbın çeşitli alanlarında kullanılan polimerlerin klinik öncesi, toksisite ve biyouyumluluğu *in vivo* ve *in vitro* kültür modellerinde tayin edilmektedir. Mevcut hücre kültürleri polimerlerin bu özelliklerinin tayin edilmesinde her zaman yüksek duyarlılık göstermediği gibi, pahalı, yapılması zor ve zaman alıcıdır.

Bu sebeple bu çalışmanın amacı, polimerlerin toksisitesi, biyouyumluluğu ve ayrıca organizmada bulunması muhtemel enfeksiyon ajanları ile (protozoan) etkileşimi hakkında bilgi verebilecek daha duyarlı, hızlı, ekonomik ve yapılması daha kolay yeni bir kültür modeli geliştirmek olmuştur.

Deneyler, insan meme kanser hücresi (MCF7), fare fibroblast hücresi (L-929) ve yeni önerilen *Leishmania* promastigot kültürü (Ep39) üzerinde yapıldı. Farklı molekül ağırlıklarındaki ve konsantrasyonlardaki poliakrilik asit (PAA) ve polietilen glikol (PEG) kullanıldı. Hücrelerin morfolojik özellikleri mikroskopik olarak, canlılıkları ise 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yöntemi ile incelendi. Sonuçların istatistiki değerlendirilmesi SPSS programı ile (student's t-test) yapıldı.

Sonuçlar PAA'nın toksik ve PEG'in non-toksik etkisinin yeni kültür modelinde, klasik kültür modelleri olan MCF7 ve L929'dan istatistiki olarak farklı olmadığını gösterdi. Farklı polimerlerin değişik konsantrasyonlarının kültürde promastigot hareketliliğine olan etkisinin incelenmesi, polimerlerin toksisitesinin çok kısa sürede (bir kaç saat) tayinine olanak sağladı.

Aynı zamanda bu yeni kültür modelinde, vücutta bulunması muhtemel protozoa enfeksiyonları ile polimer etkileşimi sonrası, enfeksiyöz ajanlarda oluşabilecek değişimlerin incelenmesi gösterdi ki; PAA ile 48 saat inkübasyon Ep39 hücrelerinde MCF7 ve L-929 gibi toksik etki oluşurken, inkübasyon süresi artırıldığında, Ep39 hücrelerinin canlılığını oldukça arttırdığı tespit edildi ($p<0,05$).

Bu çalışmada ilk kez olarak; tek hücreli, hareketli, ökaryotik ve kültürü oldukça kolay yapılan *Leishmania* protozoanlarının, toksik ve non-toksik gruptan olan polimerlerin toksisitesinin incelenmesinde kullanımının uygun olduğu, önerilen yeni kültür modelinin polimerlerin toksisitesinin birkaç saatte incelenmesine imkan sağladığı, ayrıca polimer toksisitesinin tayin edilmesinde kullanılan klasik kültür modellerinden farklı olarak yeni kültür modeli kullanılarak vücutta polimerler ile enfeksiyon ajanlarının (protozoa) etkileşiminin önceden tayin edebileceği gösterildi.

Anahtar kelimeler: Polimer, biyouyum, toksisite, MTT, hücre kültürü, MCF 7, L-929, Ep39, *Leishmania*

The Development of a New Culture Model to Study the Toxicity of Polymers

ABSTRACT

Toxicity and biocompatibility of polymers, which are used in different areas in medicine, are examined *in vivo* and *in vitro* cell culture models. Current cell culture methods are not sufficient always as they are not sensitive, they are expensive, labour-intensive and time-consuming.

Therefore, the aim of the study is to develop a new, more sensitive, easy and cost-effective culture model to test toxicity, biocompatibility as well as for understanding of polymer-infection interactions.

Experiments were done in human breast cancer cells (MCF-7), mouse fibroblast cell (L929) and newly suggested *Leishmania* promastigote culture (Ep39). Polyacrylic acid (PAA) and polyethylen glycol (PEG) have different molecular weight and concentrations were used. Cell morphology was observed on the microscope and cell viability was examined with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Statistical analysis was done SPSS software (student's T-test).

Results have indicated that PAA toxicity is related to concentration in all culture models as well as Ep39 and PEG was non-toxic in all culture models with all concentration rates that have been examined. Moreover, polymer toxicity has been observed on Ep39 cell culture by observing changes on movement of promastigotes with the addition of discrete concentrations of the polymer. It has been shown that toxicity of polymers can be analysed in a couple of hours rather than 48 hours with this method.

In addition to polymer toxicity, interactions of polymers with possible protozoan infections in the body have been examined in newly suggested Ep39 culture model by observing changes in infectious agents. In Ep39 cells incubated with polymer for 48 hours, as well as MCF-7 and L-929, PAA in high concentrations showed toxic effect whereas increased incubation time with PAA Ep39 cells viability augmented compare to control group.

It has been shown with this study first time that unicellular, eukaryotic and easily cultures leishmania protozoans can be used in toxic and non-toxic polymer toxicity tests, it is possible to study of polymer toxicity faster with new suggested culture method and also this suggested method differs than classic tissue culture methods as it can be used to determine interactions between polymers and infectious agents prior to application.

Key words: Polymer, biocompatibility, toxicity, MTT, cell culture, MCF7, L-929, Ep39, *Leishmania*

1. GİRİŞ

Son yıllarda tıp ve biyoteknoloji alanında polimerlere olan ilgi giderek artmaktadır (Davis vd., 1978; Duncan, 2003). Kontrollü ilaç dağıtım sistemlerinde, yapay organ ve doku mühendisliğinde, gen terapide polimerler uygulamaları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Kope'cek vd., 2000).

Mevcut polimerler arasında polietilen glikol ve poliakrilik asit farmakoloji alanında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu polimerlerin insan vücudunda kullanılabilmesi, toksik olmaması ve biyouyumlu olması temeline dayanır. Toksisitenin ve biyouyumluluğun tayin edilmesinde *in vivo* ve *in vitro* kültür modelleri kullanılmaktadır. Mevcut hücre kültür hatları polimerlerin toksik etkilerinin gösterilmesinde her zaman yüksek duyarlılık göstermemektedir. Ayrıca ekonomik açıdan pahalı, yapılması zor ve zaman alıcıdır. Bununla birlikte standart bir kültür modeli bulunmadığı için farklı hücre kültürlerinden alınan sonuçlar da farklı olabilmektedir.

Mevcut hücre kültürleri polimerlerin, sadece toksik özelliği ve hücrelerle olan biyouyumluluğunu tayin etme imkanı sağlamaktadır. Fakat insan ve hayvan kaynaklı hücre kültür modelleri tıbbi uygulama alanında polimerlerin, organizmada olası bir enfeksiyon ajanıyla etkileşiminin nasıl olacağı konusunda herhangi bir bilgi vermemektedir. Öyle bir hücre kültür modeli geliştirilmelidir ki, incelenecek polimerlerin toksik özelliğini, biyouyumluluğunu gösterdiği gibi, herhangi bir enfeksiyon ajanıyla etkileşimini göstermelidir. Bu sebeple bu çalışmanın amacı, polimerlerin toksisitesi, biyouyumluluğu ve organizmada bulunan hastalık oluşturabilecek mikroorganizmalarla (protozoan) etkileşimi hakkında bilgi verecek; daha hızlı, ekonomik, duyarlı ve kolay yapılan bir kültür modeli geliştirmek olmuştur.

Çalışmamızda ökaryot hücre kültürlerinde, farklı molekül ağırlıklı ve farklı özelliğe sahip polimerlerden poliakrilik asit ve polietilen glikolün; toksik özellikleri, biyouyumlulukları kıyaslı olarak incelenmiş ve yeni önerilen hücre kültür modelinde polimerlerin hem toksik özelliğini hem de vücutta enfeksiyon oluşturabilecek protozoan etkenleri ile nasıl bir etkileşime girebileceği gösterilmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Polimerler

2.1.1 Polimerlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılmaları

Polimerler monomer adlı basit yapıların birleşmesiyle oluşan uzun zincirli moleküllerdir. İki veya daha fazla monomerin birleşiminden yapılabildikleri gibi tek bir monomerden de yapılabilirler. Her polimer kendi kendine çok kereler tekrarlayan basit yapılı ünitelere sahiptir (Chandrasekhar, 2005).

Polimerlerin, farklı kriterleri göz önünde bulundurularak, farklı sınıflandırmaları yapılmaktadır. Örneğin molekül ağırlıklarına göre (oligomer, makromolekül), doğal veya sentetik olmalarına göre, ısıya karşı gösterdikleri davranışlara göre (termoplastikler, termosetler), zincirin kimyasal ve fiziksel yapısına göre (düz, dallanmış, çapraz bağlı, kristal, amorf; homopolimer, kopolimer), sentezlenme şekillerine göre sınıflandırılabilirler.

Polimerleşme reaksiyonları esnasında pek çok monomer, diğer monomerlerle ya da ortamda daha önce tepkime vermiş ve belli bir moleküler ağırlığa ulaşmış molekül zinciri ile tepkime verebilir. Eğer polimer zinciri yeterince büyümemişse oligomer olarak adlandırılır. Oluşan zincirlerin büyüklükleri, türlerin moleküler yapılarından, tepkime verme yollarına ve sentez şekillerine kadar pek çok faktöre bağlıdır.

Uzun zincirler halinde bulunan düz ya da dallanmış zincirlerden oluşan polimer sistemlerine termoplastik adı da verilmektedir. Yüksek oranda çapraz bağ içeren sistemler ise termosetting olarak tanımlanır. Termoplastik bir malzeme, sıcaklık artışı ile eriyerek şeklini değiştirebilir ve böylece kalıplara dökülebilmesi mümkün olur. Oysa yüksek oranda çapraz bağ içeren bir yapının sıcaklık artışı ile böyle bir değişim geçirmesi, zincirlerin hareketli olmayışı nedeniyle, zordur ve sıcaklığın artışı bu tür malzemenin erimesine değil, parçalanmasına neden olur (Baysal, 1994).

Polimerlerin çoğu etilen, stiren gibi basit monomerlerden hazırlanır. Poli(etilen terethalate) veya naylon-6,6 gibi polimerler iki monomerin reaksiyonundan hazırlanırken, iki monomerden fazlasının reaksiyonunu içeren polimerler de vardır. Buna örnek olarak akrilonitril, stiren ve butadienin polimerizasyonu ile oluşan poli(akrilonitril-butadien-stiren) kopolimeri verilebilir (Chandrasekhar, 2005).

Sentetik polimerlerin yanı sıra doğal olarak oluşan birçok polimer vardır. En iyi bilinen doğal polimerler; proteinler, deoksiribonükleik asit (DNA), hemoglobin, insülin, nişasta gibi yapılardır (Chandrasekhar, 2005).

Polimerler iyon içeriklerine göre polielektrolit ve poliamfolitler olmak üzere iki grup oluşturmaktadırlar.

2.1.1.1 Polielektrolitler

Polielektrolitler, kovalent olarak bağlı anyonik veya katyonik grupları ve bu gruplara bağlı iyonları bulunan polimer sistemleridir. Polielektrolitler, üzerinde bulunan yüklü grupların tümünün eksi yüklü olması durumunda polianyon adını alırken, tümü artı yüklü ise polikasyon adını alır.

Polifosfatlar ve polisilikatlar inorganik polielektrolitler olarak sayılabilir. Sentetik polielektrolitler genelde bir katılma veya kondenzasyon polimerleşme reaksiyonlarıyla elde edilebilir (Dautzenberg vd., 1994). Sentetik yapıda polielektrolitlerin dışında, polisakkaritler, proteinler ve nükleik asitler gibi doğal polielektrolitler de mevcuttur (Hileman vd., 1998). Bunların yanı sıra karboksimetilselüloz gibi yarı sentetik polielektrolitler, doğal polimerlerin özelliklerinin iyileştirilmesi için modifiye edilmesiyle elde edilir (Trabelsi ve Langevin 2007).

Polielektrolite bağlı elektrolit gruplar sulu çözeltilerde dissosiyasyon olup polimeri yüklü hale getirirler. Bu durum polimerin konformasyonunu değiştirir. Herhangi bir polimerin konformasyonu, polimerin yapısı ve çözeltiyle ilişkisi gibi çeşitli etkenlere bağlıdır. Çözelti içindeki yüksüz, düz bir polimer zinciri rasgele yumak konformasyonu gösterirken, polielektrolitler üzerindeki yüklerin birbirini itmesi sonucu uzanmış, düz bir konformasyon oluşturmaya eğilim gösterir (Coulomb etkisi). Bu konformasyon, polielektrolit çözeltilerinin viskozitesinin yükselmesine yol açar. Polielektrolit çözeltilerinin özellikleri, sulu ortamın iyonik şiddetine bağlıdır. İyonik şiddetin artmasıyla polielektrolitteki iyonların elektrik yükleri arasındaki itme kuvvetinin engellenmesi viskozitenin değişmesine neden olur. Polielektrolitler, çözeltideki iyonik şiddetin daha fazla artması ile yüksüz polimerlere benzer davranış göstermeye başlarlar (Bromberg, 2001).

Zayıf polielektrolitlerin özellikleri iyonik şiddetin yanı sıra, ortamın pH'ından da etkilenir. Çünkü iyonik grupların dissosiyasyon derecesi ve polielektrolitin yük yoğunluğu ortamın pH'ına bağlı olarak değişir. Polielektrolit çözeltilerinin diğer bir özelliği ise yüksek iyonik iletkenlikleridir. Elektrik alanı altında, küçük molekül ağırlıklı iyonlardan daha yavaş olmakla birlikte makroiyonlar da göç etmektedirler (Dautzenberg vd., 1994).

1970'li yılların başlarında immünologların ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bazı sentetik polielektrolitlerin organizmadaki immün cevaba etkisi aydınlatılmış ve sentetik polielektrolitlerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu tespit edilmiştir. Çünkü polielektrolitlerin sentezi ve modifikasyonu daha basittir, istenilen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek mümkündür. Ayrıca suda iyi çözünür ve bilinen yapılarda çeşitli kompleksleri sentezlenebilir. Polielektrolitlerin molekül ağırlığı, polimerleşme derecesi ile orantılı olup molekül ağırlığı çözünürlüğü etkiler (Mustafaev, 1996).

2.1.1.2 Poliamfolitler

Poliamfolitler yapılarında kovalent bağlı olarak anyonik ve katyonik grupların her ikisini de içeren makromoleküllerdir. Doğada bol bulunan veya sentetik yapıda elde edilebilen proteinler, asidik veya bazik aminoasitler içerdikleri için amfolit özelliktedir. Bu proteinler pH'a bağlı olarak proton verme veya alma özelliğindedir. Asidik ortamlarda proteinler çözeltiden proton aldıkları için net pozitif bir yüke, bazik ortam koşullarında ise ortama proton verdikleri için net negatif yüke sahip olurlar. İzoelektrik noktada ise poliamfolitlerin net yük toplamı sıfıra eşittir (Higgs ve Joanny, 1991; Merle, 1987).

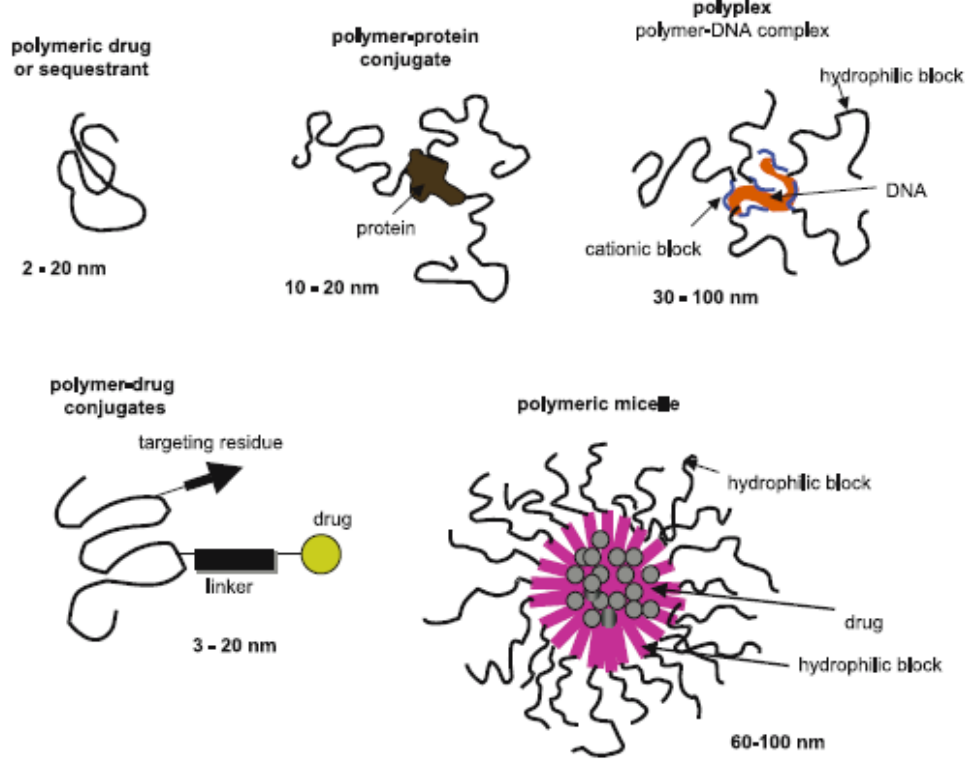
Poliamfolitlerin yapısal özellikleri, anyonik ve katyonik monomer birimleri arasındaki iyonik çekme kuvvetleri tarafından yönlendirilmektedir. Anyonik ve katyonik grupların molar oranı birbirine yaklaştıkça iyonik etkileşimler globular yapıya neden olurlar ve birçok durumda deiyonize suda çözünmezler (Higgs, 1991; Merle, 1987). Bir poliamfolit izoelektrik noktasının pH koşullarında bulunuyorsa çözünürlüğü düşüktür ve kolay çöktürülebilir (Gözükara, 1997).

2.1.2 Polimerlerin Tıp ve Biyolojide Kullanımı

Geçen 30 yıl boyunca polimerlerin biyotıp alanında rolü önemli ölçüde artmıştır. Polimerik materyaller tarafından sağlanan fiziko kimyasal özellikler, biyotıp uygulamalarının çeşitliliğini sağlamıştır. Yeni yapısal mimari ile fonksiyonel polimerlerin geniş bir aralığı biyolojik çevrede geliştirilmiştir (Davis vd., 1978; Duncan, 2003). İlaç dağıtım çalışmalarında, yapay organ ve doku mühendisliğinde, stent gibi medikal malzemelerin hazırlanmasında, kontak lenslerde, dental malzeme üretimlerinde polimerik materyaller kullanılmaktadır (Kopeček vd., 2000).

Polimerler esas olarak biyoaktif olabilir veya kimyasal ve biyoterapötik ajanlar olarak çeşitli alanlarda spesifik olarak kullanılabilir. Ringsdorf'un sunduğu orijinal çalışmada, bölge hedefli

polimerik ilaçlar, çeşitli hastalıklara karşı terapötik ajanlar olan fonksiyonel polimerlerin rollerini aydınlatmıştır. Bu polimer ilaç-konjugat sistemleri küçük moleküllu ilaçların ve terapötik ajanların hedefli dağıtımını sağlamıştır (Şekil 2.1) (Harris ve Chess, 2003).



Şekil 2.1 Polimer-ilâç, polimer-protein ve polimer-DNA konjugat sistemleri (Abe vd., 2006)

Son zamanlarda birçok fonksiyonel polimer, gen terapide genetik materyalin dağıtımı için non-viral vektörler olarak geliştirilmektedir (Nucci vd., 1991; Russell-Jones, 1996). Polimer-ilâç konjugatları gibi polimer bazlı ilâç geliştirme alanındaki çabalar, klinik olarak uygulanabilen ürünleri içererek bu alanda kayda değer bir ilerleme sağlamıştır (Okamoto, 1998; Takakura vd., 1998; Allen, 2002).

Başlangıçta yenilikçi polimer temelli ilâçlara karşı konulmuştur ancak bilimsel meraklar, endüstriyel gelişmeler sonucu düzenleyici birimlerin onayları da alınarak bazı gereksinimler için polimer uygulamaları çalışılmıştır. Klinikte düşük maliyet ile verimli ilâç ve tanı sistemleri olarak güvenli şekilde uygulanması amaçlanmıştır. Polimer tedavisi, klinik amaçlı nanoteknoloji olarak adlandırılan popüler alanda odak noktası olup bu alanda büyük bir gelişime neden olmuştur (Abe vd., 2006).

2.1.3 Tarihi Gelişimi

Polimerlerin tıpta kullanımı yeni değildir. Hiç kuşkusuz, doğal polimerler doğal ilaç komponentleri olarak bin yıldan fazla süredir kullanılmaktadır. Modern farmakoloji spesifik doğal ürünleri ilaç olarak belirlemede çok daha dikkatlidir ve onların mekanizmalarının moleküler seviyesini kesin olarak anlamaya başlamıştır. Enjekte edilebilir ilaç dağıtım sistemlerinin makromoleküler ilaçlar veya komponentleri olarak sentetik, suda çözünabilir polimer fikri ile yakın bir tarihte polimer biliminin kendi kendine ortaya çıkışı sürpriz olmamaktadır (Morawetz, 1985; Lehn, 1995; Ringsdorf, 2004).

Hermann Staudinger ve arkadaşları, 1920’de polimer biliminin doğuşunda büyük çabalar sarf etmişlerdir. 1953 yılında Staudinger ilk polimer Nobel ödülünü “ makromoleküler kimyanın keşfedilen alanları” ile almıştır. Tesadüfî olarak aynı yıl Watson ve Crick DNA’nın yapısının üstüne makalesini çıkartmışlardır. Yaklaşık bu zamanlarda suda çözünür sentetik polimerler sağlık alanında parenteral ilaç verilmesi için yardımcı olmuştur (Abe vd., 2006).

İkinci dünya savaşı boyunca polivinil prolidon gibi sentetik polimerik plazma açıcılara geniş oranda uyum sağlanmıştır. İlk polimer ilaç konjugatı olarak yan zincirlerinde enzimatik yıkılan veya parçalanmayan ilaçların tutturulduğu meskaline-N-vinilpirolidin konjugatları ortaya çıkmıştır (Jatzkewitz, 1955). Böylece biyolojik olarak aktif polimerik ilaçlar popülerite kazanmaya başlamıştır (Breslow, 1976).

İlk olarak 1960’larda divinil eter-maleik anhidrit kopolimeri anti-kanser ilacı olarak klinikte test edilmiştir. Erken klinik deneylerde, ağır toksisite nedeniyle başarısız olmuştur ve damar içine verildiğinde, polimerin molekül ağırlığında değişimleri ile ilişkili tehlikeli yan etkileri görülmüştür (Regelson, 1986). 1970’lerde ortaya çıkan polimerik ilaçlar, polimer-protein ve polimer-ilac konjugatları, çalışmalara öncü olmuştur.

1970 ve 1980’lerdeki ilk polimerik ilaç adayları için çalışmalar klinik testlerde son bulan girişimlerdir. Polimerik ilaçlar için yapılan bazı önemli çabaların sonucu olarak, ilk denemelerinde klinik sorunların çözümü ile rutin klinik kullanıma dönüşüm sağlanabilir. Klinik öncesi toksikolojik protokollerin belirlenmesi, güvenliği bir ölçüde sağlayabilir ancak klinik deneylere ve klinik protokollerin optimizasyonuna da ihtiyaç vardır (Abe vd., 2006).

1990’larda polietilenin rutin klinikte kullanımı, FDA tarafından onaylanmıştır. Akut immuno bozukluk sendromunun tedavisi için PEG-adenozin, akut lenfoblastik lösemi tedavisi için PEG-L-asparaginaz kullanılmıştır. Aynı zamanda Japonya’da, Maeda ve arkadaşları tarafından, 1-sitren-ko-maleik anhidritin anti-kanser proteini olan neokarzinstatin ile konjugatı (SMANCS) geliştirilip, primer karaciğer kanserli hastalarda başarılı bir şekilde kullanılmış ve

hastalığın tedavisi için kullanımı onaylanmıştır (Maeda vd., 1984). Hidrofobik bir protein ve polimerin konjugasyonu ile görüntüleme sistemleri için kullanılan faz kontrast ajan olan Lipiodol'in polimer yoluyla dağıtımına izin verilmiştir. Bu formülasyon hepatik arter yoluyla lokal olarak uygulanmıştır. Bu çalışma sırasında, Maeda, pasif tümör hedefleme için geçirgenlik ve "alıkoyma etkisini arttırmak" (EPR) olarak bilinen özelliği keşfetmiştir. Bu fenomen iki faktör tarafından desteklenmiştir; birincisi dolaşan makromoleküllere karşı aşırı geçirgenliğe yönelen bozuk endotel ile tümör damarlanmasının patolojisini bozmak, ikincisi etkili tümör lenfatik drenajın eksikliği ile makromolekül birikimine yöneltmektir. Polimer konjugatlarını içeren makromoleküllerin uzun süreli sirkülasyonu ve polimer kaplı lipozomların EPR etkisi ile damardan enjeksiyondan sonra anti-tümör ilaçların tümör dokularda pasif olarak birikmesi artık daha iyi bilinen özelliklerdir. Bu konjugatlardaki polimerler sentetik olup L-alanin, L-lizin, L-glutamik asit ve L-tirozinin rastgele olarak kopolimer sentezini içerir (Maeda, 1998).

Ek olarak edinilmiş bağışık yetersizliği hastalığı (AIDS) hastalarına, vajinal anti-HIV virüsü ve dekstrin-2-sülfat ilk dendrimer temelli ilaçlar periton içersine verilmiştir (Richard vd., 2004).

İlk sentetik polimer ile anti-kanserojen ilaç konjugatının klinik testleri 1994 yılında başlamıştır. N-(2-hidroksipropil) metakrilamid (HPMA) kopolimeri doksorubusin ile konjuge edilmiştir (Duncan, 2003; Duncan ve Kwon, 2005). O zamandan bu yana beşten fazla HPMA kopolimer konjugatı klinikte uygulanmış ve anti-anjiyogenik ilk konjugat şu an *in vivo* test aşamasındadır (Satchi-Fainaro vd., 2004). Anti-kanser ilaç taşıyıcı polimerlerden poli(glutamik asit), PEG ve polisakkaritler şu an klinik deneylerde ve bu sınıftaki ilk polimer çok yakında kullanılmaya başlanacaktır.

Anti-kanser ilaçların hedefli dağıtımı için alternatif bir yaklaşım, anti-kanser ilaçların kopolimer miseller içersine kovalent bağlanması veya kolayca hapsedilmesi ile hazırlanan konjugatların kullanımıdır. Bu tip 3 sistem erken klinik testler için geliştirilmiştir (Abe vd., 2006).

1980'lerin sonlarına doğru, hastalıkların moleküler temellerine odaklanan ilgi sonucu gen terapi umutları hız kazanmıştır. Viral vektörler gen terapi için kullanılmaktayken, hala polimerik, non-viral vektörler alternatif olma yolundadır. Polimer temelli vektörlerin çeşitliliği nedeniyle gen dağıtım sistemi olarak kullanımı tasarlanmıştır (Pack vd., 2005). İlk polimerik viral vektör ürünleri piyasada olmakla beraber bu alanda yapılacak daha çok şey vardır.

Akrilik asitin kolaylıkla polimerize olma özelliğinden dolayı kuvvetli bir ekzotermik polimerleşmeden korunmak için ticari akrilik asitin içerisine polimerleşme inhibitörü eklenir.

Poliakrilik asitin çözünürlüğünü etkileyen birçok parametre vardır. Bunlara deney şartları, dallanma derecesi, molekül ağırlığı, çapraz bağlanma oranı, ortamdaki diğer çözünen maddeler ve sıcaklık örnek verilebilir (Barreiro-Iglesias vd., 2004). Poliakrilik asitin kurutma işlemi çapraz bağlanmayı önleyecek şekilde yapılırsa çözünürlüğü yükselir. Buna karşın polimer yüksek sıcaklıklarda tamamen kurutulmuşsa çözünürlüğü oldukça azdır (Willey, 1964).

Poliakrilik asitin çözünürlüğü sıcaklığın azalmasıyla düşer. Fakat poliakrilik asitin molekül ağırlığı ve konsantrasyonu düşükse ve tuz ya da mineral asitleri bulunduruyorsa sıcaklık düştüğünde çözünürlüğünde azalma görülmez. Ancak hidrojen bağı olan bileşiklerdeki çözünürlüğü sıcaklığın artması ile düşer (Willey, 1964).

Akrilik asit farklı alanlarda kullanılmaktadır. Örneğin tekstil materyallerinin modifiye edilmesinde, plastiklerde, kâğıt imalatında, dış cephe boyalarında, zemin cilalarında, zemin ve duvar kaplamalarında, otomobil, araç-gereç ve mobilya verniklemede, eczacılıkta kontrollü ilaç salınım sistemlerinde kullanılmaktadır.

Biyo-adeziv hidrojel olarak, hem mukozaya yapışan hem de viskozite artıran PAA jelleri, gözde merhemler gibi bulanıklık yapmadan rahat şekilde kullanılmaktadır (Robinson, 1989). Göz için yapılan ilaçların, göz içine iyi bir şekilde absorplanabilmeleri ve tedavide aktif rol oynayan maddelerin daha uzun süreli göz tabakasında bulunabilmeleri için PAA ile deneyler yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada PAA gibi ayrı ayrı kullanılan polimerler mukoz tabakayla bağ kurarak göz yüzeyinde çözünür, kolloidal ve partikül halde bulunan materyali yakalayabilmektedir (Greaves ve Wilson, 1993).

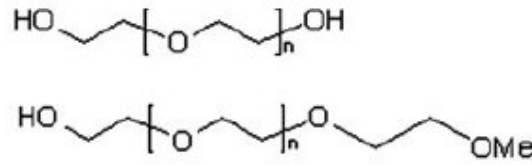
Vajinal lezyonların tedavisi amacıyla poliakrilik asit, metilselüloz, karboksi metilselüloz, hidroksi propil selüloz ve hidroksipropil metil selüloz kullanılarak asiklovir içeren bioadhesive tabletler hazırlanmıştır. Bioadhesive polimer olarak poliakrilik asit ve hidroksipropil metil selüloz kullanılan tabletlerin laktik çözeltisi veya distile suda 6 saat boyunca şiştiği ve etkin madde salımının 8 saatten daha fazla olduğu görülmüştür. Poliakrilik asit, sodyum karboksimetil selüloz ve çinko sülfat içeren vajinal tabletler bu konuda önemli örneklerdir (Bell vd., 1995; Kiyama vd., 1995; Serres vd., 1996; Ramkinssoon vd., 1999; Genç vd., 2000).

Yapılan bazı çalışmalarda poliakrilik asitin adjuvant, antitrombojenik madde ve ilaç salınımlarında taşıyıcı olarak kullanılmakta olduğu gösterilmiştir. Normalde toksik olan PAA zincirine, NIPAAm ünitelerinin katılmasıyla toksisitesi azaltılmaktadır (Mustafaev vd., 1998). Mevcut çalışmalar, poliakrilik asit ve Cu^{2+} komplekslerinin sulu çözeltilerinin, protein

karışımları ile radyasyon etkisine maruz bırakıldıklarında, belli dozlara kadar gerek polimer gerekse protein moleküllerinin *in vitro* koşullarda bozulmadan direnç gösterdiklerini bildirmiştir. Poliakrilik asit ve poliakrilik asit-Cu²⁺ örneklerinin kan hücrelerini radyasyondan koruma özelliği taşıdığı gösterilmiştir (Mustafaev vd., 1998).

2.1.5 Polietilen Glikol

Polietilen glikol (PEG) etilen glikol alt ünitelerinden yapılan bir polimerdir (Webster vd., 2007).



Şekil 2.3 Polietilen glikolün yapısı (Webster vd., 2007)

PEG molekül ağırlığına bağlı olarak sıvı veya az eriyen katı olabilir (Werle, 2007). Ticari adı Carbowaxes, kimyasal yapısı $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n$ 'dir (Şekil 2.3) (Jackson, 1962; Mehvar, 2000). PEG su, metilen klorid, etanol, toluen, aseton ve kloroform gibi birçok organik çözücünde yüksek oranda çözünür. Çeşitli büyüklüklerde (moleküler ağırlıklarında) ve işlevselleştirilmiş yapılarda (örn: amino-, karboksil-, ve sülfhidril- ekli) formları mevcuttur. 1000 Da'dan düşük molekül ağırlıklı PEG'lerin kaynama noktaları 67°C civarında olup daha yüksek moleküler ağırlıktakilere oranla, viskoz ve renksiz maddelerdir.

Polietilen glikol yaklaşık 300–20,000 Da molekül ağırlığında bulunabilir (Jackson, 1962). Polimer 10 kD'dan düşük moleküler ağırlıklarda genellikle doğrusal yapıdadır. Bununla beraber yüksek molekül ağırlıklarında PEG farklı derecelerde dallanır. Değişik molekül ağırlıklarında sentezlenen PEG, farmasötik ürünlerde kullanılmaktadır (Mehvar, 2000)

Polietilen glikol son zamanlarda kozmetik ve farmakoloji alanlarında geniş şekilde kullanılmaktadır. Hayvanlarda ve hatta insanlarda toksisite çalışmaları yapılmıştır (Jackson, 1962). PEG'in immunojen ve toksik olmaması, suda ve birçok organik çözeltilerde yüksek çözünürlüğü, insan kullanımı için FDA tarafından onaylanması gibi birçok önemli avantajı vardır. İlaçların polietilen glikolizasyonu (PEG'lizasyonu) için ortak düşünceler, böbrek tarafından atılımı azaltması, proteolitik enzimlerce veya hidrolitik ortam tarafından yıkımını azaltması ya da önlemesi, suda çözünürlüğü artırması, retikuloendotelial sistem tarafından

temizlenmeyi engellemesi ve immunojenlik ve antijenliği azaltması gibi özelliklerdir (Nucci vd., 1991; Kope'cek vd., 2000).

Küçük proteinlerin, peptitlerin ve oligonükleotitlerin PEG ile konjugasyonu giderek artan bir yöntem olup, moleküllerin biyolojik yarı ömrünü arttırıp böbreklerden atılımını ve enzimatik parçalanmalarını azaltır (Webster vd, 2007). PEG-protein konjugatları anti-kanser, trombolitik ve oksijen taşıyıcı ajanlar olarak ayrıca vücutta eksik enzimin yerini doldurmada veya diğer işlevsel proteinlerin görevlerini yapmak üzere kullanılabilirler (Mehvar R., 2000)

PEG'lizasyon ile moleküllerin suda çözünabilirlik, yüksek toksisite ve zayıf farmakokinetik profil gibi olumsuzlukları düzeltilebilir. Bazı peptit ve proteinler, tedavi edici ajan olarak kullanımı için vücutta uzun süre kalmaması, *in vivo* ve *in vitro* olarak kolayca parçalanmaları, immunolojik reaksiyonlara sebep olmaları gibi ortak dezavantajları nedeniyle tam olarak kullanıma geçirilememiş; birçok çalışmada polietilen glikolün kullanılması ile istenen sonuçlara ulaşılmış ve piyasaya sürülmüştür (Abe vd., 2006).

PEG ile polimer peptit konjugasyonunda gerçek bir patlama 1970'lerde Prof. Frank Davis tarafından gerçekleştirilmiştir (Davis vd., 1978). Proteinler, peptitler, düşük moleküler ağırlıklı ilaçlar ve polinükleotitler gibi farklı ilaç adaylarının geniş bir kısmının PEG'lize edilmesi ile ilgili çalışmalar birçok yayında geçmiş ve hastalarda rapor edilmiştir (Duncan, 2003).

PEG ile konjugasyonun avantajları kısaca şöyle özetlenebilir;

- İlaçların kimyasal yıkıma karşı stabilizasyonu,
- Proteolitik yıkımdan koruma,
- İmmunojenliği azaltma,
- Antikor tanınmasını azaltma,
- Biyo dağıtımın modifikasyonu,
- Endositoz ile ilaç alınması,
- Hedefli ilaç verilmesinde yeni stratejiler geliştirilmesi,
- Suda çözünürlüğün arttırılması,
- Toksisitenin azaltılmasıdır (Zaplisky ve Harris, 1997; Bailon ve Berthold, 1998; Veronese, 2001).

Polietilen glikol bir protein ile bağlanmadan önce genellikle monomethoksil PEG [CH_3 (-O- CH_2 - CH_2) $_n$ -OH], siyanürik asit, 1,1'-karbonildiimidazol, fenilkloroformat veya suksidinimidil gibi aktif esterler ile aktifleştirilir. PEG-protein konjugatlarının farmokokinetiği ve

farmokodinamiği konjugasyon için kullanılan PEG'in molekül ağırlığına ve her protein molekülü için kullanılan PEG sayısına bağlıdır (Mehvar, 2000).

PEG ile önemli ürünler yaratılmış ve ağır immuno-bozukluk hastalığı (SCID) tedavisinde kullanılan PEG-adenozin deaminaz ve lösemi tedavisinde kullanılan PEG-asparajinaz gibi bazı ilaçlar piyasaya sürülmüştür (Graham, 2003).

Yeni geliştirilen dallanmış PEG'ler lineer PEG ile kıyaslandığında boyutu arttırdığı için daha geniş uygulama alanı sağlar. Heterobifonksiyonel PEG'ler hedefleyici rolde ikinci molekül ile spacer adı verilen ve polimer ile ilacı bağlayan arabulucularla bağlanarak hazırlanmıştır. İkinci jenerasyondaki birçok ürünler piyasaya ulaşmış olup lineer PEG-interferon $\alpha 2b$ (PEG-Intron) (Wang vd., 2002), dallanmış PEG-interferon $\alpha 2a$ (Pegasys) (Bailon vd., 2001; Reddy vd., 2002), PEG-büyüme hormon reseptör antagonisti (Pegvisomant, Somavert) (Trainer vd., 2000), PEG-G-CSF (Pegfilgrastim, Neulasta) (Kinstler vd., 2002) gibi örnekleri vardır ve birçokları klinik deneylerde olup gelecek kullanımı için umut verici gelişmeleri beklenmektedir.

Polimerlerin klinik kullanım için biyo-uyumlu olmaları gereklidir. PEG toksik olmadığı bilinen bir polimer olup tıpta kullanımı için onay almıştır. Aynı şekilde bütün polimerlerin klinik çalışmalardan önce ciddi toksikoloji testlerinin yapılması şarttır (Abe vd., 2006).

2.2 Biyouyumluluk ve Toksisite Testleri

Biyouyumluluk kavramı; spesifik uygulama için kullanılacak materyalin, toksik olmaması ve fonksiyonel şekilde çalışması olarak tanımlanmıştır. Son 10 yıldır tartışılan biyouyumluluk kavramında genel olarak iki prensip vardır. Bunlardan birincisi sitotoksik etkinin saptanması, ikincisi ise biyofonksiyonelliğin gösterilmesidir. Biyomateryal veya ilaç sistemlerinin fonksiyonelliğini belirlemek için kullanım amacına göre testler seçilir. Ancak ne kadar fonksiyonel olursa olsun, insanda kullanılması hedeflenen maddelere klinik öncesi toksisite testlerinin yapılması şarttır (Kirkpatrick vd., 2005).

Toksisite testleri *in vivo* hayvan modellerinde ve *in vitro* kültür modellerinde yapılmaktadır. Deney hayvanlarını koruma yasalarının temelindeki 3R (reduction, replacement and refinement) kuralına göre; toksisite çalışmalarında deney hayvanlarının kullanılması yerine sayısı hızla artan yeni alternatif yollar geliştirilmektedir. Bunlardan biri olan *in vitro* toksikoloji yöntemleri kullanılarak yapılan hücre kültür çalışmaları, son yıllarda yaygınlaşmış ve laboratuvar hayvanı kullanımı yerine daha ekonomik olan alternatif bir yol getirmiştir.

In vitro toksikolojik teknikler pratik, güvenilir ve avantajlı yöntemler olarak bilinmektedir. Bu teknikler ürünlerin geliştirilmesi, ilaçların keşfi, güvenliğin geliştirilmesi ve *in vivo* akut ölümcüllüğün önceden anlaşılmasında rutin olarak kullanılmaktadır. Birçok çalışmada insanda akut toksisite ile *in vitro* metotlar arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (Lestari vd., 2006).

Ancak hücre kültürü asla tam bir organizmanın cevabını oluşturmaz. Organizmada meydana gelebilecek etkileşimler hakkında tam olarak bilgi vermez. Diğer bir problem de memeli kültürünün en çok kullanılan kalıcı hücre serileri, biyomateryalin toksik etkilerine primer kültürlerden veya birkaç pasajlık kültürlerden daha az duyarlıdır. Ayrıca devamlı veya primer hücre serileri arasındaki seçime ek olarak, hücre türünün seçimi de oldukça önemlidir.

Uygun testin dizaynında uygulanan daha ileri bir prensip insandan alınan biyolojik dokulardır. İlk olarak izole edilen doku veya bağlantılı hücreler taze izole edilmiş primer yapıda olup transforme olmamalıdır. Fakat primer kültürlerin insandan izole edilmesi ve kültürünün yapılması oldukça zordur. Primer kültürler farklı donörlerden alındığı için fonksiyonel durumları yansıtmaları farklıdır. Kalıcı hücre serileri bu açıdan daha stabil bir fenotipe sahiptir. Ayrıca kalıcı hücre serileri ile yapılan çalışmalar, primer hücrelere göre tekrar edilebilirdir. Kalıcı hücrelerin; kendiliğinden, viral antijenlerle veya kimyasallarla transforme olması bunların önemli hücresel fonksiyonlarını denetlemeyi gerektirir.

İn vitro kültür metotlarında diğer bir önemli durum ise kültürde yapının 2 boyutlu olmasıdır. Geçerli fonksiyonel parametreleri içermesi için gerekli hücre fenotipinin sağlanması oldukça önemlidir. Bir hücre tipinin saf izolasyonunun sağlanması yeterli değildir. Ayrıca kültür koşullarında gerekli hücresel fonksiyonlarının kaybolma riskinin olmadığı gösterilmelidir (Kirkpatrick vd., 2005).

Uygun hücre kültürü seçimi ile beraber kullanılacak toksisite testinin seçilmesi de oldukça önemlidir. *İn vitro* sitoksisite testlerinde; kültür ortamında hücreler ile belli süre etkileşime bırakılan maddelerin hücrelerde oluşturduğu değişimler ve hücre canlılığı incelenir.

Hücrelerin metabolik aktivitesinin ölçülmesine dayalı birçok kolorimetrik yöntem geliştirilmiştir. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) veya 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetilmethoksifenil)-2-(-4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) gibi testler ile hücre canlılığı ölçülebilir.

Hücre sayısının belirlenmesinde diğer bir kolorimetrik metot ise toplam DNA miktarının ölçülmesidir. Kullanılan floresan boya çift sarmal DNA'nın nükleik asitlerine bağlandıkça daha yoğun floresan açığa çıkar. DNA miktarının ölçülmesinde yüzeye tutunan hücrelerin dezavantajı hücrelerin tripsinizasyonunu gerektirmesidir. Sonuçta materyalden kaldırılması ve boyamayı gerektirmesi zahmetli ve yoğun bir süreçtir.

Radyo etiketli timidin ile çoğalan hücre sayısı tam olarak ölçülebilir. Radyoaktif timidin ekleme yöntemiyle yeni bölünen hücrelerin DNA molekülleri işaretlenir. Geriye kalan radyoaktif timidinin ortamdan uzaklaştırılması ve örneğin radyoaktivitesinin ölçümü artan hücre sayısı ile doğrudan orantı gösterir. Bu metot başlangıç hücreleri radyoaktif timidini kullanmadıkları için bütün hücre sayısını ölçemez. Diğer bir dezavantajı ise radyoaktivite kullanmanın neden olabileceği sağlık riskleridir. Radyoaktivitenin getirdiği problemler, timidin analogu olarak 5-bromo-2'-deoksiüridin kullanılarak uygulanmasıyla ortadan kaldırılabilir.

Hücre fenotip ve canlılığı ile yakın ilişkili olduğundan, hücre morfolojisinin görüntülenmesi önemlidir. Floresein diasetat veya klorometilfloresein diasetat boyalar hücre fiksasyonunu gerektirmeden canlı hücrelerin klasik ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu kullanılmasıyla gözlenmesini sağlar. Floresan olmayan lipofilik boyalar, hücre membranından içeri alınıp hücresel hidrolaz enzimi ile parçalanarak hücre dışına kolayca çıkamayacak olan floresan ürünler oluşturur. Hücre morfolojisi floresan mikroskop veya konfokal lazer taramalı mikroskop ile kolayca gözlenebilir. Bu boyalar hücre büyümesine negatif bir etki yaratmadığından dolayı uzun süreli kültürü gözleyebilmek amacıyla kullanılabilir.

Atomik force mikroskobu gerçek zamanlı dinamik hücresel sürecin çalışılması için potansiyel bir araç olabilmektedir. Fiziksel tampon aday hücrelerin morfolojiyi bozmadan ve hasara yol açmadan devamlı görüntülenmesi amacıyla hücrelere saatlerce uygulanabilir. Hücrelerin yayılımı, hareketliliği gibi dinamik olaylar normal kültür sırasında gözlenebilir.

İmmunofloresan; hücre yapısının tanımlanmasında, hücrelerin dinamik proseslerinin, nükleus, lizozom, sitoskelet gibi elemanların görüntülenmesinde kullanılan önemli bir metottur. Direkt immunofloresan yöntemi ile komponentler hücresel hedef moleküllerce tanınır ve doğrudan floresan boyayla boyanır. İndirek immunofloresanda ise sandviç metodu ile çalışılır. Antikor ilk olarak hücresel hedef moleküle (antijene) bağlanır, ikinci adımda antijen-antikor kompleksi boya bağlı antikorlar ile belirlenir. Canlı hücrelerin nükleusunu boyamada Hoechst 33342, 4-,6-d diamidino-2-fenilindole, dihidroklorid (DAPI) ve etidyum bromid rutin olarak canlı hücrelerin nükleusunu boyamada kullanılır (Ma vd., 2007).

Hücrelerin biyosentetik fonksiyonlarının incelenmesindeki genel prensipler kısaca şöyledir. İlk olarak *in vitro* hücre fenotipinin başlıca elemanlarının incelenmesi esastır. Genelde bu, insan primer hücrelerinin erken pasajda kullanılması anlamına gelir. İkinci olarak hücre biyosentetik fonksiyon kinetiğinin çeşitli yönleri araştırılmalıdır. Bu özellikle doz-cevap çalışmalarında farklı zaman noktalarının kullanımını içerir. Doz-cevap deneyleri adezyonu artıran mikromolar altı iyon konsantrasyonu ile ilgilidir. Bu *in vitro* deneylerde hücreleri baskılar, organizmaya girişte dikkatli karar verilmesini gerektirir. Üçüncü olarak biyosentetik aktivite sadece gen üretim seviyesinde değil, transkripsiyon seviyesinde de önemlidir. Gen ekspresyonunun her iki seviyesinin çalışılması hücre içinde gen kontrol ve sinyal üretiminin anlaşılması için gereklidir (Kirkpatrick vd., 2005).

Biyomateriyallerin sebep olduğu sistemik toksisite ve mekanik hasarın belirlenmesinde *in vitro* kültür modelleri kullanılmaktadır ancak hayvan denemelerinde olduğu kadar net sonuçlara ulaşamaz. *In vitro* testlerin sistemik toksisiteyi araştırmakta yetersiz kalabileceği, bu nedenle ancak *in vivo* testler için bir ön tarama testi olarak kabul edilmesi gerektiği şeklinde tartışmalar sürmektedir (Davis 1994). Bu kültür metotları ile maddelerin vücutta oluşturacağı etkileşimler tam olarak ortaya konulamayacağı düşünölmektedir. Ancak kültür yöntemi ile polimerlerin sitotoksik özellikleri ve yıkım ürünleri tanımlanabilir. Bunun yanı sıra *in vitro* deri absorpsiyon testi, *in vitro* fototoksisite testi, *in vitro* deri korozyon testi ve hassasiyet testleri hayvan testlerinin yerini almış testlerdir. Kimyasalların, ilaçların, kozmetik ürünlerin toksisite testlerinin şu anki ve gelecekteki düzenlemeleri için *in vitro* metotların ve hücre kültürü yöntemlerinin geliştirilmesi gereklidir (Lestari vd., 2006).

2.2.1 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum (MTT) Testi

Hücreler üzerindeki toksik etkinin incelenmesi amacıyla hücre canlılığının ölçülmesini sağlayan metotlardan önemli bir tanesi de MTT testidir. MTT testi hücre büyümesi veya hücre ölümünü değerlendirmeye olanak sağlayan indirekt bir testtir. Kültür ortamındaki hücreler üzerinde uygulanabilen ve hücrelerin metabolik aktivitesinin ölçülmesine dayalı kolorimetrik bir yöntemdir. Hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrojenaz enzimi ile MTT reaktanı mor renkli formazan kristaline indirgenir. Bu reaksiyon sadece canlı hücrelerde gerçekleşir. Oluşan kristaller, mikroskopik olarak gözlemlenebilir ve DMSO, izopropanol gibi kimyasallar ile çözündürülerek oluşan mor renk kolorimetrik olarak ölçülebilir. Mor renkli ürünün toplam miktarı hücre popülasyonundaki dehidrojenaz enziminin toplam aktivitesini verir. Ölçülen optik değer hücrelerin canlılığı ile doğrudan orantılıdır (Kirkpatrick vd., 2005)..

2.2.2 Hücre Kültürleri Üzerinde Toksisite Araştırmaları

Hücre kültürlerinin toksisite araştırmalarında çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Hücre kültürlerinde toksisite araştırmalarının avantajları şöyledir

- a. Tür farklılığını ortadan kaldırır,
- b. Kimyasal maddelerin muhtemel toksik etki yapacağı düşünülen deri, karaciğer gibi spesifik doku hücreleri üzerinde araştırma yapılmasını sağlar,
- c. Toksisite mekanizmalarının hücreler üzerinde aydınlatılmasına imkân verir,
- d. Deneyde kullanılan hayvanların acı çekmesi veya ölmesi söz konusu değildir.

Hücre kültürlerinin toksisite araştırmalarındaki dezavantajları;

- a. Tekli sistemdir. Multifaktöriyel ilaç metabolizması için uygun değildir,
- b. Teknolojik alt yapı, maliyet ve deneyim gerektirir,
- c. *In vitro* ortamda hücrelerin yaşam siklusu kısadır,
- d. Enzim stabilitesi kısıtlıdır,
- e. Kültür ortamının penetrasyon kabiliyeti kısıtlıdır,
- f. Ko-faktörlere gereksinim duyar.

Günümüzde 2300'den fazla insan ve hayvan hücre kültür modeli mevcuttur. Hücre kültürleri ticari olarak firmalardan sağlanabileceği gibi, araştırmacıların kendi özel hücre kültürlerini gönüllülerden veya cerrahi operasyonlardan çıkacak doku örneklerinden yararlanarak oluşturmaları da mümkündür (Davis, 1994).

2.3 Hücre Kültürü

Hücre kültürü; hücrelerin bir doku veya organdan izole edilerek *in vitro* koşullarda üretilmesi ve bu üretilen hücrelerin devamlılığının sağlanmasıdır. Ökaryot veya prokaryot hücreler *in vitro* olarak geliştirilebilir ve çoğaltılabilirler. Günümüzde hücre kültürleri üzerinde yapılan araştırmalar, konu ile ilgili çalışmalar arasında önemli bir yer tutmaktadır. Kanser türleri gibi çeşitli patolojik durumlarda bir maddenin etkileri ve işlevlerini belirlemek amacıyla, *in vitro* hücre kültürü üzerinde araştırmalar yapılarak *in vivo* ortamda uygulanabilecek sonuçlara ulaşılabilir. Hücreler çoğaltılarak fazla miktarda elde edilebilir, karakterizasyonu yapılabilir, uygun besiyerinde üretilerek fiziksel ayırım yapılabilir ve belirli bir hücre grubu dondurularak saklanabilir.

Hücre kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamaktadır. İlk olarak 1885'te Roux, embriyonik tavuk hücrelerinin vücut dışında tuz çözeltisi içerisinde canlılıklarını sürdürebildiklerini göstermiştir. Carrel 1913'te, hücrelerin aseptik koşullarda düzenli olarak beslenmeleri halinde kültür ortamında uzun süreler boyunca çoğalabildiklerini göstermiştir. 1952'de Gey ve arkadaşları bir insan servikal karsinomasından türeyen hücrelerin devamlı serilerini elde etmişlerdir. Dünya genelinde süregelen çalışmaların devamında 1986'da Martin, Evans ve arkadaşları, fareden pluripotent embriyonik kök hücrelerini izole ederek kültürünü yapmışlar ve 1998'de Thomson, Gearhart ve arkadaşları insan embriyonik kök hücrelerini izole etmeyi başarmışlardır (Freshney, 1994).

2.3.1 Hücre Kültür Modelleri

Hücre kültürleri genel olarak primer, diploid ve devamlı hücre kültürleri şeklinde sınıflandırılırlar.

Primer hücre kültürleri; organizmadan alınan organ ve dokulardan mekanik, enzimatik veya primer eksplant yöntemleri ile hazırlanarak ilk üretilen hücre kültürüdür. İçerisinde besiyeri bulunan kültür kaplarında yüzeye yapışan canlı hücreler büyür ve çoğalmaya başlar. Hücreler çoğalarak bulundukları yüzeyi kaplar ve birbirlerine dokunduklarında kontak inhibisyon ile çoğalmalarını durdurur. Böylece tek tabakalı hücre kültürü elde edilir (Ustaçelebi, 1991; Konneman, 1992; Ryan, 1994).

Diploid hücre kültürleri; primer hücre kültürlerinin subkültürü ile elde edilir. Histolojik olarak tek bir hücre tipinden oluşur ve az sayıda pasajı yapılabilir. Sonrasında bölünme yeteneklerini kaybederler.

Diploid hücre kültüründeki hücrelerin yaklaşık %75'i orijinal olarak elde edilen normal hücre türü ile aynı karyotipe sahiptir. MRC-5 ve WI-38 insan akciğer fibroblast kültürleri diploid hücre kültürlerine örnek verilebilir (Ustaçelebi, 1991; Akan, 1994).

Devamlı hücre kültürleri; kanser hücreleri gibi anormal ya da transformasyona uğramış ve sınırsız çoğalabilen hücre serileridir. Bunlar *in vitro* olarak, hücrenin spontan veya kimyasal ajanlarla transformasyonu sonucu veya tümörden izole edilen hücrelerden yapılırlar. Bir hücre kültürünün devamlı sayılabilmesi için en az 50 subkültürünün yapılmış olması gerekir. Genellikle bu hücreler *in vitro* kültür boyunca geçirdikleri mutasyonlar nedeni ile morfolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından orijinal hücrelerden farklılık gösterir. Genellikle kromozom sayıları bakımından aneuploidlerdir (Ustaçelebi, 1991; Ryan, 1994; Boyd, 1995).

Çoğu omurgalı hücreler, kültürde sınırlı sayıda bölündükten sonra hücre ölümü denilen bir sürece girerek bölünmeyi durdururlar. Örneğin, insan fibroblastları kültürde sadece 25–40 kez kadar bölünürler. Bu olay telomerlerin kısalmasına bağlıdır. İnsan somatik hücreleri, telomeraz enziminin yapımını durdurdukları için telomerler kısaltmakta ve hücrelerin yaşamı da sınırlı olmaktadır. Bu hücrelere, telomeraz enziminin katalitik alt birimini kodlayan bir genin katılması ile hücrelerin sonsuz çoğalmaları sağlanabilir ve böylece ölümsüz hücre serileri olarak kullanılabilirler.

Bununla birlikte, bazı insan hücreleri bu işlem gerçekleşse de ölümsüzlük özelliklerini kazanamazlar. Telomerlerinin uzun olarak kalmasına karşın yine de kültürde bölünmelerini durdururlar. Çünkü kültür ortamının koşulları hücre döngüsünün kontrol noktasını uyarmakta ve böylece de hücre döngüsü durmaktadır. Bu kontrol mekanizmasının inaktive edilmesi için tümör yapıcı virüslerden türetilen kanser başlatıcı onkogenler kullanılmaktadır (Tanya vd., 1998).

Kanser hücrelerinden izole edilen veya tümör indükleyici bir virüs ya da kimyasal madde kullanılarak normal hücrelerin transformasyonu ile elde edilen hücre serileri normal hücrelerden farklı özellikler taşırlar. Örneğin, kanser hücre serileri bir yüzeye tutunmadan çoğalabilir ve kültür kabında çok yüksek bir yoğunluğa ulaşabilir (Halvorsen vd., 1998).

2.3.2 Hücre Kültürü Tanım ve Yöntemleri

Tek bir hücre tipi hakkında en iyi bilgiyi elde edebilmek için, o hücrenin dokudan ve diğer hücre tiplerinden ayrılarak izole edilmesi gerekir. Bunun sonucunda oluşan homojen hücre popülasyonu ya doğrudan ya da kültür ortamında çoğaltıldıktan sonra analiz edilebilir. Farklı hücre türleri doku süspansiyonundan değişik yöntemlerle ayrılarak tespit edilebilir [1].

Hücre kültürleri genellikle embriyonik dokulardan hazırlanır. Çünkü erişkin dokuya göre embriyonik doku daha uzun süre çoğaltılabilir. Embriyonik hücre dizileri MRC-5 ve bir diğer insan embriyonik akciğer fibroblast hücreleri 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).

Kullanılacak hücrenin özelliğine bağlı olarak uygulanacak metot seçilir. Hangi yöntem kullanılmış olursa olsun belli bir tipteki hücreler elde edildikten sonra, bunlar hücre kültürü için başlangıç materyalini oluştururlar ve koşulları belirlenmiş bir kültür ortamında sayıları çoğaltılarak çeşitli araştırma çalışmaları için kullanılabilirler (Alberts vd, 1994). Çeşitli amaçlar için kullanılacak kültür hücrelerinin elde edilmesinde kullanılan 3 yöntem vardır.

2.3.2.1 Eksplant Yöntemi ile Kültür Hücrelerinin Elde Edilmesi

Eksplant metodu ile primer hücre kültürü hazırlarken önce dokular küçük parçalara ayrılır ve kültür kaplarına yerleştirilir. Eksplant metodu özellikle küçük doku örnekleri için uygundur. Dışa göç eden ilk hücreler fibroblast hücrelerdir ve bu hücrelerden sonra epitelyal hücreler gelmektedir. Dışarıya alınan doku parçasının kenarında oluşacak hücre proliferasyonunu uyarmak bu metodun temel amacıdır.

Eksplant metodu ile yapılan primer hücre kültürlerinde başarı oranı oldukça yüksektir. İlk 24 saat içerisinde 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 parçalarının boyutsal olarak büyüklüğü ile birlikte hazırlanış aşamalarına, çoğaldıkları yüzeye yapışmalarına ve uygun kültür besiyerinin seçimine dikkat edilmelidir. Dokudaki bütün hücrelere besinin rahatça ulaşması ve toksik metabolitlerin dışarıya kolaylıkla atılabilmesi için doku parçalarının büyüklüğünün 1–3 mm³ arasında olması gerekmektedir. Ezilme ve zedelenmeler hücre gelişimini ve canlılığını engelleyebileceği için dokuların kesilmesi sırasında dokunun ezilmemesine ve yırtılmamasına dikkat edilmelidir (Gürtürk, 1977; Koneman vd., 1992; Alberts vd., 1994; Doyle vd., 1995).

2.3.2.2 Fiziksel Ayırıştırma Yöntemi ile Kültür Hücrelerinin Elde Edilmesi

Fiziksel metotların kullanımı hücrelerin birbirine veya stromaya gevşek bağlandığı dokular için oldukça uygundur. Fiziksel ayırıştırma metodunda önce kültür besiyerinde donör dokusu parçalara ayrılır. Daha sonra dökülen hücreler sedimantasyon yöntemiyle filtre edilerek

toplanır. Perfüzyon metodu ile bazı organlarda primer kültürler için gerekli sayıda hücrenin elde edilmesi sağlanır. Perfüzyonla ayırtırmaya verilen bu iki örnek buna paralel olarak fizyolojik tuzlu su ile perfüzyon aşaması ya da bunu takiben enzimatik ayırışma aşamasını da kapsar. Kısaca, fiziksel hücre ayırışma 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 Ayırışma Yöntemi ile Kültür Hücrelerinin Elde Edilmesi

Donör dokusundan hücreleri ayırtırmak için kullanılan metotların temel prensibi hücrelere zarar verilmemesidir. Enzimatik ya da diğer kimyasal metotlar, farklı türdeki donör dokularından hücrelerin ayırıştırılabilmesi için kullanılır. Enzimatik aktivite, ayırışma tekniğinin önemli bir parçasıdır. Ayırışma işlemi donör dokusunun 1-3 mm³'lük parçalara ayrılması ile başlar. Bu işlem uygulanırken hem enzimatik aktivasyonun etkileyebileceği maksimum yüzey alanı elde edilmeli, hem de mümkün olabildiğince hücreler zarar görmeden dokunun parçalanması sağlanmalıdır. Parçalanmış dokular osmotik tuz solüsyonları ile yıkanır ve uygun konsantrasyondaki enzim solüsyonuna aktararak 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 yerine birkaç enzimin kombinasyonu kullanılabilir. Ayırıştırılan hücreler uygun besiyeri ilavesi ile inkübasyona bırakılır.

Tripsin, kollagenaz, hyaluronidaz, 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 ayırıştırılması için çok saf olmayan enzim preparatları daha etkindir (Hodges ve Livingston, 1973; Lenette ve Schmidt, 1979).

2.3.3 Hücre Kültürü Yönteminin Temel Aşamaları

Hücre kültürü çalışmaları için gerekli araç-gereçler; laminar akımlı kabin, karbon dioksit (CO₂) etüvü, faz kontrast mikroskop, hücreleri saklama ve koruma için sıvı azot tankı ve hücrelerin üreme ve tutunmalarına uygun yapıda, toksik olmayan, biyolojik olarak inert ve optik olarak saydam, tek kullanımlık steril plastik kaplardır.

Laminar akımlı kabinler dikey ya da yatay olabilirler, dikey olanlarında süzülen hava kabinin üstünden çıkarken yatay olanlarında kullanıcı bölgesinden yatay olarak dışarı üfürülür. İçerdikleri HEPA (yüksek etkili partikül yakalayıcı) filtreler sayesinde çalışma alanında steril ortam oluştururlar. Böylece, çalışılan ürünü, çalışan kişiyi ve çevreyi korurlar. Kabinlerin kullanım öncesi UV (ultraviyole, morötesi) ışıkla sterilizasyonu sağlanmalıdır. Hücreler yaklaşık olarak %5 CO₂ içeren ortamda üretildikleri için CO₂ etüvlerinden yararlanılmaktadır. Karbondioksit gerektirmeyen kültürler için CO₂'siz etüvler kullanılır. Cam veya plastik kültür kaplarındaki hücreleri gözlemleyebilmek için ters mikroskop kullanılmalıdır [1].

2.3.4 Kültürde Hücrelerin Gelişimini Etkileyen Faktörler

Kültürde hücrelerin gelişimini etkileyen faktörler; sıcaklık, pH, çeşitli iyon konsantrasyonları, kültür ortamında bulunan temel metabolitler, hormonlar, enzimler ve proteinlerdir.

2.3.4.1 Sıcaklık

Kültür ortamı için en uygun sıcaklık ayarlanırken, hücrenin doğal ortamındaki sıcaklığı dikkate alınmalıdır. Birçok hücrenin çoğalabilmesi için gerekli olan sıcaklık 36,5–38 °C'dir. Hücreler 45°C'de 12–48 saat yaşayabilirler, 20–25 °C sıcaklıklarda üremeleri yavaşlar, +4°C'de ise hücreler bölünmeleri gecikmiş ama yapıları zarar görmemiş olarak muhafaza edilebilir. Birçok hücrenin çoğalabilmesi için yaklaşık 37°C optimum sıcaklıktır (Kuchler, 1977).

2.3.4.2 pH

Hücrelerin kültürde üretilmesinde ortamın pH'ı oldukça önemlidir. Optimum pH değeri 7 olup bu değerin 6,8'in altına düşmesi veya 7,6'nın üstüne çıkması hücreleri olumsuz etkiler (Hoffmann ve Simonsen, 1989).

2.3.4.3 İyon Konsantrasyonu

Sodyum, potasyum, magnezyum, kalsiyum, demir, fosfat, sülfat gibi iyonlar hücre gelişmesi açısından önemlidir. Kalsiyum ve magnezyum hücrelerin yüzeye yapışmasında, kalsiyum sitoplazmik gelişimde, magnezyum enzimatik reaksiyonlarda kofaktör olarak ve ribozomların bütünlüğünün sağlanmasında önemlidir. Kalsiyum hücre membranının büyük bir kısmını oluşturur. Diğer proteinlerle ve anyonlarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Potasyum hücre zarının potansiyelinde önemli rol alır (Garay, 1982).

2.3.4.4 Temel Metabolitler

Temel metabolitler: Amino asitler, vitaminler, gazlar, karbonhidratlar, proteinler ve peptitlerdir.

Amino asitler; arjinin, sistin, glutamin, histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan, tirozin, valindir.

Karbonhidrat bazlı temel metabolitler; glukoz, fruktoz, mannoz ve galaktoz gibi şekerlerdir.

Kültür ortamındaki vitaminlerin çoğu metabolizma için gerekli olan koenzimlerin temel yapısını oluşturur. Kültürde gerekli olan diğer vitaminlerin besiyeri içerisine eklenen serumdan karşılanabileceği düşünülmektedir.

Vitaminler biotin, kolin, folat, nikotinamid, pentotenat, pridoksal, tiamin ve riboflamin gibidir. Kültür ortamında mutlaka bulunması gereken esansiyel metabolitler sistin, tirozin, methionin ve fenil alanin gibi temel aminoasitlerdir (Alberts vd., 1994).

2.3.4.5 Hormonlar

Hormonlar hücrelerin gelişimlerinde değişik etkilere sahiptir. Hücrelerin yüzeye tutunmasını ve hücre proliferasyonunu artırır. Hücre yoğunluğu fazlaysa sitostatik olabilir ve hücre differensiyasyonunu uyarabilir. Kültür için serum içersinde bulunan hormonlar kullanılabilir (Freshney, 1987; Alberts vd., 1994; Doyle vd., 1995).

2.3.4.6 Enzimler

Hücrenin organizasyonunu sağlayan enzimler, hücrenin gerek duyduğu zamanlarda sentezlendiği gibi, gerekli olmasa da sentezlenebilmektedir. Bunlar hücrenin adaptasyonunu sağlar (Alberts vd., 1994).

2.3.5 Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerleri

Hücrelerin *in vitro* şartlarda üretilmesi için uygun besiyerleri kullanılmalıdır. Bu besiyerlerinde glukoz konsantrasyonu 5–10 mM arasındadır. Tüm aminoasitler L formundadır ve bir iki istisna dışında konsantrasyonları 0,1–0,2 mM'dır. Vitaminlerin konsantrasyonu ise 100 kat daha az olup yaklaşık 1 μ M'dır. Serum kullanılmadan kimyasal olarak koşulları belirlenmiş bir besiyerine, serum yerine hücre çoğalmasını uyarıcı büyüme faktörleri ve hücreye demir taşıyan transferrin gibi proteinler eklenir (Finegold ve Baron, 1986; Isenberg, 1992).

2.3.6 Besiyerlerine eklenen katkı maddeleri

Serum: Albumin, globulin, üreme uyarıcıları ve üreme inhibitörlerinin bulunduğu serum hücre kültürü için 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 tutunmasını 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 epidermal üreme faktörü gibi faktörler bulunur. 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).

Genelde besiyeri hazırlanırken % 5-25 oranında serum eklenir. Fetal calf serum (FCS), fetal bovine serum (FBS), at serumları ve bazen de çok özel amaçlar için insan serumları kullanılabilir.

Tampon çözeltileri: Hücre kültür ortamının pH'nın sabit olarak tutulmasını sağlar. N-2-hidroksi etilpiperazin N-2 etansulfonik asit (HEPES) veya sodyum bikarbonat bu amaçla kullanılan tampon çözeltilere örnektir (Good vd. 1966).

Fenol Red: Hücre kültür ortamına pH inidikatörü olarak fenol red konulabilir. Hücrelerin 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 (Lenette ve Schmidt, 1979; Doyle vd., 1995).

Antibiyotikler: Bakteri ve mantar kontaminasyonlarına karşı hücre kültür ortamına %1–2 oranında antibiyotik eklenir. Bakteri ve mantar kontaminasyonunu önlemek için kullanılan antibiyotikler hücreler için toksik olmamalı ve yüksek dozda tercih edilmemelidir. Kullanılan antibiyotiklere penisilin, streptomisin, gentamisin, klorotetrasiklin, kanamisin, neomisin, polimiksin B; antimikotiklere de fungizone örnek verilebilir.

Hücre kültürünün bakteri, mantar, mikoplazma veya virus kontaminasyonu hücrelerin üreme oranının düşmesine, morfolojik değişikliklere, kromozom değişikliklerine ve protein metabolizmasında değişikliklere yol açar.

2.3.7 Kültürdeki Hücrelerin Gelişme Fazları

In vitro kültürü yapılan hücrenin morfolojisi *in vivo* ortamdakine göre oldukça farklıdır. *In vitro* olarak çoğalan hücrelerin 4 ayrı gelişme fazı vardır (Freshney, 1986; Balows vd., 1991; Doyle vd., 1995).

Ayrılma (Dispersiyon) Fazı: İnsan veya hayvanlardan alınan kültür hücreleri pasajlarının ilk yapıldıkları andan yüzey tutunmasına kadar geçen sürede, süspanse halde sıvı içerisinde tek tek ya da kümeler halinde bulunurlar ve ışığı fazla kıran yüzeyler şeklinde görünürler.

Yapışma Fazı: Süspanse halinde olan yuvarlak hücreler bir katı yüzey ile temas ettiklerinde bu katı yüzeye yapışırlar. Hücrenin yüzeye yapışması esnasında hücrede herhangi bir çoğalma meydana gelmez. Fakat oldukça yüksek metabolik aktivite gösteren hücre, mitoz için hazırlanmaya başlar. Süspanse halinde olan hücreler katı yüzeye 37 °C’de 2 saat içerisinde yapışır ve 24 saat sonra hücreler artık yüzeye tamamen yapışmış ve yapısal şekillerini oluşturmuş duruma geçerler (Balows vd.,1991).

Çoğalma Fazı: Hücreler katı bir yüzeye yapıştıktan birkaç saat sonra çoğalma fazına girerler. Çoğalma fazında genelde her hücreden 2 hücre meydana gelir. Kromozom formasyonu olmadan nükleusun 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 şekli olup kromozomlar bölünme olmadan önce ikiye ayrılır ve yavru hücreler diploid sayıda kromozom taşırlar. Hücreler bazen de normal diploid kromozom sayısı yerine anomali olarak nitelendirilen aneuploid şeklinde çoğalırlar. Aneuploid predominanttır ve kültürü yapılan hücrelerde bu tip hücrelerin nesilden nesile meydana gelme olasılığı yüksektir. Burada stabilite büyük bir olasılıkla genetik faktör tarafından etkilenmiştir. Normal yetişkin dokularından alınıp üretilen hücrelere göre tümörlü dokulardan alınıp üretilen hücreler daha az stabil olabilmektedir.

Dejenerasyon Fazı: *In vitro* kültürü yapılan ve çoğaltılan hücreler, besiyeri içerisindeki gerekli maddelerin kullanılarak azalması ya da ortamda aşırı toksik katabolitlerin birikmesi nedeniyle bir süre sonra dejenere olurlar.

2.3.8 Hücrelerin Dondurularak Saklanması (Kriyoprezervasyon)

Hücrelerin dondurulmasında başlıca sorun, hücre içerisindeki sıvıların azalan sıcaklıkla buz kristalleri oluşturması ve bu kristallerin hücreyi parçalamasıdır. Bu sorunu çözmek amacıyla kriyoprotektif maddeler kullanılır. Bu maddelerin özelliği hücre içi buz oluşum noktasını

baskılayıp ve hücre içinde buz oluşumunu engellemesidir. Bu maddeler, hücre membranını stabilize eder ve hiperozmotik çevre oluşturarak hücrenin su kaybetmesini sağlar. En sık kullanılan kriyoprotektif maddeler dimetil sülfoksit (DMSO) ve gliseroldür. Dondurulacak olan hücreler bu kriyoprotektif maddelerle birlikte kriyotüplere alınır, kademeli olarak soğutularak dondurulur ve azot tanklarında uzun süre saklanabilirler [1].

2.3.9 Hücre Kültür Çalışmalarının Uygulama Alanları

Hücre kültürü teknolojileri, tıp ve endüstride birçok alanda uygulanabilmektedir (Rheinberger, 2007). Klinik çalışmalarda, hayvan deneyleri ile birlikte yapılan ön çalışmaları ve sitotoksikolojik testlerde önemli bir kısmı oluşturmaktadır (Komori vd., 2008). Virolojide aşı üretimi, hücre virus etkileşimlerinin incelenmesi, tanı ve tedavinin geliştirilmesinde; moleküler biyoloji ve genetikte gen ekspresyonu, gen haritalanması, gen fonksiyonları ve kanser araştırmalarında hücre kültüründen yararlanılmaktadır (Fuchs vd., 2007).

2.3.10 MCF-7 Hücre Serisi

MCF 7 meme kanser hücre serisi olup 5 yıllık bir sürede iki göğsü alınan 69 yaşında Kafkasyalı bir kadından izole edilmiştir. İlk alınan göğüsün dokusu iyi huylu olup ikinci göğüsten malign adenokarsinomadır. 3 yıllık bir periyotta radyoterapi ve hormon tedavisi uygulanmıştır. Göğüs duvarından nodüllerin kaldırılmasından sonra plevral sızıntı tespit edilmiştir. MCF-7 hücre serisi 1970’de bu plevral sızıntıdan elde edilmiştir (Dickson vd., 1986).

MCF-7 ile ilgili bilgiler MCF-7 hücrelerinin farklı kaynaklardan ve orijinal MCF-7 hücre serisinin özelliklerinden elde edilmiştir. MCF-7 hücreleri koloniler şeklinde gelişmeye yönelirler. %5 FBS ile pasajı yapılabilir. MCF-7 hücre serisi yumuşak agarda gelişebilir (Osborne vd., 1987). Hücreler kollajen fibroblast matrikste penetre olabilir (Tong vd., 1999).

Bazı çalışmalarda MCF-7 hücre serisinin *in vitro* ortamda düşük invaziv etkisi olduğu belirtilmiştir (Thompson vd.,1992) . *In vivo* ortamda nude farede MCF 7 hücrelerinin tümöre dönüşme yeteneği vardır ancak fare 17-b estradiol ile muamele edildiğinde daha iyi gelişme sağlanabilir (Shafie ve Liotta, 1980). MCF 7 hücrelerinin tümör oluşturma dozunun 5×10^6 cells olduğu iddia edilmiştir (Mukhopadhyay vd., 1999). Bazı yayınlarda ise MCF-7 hücre serisinin nude farede metastaz yapmadığı iddia edilirken başka bir yayında MCF-7 hücre serisi kendiliğinden ve deneysel metastaz göstermiştir (Mukhopadhyay vd., 1999).

2.3.11 L929 Hücre Serisi

L929 1940 yılında W.R. Earle tarafından oluşturulan esas L serisinin alt klonudur. L serisi 100 günlük C3H/An erkek farenin bağ dokusunun normal subkutenöz bölgeden ve yağ dokusundan elde edilmiştir. Kültürü genelde %10 FBS içeren 2mM L-glutaminli DMEM besiyerinde yapılır [4]. Morfolojik yapısı fibroblast benzeridir [5].

2.4 *Leishmania* Protozoonları ve *Leishmania* Kültürünün Yapılması

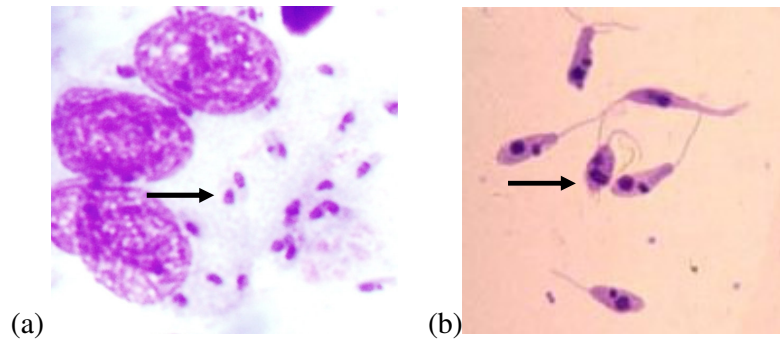
2.4.1 *Leishmania* Protozoonları

Leishmania türü protozoonlar, Tripanozoma ailesinin üyesidir. *Leishmania* protozoonları, tek bir kamçı, mitokondri benzeri bir organel, kinetoplast, lizozom, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı, vakuoller ve zengin DNA içeriğine sahip nükleusu bulunan tek hücreli ökaryot organizmalardır (Decoteaux ve Turco, 2002).

Leishmania parazitleri dünya çapında milyonlarca insanı tehdit eden leishmaniasis hastalığına yol açarlar. Dünya çapında 200 milyon insanın leishmaniasis riski altında olduğu bilinmektedir. Ayrıca yıllık yeni olgu sayısı 500,000'dir (Allahverdiyev vd., 2005). Klinik olarak leishmaniasis visseral, kutanöz ve mukokutanöz semptomlara neden olmaktadır. *L.major*, *L.tropica* ve *L.mexicana* türlerinin sebep olduğu kutanöz leishmaniasis, derideki ülseratif lezyonlar oluşturur. Lezyonlar, birçok vakada kendiliğinden iyileşir ancak bazı formlarda kalıcıdır ve yayılma gösterir. *L.braziliensis* sebep olduğu mukokütanöz leishmaniasis, kutanöz leishmaniasisin diğer bir formudur. Bu *Leishmania* türleri özellikle burun ve farinks bölgesindeki makrofajları enfekte ederler. Son olarak da *L.donovani* karaciğer, dalak ve kemik iliğinde bulunan makrofajları enfekte ederek visseral leishmaniasise (kala azar) yol açar. Bu enfeksiyon kronik olup tedavi edilmezse ölümcül olabilir. Hastalığa karşı şimdiye kadar güvenli bir aşı geliştirilemediğinden, verimli bir koruma da sağlanamamıştır. Ayrıca visseral leishmaniasisin tedavisi sadece toksik olan antimonial ilaçlar veya diamidin bileşikleri ile sağlanabilmektedir (Decoteaux ve Turco, 2002).

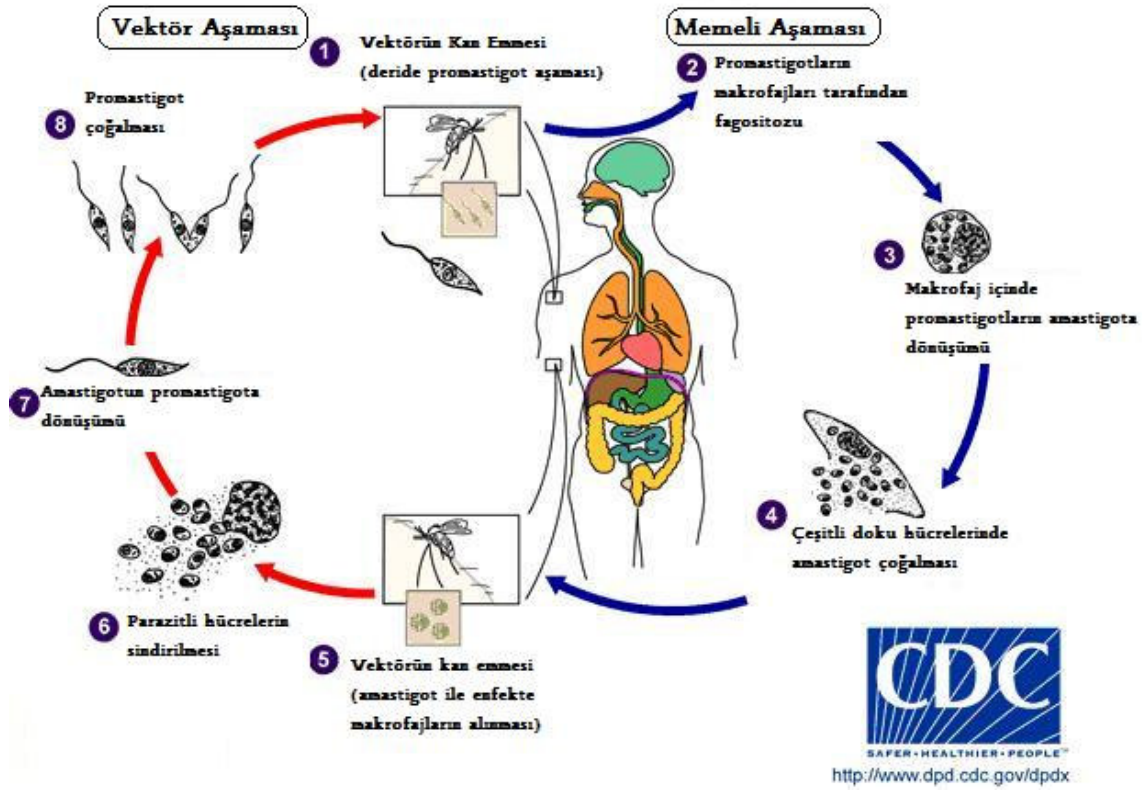
2.4.2 Morfoloji ve Hayat Siklusu

Leishmania türlerinin hayat siklusları 2 farklı morfolojik aşamadan oluşur. *Leishmania*, memeli makrofajları içerisinde kamçısız amastigot formunda, vektör vücudunda kamçılı promastigot formunda bulunur (Şekil 2.4) (Chang vd., 1985).



Şekil 2.4 Amastigot (a) ve promastigot (b) yapısı (Giemsa boyama).

Enfekte flebotomların (tatarcık) kanla beslenmeleri sırasında, promastigotlar konak memeliye geçer. Metasiklik promastigotlar memeli derisinin içinde insekt vektörün hortumu boyunca enjekte olurlar. Enjeksiyondan hemen sonra konak makrofajlarının içersine giren metasiklik promastigotlar kamçısız amastigot forma dönüşürler. Fagolizozomal vezikül içinde 2-5 µm çapında olan bu amastigot formlar, anaerobik solunum yapar, metabolik enzimleri düşük pH'da aktivite gösterir ve eşeysiz üreme ile bölünürler (Mukkada vd., 1985). Fagolizozomal parazitler yüksek basınca, düşük pH'ya ve hidrolaz enzimlerine maruz kalırlar ve bu stres faktörleri parazitin hücrel farklılaşmasını tetikler (Doyle vd., 1991). Fagolizozomlar içerisinde amastigot çoğalması makrofajların patlamasına kadar devam eder. Makrofajın patlamasıyla serbest kalan amastigotlar, komşu makrofajlar tarafından fagolizozomlara geçer veya hayat sikluslarını tamamlayıp insekt vektör tarafından alınırlar (Şekil 2.5) (Williams, 1998).



Şekil 2.5 *Leishmania* hayat siklusu [2].

Tatarcıklar enfekte memeli konaktan kan emme esnasında, makrofaj ve monositlerle birlikte amastigotları da alır (Decoteaux ve Turco, 2002). Enfekte bireyden alınan amastigotlar vektörde tekrar hareketli promastigot formuna dönüşür ve vektörün epitelyumuna tutunarak,

kan ile birlikte sindirilmekten korunurlar. Promastigotların boyları yaklaşık 10–15 µm, enleri ise 2 µm dir. Kamçı boyları 20 µm’ye ulaşabilir ve yüksek oranda hareketliliğe izin verir. Promastigotlar, vektörün orta bağırsağında lateral ayrılma ile bölünürler ve kamçı aracılığıyla buraya tutunurlar. Promastigotlar vektörün hortum kısmına göç etme yeteneğine sahiptir ve bu göç sırasında yuvarlak ve kısa formun çeşitli varyasyonlarını gösterdikleri birkaç aşamaya girer. Bu proses metasiklogenez olarak adlandırılır, bu evrede parazitler olgun ve bölünmeyen enfektif aşamadadırlar (Sacks, 1989). Yüzey glikokonjugatları bu proses boyunca sentezlenir ve promastigotun konak serumuna direncini artırır. Bu evredeki parazit, metasiklik promastigot olarak adlandırılır (Turco ve Descoteaux, 1992). Bu metasiklik promastigotlar epitelyal hücrelerden ayrılır ve hortum bölümüne doğru göç ederler. Vektörün bir sonraki kan emmesinde metasiklik promastigotlar memeli konağa girerek makrofajların fagolizozomlarına yerleşirler (Decoteaux ve Turco, 2002).

2.4.3 Konak Memelide Hayatta Kalması

Hayat siklusu boyunca *Leishmania* birçok çevresel etkenle mücadele etmek zorundadırlar. Bunlar;

—Vektörün orta bağırsağındaki çeşitli sindirim enzimleri,

—Vektörden aktarıldıktan sonra memeli konağın kan dolaşımındaki immunitedir (Decoteaux ve Turco, 2002).

Metasiklik promastigotların makrofajlara alınması ve hayatta kalması, parazitin sitotoksik serum komponentlerinden kaçmasına, makrofaj içersinde hayatta kalmasına ve T hücre immun cevabı oluşturmamasına bağlıdır (Chang vd., 1985).

Promastigotların makrofaja girişleri yüzeyindeki LPG ve gp63 gibi yapılar ile bağlantılıdır (Turco ve Descoteaux, 1992). *Leishmania* parazitleri, hayatta kalmak için makrofajdaki oksidatif etkiyi düşürür. Bu proses, lipofosfoglikan (LPG) tarafından oksidatif metabolitlerin oluşumunu sağlayan anahtar molekül olan protein kinaz C’yi inhibe etmesi ile gerçekleşir (McNeely vd., 1989). Amastigotlar, promastigotlardan farklı olarak peroksidaz, superoksit dismutaz ve katalaz gibi oksidatif stres metabolitlerini nötralize edecek enzimlere sahiptir (Sacks ve Perkins, 1989). Gp63’ün proteaz aktivitesinin optimal pH 4’de olduğu ve proteolitik lizozomal enzimlerin inaktivasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Chaudhuri vd., 1989). Ayrıca *Leishmania*, makrofajların hücrel immun cevap aktivasyonu için gerekli sinyallerden olan MHC II ekspresyonunu ve IL-1 salgısını engelleyerek immun cevaptan kaçır (Bogdan vd., 1990). Kısaca glikokonjugatlar, *Leishmania*’nın memeli konaktaki çevre

faktörlerine adaptasyonu ve korunma yeteneğinde önemli rol oynayan moleküllerdir (Decoteaux ve Turco, 2002).

Sonuç olarak *Leishmania* hayat siklusu boyunca, yüksek organizmalardaki çevreler adapte olur ve çoğalır. *Leishmania* parazitleri, lipofosfoglikan, glikosilinositolfosfolipit ve salgılanan glikokonjugatlar, proteofosfoglikan ve salgılanan asit fosfatazlardan oluşan yoğun bir hücre yüzey glikokaliks tabakası sayesinde zor şartlara karşı dayanabilirler.

2.4.4 *Leishmania* Kültürü

Leishmania'nın kültürde üretilmesi; biyokimya, immünoloji ve hücre biyolojisi üzerine çalışma yapılmasına olanak sağlar. Memeli konaklarda hücre içinde yaşayan amastigotların kültürü, makrofaj benzeri hücreler içinde yapılmasının nispeten zor ve zahmetli olması nedeniyle, promastigot kültürü tercih edilmektedir. Yine de makrofaj hücrelerinde bulunan amastigotların pasajları yerine, aksenik amastigot kültürleri de başarıyla yapılabilir (Chang ve Bray, 1985a; Chang ve Bray, 1985b; Gholamhosseini ve Vassef, 1988).

Promastigot ve amastigot formdaki parazitlerin büyüme koşulları arasında, sıcaklık, pH, besin kaynağı ve serum komponentleri açısından önemli farklılıklar bulunur. Sıcaklık ve pH'ın, promastigotların amastigotlara dönüşümünü tetiklemede önemli rolü vardır. Bu şekilde ortam özelliklerini değiştirerek promastigotlar aksenik amastigotlara dönüştürülebilir (Somana vd., 2002).

Leishmaniasisli hayvanlardan alınan biyopsi örnekleri, uygun besiyerine ekilerek *Leishmania* kültürü yapılabilir. Kültüre ekilen biyopsi örneklerindeki *Leishmania*'lar önce hareketli promastigotlara dönüşür daha sonra çoğalmaya başlar (Chang ve Bray, 1985a; Chang ve Bray, 1985b).

Leishmania'nın *in vitro* kültürünün yapılmasında birçok besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyerlerinin her birinin farklı avantaj ve dezavantajları vardır. Bugün, *Leishmania*'nın ürettiği besiyerlerinin tümü, diğer organizmaların ürettikleri besiyerlerinin denenmesi ile bulunmuştur. (Chang ve Bray, 1985a; Chang ve Bray, 1985b; Gholamhosseini ve Vassef, 1988).

1994 yılında, McNeal ve Novy tarafından *Trypanosoma* kültürünü elde etmek için hazırlanan bifazik besiyeri, Nicole tarafından modifiye edilerek *Leishmania* promastigotlarını üretmek için denenmiş ve tüm dünyada Novy-McNeal ve Nicole (NNN) ismiyle bilinen besiyeri geliştirilmiştir (Chang ve Bray, 1985a; Saran vd., 1986; Gholamhosseini ve Vassef, 1988).

Günümüzde *Leishmania* kültürü için çeşitli katı, yarı katı ve sıvı besiyerleri bulunmaktadır. Katı besiyerlerinden olan NNN besiyeri; agar, tuz ve defibrine edilmiş tavşan kanından oluşmaktadır. Besiyerine ayrıca %20 fetal dana serumu (FDS) ilave edilerek 5–14 günde promastigotların üremesi sağlanmıştır (Charles ve McMahan, 1984; Bard, 1985).

Fetal dana serumu kullanılan besiyerlerinde, *Leishmania* %25 oranında daha fazla üremektedir. Besiyerindeki besinin hızla tükenmesi, hücre ölümüne neden olacağından, *Leishmania* kültürünün sık sık rutin pasajlarının yapılması gerekmektedir (Sadigursky ve Brodskyn, 1986).

Schneider'in besiyeri ise sıvı bir besiyeri olup birçok amino asit içermektedir. Bu besiyeri genelde immunolojik ve biyokimyasal çalışmalar için kullanılmaktadır. Ayrıca belli oranlarda FDS eklenmesi ile promastigot kültüründe kullanılması uygundur (Charles ve McMahan, 1984). Schneider'in besiyeri, *Leishmania*'nın üremesini hızlandırmakta böylelikle kısa sürede yüksek parazit miktarlarına ulaşılabilir (Chang ve Bray, 1985b).

Daha çok tanı amaçlı kullanılan beyin-kalp infüzyonu kan eriyiği, NNN besiyerinden agarın çıkartılması ile hazırlanmakta ve kısa sürede bol miktarda *Leishmania* üretilmesini sağlamaktadır (Gholamhosseini ve Vassef, 1988).

Ayrıca tampon olarak HEPES kullanılan ve genelde %10–20 FDS eklenmesi ile uygun sonuç alınabilen Medium 199 ile *Leishmania* pasajı 2 hafta kadar dayanabilmektedir (Chang ve Bray, 1985b). Bunun yanı sıra RPMI 1640 gibi besiyerlerine %10 FDS eklenmesi ile rutin promastigot kültürü başarılı bir şekilde yapılmaktadır.

Biyokimyasal çalışmalarda, sıvı besiyeri önerilirken, izolasyon ve pasajlarda modifiye NNN besiyerleri önerilmektedir (Chang ve Bray, 1985b; Rao vd., 1984). Sıvı besiyerleri ile kültür yapılmasının birçok avantajı vardır. En önemlisi kapalı bir sıvı örnek içerisinde birçok hareketli promastigot bir arada toplanıp çalışılabilir. Hastalık tanısı konulmasında, sıvı besiyerleri özellikle parazit sayısının yüksek olduğu örneklerde oldukça avantajlıdır. Ayrıca Allahverdiyev vd. (2004) tarafından geliştirilen yeni kültür yöntemi ile kapiler tüpte sıvı besiyeri kullanılarak, örnekte parazit sayısı az olsa bile sıvı kültürde çoğaltılmasının mümkün olduğu gösterilmiştir. Mikrokültür yöntemi olarak bilinen bu yöntemde sıvı besiyeri ortamında parazitler konsantre edilip mikroaerofilik bir ortam sağlanarak, kısa sürede amastigotların promastigotlara dönüştüğü ve bu promastigotların hızlı bir şekilde çoğaldığı gösterilmiştir.

Yapılacak çalışmaya uygun besiyeri seçilip, besiyerlerinin pH'ının: 6.8 ila 8'e arasında ayarlanması gerekir. İnkübasyon derecesi ise genellikle 25–30°C arasında olmaktadır. Ancak

promastigotların bazı durumlarda 38°C'ye de uyum sağlayabildikleri görülmüştür (Chang ve Bray, 1985b). Makrofaj içinde yapılan amastigot kültürü için CO₂ etüvü gerekiyken, promastigot kültüründe böyle bir gereksinim yoktur, sadece sıcaklığın ayarlanması yeterlidir.

Promastigotların kültüründe farklı plastik ve cam tüpler kullanılabilir. Kullanılan tüpler veya flasklar, vidalı kapaklı olup hava geçirmeyecek şekilde kapalı tutulur. Rutin pasajlar, eski kültürden alınan 10⁵-10⁶ promastigotun, yeni medium içine konulmasıyla yapılır. Bakteri kontaminasyonlarını önlemek için besiyeri içine Penicillin, Streptomycin veya Gentamycine gibi antibiyotikler katılabilir (Alfred ve Steve, 1986). Rutinde kullanılan bu antibiyotikler, promastigotların üremesini etkilememektedir. Ayrıca, *Leishmania* kültürlerindeki mantar kontaminasyonlarını önlemek amacıyla Mycostatin ve Amfotericine B gibi antifungal bileşikler besiyerine eklenebilir (Charles ve McMahan, 1984).

Leishmania kültüründe kontaminasyon oldukça önemli bir problemdir. Bu sebepten kültürün steril ortamda yapılması zorunludur (Charles ve McMahan, 1984; Jackson vd., 1989).

In vitro ortamda çoğalan tüm *Leishmania* promastigotlarının ortak özelliği; diğer organizmalarda olduğu gibi logaritmik üreme ve sabit faz dönemlerinin olmasıdır. Genellikle ilk inokülasyonda 10⁵-10⁶ hücre/ml olan parazitler, 3-4 günlük inkübasyonun ardından 10⁷-10⁸ hücre/ml'ye kadar çıkabilmektedir (Sadigursky ve Brodskyn, 1986).

Rutinde, örnek sayısı çok olduğu zaman hücrelerin sayımında Coulter sayacı kullanılabilir. Ayrıca, *Leishmania*'nın mikroskopik incelenmesi invert mikroskopla yapılabilir (Bray, 1985). Kültür süresince, kültürdeki promastigotlar sıkça pleomorfizm gösterirler. Birçok türde promastigotların eni 1.5-2 µm, boyu ise 1-20 µm arasında değişebilir (Gholamhosseini ve Vassef, 1988). Yuvarlak, oval, eliptik veya silindirik şekilde olabilirler. Bazen de uç kısımları sivri olabilir veya yuvarlaklaşabilir. İyi hazırlanmış bir kültürde, kendiliğinden hareket edebilen ve bölünen hücrelerin olması gereklidir. Çok sayıda hareketsiz ve normalden büyük veya aşırı küçük atipik hücrelerin varlığı, kültür ortamının yetersizliğinin göstergesidir (Chang ve Bray, 1985b).

Primer izolasyonda önemli olan, en uygun besiyerine karar vermektir çünkü bazı *Leishmania* türleri ilk izolasyonun yapıldığı besiyerinin değiştirilmesine adapte olamazlar. Eğer, besiyerleri arasında karşılaştırma yapılmak isteniyorsa, ilk besiyerine uyum sağlandıktan sonra alınan örneğin, birden fazla farklı besiyerlerine ekilmesi gerekir. *Leishmania*'nın primer olarak izolasyonu sırasında %10 FCS eklenmiş RPMI 1640 besiyeri kullanılabilir (Chang ve Bray, 1985b; Alfred ve Steve, 1986; Gholamhosseini ve Vassef, 1988).

Promastigotların üretilmesi, amastigotlara oranla biraz daha kolaydır. Kamçısız amastigotlar, ancak memeli makrofaj hücrelerinde üremektedir. Amastigotların ısı tercihi de promastigotlardan farklı olup 32°C'dir (Alfred ve Steve, 1986).

Leishmania amastigotlarının üremesi konusunda başarılı deneysel çalışmalar yapılmış, memelilerden hazırlanan doku kültürlerinde hücre içinde yaşayan amastigotların araştırılması kolaylaşmıştır (Chang ve Bray, 1985a; Chang ve Bray, 1985b; Gholamhosseinian ve Vassef, 1988).

Doku kültüründeki teknik ilerlemeler, amastigotların *in vitro* kültürünü de olumlu yönde etkilemiştir. Sonuçta memelilerde hücre içi üretilen amastigotların ardından bu yöntem diğer *Trypanosoma*'lara da uygulanmış ve başarı sağlanmıştır (Ashford ve Betini, 1987). Bu konuda yapılan ilk araştırmalar, amastigotların embriyoda üretilmesi ile ilgili olup, karaciğerde az miktarda amastigotların üremesiyle başlamıştır. Halbrook ve Palcuk 1975'de *Leishmania* promastigotlarını tavuk embriyosunda üretmeyi denemişler ve embriyonun karaciğerinde kısa bir sürede üreyebilen amastigotları elde edebilmişlerdir (Chang ve Bray, 1985b).

Bugün, çeşitli hayvanlardan alınarak hazırlanan primer makrofaj kültürleri, araştırmalarda amastigotların standart kültür sistemini oluşturmaktadır (Alfred, 1983). Bu sistemler sayesinde, laboratuvar hayvanlarına bağlı kalmaksızın *Leishmania*'ların yaşam döngüleri ve amastigotların biyokimyasal analizleri araştırılabilmektedir. Yapılan bu kültür yöntemiyle, amastigotların devamlılığı da sağlanmıştır.

Leishmania türleri; hazır besiyerlerinde üretildikleri gibi, deney hayvanlarına inoküle edilerek de üretilirler. Deney hayvanları kullanılarak; *Leishmania*'ların vektörlerdeki yapısı, biyolojisi ve patolojisi deneysel olarak araştırılabilmektedir (Chang ve Bray, 1985b; Grimaldi vd., 1989). Günümüzde de enfekte edilmiş deney hayvanları kullanılarak aksenik amastigotları elde etme çalışmaları devam etmektedir (Scott vd., 1987).

Leishmania türlerinin devamlılığı, yapılan promastigot ve amastigot kültürleri ile hayvanlara inokülasyonla ya da diğer memeli hücreleri veya protozoalarda olduğu gibi sıvı azotta dondurup uzun süre saklayarak sağlanabilir (Chang ve Bray, 1985b; Grimaldi vd., 1989).

2.5 Amaç

Polimer toksisitesinin incelenmesinde mevcut hücre kültürlerinde bazı problemler yaşanmaktadır. Bunların başlıcası standart bir kültür modeli bulunmadığı için farklı hücre kültürlerinden alınan sonuçların da farklı olmasıdır. Ayrıca her hücre kültür modeli polimerlerin toksik etkilerinin gösterilmesinde her zaman yüksek duyarlılık göstermediği gibi; kültür çalışmaları ekonomik açıdan pahalı, yapılması zor ve zaman alıcıdır. Ayrıca şimdiye kadar bilinen insan ve hayvan kaynaklı hücre kültür modelleri tıbbi uygulama alanında polimerlerin, organizmada olası bir enfeksiyon ajanıyla etkileşiminin nasıl olacağı konusunda herhangi bir bilgi vermemektedir.

Bu nedenle bu çalışmanın amacı polimerlerin toksisitesinin incelenmesinde; daha hızlı, daha ekonomik, yapılması kolay bir kültür modeli geliştirmektir. Ayrıca bu kültür modeli kullanılarak polimerlerin organizmada bulunması muhtemel enfeksiyon ajanları ile (protozoan) etkileşimi hakkında bilgi edinmek amaçlanmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

3.1.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Deneyisel çalışmalarımızda aşağıdaki cihazlar kullanıldı.

- Laminar-hava akışlı kabin
- Soğutmalı Etüv (Friocell)
- İnkübatör (37 C %5 CO₂)
- Ters mikroskop
- ELISA okuyucu
- Magnetik karıştırıcı (Heidolp MR 3001)
- pH metre (İnolab WTW level 1)
- Hassas terazi (Precisa XB 220A)
- Kaba terazi (Precisa BJ 6100D)
- Santrifüj (Hettich Zentrifugen-EBA20)
- Vorteks (Heidolp REAX top)
- Bidistile su cihazı
- Buzdolabı
- -45°C derin dondurucu
- Sıvı azot tankı
- Otoklav

3.1.2 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

MADDE ADI	ÜRETİCİ FİRMA	KATALOG NO
Sodyum hidroksit	Riedel De Haen	062303
Hidroklorik asit	Merck	100314
DMEM-F12	Sigma	D5546
RPMI 1640 with L glutamin	Biological Industries	01-100-1B
L-glutamin	Biological Industries	03-020-IC
Penisilin streptomisin	Biological Industries	03-031-IC
Gentamicin	Sigma	G1397
Fetal sığır serumu	Seromed	S0115
Tripsin EDTA	Biological Industries	03-051-5B
DMSO	Sigma	D26650
Sodyum klorür	Atabay	AT091-950
Potasyum klorür	Carlo Erba	360107
Disodyum hidrojen fosfat	Riedel De Haen	81890
Potasyum dihidrojen fosfat	Riedel De Haen	8210A
Tripsin	Biochrom	L2103
EDTA	Merck	1132780
Thiazoly blue tetrazolium bromide(MTT)	Sigma	M5655-1G
Formaldehyd (%37)	Applichem	A0877
2-propanol	Applichem	A03928
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck	S95310-811
Poliakrilik Asit (MA:100,000 Da)	Aldrich	523925
Poliakrilik Asit (MA:30,000 Da)	Aldrich	416045
Poliakrilik Asit (MA:2,000 Da)	Aldrich	323667
Polietilen Glikol (MA:4,600 Da)	Aldrich	37300
Polietilen Glikol (MA:2,000 Da)	Aldrich	295906
Polietilen Glikol (MA:1,000 Da)	Sigma-Aldrich	P3515

3.1.3 Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.3.1 1x PBS Tampon Hazırlanması

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 gr Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ tartılıp 900 ml deiyonize suda çözündürüldü. pH 7,4'e ayarlandı ve son hacim deiyonize suyla 1 litreye tamamlandı. 1 atm basınç, 121°C sıcaklık ayarlanmış otoklavda cam şişeler içersinde 20 dakika steril edildi.

3.1.3.2 1x Tripsin solusyonu

Tripsin 62,5 mg tartıldı. Steril edilmiş 50 ml'lik 1xPBS içinde çözündürüldü. Önce 0,45'lik sonra 0,22'lik filtreden süzülerek steril edildi.

3.1.3.3 DMEM/F12 Medyumunun Hazırlanması

500 ml DMEM-F12 besiyeri içersine 5 ml 200 mM L-glutamin, 2,5 ml penisilin streptomisin ilave edilerek stok hazırlandı. Hücre pasajında kullanılmak üzere %10 FCS içeren besiyeri için 45 ml stoktan alınıp 5 ml FCS eklendi, tüm besiyerleri +4°C'de saklandı.

3.1.3.4 Fenol Red İçermeyen DMEM/F12 Hazırlanması

Fenol Red'siz 500 ml DMEM/F12 (L-glutamin içeren) besiyeri içersine 2,5 ml penisilin streptomisin ilave edilerek stok hazırlandı. Deneylerde kullanılmak üzere %10 FCS içeren besiyeri için 45 ml stoktan alınıp 5 ml FCS eklendi, tüm besiyerleri +4°C'de saklandı.

3.1.3.5 RPMI 1640 Medyumunun Hazırlanması

100 ml RPMI 1640 (L-glutamin içeren) içersine 0,5 ml gentamisin (10 mg/ml'lik) eklenerek stok hazırlandı. Kültürde kullanılmak üzere buradan 45 ml alınıp 5 ml FCS eklenerek %10 FCS'li besiyeri hazırlandı.

3.1.3.6 Hücre Dondurma Medyumunun Hazırlanması

%80 FCS ve %20 DMSO'dan steril bir biçimde hazırlandı.

3.1.3.7 MTT Solüsyonunun Hazırlanması

MTT (Sigma M5655) 1xPBS içersinde çözündürüldü. Kullanılacak MTT prosedürüne uygun olarak 0,6 mg/ml ve 10 mg/ml konsantrasyonlarda 5 ml hazırlandı. Önce hassas terazide 0,6 mg/ml için 3 mg, 10 mg/ml için 50 mg MTT tartılıp PBS ile 5 ml'ye tamamlandı. Vortekste çalkalanarak iyice çözündükten sonra steril edilmek üzere önce 0, 45µl daha sonra 0,22 µl'lik

(CS) filtreden geçirilerek steril edildi. MTT ışığa duyarlı olduğu için, genel olarak bu işlemler karanlıkta yapıldı.

3.1.3.8 MTT Reaksiyon Durdurucu Solüsyonun Hazırlanması

%50 izopropanol, %10 SDS bulunan bu çözeltiden 10 ml hazırlandı. 5 ml sıvı izopropanol, 5 ml distile su ve 1 mg toz SDS tartılıp vorteksle karıştırılarak hazırlandı.

3.1.3.9 50 mg/ml ve 0,5 mg/ml Poliakrilik Asit (MA: 100,000 Da) Çözeltisinin Hazırlanması

Deneylerde MA:100.000 D olan ve ticari olarak satın alınan %35 g/ml sıvı PAA kullanıldı. PAA %35'lik olduğu için 100 ml'de 35 g PAA bulunur. 50 mg'dan 5 ml hazırlamak için 2500 mg PAA gereklidir.

100 ml'de 35 g varsa

 X 2500 mg

$$X=7,142 \text{ ml PAA}$$

35 ml PBS eklendi 48–72 saat manyetik karıştırıcıda karışması beklendi. pH 7'ye ayarlandı. Son hacim 50 ml olacak şekilde PBS ile tamamlandı, 0,22 µm'lik millipore filtrelerden geçirilerek steril edildi ve 4°C'de saklandı. Steril edilmiş 50 mg/ml hazırlanan PAA çözeltisinden 0,5 ml alınıp, steril PBS ile 50 ml'ye tamamlanarak 0,5 mg/ml konsantrasyonu hazırlandı.

3.1.3.10 50 mg/ml ve 0,5 mg/ml Poliakrilik Asit (MA: 30,000 Da) Çözeltisinin Hazırlanması

MA: 30,000 Da olan ve ticari olarak satın alınan %40 g/ml sıvı PAA kullanıldı. 100 ml'sinde 40 g PAA bulunacağı için

100 ml 40 g varsa

 X 2500 mg

$$X= 6,25 \text{ ml PAA}$$

PBS eklenip manyetik karıştırıcıda 48 saat karıştırıldıktan sonra pH 7'ye ayarlanıp son hacim 50 ml olacak şekilde PBS ile tamamlandı. 0,22 µm'lik millipore filtrelerden geçirilerek steril edildi ve 4°C'de saklandı. Hazırlanan bu PAA çözeltisinden 0,5 ml alınıp, steril PBS ile 50 ml'ye tamamlanarak 0,5 mg/ml konsantrasyonu hazırlandı.

3.1.3.11 50 mg/ml ve 0,5 mg/ml Poliakrilik Asit (MA: 2,000 Da) Çözeltisinin Hazırlanması

Deneylerde MA:2.000 olan ve ticari olarak satın alınan toz PAA kullanıldı. PAA %100'lük olduğu için 100 ml'de 100 g PAA bulunur. 50 mg/ml'lik 10 ml stok hazırlamak için 0,5 g PAA tartılıp 9 ml PBS içersinde çözündürüldü. Yaklaşık 48 saat manyetik karıştırıcıda karışması beklendi. pH 7'ye ayarlandı. Son hacim 10 ml olacak şekilde PBS ile tamamlandı, 2 µm'lik millipore filtrelerden geçirilerek steril edildi ve 4°C'de saklandı. 50 mg/ml hazırlanan PAA çözeltisinden 0,1 ml alınıp, steril PBS ile 10 ml'ye tamamlanarak 0,5 mg/ml konsantrasyonundaki PAA çözeltisi hazırlandı.

3.1.3.12 50 mg/ml ve 0,5 mg/ml Polietilen Glikol (MA: 4,600 Da, MA:2,000 Da, MA:1,000 Da) Çözeltisinin Hazırlanması

Üç molekül ağırlığındaki PEG de %100'lük toz halde ticari olarak satın alınmıştır ve deneylerde kullanılacak çözeltileri aynı şekilde hazırlandı. Son hacim 5 ml olarak ayarlandı. Bunun için 250 mg PEG tartılıp 4 ml PBS eklenerek manyetik karıştırıcıda bir gece karıştırılarak çözüldü. pH'ı kontrol edilip ve son miktar PBS ile 5 ml'ye tamamlandı ve 0,22 µm'lik millipore filtrelerden geçirilerek steril edilip, 4°C'de saklanmıştır. 0,5 mg/ml hazırlamak için bu çözeltiden 0,05 ml alınıp PBS ile 5 ml'ye tamamlanmıştır.

3.2 Hücre Kültürü Teknikleri

3.2.1 Hücre Soyunun Açılması

3.2.1.1 MCF 7 ve L 929 Hücre Soyunun Açılması

Sıvı azot tankından çıkartılan hücreler 37°C su banyosunda çalkalanarak sıvı içersinde tutularak çözündürüldü. Çözünen hücre süspansiyonu tüpüne alınarak üzerine 5 ml %10 FCS'li DMEM-F12 eklenir ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra pellete az miktar medyum eklenerek yavaşça pipetajlandı ve besiyeri konulmuş flasklara ekim yapıldı.

3.2.1.2 Ep 39 Hücre Soyunun Açılması

Sıvı azot tankından çıkartılan hücreler 37°C su banyosunda çalkalanarak sıvı içersinde tutularak çözündürüldü. Çözündürülen hücre süspansiyonunun, 7,5 ml RPMI 1640 (%10 FCS) medyum konulmuş flasklara ekimi yapıldı.

3.2.2 Hücrelerin Çoğaltılması

3.2.2.1 MCF 7 ve L 929 Hücrelerinin Çoğaltılması

Hücreler 25 cm²'lik flasklarda 7,5 ml DMEM-F12 (%10 FCS) içersinde 37°C, %5 CO₂ ortamında yeterli yoğunluğa ulaşana kadar inkübe edildi.

3.2.2.2 Ep 39 Hücrelerinin Çoğaltılması

Hücreler 25 cm²'lik flasklarda 7,5 ml RPMI 1640 (%10 FCS) içersinde 27°C'ye ayarlı inkübatörde uygun yoğunluğa ulaşana kadar inkübe edildi.

3.2.3 Hücrelerin Pasajlanması

3.2.3.1 MCF 7 ve L 929 Hücrelerinin Pasajlanması

İnvert mikroskopla incelenerek yüzey kaplamasının tamamen gerçekleştiği tespit edildikten sonra kültür pasajı yapıldı. Tek tabakalı hücre kültürünün üst kısmındaki besiyeri döküldü, 1xPBS ile yıkandı ve 1 ml tripsin eklenerek 37°C'lik CO₂ etüvde bekletildi. Yaklaşık 5-10 dakika sonra hücrelerin kalkması takip edildi ve flask içersindeki hücreler 5 ml besiyeri ile santrifüj tüpüne aktararak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak dipteki pellet süspanse edildi ve sayımı yapıldı. 1×10^5 hücre 7,5 ml DMEM-F12 (%10 FCS) içersinde yeni flaska ekilip, 37°C, CO₂ etüvüne kaldırıldı.

3.2.3.2 Ep39 Hücrelerinin Pasajlanması

İnvert mikroskopla incelendiklerinde, hareketliliğin aktif, kümelerin yoğun olduğu aşamada sayımı yapıldı. 5×10^6 hücre/ml konsantrasyona ulaşan hücrelerden ml'sinde 3×10^5 olacak şekilde hesaplanarak mikropipetle çekilip son miktar 7,5 ml olacak şekilde RPMI 1640 (%10 FCS) içersine eklenip 27°C'ye kaldırıldı.

3.2.4 Hücrelerin Sayılması

Toplam hücre süspanسیونunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, üzerinde üçlü çizgilerle ayrılmış 16 büyük kareden oluşan yivler bulunan 1 mm²'lik alan ve 0,1 mm derinliğe sahip Toma lamı kullanıldı. Süspanسیونun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

Toplam Hücre Sayısı/ml=Sayım Sonucu x 10^4 x Medyum Miktarı (ml)

3.2.5 Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

3.2.5.1 MCF 7 ve L-929 Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması

Flask içersinde tüm yüzeyi kaplamış hücreler tripsinizasyon ile yapıştıkları yüzeyden tripsinizasyon ile kaldırıldı. Santrifüj yapılarak üst kısım atıldı, dipteki pellet resüspanse hale getirildi. %80'i FCS, %20'si DMSO şeklinde hazırlanan dondurma medyumunu ile 1 ml'sinde 1×10^6 hücre olacak şekilde hücreler karıştırıldı ve kriyo tüplere konuldu. 4°C'de bir saat bekletildikten sonra -20°C'ye alındı ve burada da 2 saat bekletildi. Ardından -40°C'de 1 gece bekletip sıvı azot tankına konuldu.

3.2.5.2 Ep 39 Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması

Kültürün genel durumunun iyi olduğu invert mikroskop ile incelendikten sonra pasaj aşamasına gelen hücreler donduruldu. Süspansiyon halindeki kültürden 1,8 ml kriyo tüpe alınıp, 0,2 ml steril DMSO yavaşça eklendi. 1 saat 4°C'de, 24 saat -40°C'de bekletilip sıvı azot tankına konuldu.

3.3 Polimerlerin Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

Canlılığı ölçülecek hücreler düz tabanlı 96 kuyuculu plaklara ekildi. Yüzey kaplaması tamamlandıktan veya yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra (24 veya 48 saat) ortama polimer ilave edildi. Madde ile 48 saat inkübasyonun ardından 10 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Formazan kristalleri oluşumu invert mikroskopla tek tek incelendi ve fotoğrafları çekildi. MTT durdurucu solüsyondan 100 µl eklendi 30 dakika oda sıcaklığında beklenip formazan kristallerinin çözündüğü kontrol edildi. Aynı işlemler polimer besiyeri etkileşimini kontrol etmek amacıyla, hücre bulunmayan sadece besiyeri ilave edilmiş 96 kuyucuklu plaklarda da yapıldı. Son olarak optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 570 nm dalga boyuna ayarlanmış ELIZA cihazına yerleştirildi ve cihazın optik ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı.

3.3.1 Polimerlerin MCF 7 ve L 929 Hücrelerindeki 48 Saatlik Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

Flasktaki, MCF 7 hücrelerinin yüzey kaplaması tamamen gerçekleştikten sonra hücrelerin pasajlanması bölümünde anlatıldığı gibi, hücreler tripsinize edildi. Santrifüj edip süpernatant kısmı döküldükten sonra, hücre sayımı yapıldı. Hücreler ml'de 100,000 Da MCF 7 hücresi

olacak şekilde DMEM/F12 (fenol red'siz) besiyeri içersinde deneyde kullanılacak miktarda hazırlandı. Hazırlanan hücre süspansiyonundan her kuyucuğa 100 µl (10,000 Da hücre/kuyucuk) eklendi. Kuyucuk sayısı polimerin her konsantrasyonu için 4 kuyucuk olacak şekilde hesaplandı. Hücrelerin dağılımının eşit olduğu mikroskop ile incelendikten sonra, 37°C'lik CO2 etüvüne kaldırıldı ve 24 saat inkübe edildi. L 929 hücreleri de aynı şekilde hazırlanıp 10,000 Da hücre/ kuyucuk miktarında 96 kuyucuklu plağa ekildi. Yüzey kaplamaları 24 saatte tamamen gerçekleşmediği için polimer eklenmeden önce 48 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda hücrelerin yüzey kaplamalarının ve genel durumlarının normal olduğu tespit edildikten sonra polimerler son konsantrasyon 0,1, 5, 10, 15 mg/ml olacak şekilde 45 µl eklendi. Kontrole 45 µl PBS eklendi. Polimerlerin hazırlanan 50 mg/ml ve 0,5 mg/ml stokları kullanıldı ve kuyucuklara aşağıdaki şekilde eklendi:

0,1 mg/ml için	29 µl	0,5 mg/ml'lik stoktan
5 mg/ml için	14,5 µl	50 mg/ml'lik stoktan
10 mg/ml için	29 µl	50 mg/ml'lik stoktan
15 mg/ml için	43,5 µl	50 mg/ml'lik stoktan eklendi.

Bütün kuyucuklardaki son hacim PBS ile 145 µl'ye tamamlandı. Polimer eklendikten sonra 37°C'de 48 saat inkübe edildi. MTT solüsyonunun hazırlanması bölümünde açıklandığı gibi hazırlanan 10 mg/ml MTT solüsyonundan her kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Formazan kristalleri oluşumu invert mikroskopla tek tek incelendi ve fotoğrafları çekildi. MTT durdurucu solüsyondan 100 µl eklendi, formazan kristallerinin tamamen çözüldüğü mikroskopik olarak incelendi ve 30 dakika oda sıcaklığında beklenip ELIZA cihazı ile 570 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüldü.

3.3.2 Polimerlerin Ep 39 Hücrelerindeki 48 Saatlik Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

Flaskta kültürü yapılan Ep 39 yeterince çoğaldıkları ve durumlarının iyi olduğu invert mikroskopta incelendikten sonra, hücre sayımı yapıldı. Süspanse kültürden ml'de 300,000 Da promastigot olacak şekilde mikropipet ile çekildi ve DMEM/F1 F12 (fenol red'siz) besiyeri içersinde dilüe edilerek deneyde kullanılacak miktarda hazırlandı. Hazırlanan hücre süspansiyonundan her kuyucuğa 100 µl (30,000 Da hücre/kuyucuk) eklendi. Polimerin her konsantrasyonu için 4 kuyucuk olacak şekilde hesaplandı. Hücrelerin dağılımının eşit olduğu

mikroskop ile incelendikten sonra, 27°C'lik etüve kaldırıldı ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin genel durumlarının normal, hareketlerinin aktif olduğu tespit edildi ve polimerler son konsantrasyon 0,1, 5, 10, 15 mg/ml olacak şekilde 45 µl eklendi. Kontrole 45 µl PBS eklendi. Polimerlerin hazırlanan 50 mg/ml ve 0,5 mg/ml stokları kullanıldı ve kuyucuklara aşağıdaki şekillerde eklendi:

0,1 mg/ml için	29 µl	0,5 mg/ml'lik stoktan
5 mg/ml için	14,5 µl	50 mg/ml'lik stoktan
10 mg/ml için	29 µl	50 mg/ml'lik stoktan
15 mg/ml için	43,5 µl	50 mg/ml'lik stoktan eklendi.

Bütün kuyucuklardaki son hacim PBS ile 145 µl'ye tamamlandı. Bir mikropiçle hücreler besiyeri eklenerek aynı konsantrasyonlardaki polimerler aynı şekilde ilave edildi. Polimer eklendikten sonra hücreli ve hücreli olmayan örnekler 27°C'de 48 saat inkübe edildi. MTT solüsyonunun hazırlanması bölümünde açıklandığı gibi hazırlanan 10 mg/ml MTT solüsyonundan her kuyucuğa 10 µl eklendi ve 27°C'de 4 saat inkübe edildi. Formazan kristalleri oluşumu ve hareketlerinin aktifliği invert mikroskopla tek tek incelendi ve fotoğrafları çekildi. MTT durdurucu solüsyondan 100 µl eklendi, formazan kristallerinin tamamen çözöldüğü mikroskopik olarak incelendi ve 30 dakika oda sıcaklığında beklenip ELIZA cihazı ile 570 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçöldü.

3.3.3 Polimerlerin Ep 39 Hücrelerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

Polimerlerin 48 saatlik toksik etkisi incelendikten sonra aynı yöntem kullanılarak, 72 saatlik inkübasyonu incelendi. Bu deneyde daha fazla konsantrasyon kullanıldı. Kuyucuklara eklenen hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra genel durumları incelendi. Bir mikropiçle kontrol amaçlı sadece besiyeri eklendi. Promastigotların ve sadece besiyerinin bulunduğu kuyucuklara aşağıdaki şekilde 5'er kuyucuğa polimer eklendi;

50 mg/ml'lik stoktan;	40 µl, 30 µl, 20 µl, 10 µl, 4 µl, 1 µl
0,5 mg/ml'lik stoktan;	20 µl, 10 µl, 2 µl, 1 µl eklendi.

Bütün kuyucuklardaki son miktar PBS ile 140 µl'ye tamamlandı ve kontrol grubuna 40 µl PBS eklendi. Ve konsantrasyonlarının sırasıyla ~14,2 mg/ml, 10,7 mg/ml, 7,1 mg/ml, 3,5 mg/ml, 1,42 mg/ml, 0,35 mg/ml, 0,071 mg/ml, 0,035 mg/ml, 0,0071 mg/ml, 0,0035 mg/ml olduğu hesaplandı. Bir mikropiçle hücreli olmayan besiyeri eklenerek aynı konsantrasyonlardaki

polimerler aynı şekilde ilave edildi. Polimer eklendikten sonra hücreli ve hücretsiz örnekler 27°C’de 48 saat inkübe edildi ve 10 mg/ml MTT solüsyonundan her kuyucuğa 10 µl eklendi ve 27°C’de 4 saat inkübe edildi. Formazan kristalleri oluşumu ve hareketlerinin aktifliği invert mikroskopla incelendi ve fotoğrafları çekildi. MTT reaksiyon durdurucu solüsyondan 100 µl eklendi, formazan kristallerinin tamamen çözüldüğü mikroskopik olarak incelendi ve 30 dakika oda sıcaklığında beklenip ELIZA cihazı ile 570 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüldü.

3.3.4 Polimerlerin Ep 39 Hücrelerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin Sayım Yöntemi ile İncelenmesi

Polimerlerin Ep 39 hücrelerindeki 72 saatlik toksik etkisinin MTT yöntemi ile incelenmesi kısmında anlatıldığı gibi 96 kuyucuklu plaka aynı konsantrasyonlarda ve her konsantrasyon için 5 kuyucuk olacak şekilde hazırlandı. Polimer ile 72 saat inkübasyon sonrasında bütün kuyucuklardaki hücreler thoma lamı ile tek tek sayıldı ve ortalamaları alınarak grafik çizildi.

3.4 Polimerlerin Toksik Etkisinin Ep 39 Hücrelerindeki Hareketliliğe Göre İncelenmesi

Kültür ortamında mikroskopik inceleme ile durumlarının normal olduğu tespit edilen promastigotlardan 6 kuyucuklu mikropiçte 1 ml alındı. Üzerine son konsantrasyon 20 mg/ml olacak şekilde stok PAA’dan (50 mg/ml) eklendi ve hafif pipetaj yapıldı. Piçin kapağı kapatılarak hemen invert mikroskop altında 20x ve 40x büyütmede incelendi. Mikroskopun bulunduğu kültür odasının kliması 27°’ye ayarlandı ve 30 dakika boyunca hareketlilikleri, küme oluşumları değerlendirildi. İnkübatöre kaldırılıp bir saat geçtikten sonra tekrar incelendi ve gözlemler not edildi. Bu şekilde farklı zaman aralıklarında kontrolleri yapıldı.

İncelenen PAA (MA:100,000 Da)’ın 33 mg/ml konsantrasyonu da aynı şekilde hazırlandı ve incelendi. Bu konsantrasyonda ilk 50 dakika hareketliliğin olmamasının nedeninin hücrelerin ölümü olup olmadığını anlamak için, 6 kuyucuklu piçin boş bir kuyucuğuna 2,5 ml besiyeri konuldu ve bu hareketsizleşmiş hücre kültüründen 0,5 ml ilave edildi ve hareketlilik incelendi ve bu gözlemler de not edildi.

3.5 İstatistikî Analizler

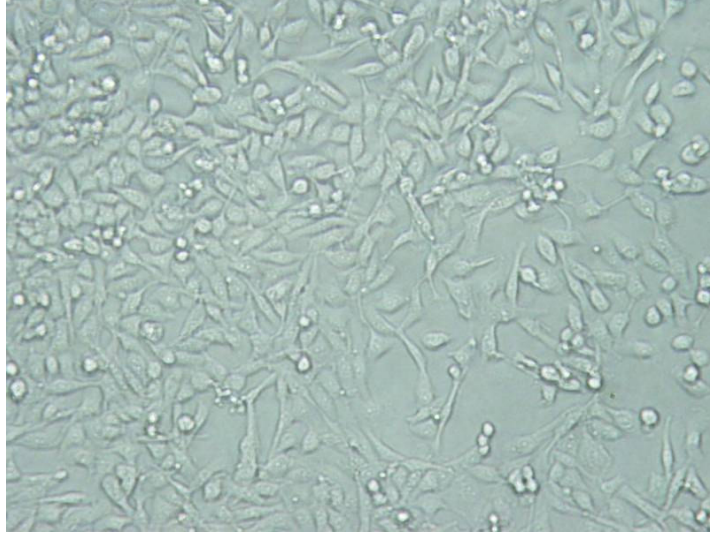
Sonuçların istatistikî değerlendirilmesi SPSS (Statistical Packages of Social Sciences version 9.0 for Windows, student t-test) programı ile yapıldı. $p < 0,05$ değeri istatistikî olarak anlamlı kabul edildi.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

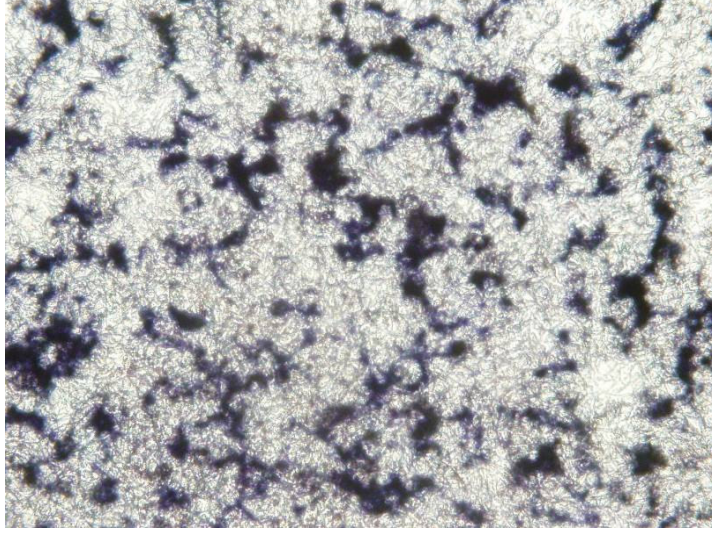
4.1 Polimerlerin Toksik Etkisinin MCF 7 Hücre Kültüründe İncelenmesi

Deneysel çalışmalar kısmında verildiği gibi, farklı molekül ağırlıklı polimerlerin toksik etkisini incelemek amacıyla, 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 10,000 MCF 7 hücresi ekilip 24 saat inkübe edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa MTT ilave edildi ve hücre canlılığını belirlemek için formazan kristallerinin oluşumu ters mikroskop ile incelendi.

MTT bulunmayan (Şekil 4.1) ve MTT bulunan (Şekil 4.2) kültür ortamında MCF 7 hücrelerinin morfolojileri gösterilmiştir. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi hücreler kültür alanını kaplamış, morfolojik olarak intak, kenarları düz, uzantıları normaldir.



Şekil 4.1 MCF 7 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü (MTT eklenmeden önce) (20x).



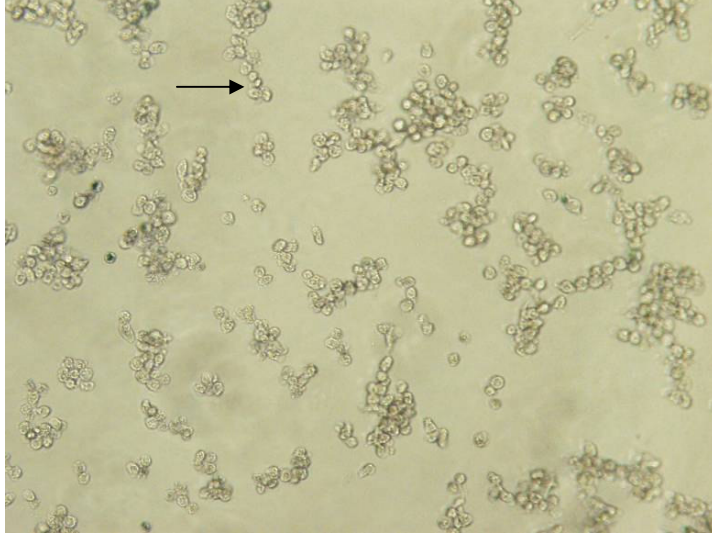
Şekil 4.2 MCF 7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu (24 saat inkübasyon sonrası, MTT eklendikten sonra)(20x).

Şekil 4.2’de ise formazan kristallerinin oluşumu net bir şekilde görülmektedir. Elde edilen sonuçlarda, kullanılan hücre miktarı (10,000 hücre/kuyucuk) ve 24 saatlik inkübasyon süresi ile hücrelerin kuyucuklarda normal bir şekilde adezyon yapıp çoğaldığı ve canlılıklarının yüksek olduğu görüldü. Bu nedenle farklı molekül ağırlığındaki polimerlerin kültür ortamındaki toksik etkisini incelemek için çalışmalarımızda bu prosedür uygulandı.

4.1.1 Molekül Ağırlığı 100.000 Olan Poliakrilik Asitin MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

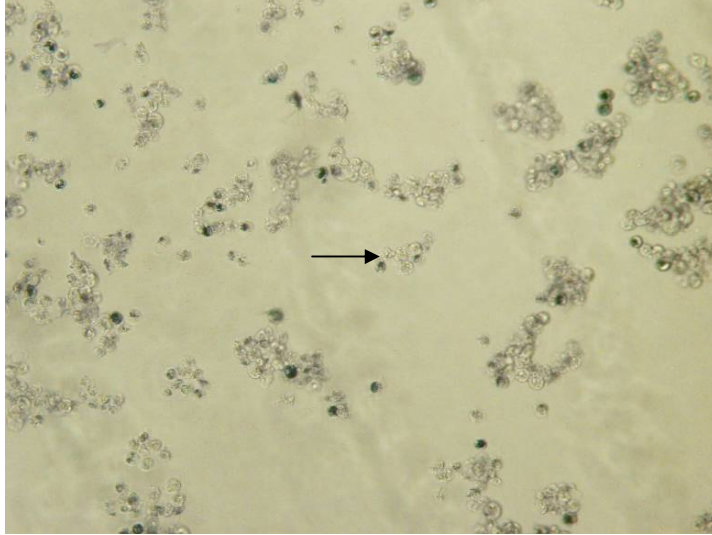
Poliakrilik asitin değişik konsantrasyonları (0,1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml) MCF 7 hücre kültürlerinde 48 saat inkübe edildikten sonra PAA’nın toksik etkisi MTT yöntemi ile morfolojik ve sayısal olarak incelendi.

Şekil 4.3’de PAA’nın en yüksek konsantrasyonu bulunan kültür ortamında hücrelerin mikroskopik görüntüleri verilmiştir. Hücreler atipik forma dönüşmüş, büzülüp küçülmüş, yüzey uzantılarını kaybetmiş ve hücrelerarası alanda boşluklar oluşmuştur.

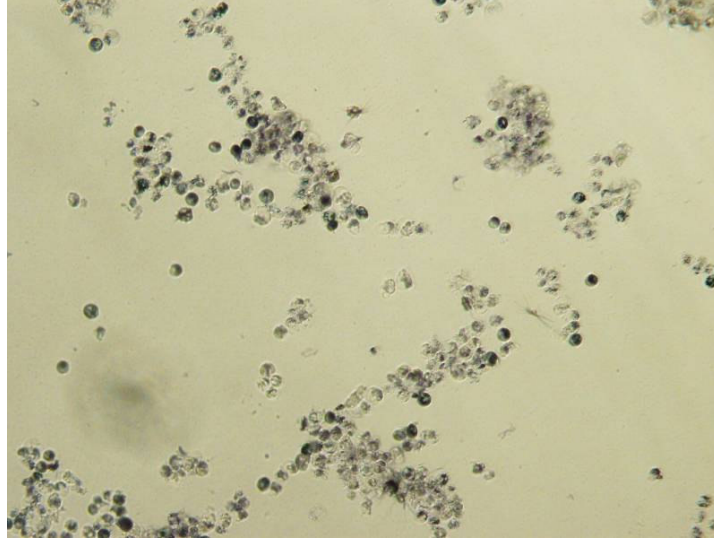


Şekil 4.3 PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

15 mg/ml ile benzer gözlemler 10 mg/ml ve 5 mg/ml'lik konsantrasyonlarda da tespit edilmiştir (Şekil 4.4, 4.5).

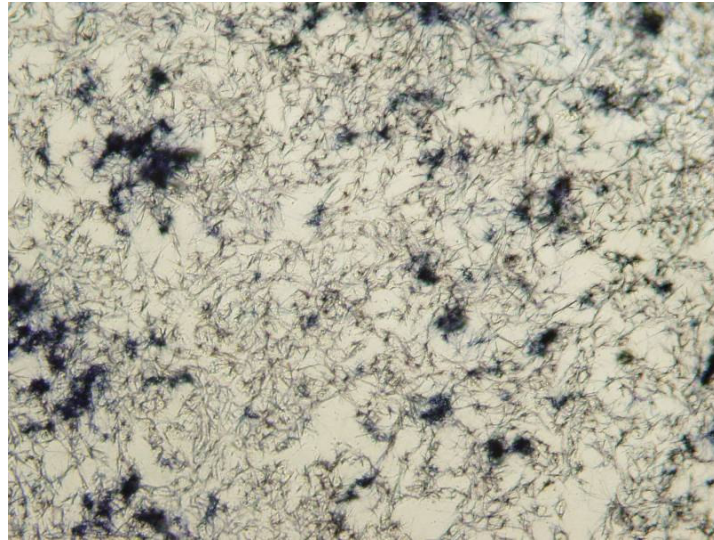


Şekil 4.4 PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.5 PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

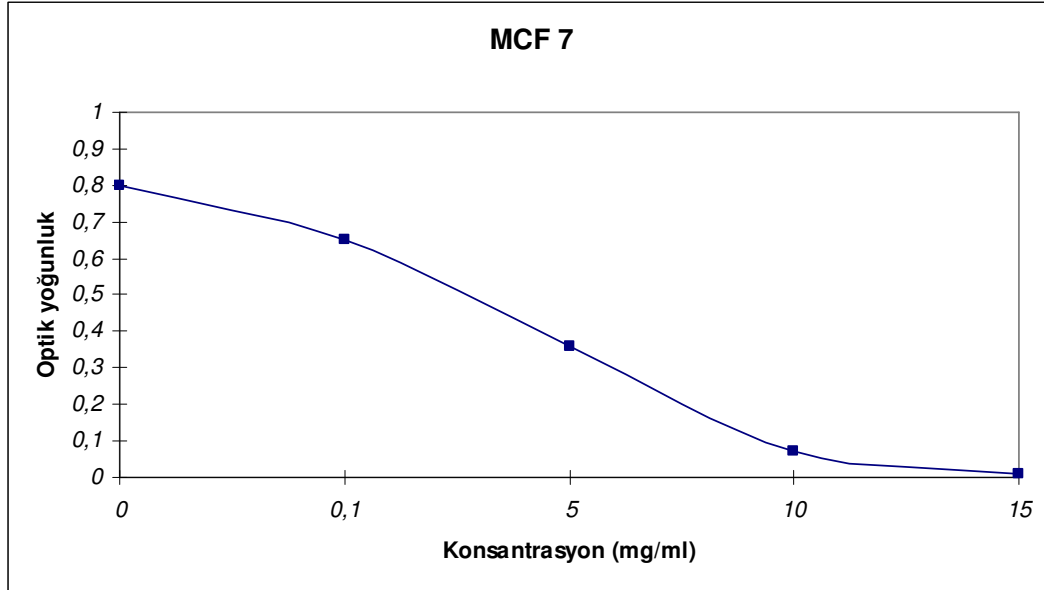
Ancak en düşük konsantrasyon olan 0,1 mg/ml'de diğer konsantrasyonlardan farklı olarak formazan kristali oluşmuş, morfolojik olarak kontrole nazaran önemli bir değişiklik göstermemiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Çizelge 4.1'de PAA'nın MCF 7 hücreleri üzerindeki toksik etkisi miktar olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi PAA'nın konsantrasyonu arttıkça MCF 7 hücrelerinin canlılıkları azalmıştır ($p < 0,05$). En yüksek konsantrasyon olan 15 mg/ml'lik PAA bulunan ortamdaki hücre canlılığı ($0,032 \pm 0,017$), kontrole göre ($0,9815 \pm 0,102$) anlamlı bir düşüş göstermiştir.

Çizelge 4.1 PAA'nın (MA:100,000 Da) farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücrelerinin canlılığına etkisi

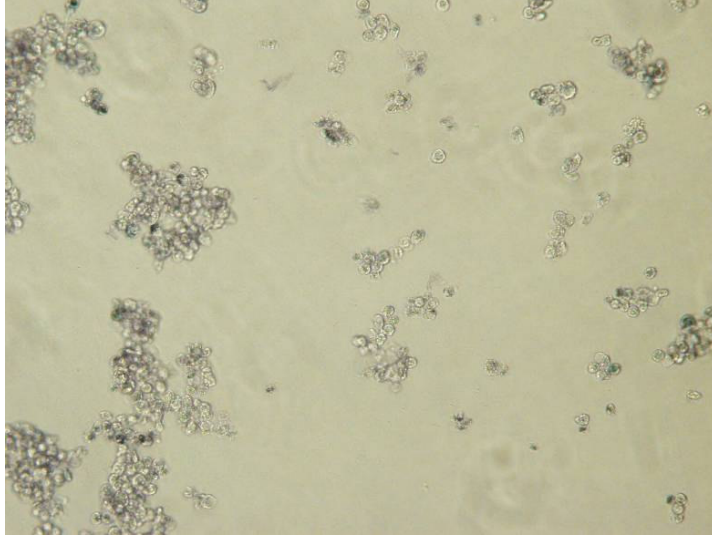


Sonuç olarak, molekül ağırlığı 100,000 Da olan PAA'nın değişik konsantrasyonlarının MCF 7 hücreleri üzerindeki toksik etkisinin, morfolojik olarak ve MTT yöntemi ile incelenmesi, kültür ortamında bulunan PAA'nın konsantrasyonu arttıkça; hücrelerin canlılığının azaldığını, sitopatik etkilerin ve morfolojik değişikliklerin arttığını göstermiştir.

4.1.2 Molekül Ağırlığı 30,000 Da Olan Poliakrilik Asitin MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

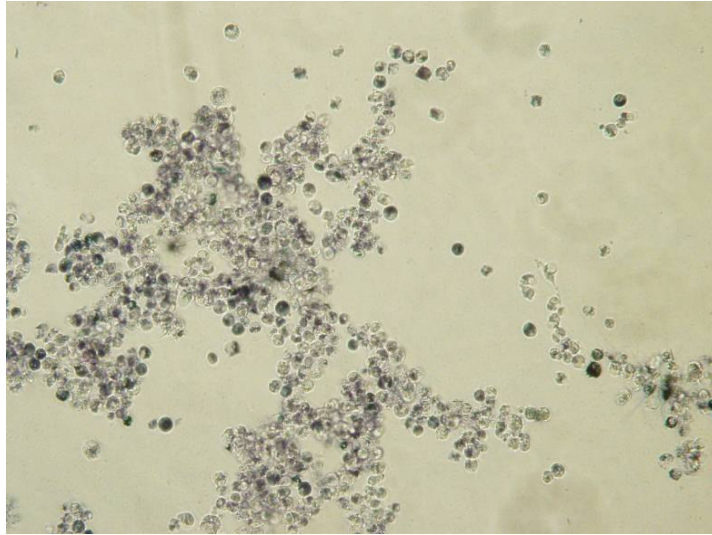
MCF 7 hücreleri PAA'nın farklı konsantrasyonları (0,1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml ve 15 mg/ml) ile 48 saat inkübe edildi. PAA'nın incelenen konsantrasyonlarının hücreler üzerindeki toksik etkisi mikroskopik ve MTT yöntemi ile sayısal olarak incelendi.

Şekil 4.7'de PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişiklikler verilmiştir. Hücrelerde yuvarlaklaşma, küçülme, uzantılarını kaybetme gibi sitopatik değişiklikler meydana gelmiştir. Ayrıca hücrelerde formazan kristali oluşumu oldukça azdır.



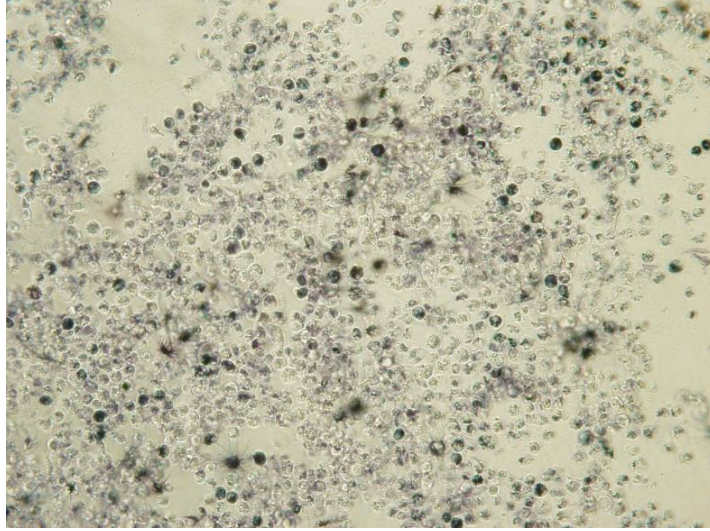
Şekil 4.7 PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Formazan oluşumuna göre değerlendirildiğinde, 15 mg/ml konsantrasyonda mor renk gözlenmezken, 10 mg/ml konsantrasyondaki hücreler düşük miktarlarda formazan kristali oluşturmuşlardır. Özellikle hücrelerin iç kısımlarında görülen mor renkler bu hücrelerden bir kısmının canlılıklarını sürdürdüğünü göstermektedir (Şekil 4.8).



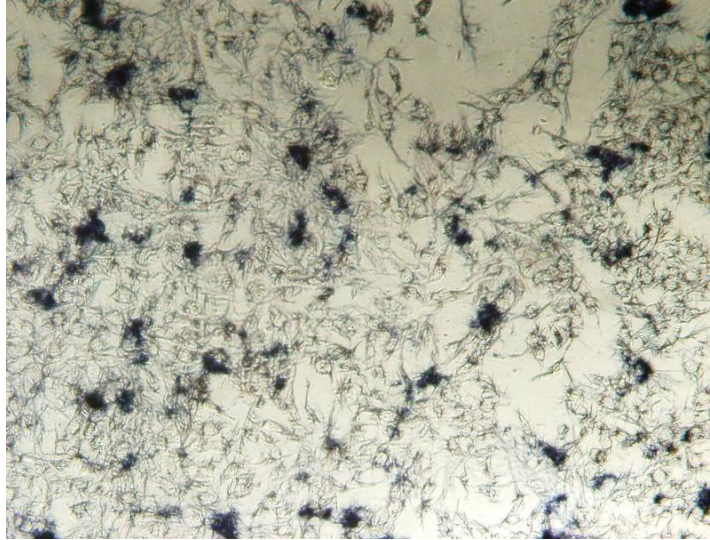
Şekil 4.8 PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Şekil 4.9'da PAA'nın 5 mg/ml'lik konsantrasyonu bulunan kültür ortamında hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler gösterilmiştir. PAA'nın 10 ve 15 mg/ml'lik konsantrasyondan farklı olarak 5 mg/ml'de hücrelerin tamamı ölmemiş bazıları hücresel uzantılarını korumuştur.



Şekil 4.9 PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

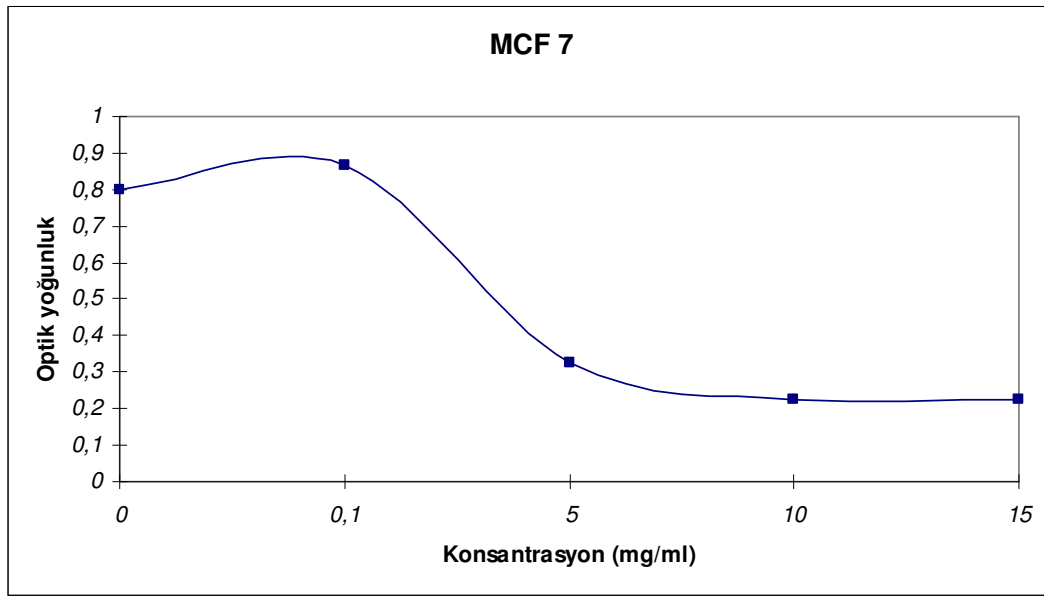
PAA'nın en düşük konsantrasyonunda (0,1 mg/ml) ise hücrelerde kontrole kıyasla morfolojik değişiklikler görülmedi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Çizelge 4.2’de ise PAA’nın MCF 7 hücreleri üzerindeki etkisi kantitatif olarak verilmiştir. Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi, PAA’nın artan konsantrasyonlarında hücrelerin canlılığı azalmaktadır. Ancak en düşük konsantrasyonda (0,1 mg/ml) toksik etkinin olmadığı ve hücrelerin canlılığının azalmadığı görülmektedir. Buna karşın 5 mg/ml’den itibaren artan konsantrasyonlar ile hücrelerin canlılıkları azalmaya başlamıştır. En yüksek konsantrasyonda (15 mg/ml) canlılık en düşük seviyededir ($0,227 \pm 0,016$). En yüksek konsantrasyonda hücrelerin kontrole nazaran canlılıkları anlamlı ölçüde düşmüştür ($p < 0,05$).

Çizelge 4.2 PAA’nın (MA:30,000 Da) farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücrelerinin canlılığına etkisi

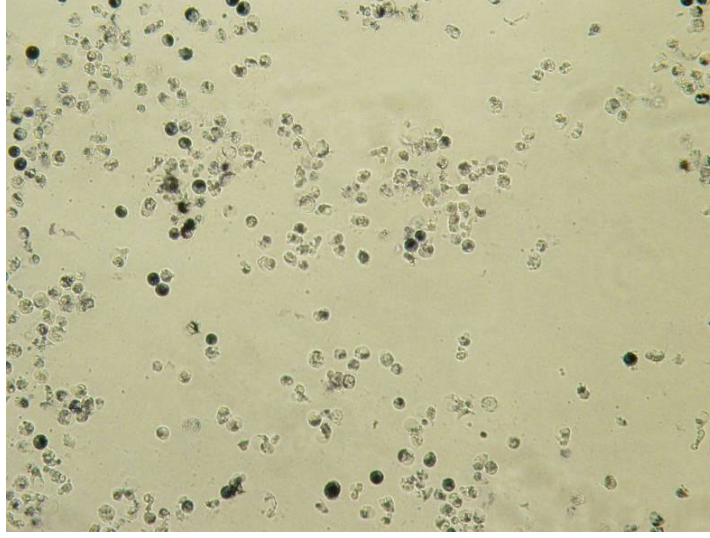


Sonuç olarak, molekül ağırlığı 30,000 Da olan PAA’nın konsantrasyonu arttıkça MCF 7 hücrelerinde dejenerasyonun arttığı görülmüştür. Miktarca canlılık incelendiğinde ise artan polimer konsantrasyonuna paralel olarak hücrelerin canlılığı azalmıştır. Elde edilen sonuçlar PAA’nın 0,1 mg/ml’den sonraki konsantrasyonun, MCF 7 hücreleri üzerinde toksik olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$).

4.1.3 Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Poliakrilik Asit’in MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

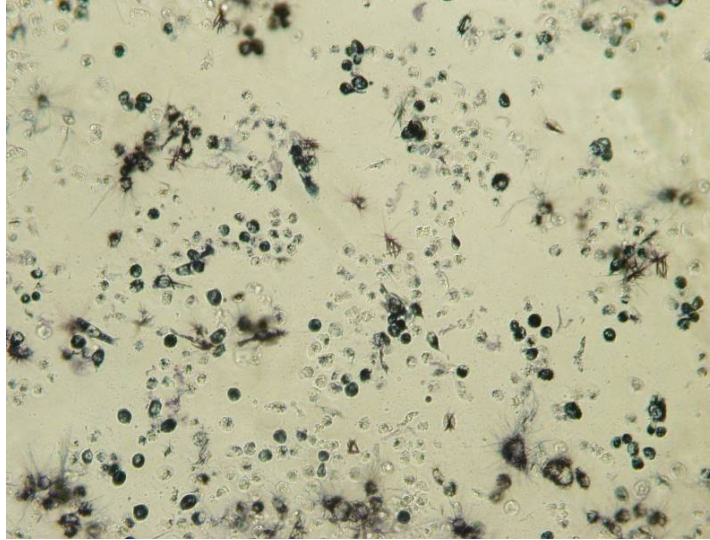
Molekül ağırlığı 2,000 Da olan PAA’nın toksik etkisi, MTT yöntemi ile morfolojik ve kantitatif olarak incelendi.

Morfolojik değerlendirmede, polimerin 15 mg/ml'lık konsantrasyonunda, hücrelerin dejenere olduğu görülmektedir. Buna rağmen hücrelerin içersinde, oldukça düşük miktarda mor renkli formazan kristalleri oluşmuştur (şekil 4.11).

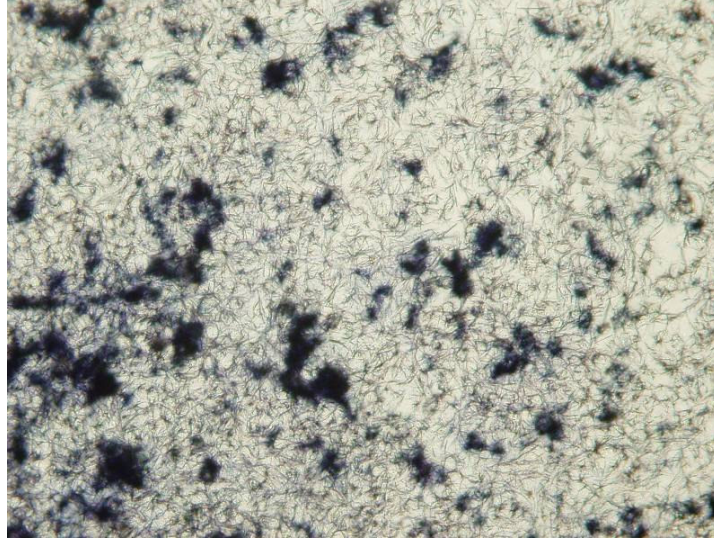


şekil 4.11 PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

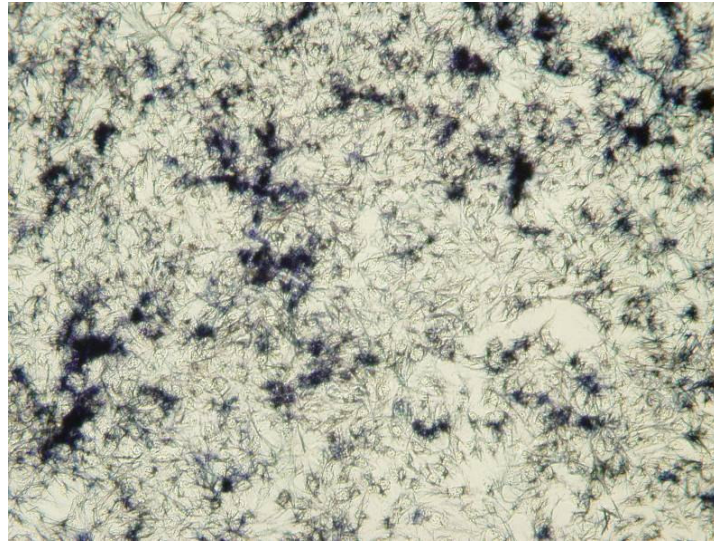
Daha düşük konsantrasyonda da (10 mg/ml) hücrelerde dejenerasyon ve sitopatik etkiler görülürken, 5 mg/ml ve özellikle 0,1 mg/ml konsantrasyonda hücrelerin morfolojileri ve formazan üretimleri kontrole benzerdir (şekil 4.12, 4.13, 4.14).



şekil 4.12 PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.13 PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



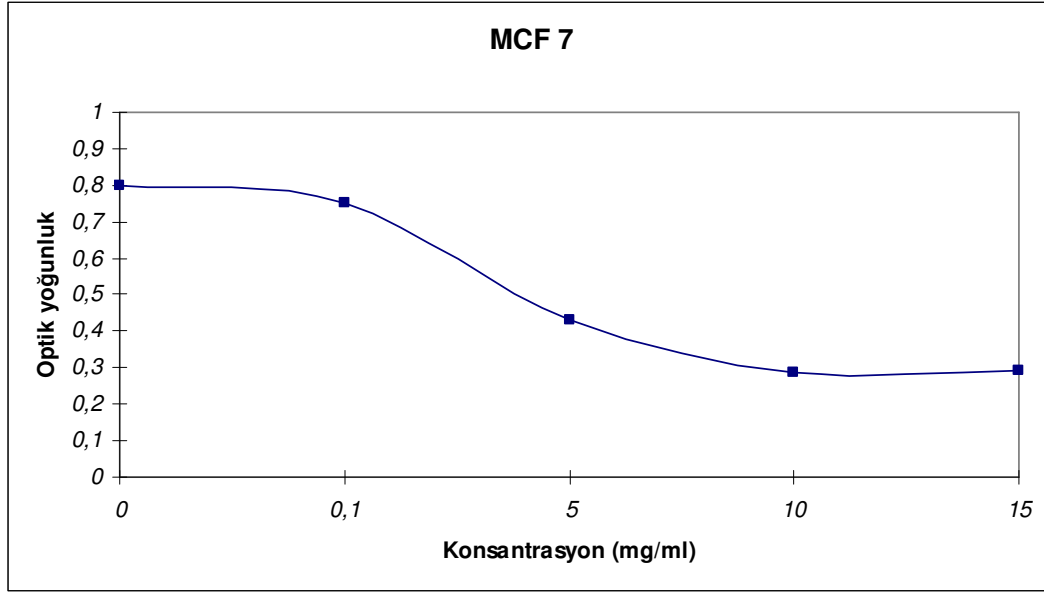
Şekil 4.14 PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Çizelge 4.3'de PAA'nın (MA:2,000 Da) MCF 7 hücrelerine toksik etkisi MTT yöntemi ile kolorimetrik olarak verilmiştir. Canlı hücrelerin oluşturduğu formazan kristalleri çözülerek, 570 nm dalga boyunda optik yoğunluğu ölçülmüştür.

Daha önceki deneylerde olduğu gibi, polimerin konsantrasyonu arttıkça, MCF 7 hücrelerinin canlılığı azalmıştır. En düşük konsantrasyonda kontrole nazaran önemli bir fark görülmesine de yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir düşüş

gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Kontrolde ölçülen optik yoğunluk $0,9815\pm0,102$ iken en yüksek konsantrasyonda $0,292\pm0,075$ olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3 PAA'nın (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücrelerinin canlılığına etkisi

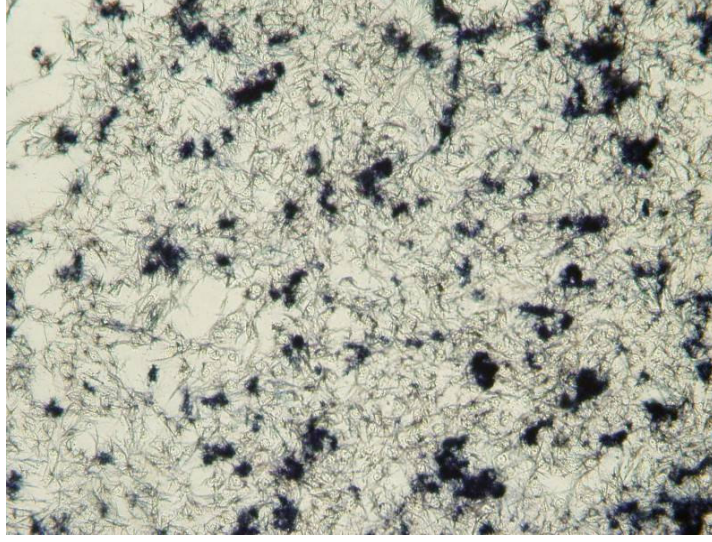


Morfolojik incelemeler ve optik yoğunluğun ölçülmesi ile elde edilen sonuçlarda, 2,000 Da molekül ağırlıklı PAA'nın yüksek konsantrasyonları ile MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkinin arttığı ve hücrelerin canlılığının azaldığı tespit edilmiştir.

4.1.4 Molekül Ağırlığı 4,600 Da Polietilen Glikolün MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

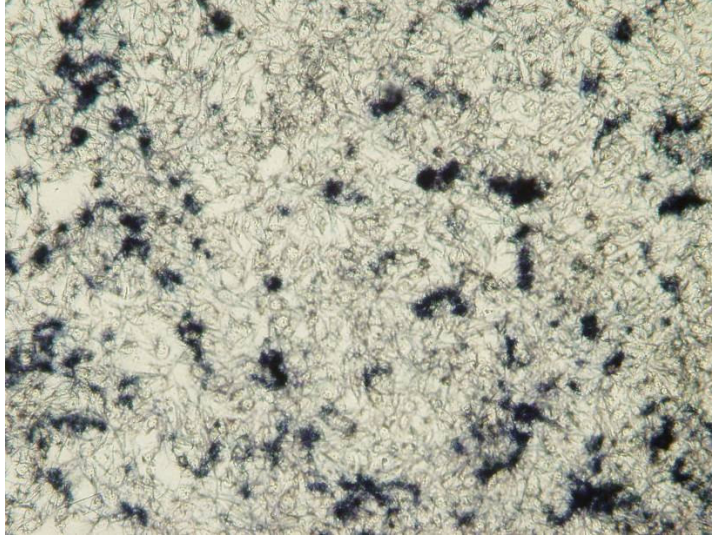
Farklı molekül ağırlığına sahip (1,000 Da, 2,000 Da, 4,600 Da) polietilen glikolün (PEG) MCF 7 hücrelerindeki toksik etkileri MTT yöntemi ile incelendi. En yüksek molekül ağırlığına sahip formunu (MA:4,600 Da) incelemek için MCF 7 hücreleri PEG'in 0,1, 5, 10 ve 15 mg/ml konsantrasyonları ile 48 saat inkübe edildi. PEG'in MCF 7 hücrelerinde 48 saatlik toksik etkisi, MTT yöntemiyle morfolojik olarak ve miktar olarak incelendi.

Morfolojik incelemelerde, PEG'in en yüksek konsantrasyonu (15 mg/ml) bulunan kültür ortamındaki MCF 7 hücrelerinin sağlam, kenarlarının düz, uzantılarının normal olduğu görülmüştür. Ayrıca formazan kristali oluşumları polimersiz ortamdaki kontrol hücrelerine benzer özelliktedir (Şekil 4.15).

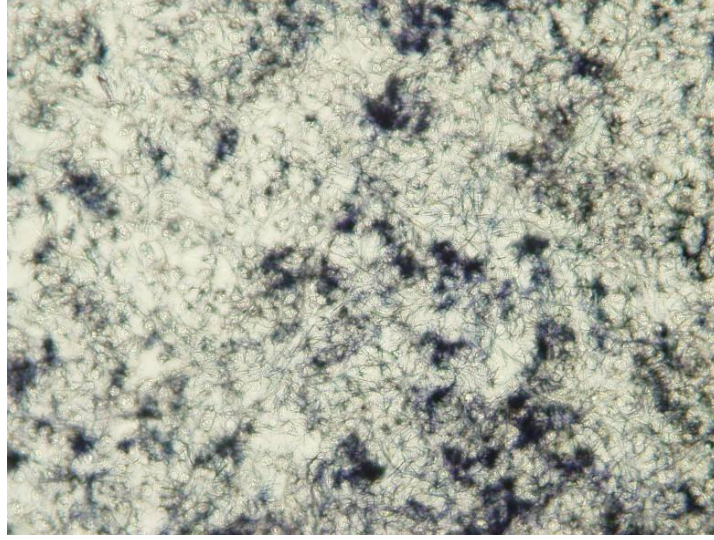


Şekil 4.15 PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

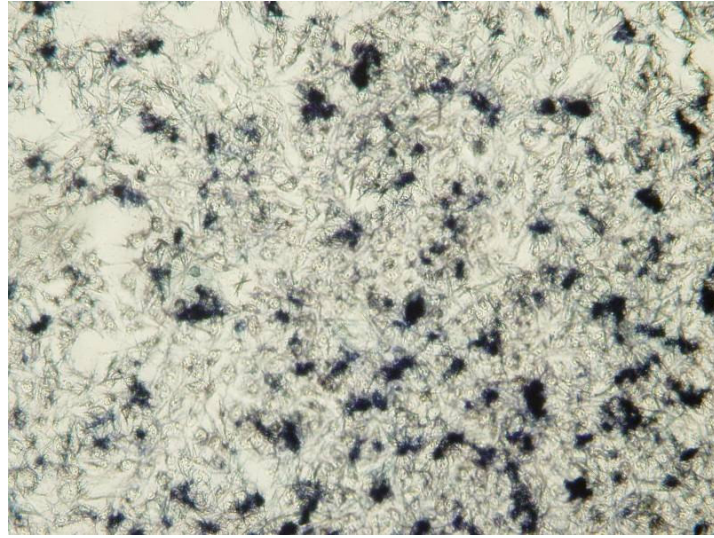
PEG'in incelenen diğer konsantrasyonlarında da, hücrelerde kontrole göre değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.16, 4.17, 4.18).



Şekil 4.16 PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.17 PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

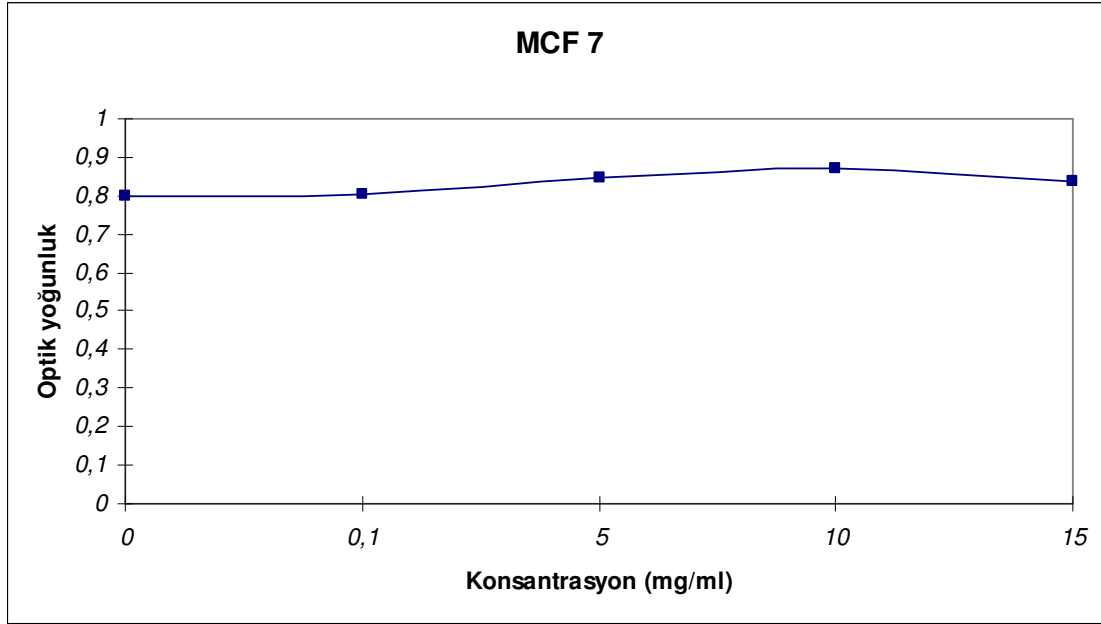


Şekil 4.18 PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Kısaca morfolojik olarak değerlendirildiğinde, PEG'in farklı konsantrasyonlarının (0,1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml ve 15 mg/ml) bulunduğu kültür ortamlarında, MCF 7 hücrelerinde sitopatik etki görülmemiştir.

Çizelge 4.4’de PEG’in konsantrasyonuna bağlı olarak, hücre canlılığına etkileri miktar olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi; PEG’in yüksek konsantrasyonu da dahil olmak üzere tüm konsantrasyonlarında, canlılık miktarı kontrole göre anlamlı bir değişiklik göstermemiştir.

Çizelge 4.4 PEG’in (MA:4,600 Da) farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücrelerinin canlılığına etkisi

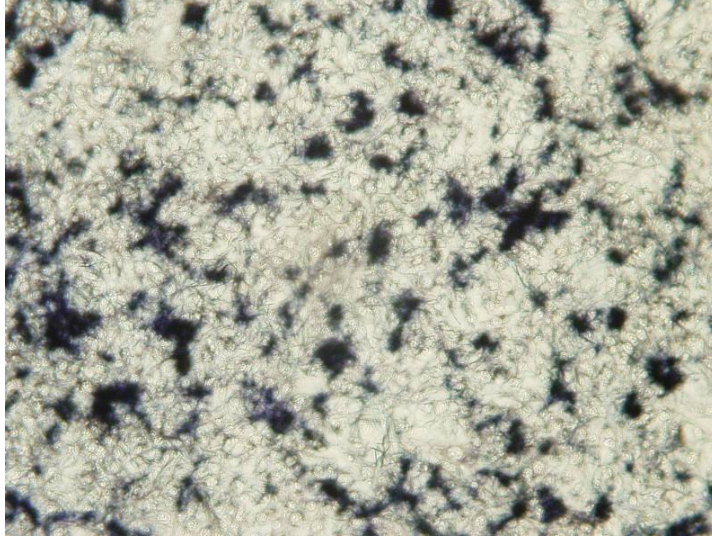


Miktar olarak canlılık ölçümünde de hücrelerde kontrole nazaran farklılık oluşmamıştır. Molekül ağırlığı 4,600 Da olan PEG’in incelenen konsantrasyonlarında, MCF 7 hücrelerine toksik etki etmediğini görülmüştür.

4.1.5 Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Polietilen Glikolün MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

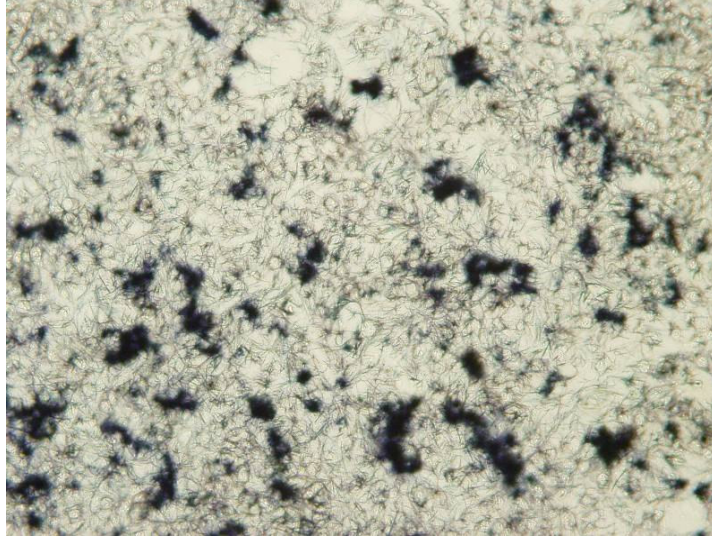
MCF 7 hücreleri, molekül ağırlığı 2,000 Da olan PEG’in 4 farklı konsantrasyonu bulunan kültür ortamında 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası morfolojik incelemeler ve miktar olarak canlılık ölçümü yapılmıştır.

Morfolojik incelemeler ile en yüksek konsantrasyon olan 15 mg/ml’de hücrelerin genel durumlarının iyi olduğu, yapışma özelliklerini koruduğu ve uzantılarını kaybetmedikleri gözlenmiştir. Ayrıca formazan kristali oluşumu da kontrole aynıdır (Şekil 4.19).

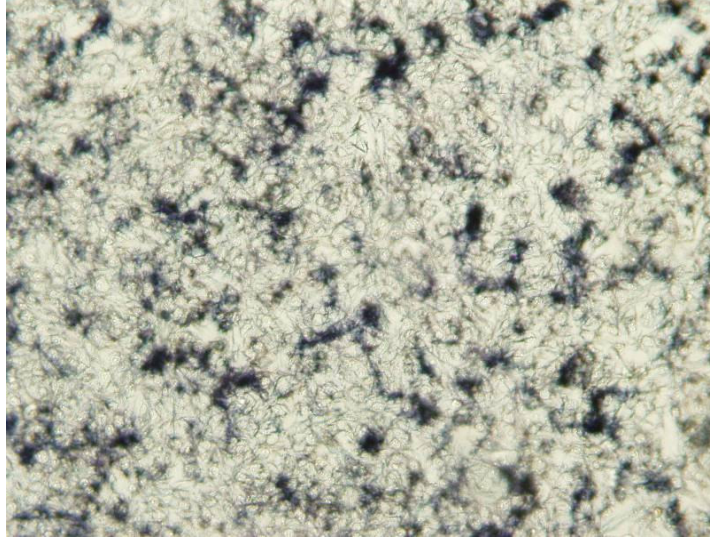


Şekil 4.19 PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

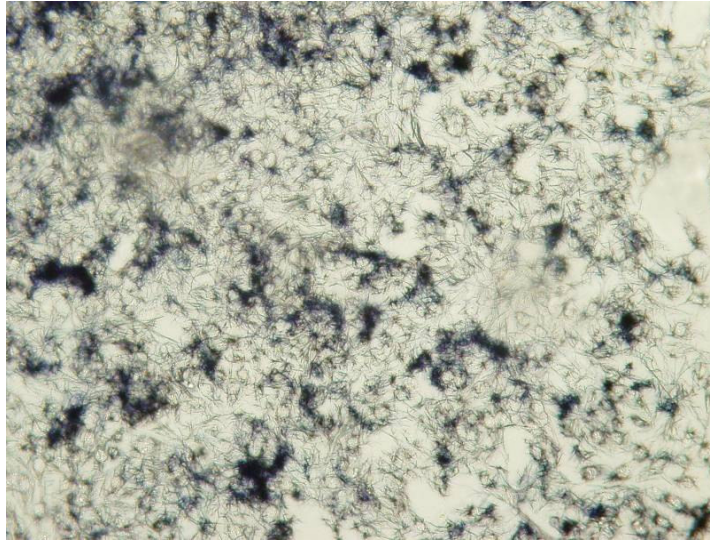
Bu durum daha düşük konsantrasyonlarda da (0,1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml) gözlenmektedir (Şekil 4.20, 4.21, 4.22).



Şekil 4.20 PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.21 PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

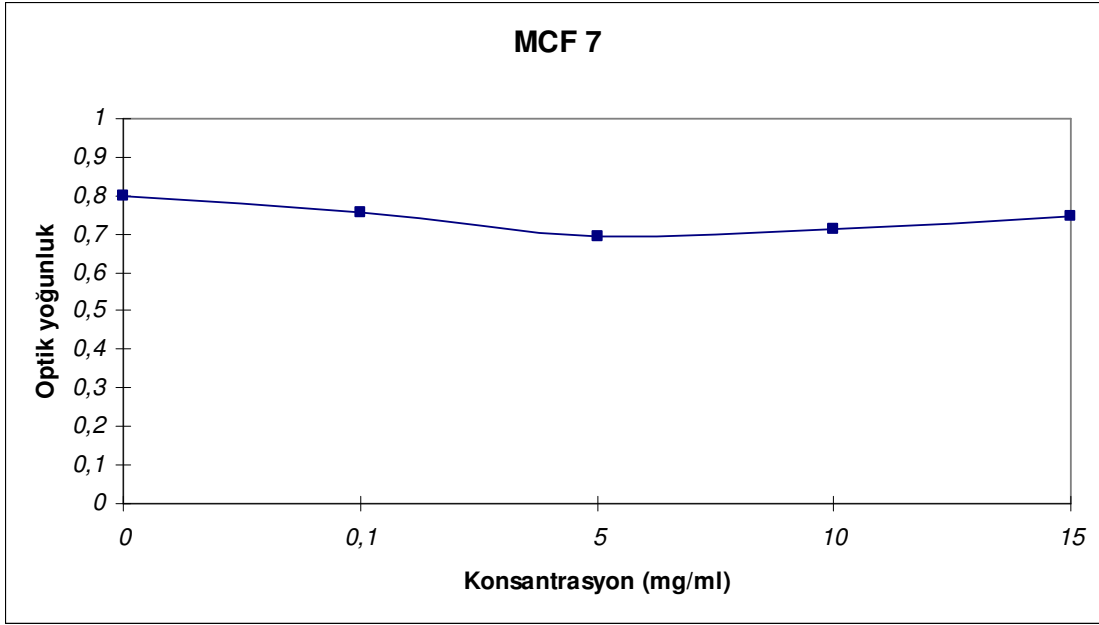


Şekil 4.22 PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Bütün konsantrasyonlarda hücrelerin genel morfolojilerinin kontrolle aynı olması, PEG'in diğer yüksek molekül ağırlıklı formundaki (MA:4,600 Da) gibi sitopatik etkisinin olmadığını göstermektedir.

PEG'in MCF 7 hücrelerinin canlılığına etkileri Çizelge 4.5'de sunulmuştur. Çizelge 4.5'de görüldüğü gibi, PEG'in bu molekül ağırlığında; 0,1, 5, 10 ve 15 mg/ml konsantrasyonu ile 48 saat inkübe edilen MCF 7 hücrelerinin canlılığında kontrole nazaran önemli bir fark görülmemektedir. Bu durum gözlemsel sonuçlarla uyum göstermektedir.

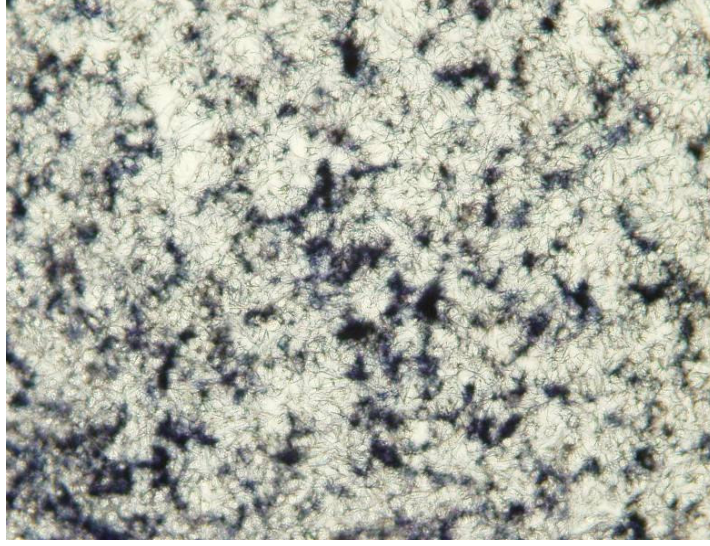
Çizelge 4.5 PEG'in (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücrelerinin canlılığına etkisi



Özet olarak, MCF 7 hücrelerinde PEG'in (MA:2,000 Da) morfolojik olarak denejasyon oluşturmadığı ve hücrelerin canlılığını azaltmadığı görülmüştür. PEG'in (MA:2,000 Da), MCF 7 hücreleri için toksik olmadığı tespit edilmiştir.

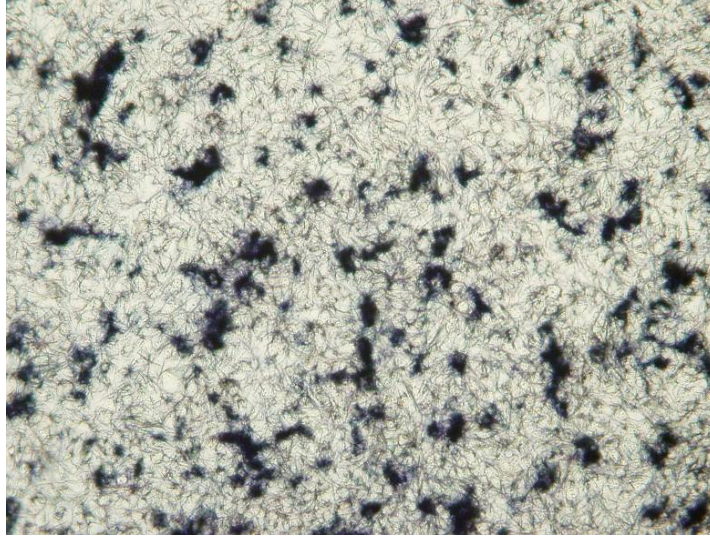
4.1.6 Molekül Ağırlığı 1,000 Da Olan Polietilen Glikolün MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

Polietilen glikolün MCF 7 hücreleri ile 48 saatlik etkileşimi sonrasında hücrelerin canlılığı ve morfolojisi MTT yöntemi ile incelenmiştir. PEG'in 1000 Da'luk molekül ağırlığında en yüksek konsantrasyonunda (15 mg/ml) bile hücresel uzantıların düzgün olduğu, parlaklıklarının ve hücre yoğunluklarının sağlıklı kontrol hücreleri ile benzer özellikte olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.23).

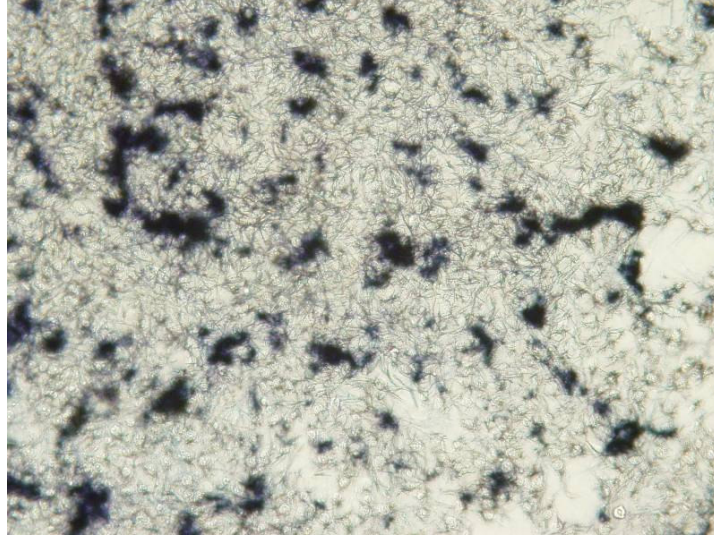


Şekil 4.23 PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

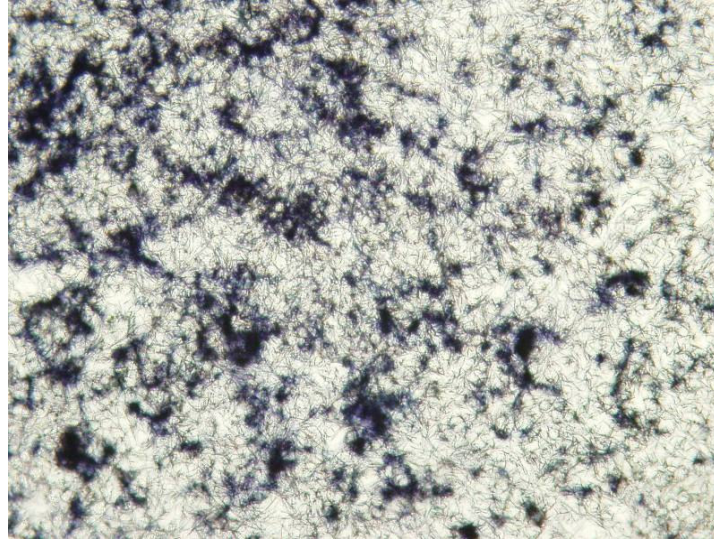
Daha düşük konsantrasyonlarda da durum 15 mg/ml ile aynıdır (Şekil 4.24, 4.25, 4.26). Bütün konsantrasyonlarda hücrelerin canlılıklarının yüksek olması, morfolojilerinin bozulmaması, PEG'in diğer formları gibi (MA:4,600 Da ve 2,000 Da) bu molekül ağırlığının da, MCF 7 hücreleri için sitopatik etkisinin olmadığını göstermiştir.



Şekil 4.24 PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



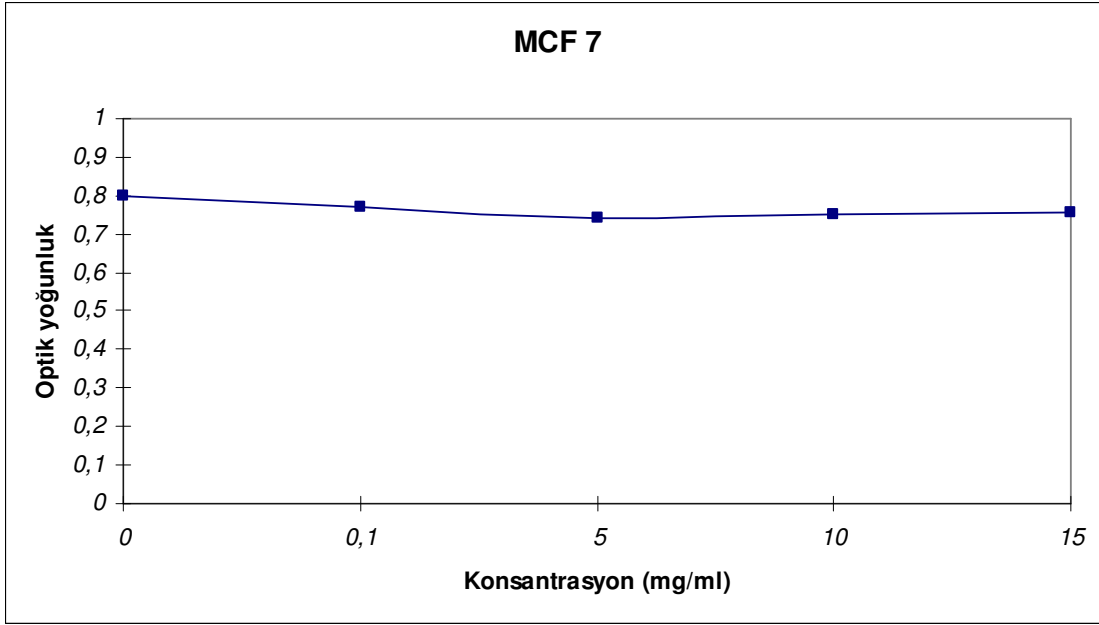
Şekil 4.25 PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.26 PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

PEG'in molekül ağırlığı 1,000 Da olan formunun kolorimetrik ölçüm sonuçları Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonlar da dahil olmak üzere, canlılık miktarları kontrolden önemli bir fark göstermemiştir. Hücrelerin mikroskopik gözlemleri de bu sonuçları desteklemektedir.

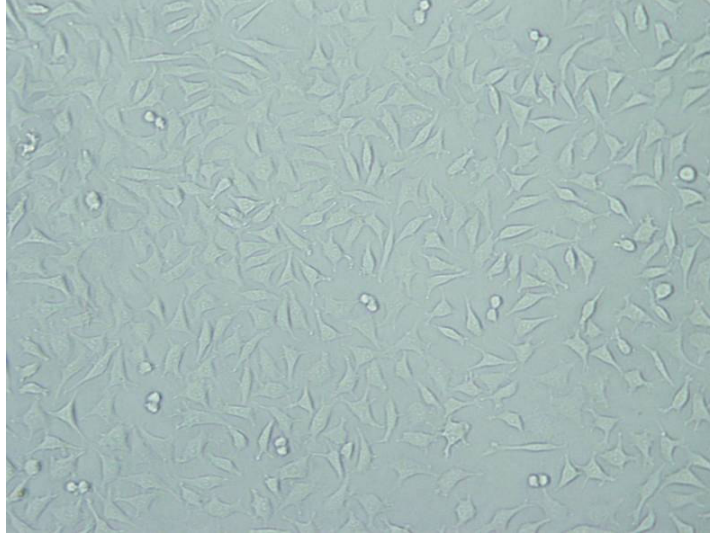
Çizelge 4.6 PEG'in (MA:1,000 Da) farklı konsantrasyonlarının MCF 7 hücrelerinin canlılığına etkisi



Sonuç olarak, PEG'in farklı konsantrasyonlarda (0,1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml ve 15 mg/ml) bulunduğu kültür ortamında, MCF 7 hücrelerinin morfolojik özellikleri ve miktarca canlılık ölçümleri kontrole göre fark göstermemiştir. Bu durum PEG'in denenen bütün molekül ağırlıklarında da (4,600 Da, 2,000 Da, 1,000 Da) tespit edilmiştir. Kısaca PEG'in incelenen konsantrasyonlarında, PAA'dan farklı olarak, hücreler üzerinde toksik etkisi yoktur.

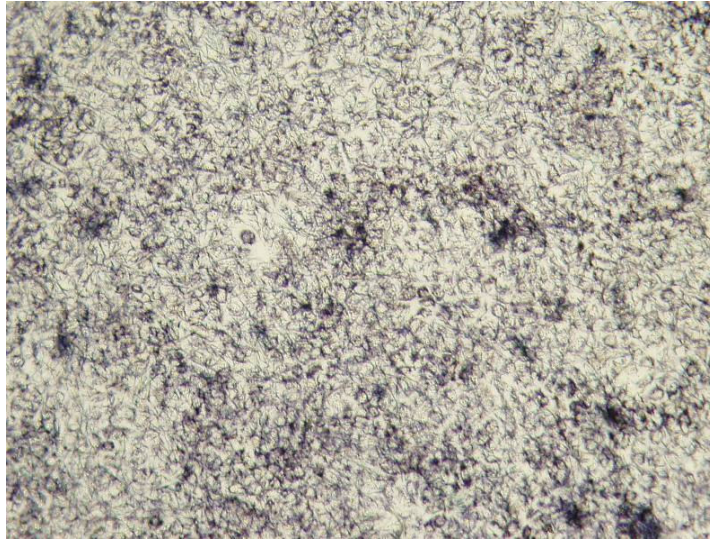
4.2 Polimerlerin Toksik Etkisinin L-929 Hücre Kültüründe İncelenmesi

Farklı molekül ağırlıklı polimerlerin toksik etkisini incelemek üzere her bir kuyucukta 10,000 L-929 hücresi olacak şekilde 96 kuyucuklu plağa ekim yapıldı ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücrelerin genel durumu ters mikroskopla incelendi. Şekil 4.27'de hücrelerin intak, uzantılarının sağlam, yüzey kaplamalarının ve parlaklıklarının normal olduğu görüldü. Polimersiz kültür ortamına MTT eklenerek 4 saat inkübe edildi ve formazan kristallerinin oluşumu değerlendirildi.



Şekil 4.27 L-929 hücrelerinin 48 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü (MTT eklenmeden önce) (20x).

Şekil 4.28’de MTT ile inkübasyon sonrası oluşan formazan kristallerinin görüntüsü verilmiştir. Hücrelerde canlılıkları ile orantılı olarak mor renkli formazan kristalleri oluşmuştur.



Şekil 4.28 L-929 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu (24 saat inkübasyon sonrası, MTT eklendikten sonra) (20x).

Mikroplaktaki tüm kuyucuklar tek tek incelendi. Hücrelerin eşit olarak dağıldığı, yüzey kaplamalarının gerçekleştiği ve hücrelerin canlılıklarının normal olduğu tespit edildi. Polimer deneyleri için bu hücre miktarı (10.000 hücre/ml) ve 48 saatlik inkübasyon süresi kullanıldı.

L-929 hücrelerinin kültür ortamında çoğalması MCF 7 hücrelerinden daha yavaş olduğu için, MCF 7 hücrelerinde 24 saat olan inkübasyon süresi 48 saate çıkarıldı.

4.2.1 Molekül Ağırlığı 100,000 Da Olan Poliakrilik Asitin L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

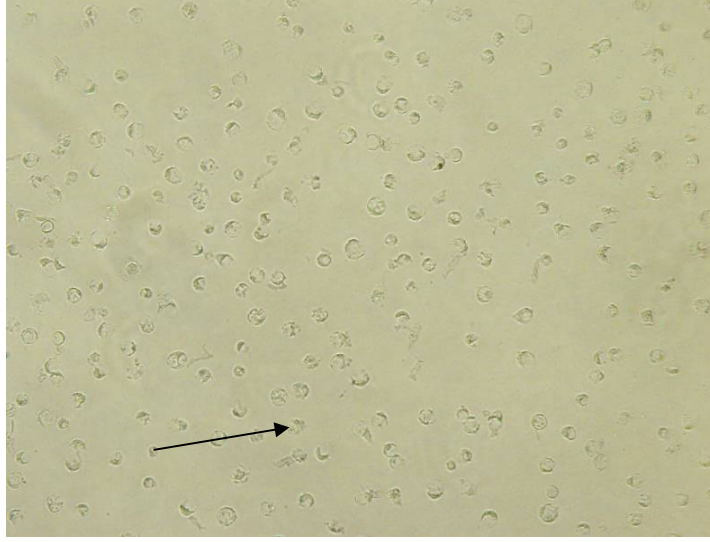
L-929 hücreleri mikropklara ekilip, 48 saat inkübe edildi. Morfolojik özellikleri ve mikropkladaki dağılımları kontrol edildikten sonra molekül ağırlığı 100,000 Da olan poliakrilik asitin (PAA) farklı konsantrasyonları (0,1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml ve 15 mg/ml) eklendi ve 48 saat inkübe edildi. PAA'nın L-929 hücreleri üzerindeki toksik etkisi MTT yöntemi ile incelendi. Ters mikroskop ile morfolojik olarak incelemeleri yapıldı ve formazan kristali oluşumları gözlemlendi.

PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonundaki hücrelerin, morfolojik olarak atipik olduğu görülmüştür. Hücreler yüzey adezyon özelliklerini kaybetmiş ve yuvarlak şekil almış, bazı hücreler dağılmaya başlamıştır (Şekil 4.29).

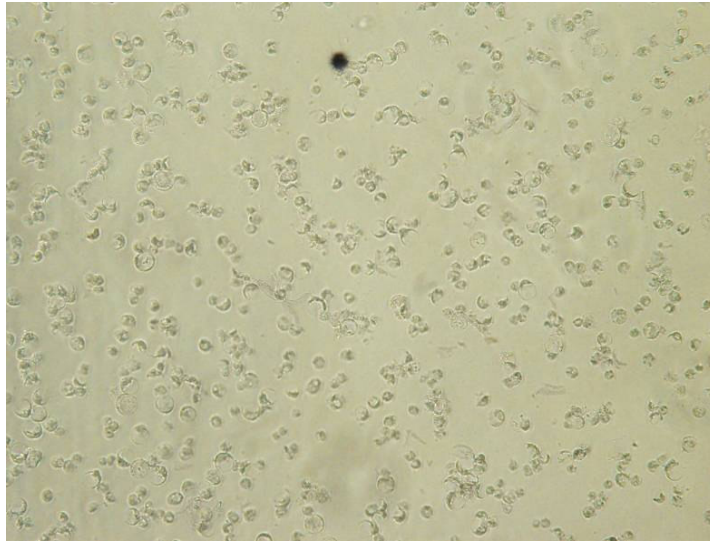


Şekil 4.29 PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunda L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

En yüksek konsantrasyondaki hücrelerle benzer özellikler 10 mg/ml'de de gözlenmiştir. PAA 15 mg/ml ve 10 mg/ml konsantrasyonda L-929 hücrelerinde dejenerasyon meydana getirmiştir. Kültür ortamındaki PAA konsantrasyonu 5 mg/ml'ye düştüğünde, hücreler atipik morfolojiye sahip olduğu, bazı bölgelerde formazan kristali oluşturduğu görülmektedir. Hücreler dejenere olmuşlar, ancak canlılıkları az da olsa devam ettiği için mitokondrial aktivite ile formazan kristali oluşturmuşlardır (Şekil 4.30, 4.31).

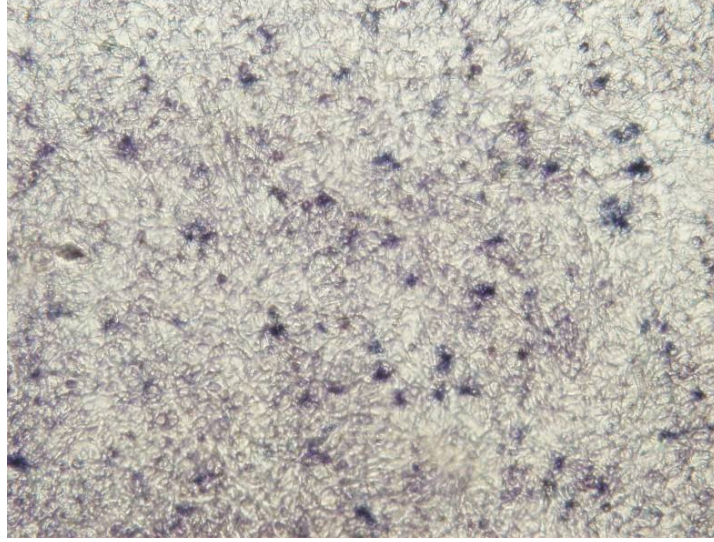


Şekil 4.30 PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunda L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.31 PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunda L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

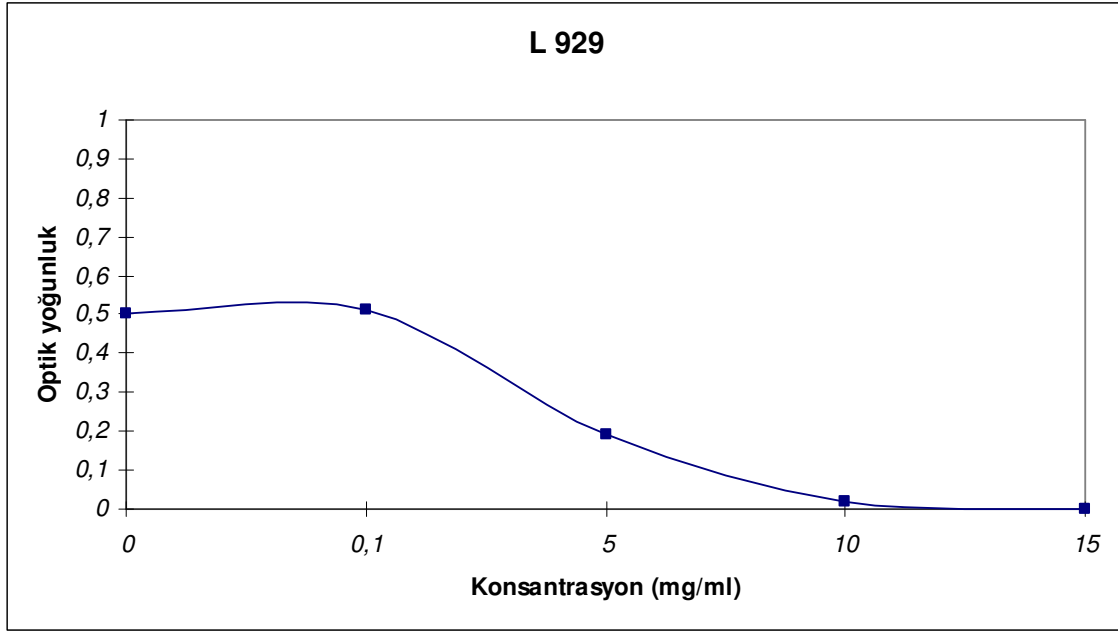
Denenen en düşük konsantrasyon olan 0,1 mg/ml'de hücrelerin morfolojik yapıları intak olup formazan kristali oluşumları da kontrole nazaran önemli fark göstermemiştir (Şekil 4.32). Polimerin 0,1 mg/ml konsantrasyonu, hücrelerde dejeneratif etki meydana getirmemiştir.



Şekil 4.32 PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunda L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Çizelge 4.7'de PAA'nın (MA: 100,000 Da) farklı konsantrasyonlarının, L-929 hücre canlılığına etkisi miktar olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi 0,1 mg/ml konsantrasyonda kontrol hücrelerine yakın değerler elde edilmiştir. Mikroskopik incelemede de düşük konsantrasyondaki hücrelerin kontrol hücreleri ile benzer özellikte olduğu tespit edilmiş ve Çizelge 4.7 onaylanmıştır. Daha yüksek konsantrasyonlarda hücrelerin canlılıklarının azaldığı görülmektedir. MCF 7 hücrelerine benzer şekilde burada da en toksik etki 15 mg/ml'de tespit edilmiştir (Çizelge 4.1, 4.7). PAA'nın bu molekül ağırlığında, hem L-929 hem de MCF 7 hücreleri için toksik etki gösterdiği ($p<0,05$) ve bu toksik etkinin konsantrasyonla orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7 PAA'nın (MA:100,000 Da) farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi



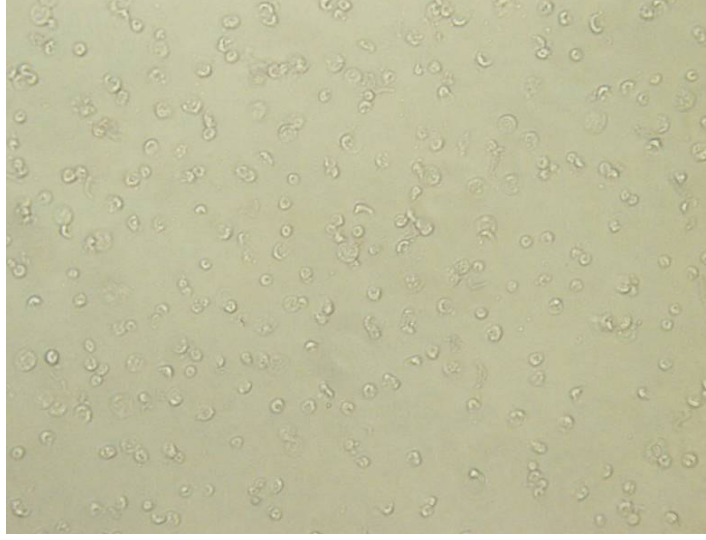
4.2.2 Molekül Ağırlığı 30,000 Da Olan Poliakrilik Asitin L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

Molekül ağırlığı 30,000 Da olan PAA'nın L-929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler incelendiğinde, denenen en yüksek konsantrasyonda hücrelerde sitopatik etki oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.33).

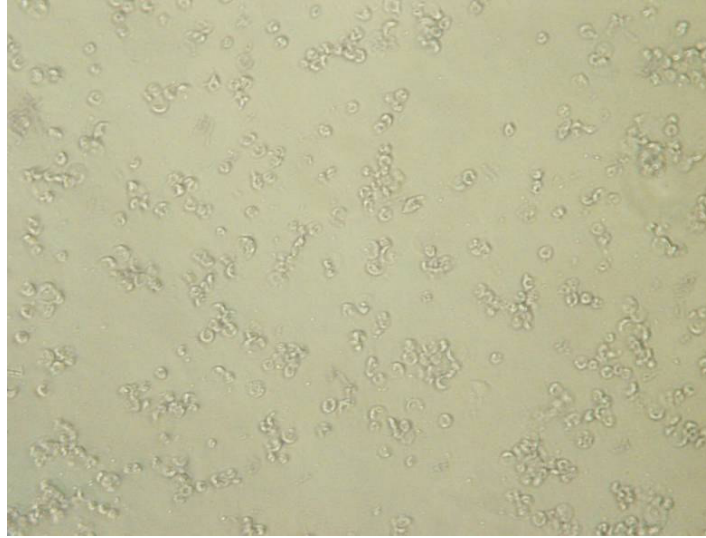


Şekil 4.33 PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Bu durum 10 mg/ml ve 5 mg/ml konsantrasyonlarda da gözlenmektedir. Bu konsantrasyonda da hücreler küçülmüş ve atipik forma dönüşmüştür (Şekil 4.34, 4.35).

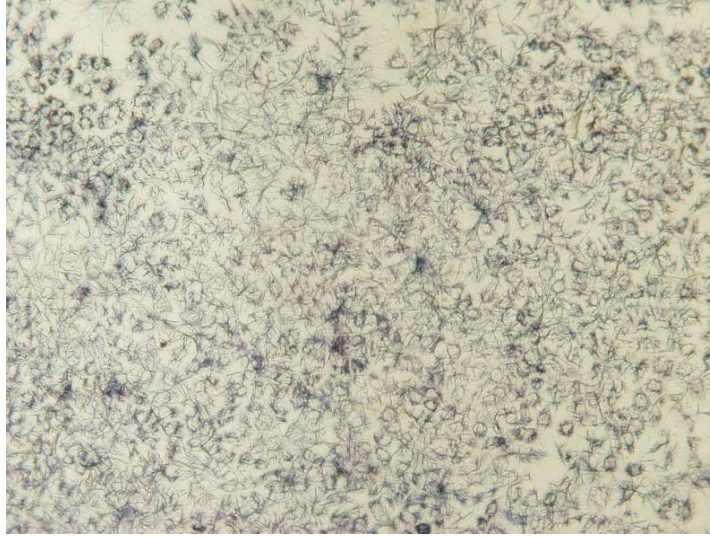


Şekil 4.34 PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.35 PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

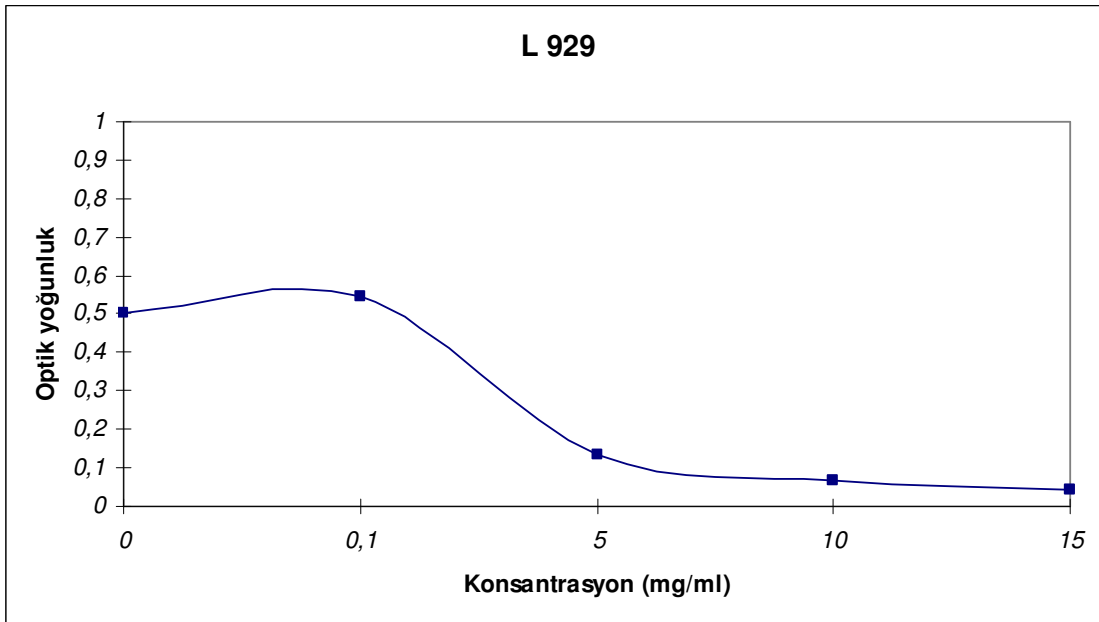
Ancak en düşük konsantrasyonda, hücrelerin morfolojileri ve formazan oluşumlarında kontrole göre önemli bir fark oluşmamıştır (Şekil 4.36).



Şekil 4.36 PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

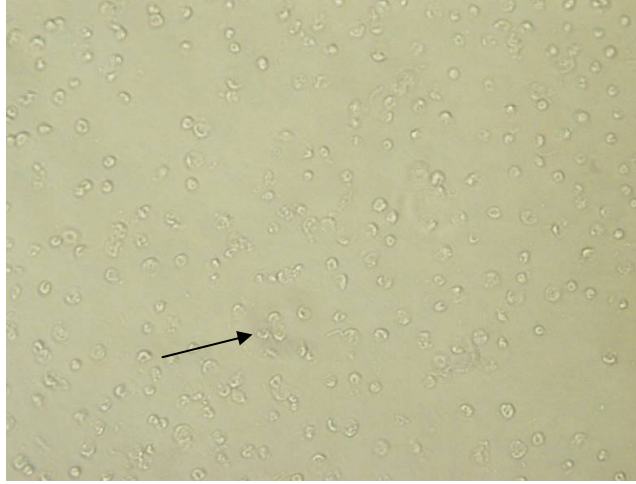
Çizelge 4.8'de molekül ağırlığı 30,000 Da olan PAA'nın, konsantrasyona bağlı olarak, L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi sunulmuştur. En yüksek 3 konsantrasyonda canlılık kontrole göre anlamlı olarak düşmüştür ($p<0,05$). Bu durumda PAA'nın bu molekül ağırlığındaki formunun L-929 hücreleri üzerinde toksik etkisinin özellikle 15, 10, ve 5 mg/ml konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir. En yüksek konsantrasyonda ölçülen optik yoğunluk $0,126\pm0,027$ iken kontrolde bu değer $0,569\pm0,076$ olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.8 PAA'nın (MA:30,000 Da) farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi

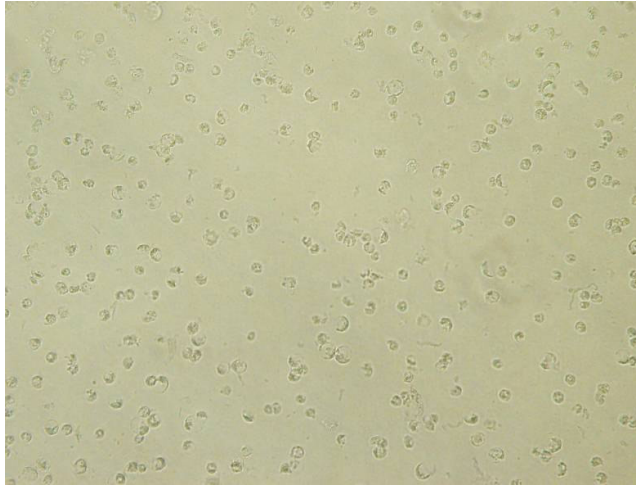


4.2.3 Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Poliakrilik Asitin L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

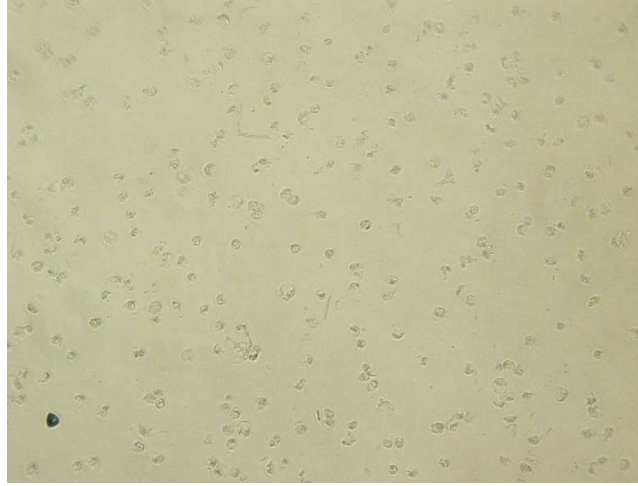
Poliakrilik asitin en düşük molekül ağırlığı olan bu formunun, L-929 hücrelerine toksik ve sitopatik etkisi MTT yöntemi ile incelenmiştir. Morfolojik incelemeler ile yüksek konsantrasyonlarda (5 mg/ml, 10 mg/ml ve 15 mg/ml) hücrelerin deforme olduğu, uzantılarını kaybettiği, büzülüp küçülerek hücreler arası alanda büyük boşluklar meydana getirdiği ve bazı hücrelerin dağılmaya başladığı görülmüştür (Şekil 4.37, 4.38, 4.39).



Şekil 4.37 PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

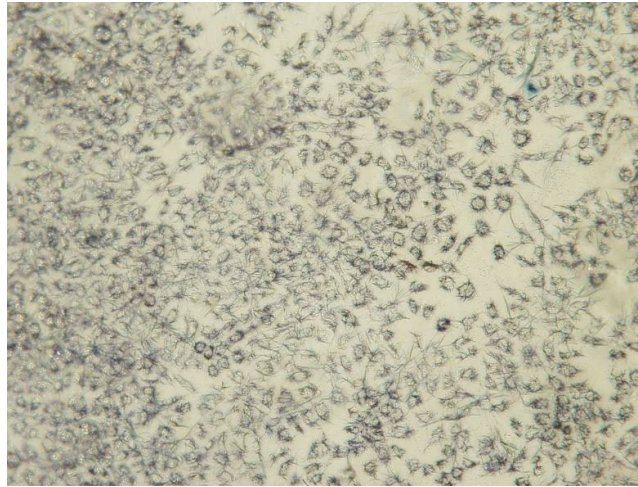


Şekil 4.38 PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.39 PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

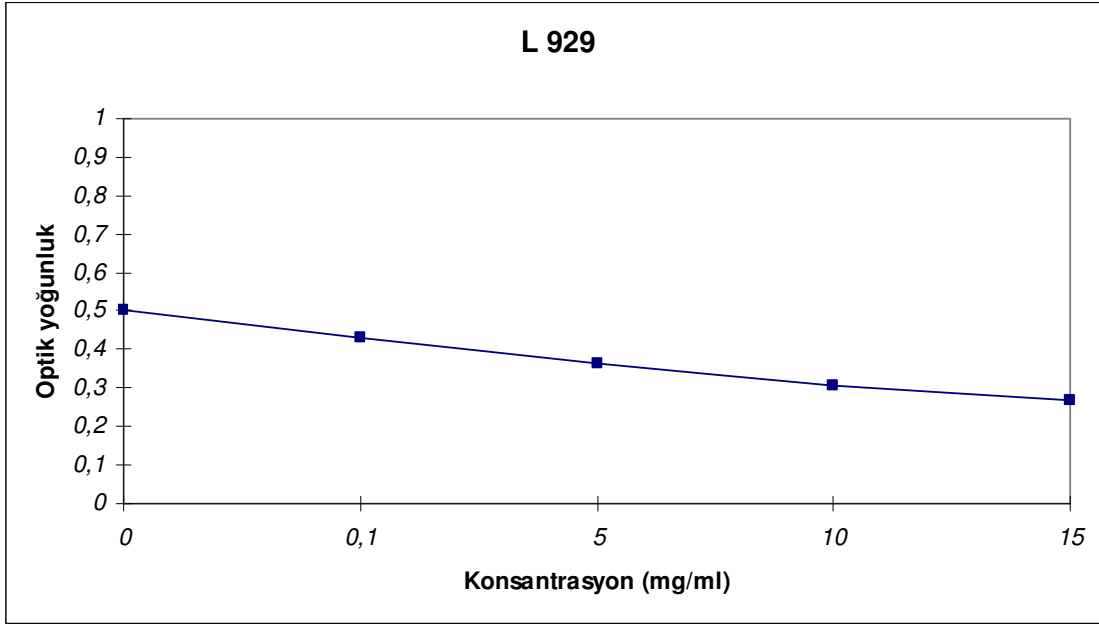
L-929 hücreleri, sadece en düşük konsantrasyonda (0,1 mg/ml) canlılık ve morfolojilerini korumuştur (Şekil 4.40).



Şekil 4.40 PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi, polimerin artan konsantrasyonunda hücrelerin canlılıkları azalmaktadır. Morfolojik incelemeler ve MTT ölçümü sonucu PAA'nın (MA: 2,000 Da) hücreler için toksik ve dejeneratif olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9 PAA'nın (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi

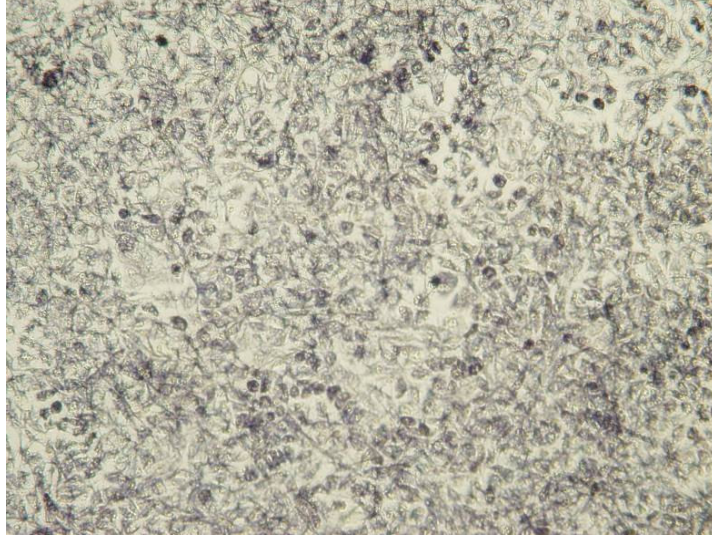


L-929 hücrelerinin, MCF 7 hücrelerine benzer şekilde PAA'nın denenen tüm molekül ağırlıklarında toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu etki genelde 0,1 mg/ml'den sonraki konsantrasyonlarda başlamış ve hücreler bozulup dejenere olmuştur. PAA özellikle 5 mg/ml konsantrasyondan itibaren MCF 7 ve L-929 hücreleri için toksik etki gösteren bir polimerdir.

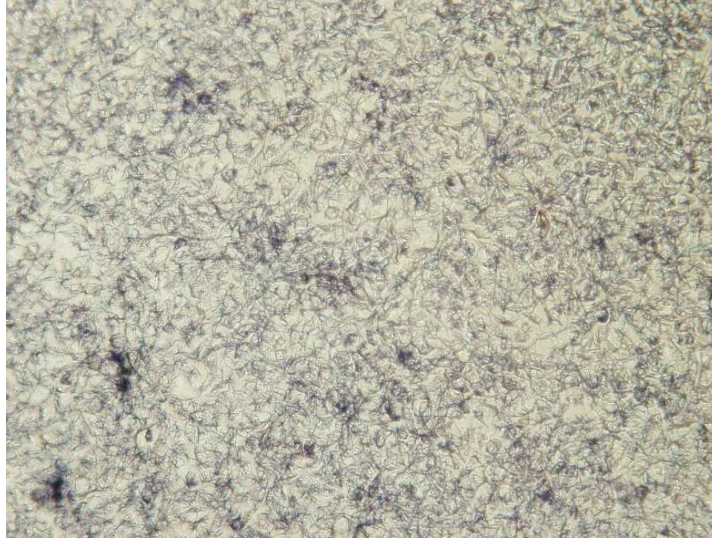
4.2.4 Molekül Ağırlığı 4,600 Da Olan Polietilen Glikolün L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

Polietilen glikolün 3 farklı molekül ağırlığına sahip formlarının L-929 hücreleri üzerindeki 48 saatlik toksik ve sitopatik etkisi incelenmiştir. Bunun için aynı polimer konsantrasyonları kullanılmıştır.

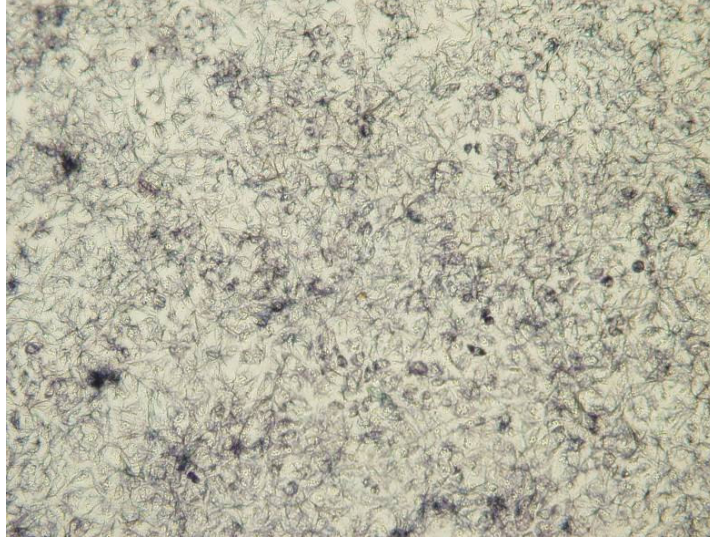
Morfolojik incelemelerde PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunda hücrelerin dejeneratif etki görmedikleri tespit edilmiştir. Hücresel morfolojiler kontrol ile önemli bir fark göstermemiştir. Bu durum daha düşük konsantrasyonlarda da (0,1 mg/ml, 5 mg/ml ve 10 mg/ml) da tespit edilmiştir. Hücreler yüzey tutunmalarını gerçekleştirmiş ve oldukça sağlıklı görünmüştür. Ayrıca PEG'in uygulanan tüm konsantrasyonlarda hücrelerin formazan kristali üretimi oldukça yüksek olup kontrole yakındır (Şekil 4.41, 4.42, 4.43 ve 4.44). PAA'nın yüksek konsantrasyonlarında görülen atipik formdaki büzülmüş ve dağılmaya başlayan L-929 hücreleri PEG'de gözlenmemiştir.



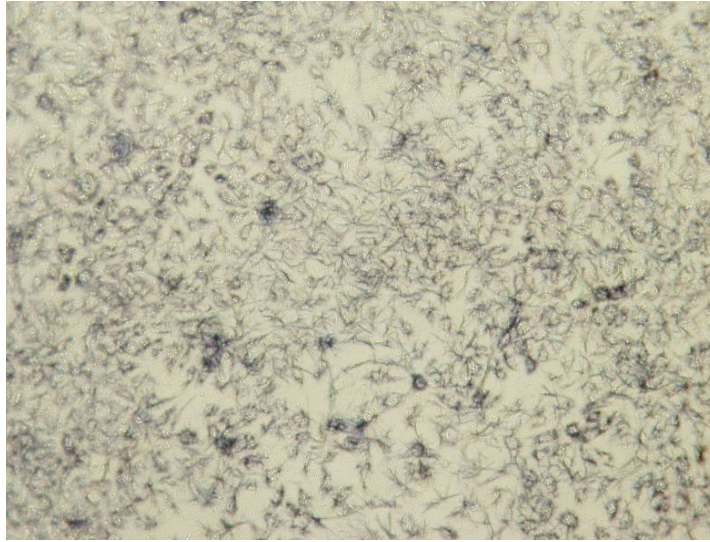
Şekil 4.41 PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.42 PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



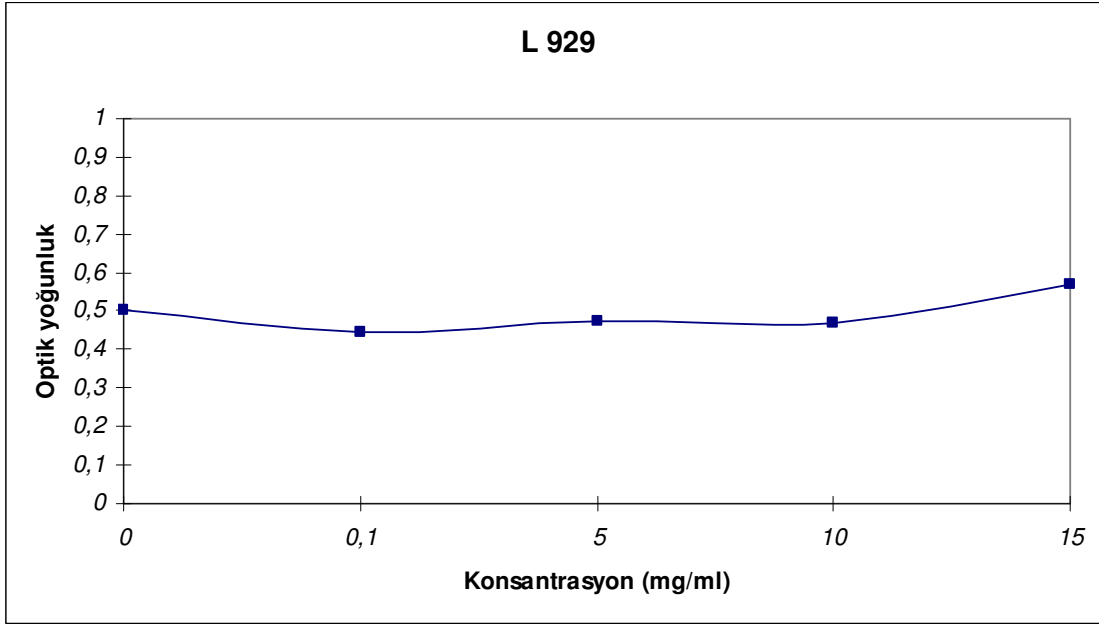
Şekil 4.43 PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi incelemesi (20x).



Şekil 4.44 PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi incelemesi (20x).

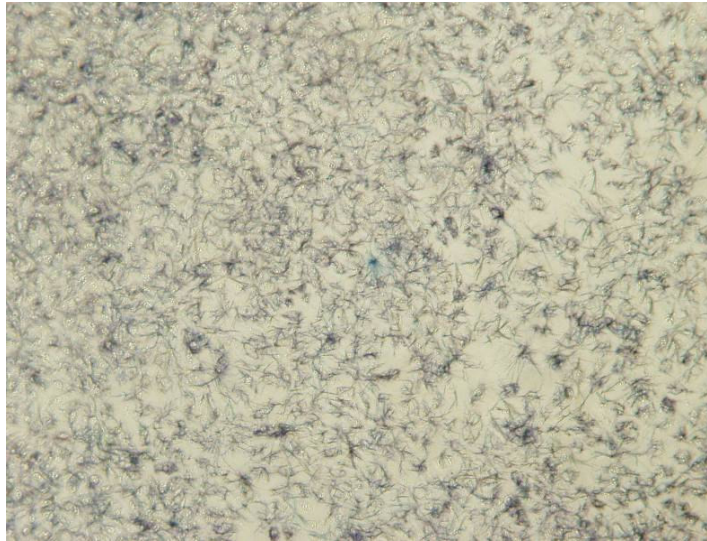
PEG'in (MA: 4,600 Da), 4 farklı konsantrasyonu ile 48 saat inkübe edilen L-929 hücrelerinin canlılıkları kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Canlılığın konsantrasyona bağlı değişimleri Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. İncelenen konsantrasyonlardaki hücre canlılığı kontrole göre fark göstermemiştir. Sonuç olarak PAA'dan farklı olarak, PEG hücrelerde toksik ve sitopatik etki oluşturmamıştır.

Çizelge 4.10 PEG'in (MA:4,600 Da) farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi



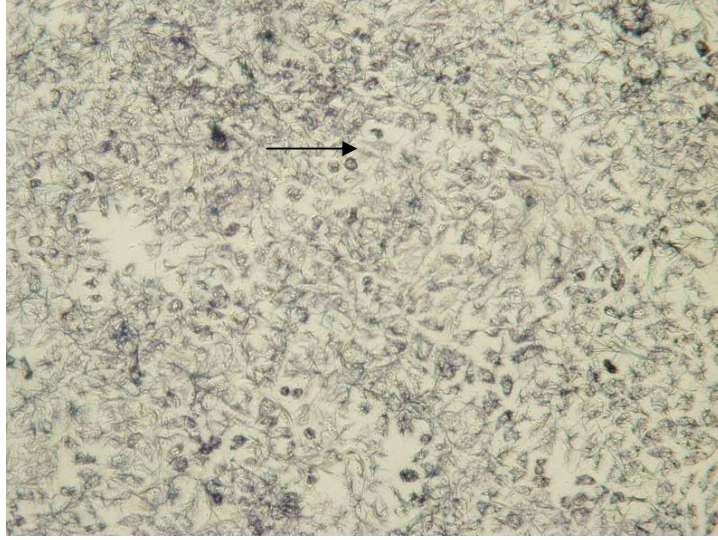
4.2.5 Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Polietilen Glikolün L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

Polietilen glikolün L-929 hücrelerindeki toksik etkisi konsantrasyonuna bağlı olarak incelenmiştir. Morfolojik incelemelere göre, 15 mg/ml konsantrasyonda hücrelerin genel durumlarının iyi olduğu, yüzeye tutunma özelliklerini koruduğu, uzantılarını kaybetmedikleri tespit edilmiştir. Formazan kristali oluşumu da kontrole yakın miktardadır (Şekil 4.45).

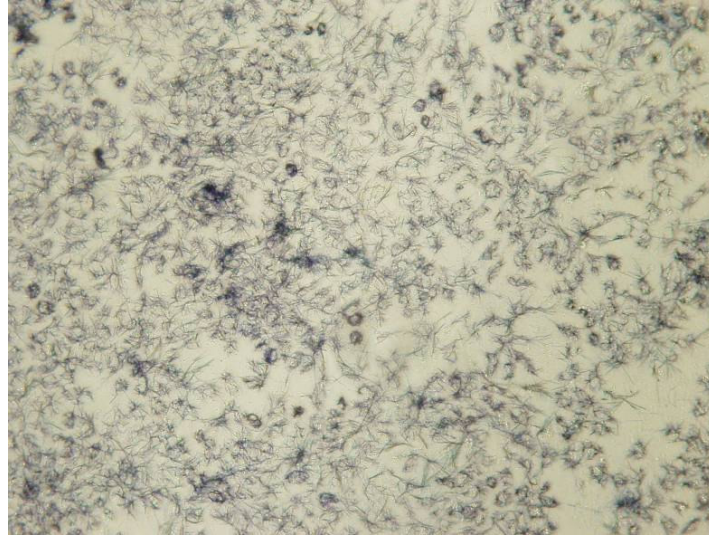


Şekil 4.45 PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

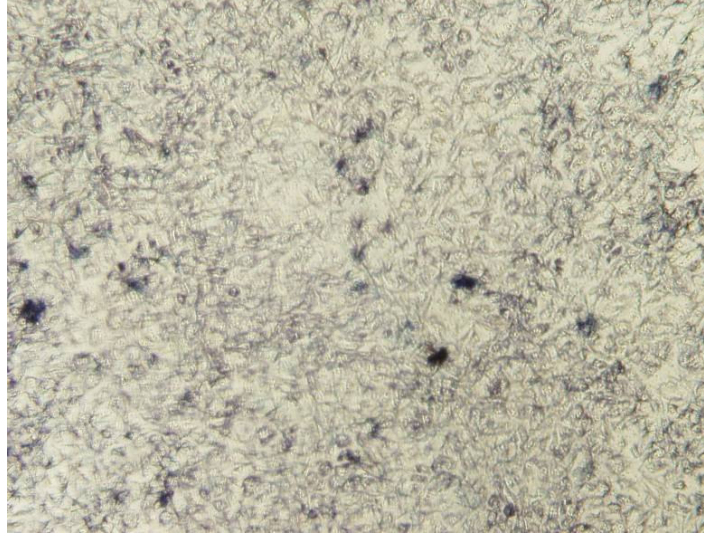
Bu durum 10 mg/ml, 5 mg/ml ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarda da görülmektedir (Şekil 4.46, 4.47, 4.48). Bütün konsantrasyonlarda hücrelerin genel morfolojik özelliklerinin normal olması, PEG'in bu formunun L-929 hücreleri üzerinde dejeneratif etkisinin olmadığını göstermiştir. Bu durum MCF 7 hücrelerindeki tespitlere benzerdir.



Şekil 4.46 PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



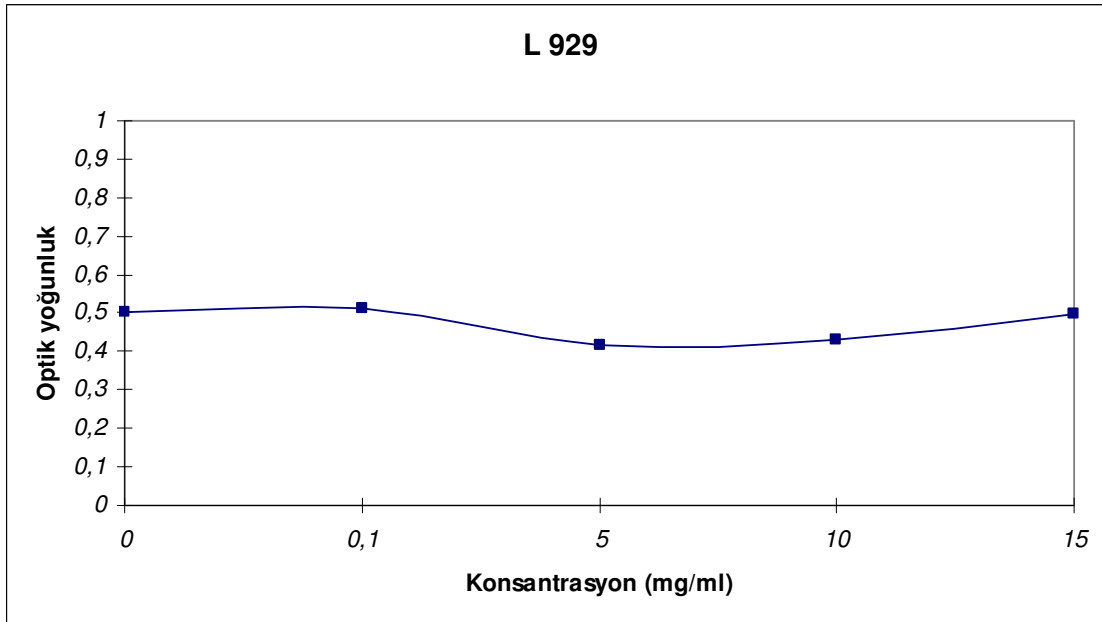
Şekil 4.47 PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.48 PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

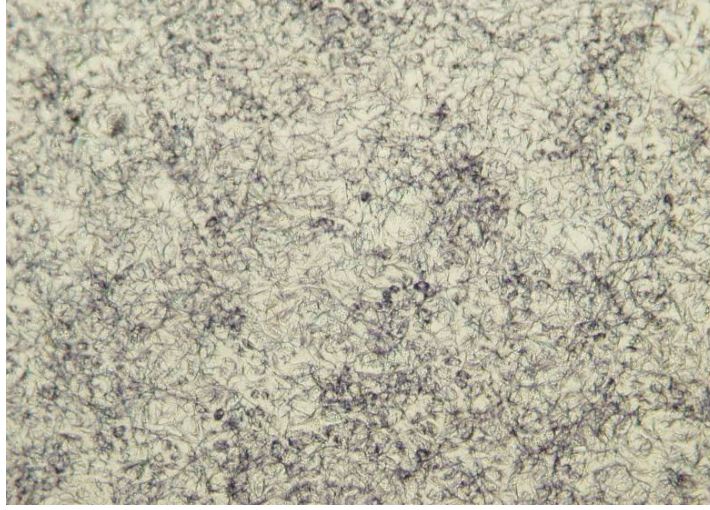
Yapılan kolorimetrik ölçüm ile PEG'in L-929 hücre canlılığına etkisi Çizelge 4.11'de gösterilmiştir. İncelenen bütün konsantrasyonlarda, hücrelerin canlılığı kontrole göre önemli bir fark göstermemiştir. Morfolojik incelemeler ve canlılığın ölçülmesi ile PEG'in L-929 hücreleri için toksik ve sitopatik etki etmediği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11 PEG'in (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi

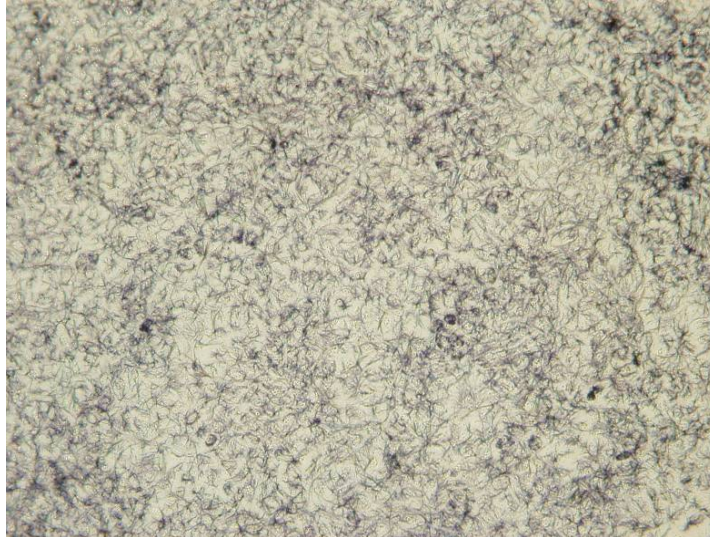


4.2.6 Molekül Ağırlığı 1,000 Da Olan Polietilen Glikolün L-929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

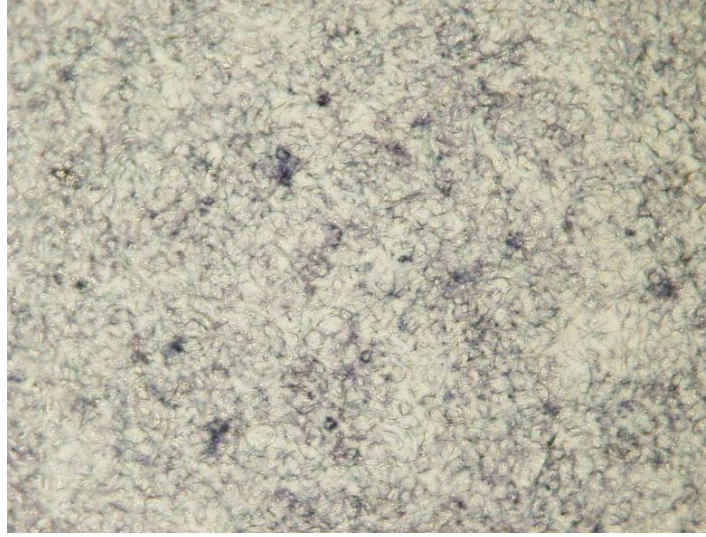
Polietilen glikolün en düşük molekül ağırlığının hücreler üzerindeki etkisi morfolojik olarak incelendiğinde, denenen bütün konsantrasyonlarda, hücrelerin uzantıların düzgün olduğu ve canlılık, parlaklık, hücre yoğunluklarının kontrole göre önemli bir fark göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.49, 4.50, 4.51, 4.52).



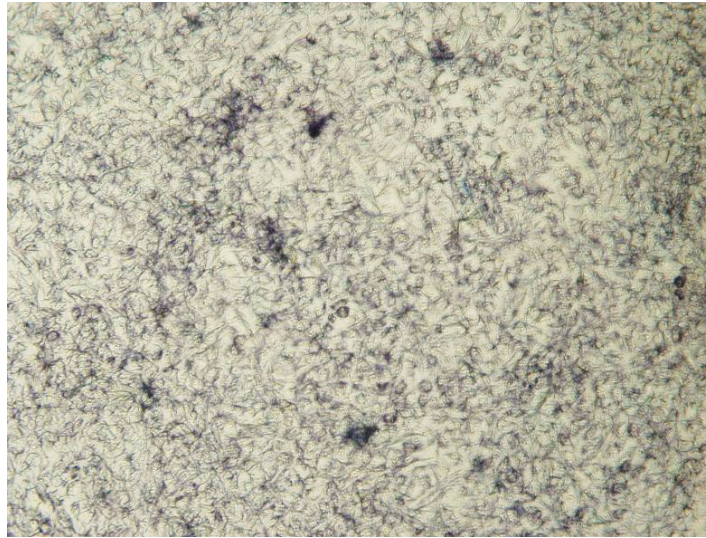
Şekil 4.49 PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.50 PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.51 PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

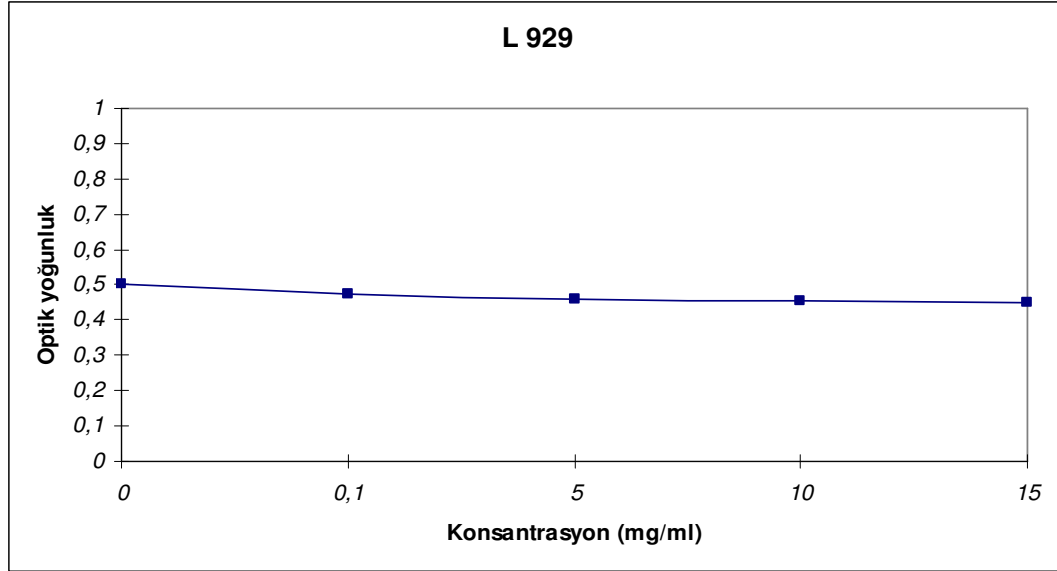


Şekil 4.52 PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun L-929 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

İncelenen tüm konsantrasyonlarda hücrelerin canlılıklarını korumaları ve formazan kristali üretimlerinin yüksek olması, bu polimerin denenen bu konsantrasyonların MCF 7 hücrelerine benzer şekilde L-929 hücreleri için de toksik olmadığını göstermektedir.

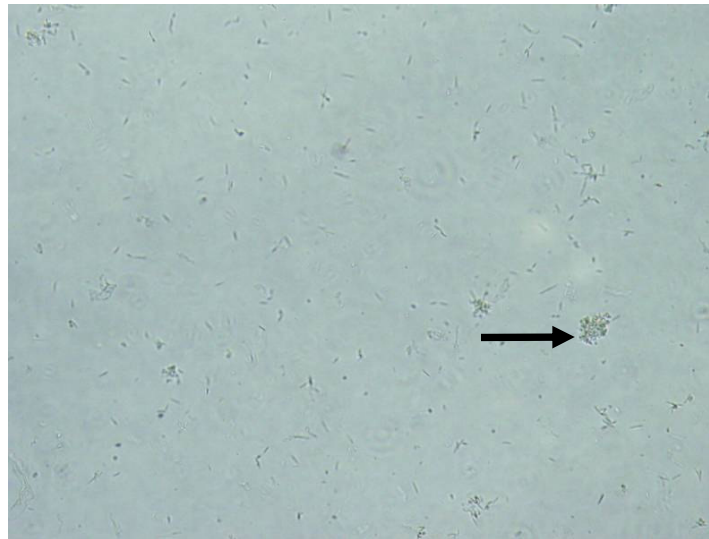
Molekül ağırlığı 1,000 Da olan PEG'in L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi Çizelge 4.12'de verilmiştir. Yüksek konsantrasyonlar da dahil olmak üzere bütün konsantrasyonlarda canlılık oranlarının kontrole yakın olduğu görülmektedir. Mikroskopik incelemeleri de desteklemekte olan bu bulgular ile PEG'in L-929 hücrelerinde toksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12 PEG'in (MA:1,000 Da) farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinde canlılığına etkisi



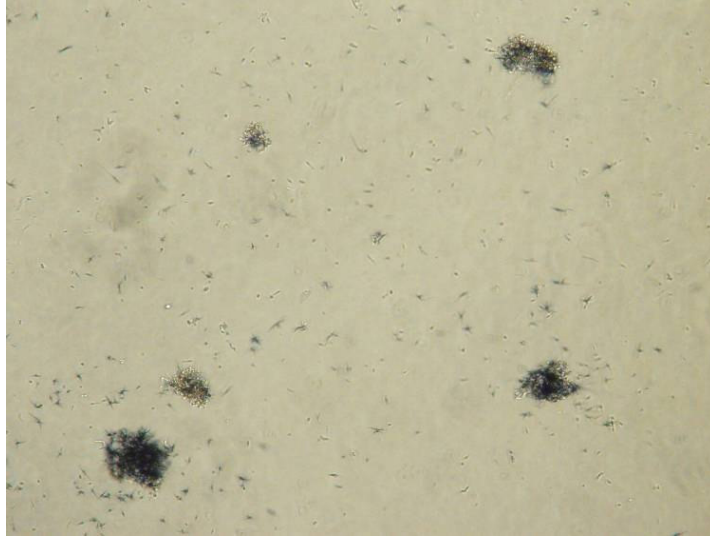
4.3 Polimerlerin Toksik Etkisinin Ep39 Hücre Kültüründe İncelenmesi

Leishmania promastigotları (Ep39) üzerinde polimerlerin toksik etkisini incelemek amacı ile 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 30,000 hücre ekilip, 48 saat inkübe edildi. Hücrelerin morfolojileri, aktifliği ve oluşturdukları kümelerin karakterizasyonu invert mikroskop ile incelendi. Mikroskopik inceleme ile mikropilaka ekilen Ep39 hücrelerinin çoğalmalarının normal olduğu gözlemlendi. Her bir kuyucukta hücrelerin ve oluşturdukları kümelerin aktif olduğu, hareketliliğin tipik olduğu tespit edildi (Şekil 4.53).



Şekil 4.53 Ep39 hücrelerinin 48 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü (MTT eklenmeden önce) (20x).

MTT eklendikten sonra, formazan kristali oluşumları Şekil 4.54’de görülmektedir. Burada kümelerde daha belirgin olmak üzere, mor renkli formazan kristali oluşumu vardır.



Şekil 4.54 Ep 39 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu (24 saat inkübasyon sonrası, MTT eklendikten sonra) (20x).

Ep39 hücrelerinde formazan kristalleri oluşumundan sonra da hareketliliklerin devam ettiği mikroskopik olarak gözlenmiştir.

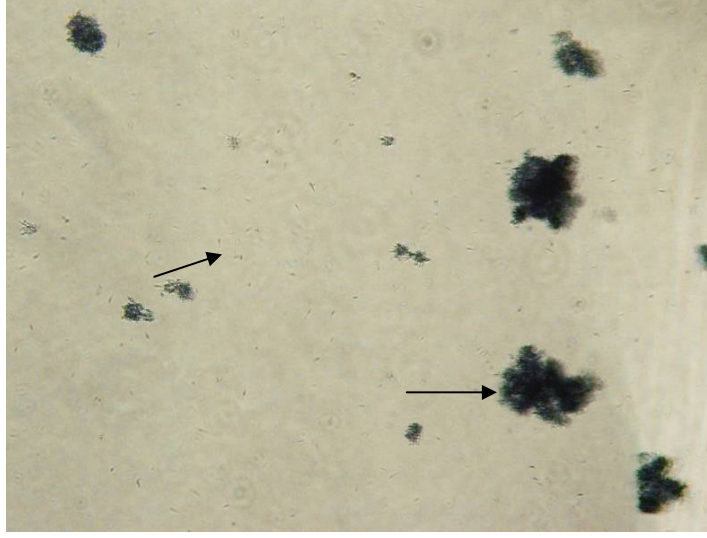
Sonuç olarak mikropakta kullandığımız hücre miktarının (30,000 hücre/kuyucuk) 48 saat inkübasyon süresinde normal bir şekilde çoğaldıkları, kümelerin ve tek tek hücrelerin aktif olduğu görülmüştür. Sonuçta hem morfolojik incelemeler, hem de formazan oluşumları polimer çalışmaları için bu protokolün uygun olduğunu göstermektedir. Bu sebeple farklı polimerlerin, kültür ortamındaki toksik etkisini incelemek için çalışmalarımızda bu protokol uygulanmıştır. Yaptığımız çalışmalarda Şekil 4.53 ve 4.54 morfolojik incelemeler için kontrol olarak kabul edilmiştir.

4.3.1 Molekül Ağırlığı 100,000 Da Olan Poliakrilik Asitin Ep39 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

Deneysel çalışmalar bölümünde anlatıldığı şekilde (30,000 hücre/kuyucuk) ekilen Ep 39 hücreleri 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası poliakrilik asitin (MA: 100,000 Da) farklı konsantrasyonları (0,1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml ve 15 mg/ml) Ep39 kültür ortamına eklendi ve 48 saat inkübe edildi.

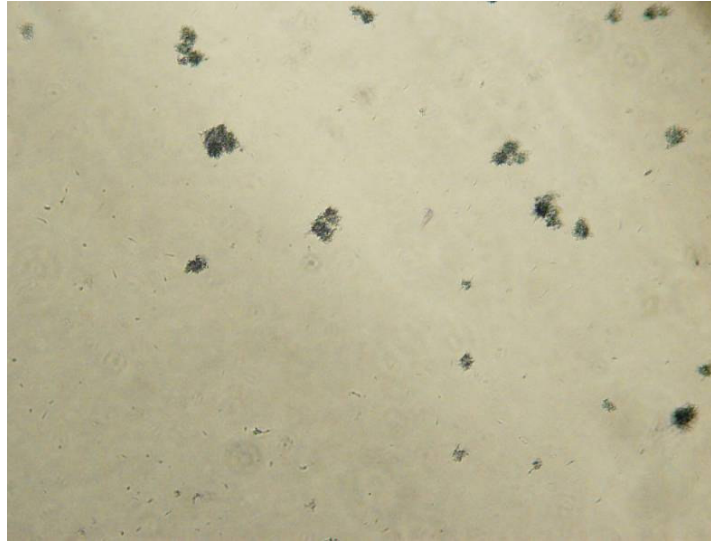
PAA’nın en yüksek konsantrasyonu (15 mg/ml) bulunan kültür ortamında, polimer eklenmesini takiben hücrelerin hareketliliğinde ve aktifliğinde azalma olduğu gözlemlendi.

Morfolojik inceleme ile Ep39 hücrelerinin oluşturdıkları kümelerin yüksek konsantrasyonlarda daha büyük olduğu ve formazan kristallerinin özellikle kümelerin orta kısımlarında olduğu, tekli hücrelerin ise küçüldükleri tespit edildi (Şekil 4.55).



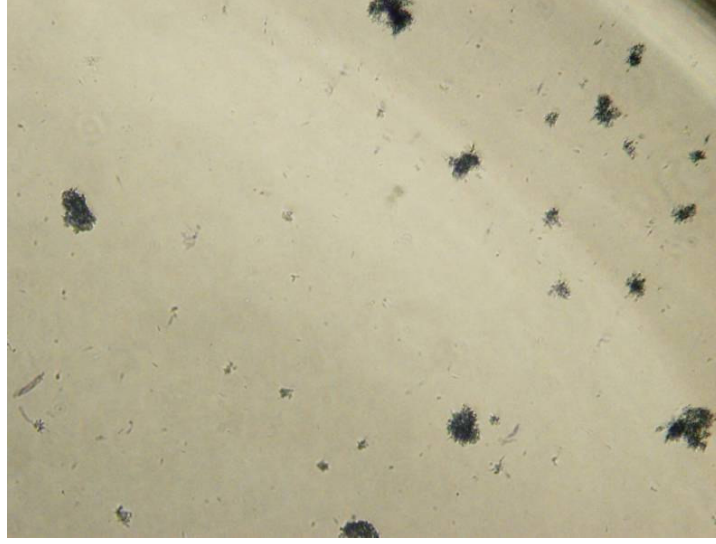
Şekil 4.55 PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Şekil 4.56'da verilen 10 mg/ml konsantrasyondaki gözlemler 15 mg/ml ile benzerdir.

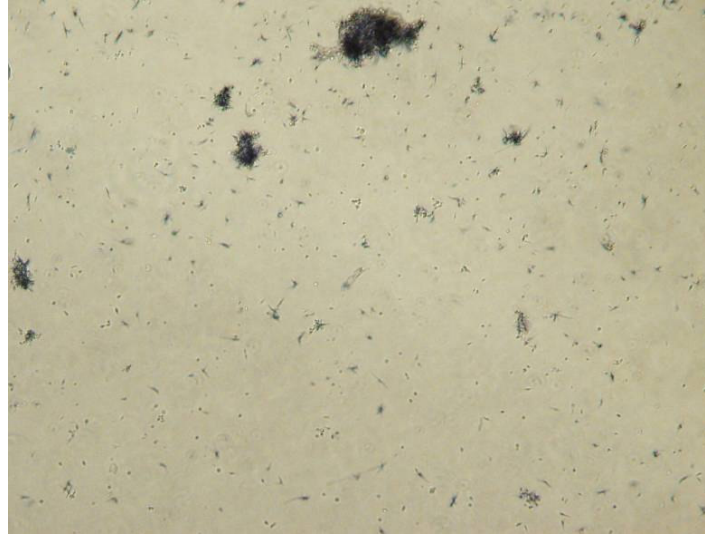


Şekil 4.56. PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Daha düşük konsantrasyonlarda (0,1 ve 5 mg/ml) ise küme oluşturmamış, intak, hareketleri aktif hücrelerin olduğu görülmüştür (Şekil 4.57, 4.58).



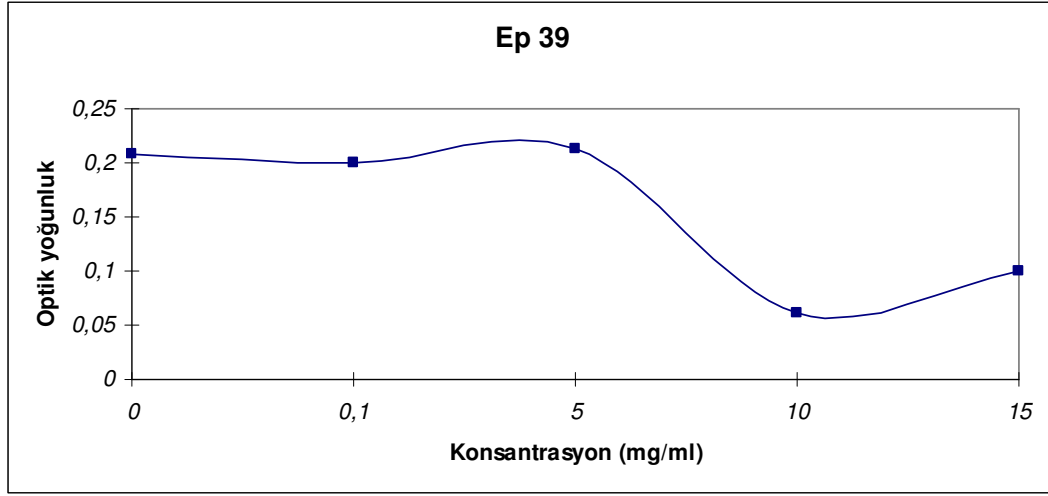
Şekil 4.57 PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.58 PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Morfolojik incelemeler sonrasında formazan kristalleri çözündürülmüş ve optik yoğunluğu ölçülmüştür. Çizelge 4.13'de PAA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi verilmiştir. PAA'nın 0,1 mg/ml ve 0,5 mg/ml konsantrasyonda bulunduğu kültür ortamındaki Ep39 hücre canlılığı kontrol ile benzerdir. Konsantrasyonun artışı ile canlılığın azaldığı görülmüştür. Toksik etkinin en yüksek olduğu konsantrasyon 10 mg/ml olup (optik yoğunluk $0,06 \pm 0,02$), 15 mg/ml konsantrasyonda da ($0,1 \pm 0,05$) hücre canlılığı kontrole göre ($0,34 \pm 0,007$) anlamlı ölçüde düşüktür ($p < 0,05$).

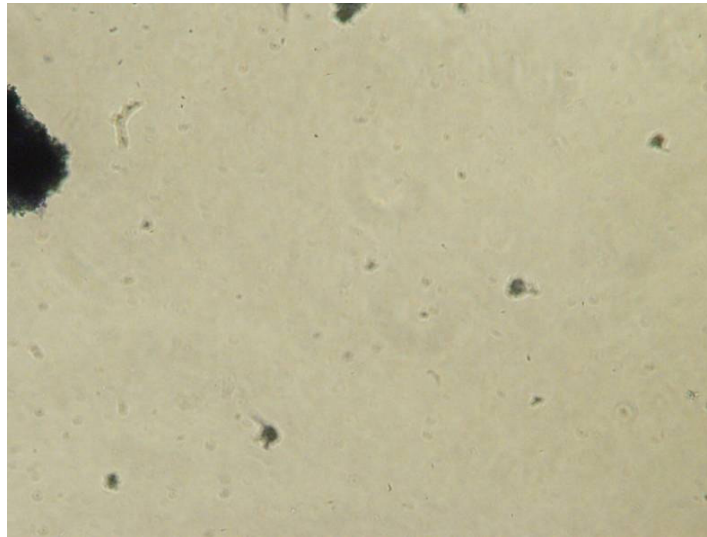
Çizelge 4.13 PAA'nın (MA:100,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi



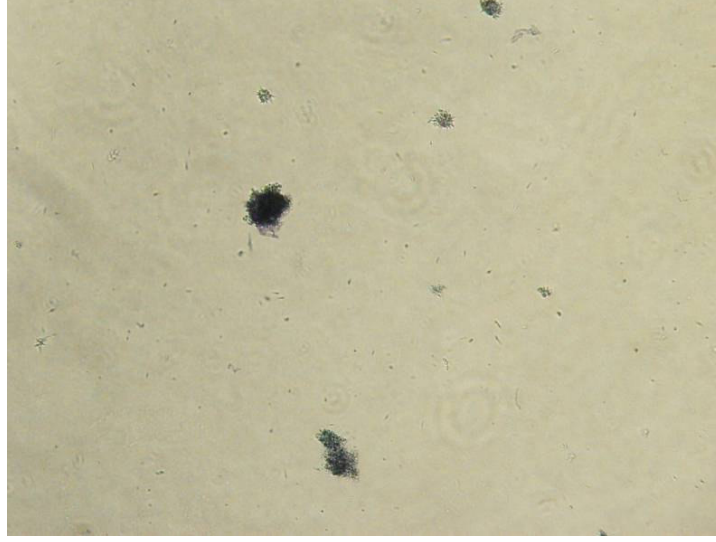
MCF 7 ve L-929 hücrelerinde tespit edilen, PAA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak canlılığın azalması, Ep 39 hücrelerinde de görülmüş ancak farklı olarak toksik etki 0,1 mg/ml'den değil, 5 mg/ml'den itibaren oluşmuştur.

4.3.2 Molekül Ağırlığı 30,000 Da Olan Poliakrilik Asitin Ep 39 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

PAA'nın Ep39 hücreleri üzerindeki toksik etkisinin morfolojik incelemeleri, yüksek konsantrasyonda küme oluşumlarının fazla, oluşan kümelerin boyutlarının büyük olduğunu alanda tek tek aktif hücrelerin az olduğunu gösterdi (Şekil 4.59, 4.60).

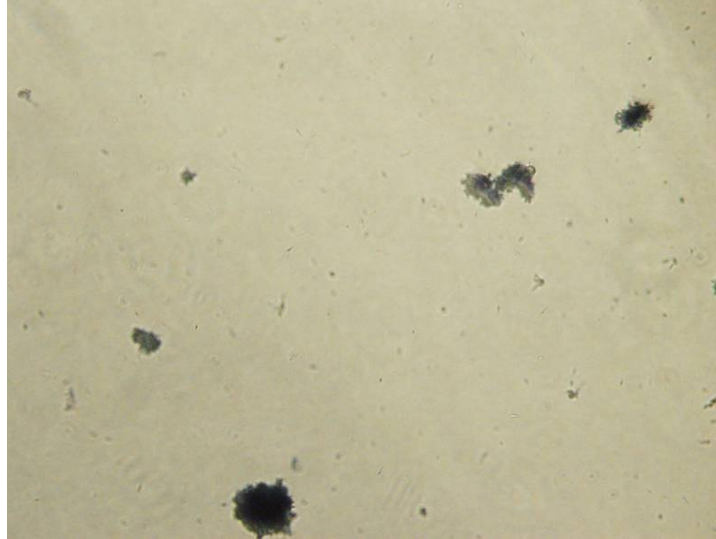


Şekil 4.59 PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

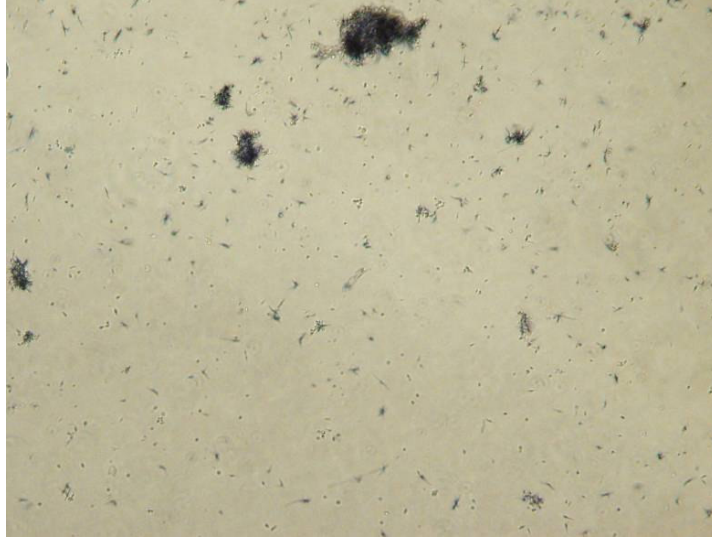


Şekil 4.60 PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Azalan konsantrasyonlarda kümelerin boyutları kontrole benzer olup, kuyucuklarda morfolojileri normal tekli hücrelerin daha yoğun olduğu görülmüştür (Şekil 4.61 ve 4.62).



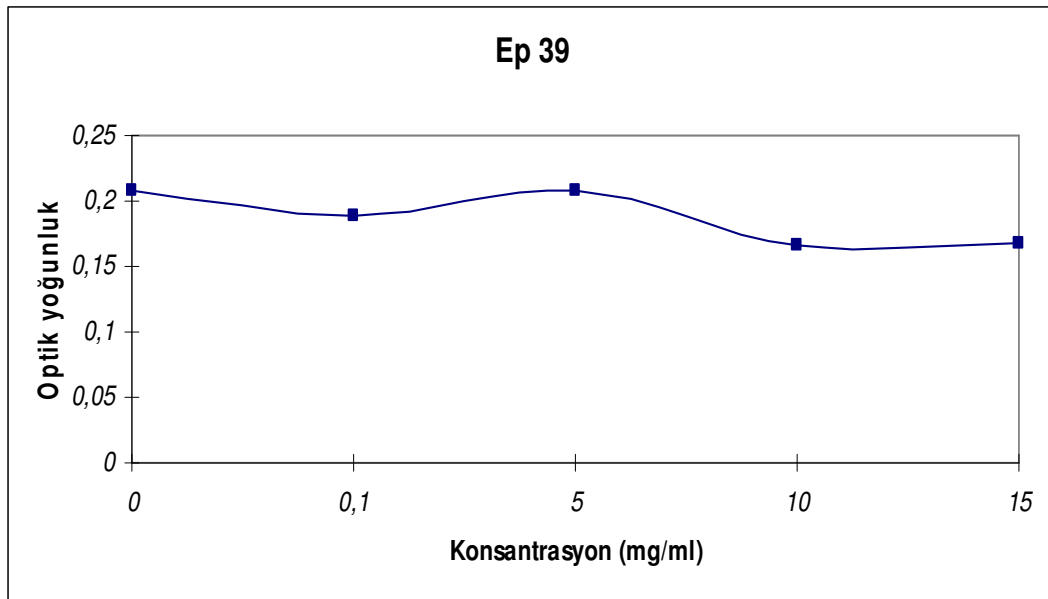
Şekil 4.61 PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.62 PAA'nın 0,1 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Çizelge 4.14'de PAA'nın farklı konsantrasyonlarının Ep 39 hücrelerinin canlılığına etkisi sunulmuştur. PAA'nın en düşük konsantrasyonunda kontrol ile yakın değerler elde edilmiştir. 10 mg/ml ve 15 mg/ml'de ise kontrole göre hafif bir düşüş gözlenmektedir. 10 ve 15 mg/ml konsantrasyonlarda hücre canlılığında kontrole göre düşüş gözlenmiş ancak PAA'nın daha yüksek molekül ağırlığında (MA:100,000 Da) tespit edilen etki kadar belirgin olmamıştır.

Çizelge 4.14 PAA'nın (MA:30,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi



4.3.3 Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Poliakrilik Asitin Ep39 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

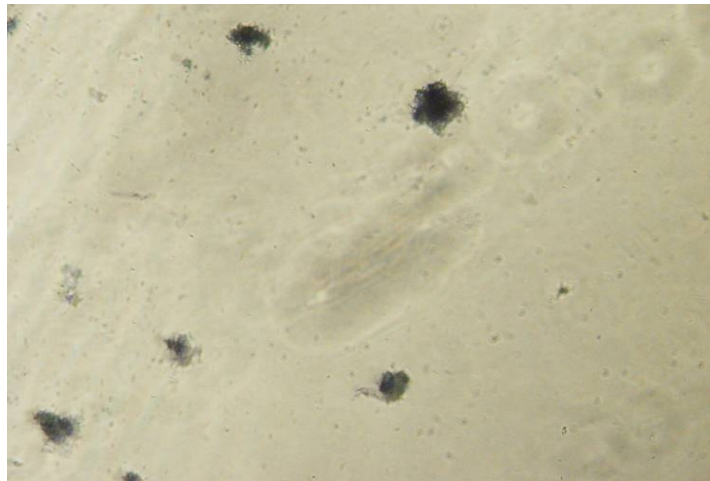
PAA'nın en düşük molekül ağırlığının sitotoksitesisi Ep39 hücreleri üzerinde morfolojik olarak ve MTT yöntemi ile canlılığı ölçülerek incelendi.

Şekil 4.63'de 15 mg/ml konsantrasyonda küme oluşturmamış tekli hücre sayısının oldukça düşük olduğu, tekli bulunan hücrelerin küçülüp dejenere olduğu, tekli hücrelerin hareketliliklerinin oldukça düştüğü görülmüştür.



Şekil 4.63 PAA'nın 15 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

0,1 mg/ml ve 5 mg/ml konsantrasyonda, küme oluşumları normal, hareketleri aktif, morfolojileri kontrole benzer hücreler olduğu görüldü (Şekil 4.64, 4.65).

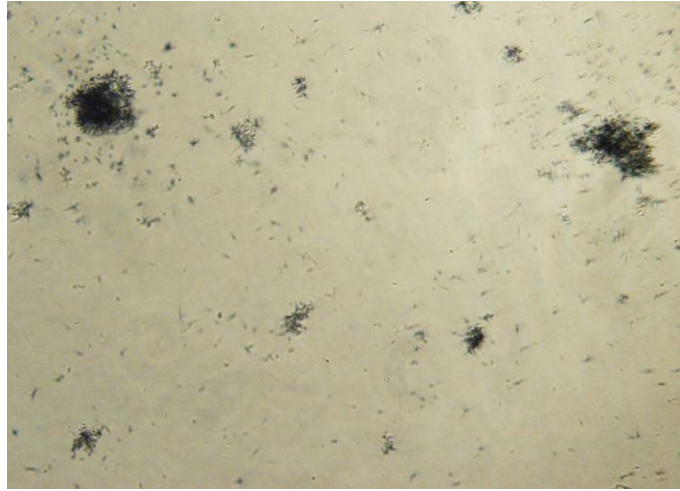


Şekil 4.64 PAA'nın 10 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.65 PAA'nın 5 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

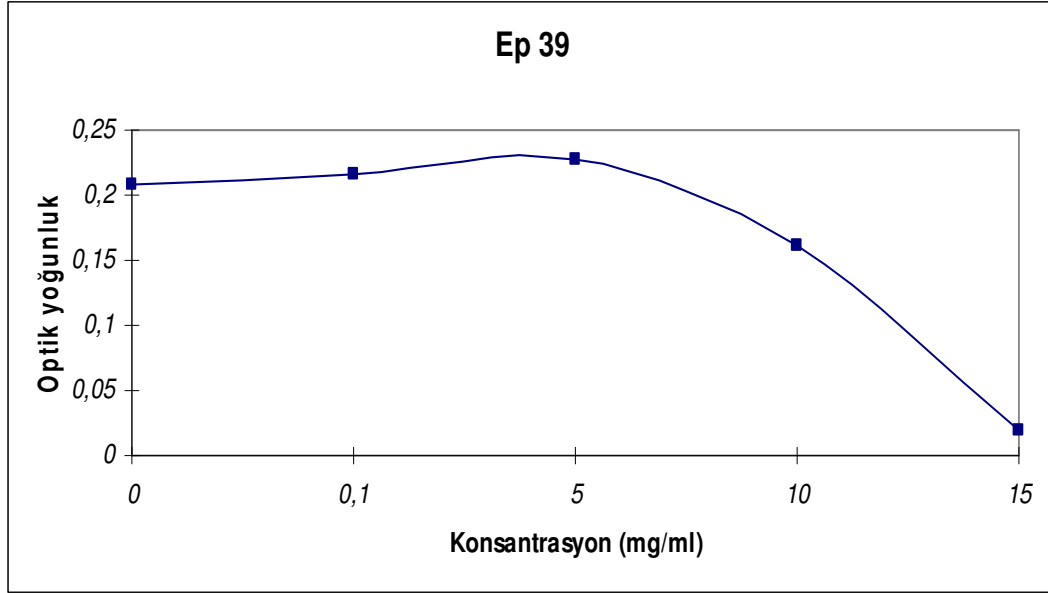
Şekil 4.66'de 0,1 mg/ml konsantrasyonda, mor renkte (formazan nedeniyle), küme oluşturmamış tek tek aktif hücreler görülmektedir.



Şekil 4.66 PAA'nın 0,1mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Çizelge 4.15'de MTT yöntemi ile incelenen, poliakrilik asitin (MA:2000 Da) Ep39 hücreleri üzerindeki toksik etkisi gösterilmektedir. 0,1 mg/ml ve 5 mg/ml konsantrasyonda hücrelerin canlılığında kontrole nazaran fark görülmezken, canlılık 10 mg/ml ve 15 mg/ml konsantrasyonda kontrole nazaran anlamlı derecede düşmüştür.

Çizelge 4.15 PAA'nın (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi



MCF 7 hücre kültüründe toksik etkinin 0,1 mg/ml konsantrasyondan itibaren başladığı görülmektedir. Buna karşılık L-929 hücre kültüründe bu polimerin toksik etkisi çok belirgin olarak görülmemiştir. L-929 hücrelerinin artan konsantrasyonlarında canlılık düşmüş ancak toksik etki MCF 7 ve *Leishmania* hücrelerindeki kadar belirgin ortaya çıkmamıştır. Aynı durum Ep39 hücreleri için PAA'nın molekül ağırlığı 30,000 Da olan formunda da tespit edilmiştir.

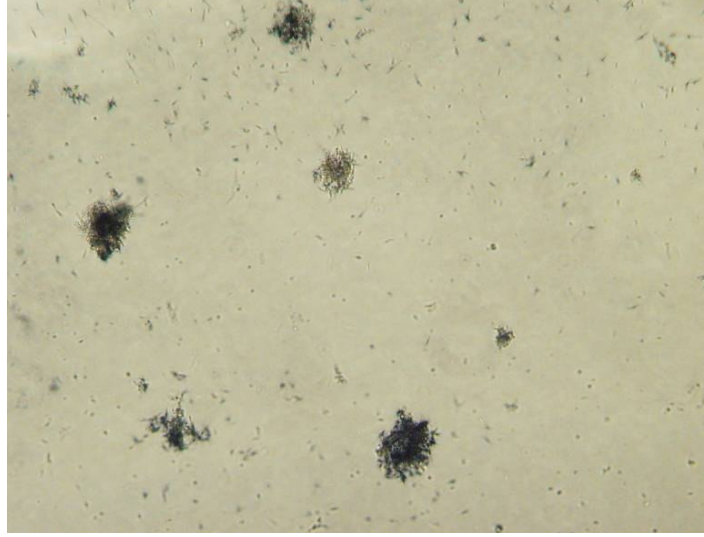
Bu durum bize farklı hücre kültürlerinin farklı şekillerde etkilendiğini ve standart olmadıklarını göstermektedir. Hücreler, farklı polimerlerden hatta aynı polimerin farklı molekül ağırlıklarından farklı şekilde etkilenebilmektedir.

4.3.4 Molekül Ağırlığı 4,600 Olan Polietilen Glikolün Ep39 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

Polietilen glikolün 4 farklı konsantrasyonda bulunduğu kültür ortamında *Leishmania* hücrelerinin morfolojik özellikleri ve canlılıkları incelendi.

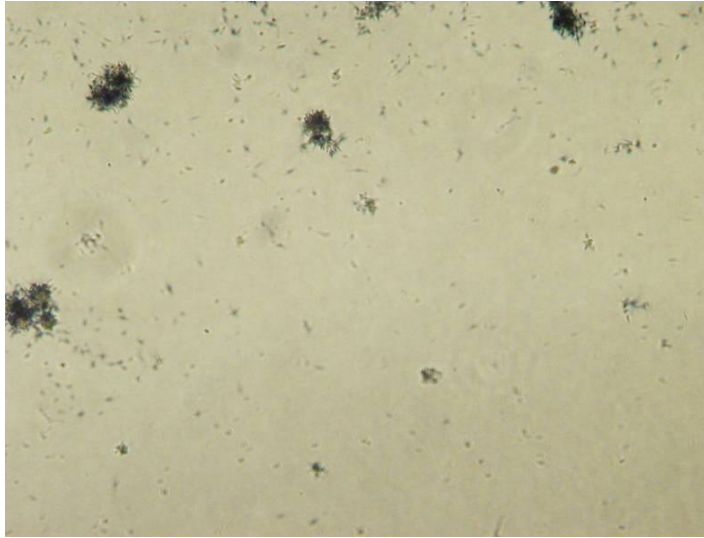
Morfolojik inceleme ile denenen en yüksek konsantrasyon olan 15 mg/ml'de hücrelerin küme karakterizasyonunun, hareketlerinin ve aktifliğinin kontrol ile benzer olduğu görüldü. En yüksek konsantrasyon olmasına rağmen, ortamda hem normal küme oluşturmuş, hem de tekli, morfolojileri tipik ve formazan kristali oluşturmuş hücreler bulunmaktadır (Şekil 4.67).

Özellikle 40x büyütmede incelenmesi ile hücrelerin intak, hareketliliklerinin aktif olduğu tespit edildi.

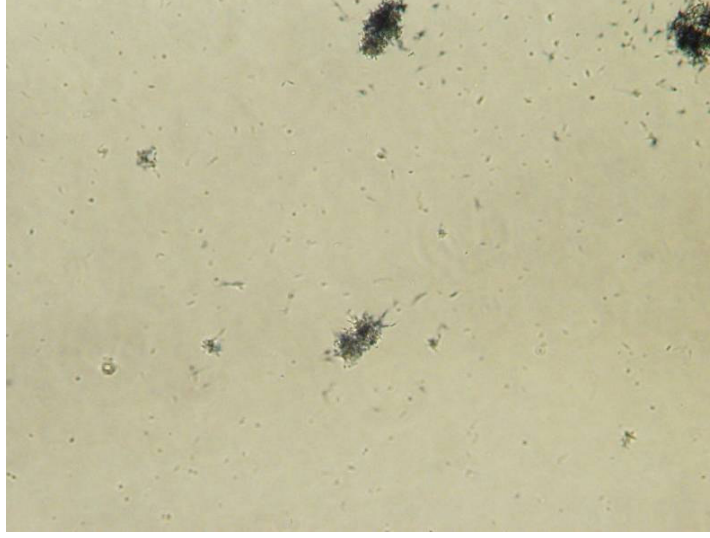


Şekil 4.67 PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

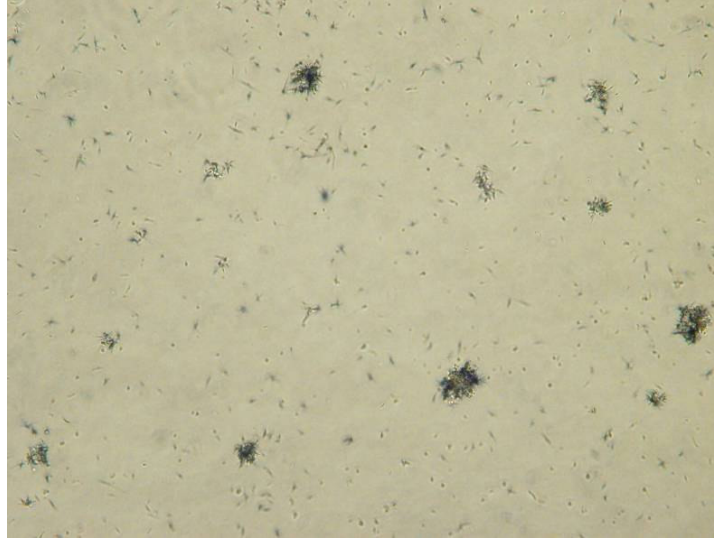
İncelenen daha düşük konsantrasyonlarda da morfolojik özellikler benzerdir. Hem tek tek aktif hücreler hem de hareketli ve canlı kümelerin varlığı tüm konsantrasyonlarda gözlenmiştir (Şekil 4.68, 4.69, 4.70).



Şekil 4.68 PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



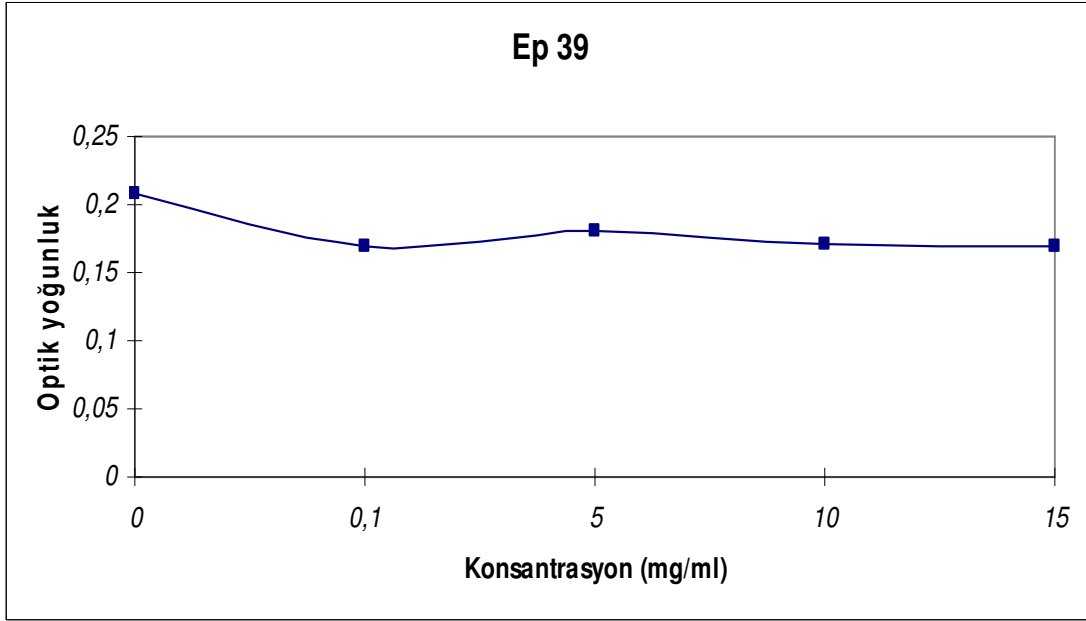
Şekil 4.69 PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.70 PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Çizelge 4.16'da polietilen glikolün farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi verilmiştir. Çizelge'de görüldüğü gibi 0,1 mg/ml konsantrasyonda canlılık oranında hafif bir düşme görülse de diğer konsantrasyonlarda canlılık kontrol ile hemen hemen aynıdır. Morfolojik incelemeler ve canlılığın incelenmesiyle denenen konsantrasyonlarda PEG'in (MA: 4,600) Ep 39 hücreleri üzerinde toksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.16 PEG'in (MA:4,600) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi



Polietilen glikolün toksik etkisini incelemek amacıyla kullanılan Ep 39 kültürü diğer hücre kültürleri ile benzer duyarlılık göstermiştir. PEG'in hücrelerin canlılığına etkisi; Ep39, MCF 7 ve L-929 hücrelerinde aynı olmuştur.

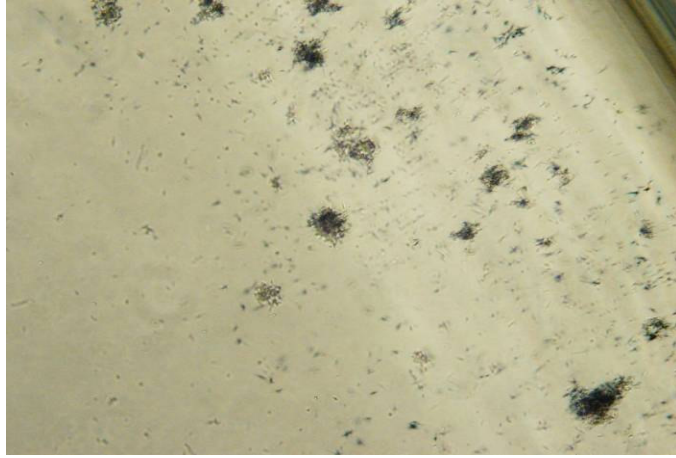
4.3.5 Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Polietilen Glikolün Ep39 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

Molekül ağırlığı 2,000 Da olan PEG'in Ep39 hücreleri üzerinde toksik etkisini incelemek amacıyla polimer ile 48 saatlik etkileşim sonrasında morfolojik inceleme ve canlılık tayini yapıldı.

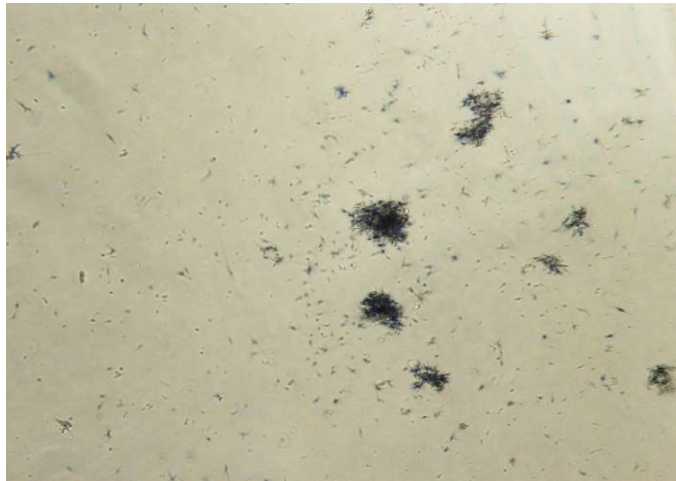
Mikroskopik inceleme ile denenen bütün konsantrasyonlarda hücrelerin morfolojilerinin, küme özelliklerinin kontrole benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 4.71, 4.72, 4.73 ve 4.74). Kültür ortamında küme oluşturmuş ve oluşturmamış hücrelerin hareketlerinin aktif olduğu tespit edildi. Ayrıca tüm konsantrasyonlarda formazan kristali oluşumunun kontrolden farklı olmadığı tespit edildi.



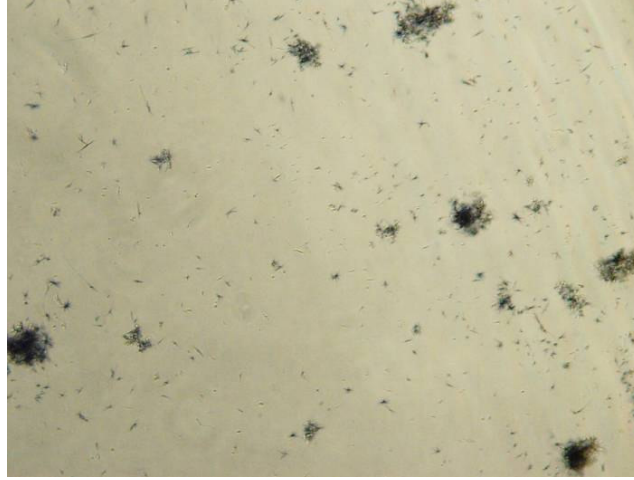
Şekil 4.71 PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.72 PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



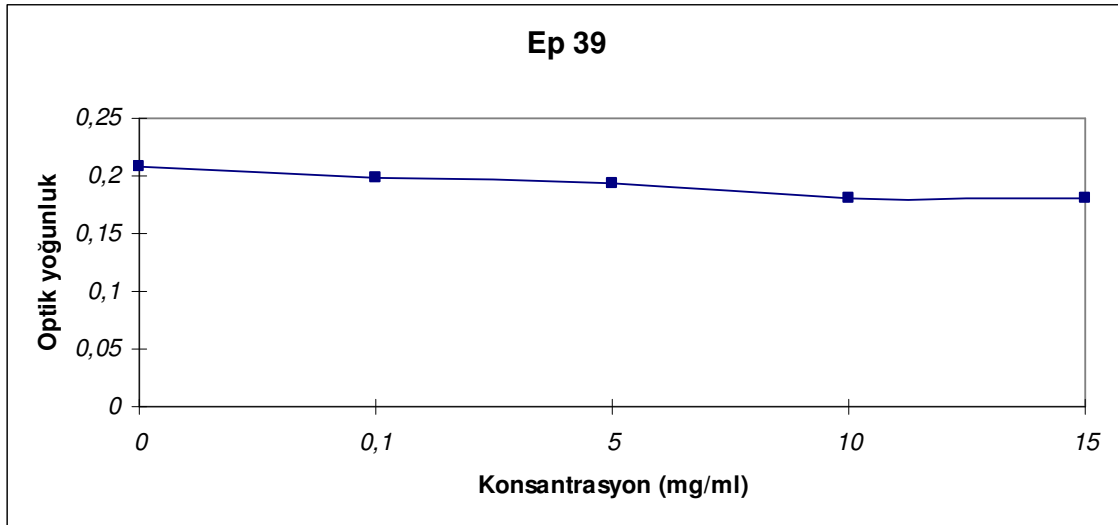
Şekil 4.73 PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.74 PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Çizelge 4.17'de canlılığın konsantrasyona bağlı değişimi verilmiştir. PEG'in bu molekül ağırlığında artan konsantrasyona bağlı olarak *Leishmania* canlılığında çok hafif bir azalma görülmektedir. Ancak bu azalma düşük miktarda olup tüm konsantrasyonlarda canlılık kontrole yakın değerlerdedir.

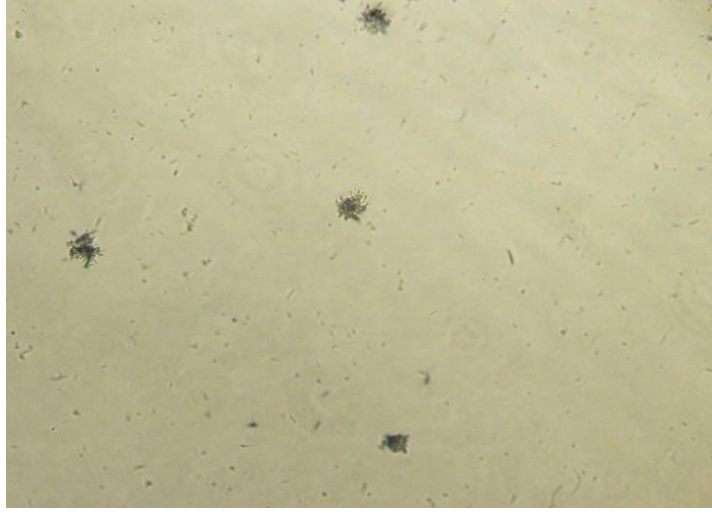
Çizelge 4.17 PEG'in (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi



Sonuçta PEG'in bu konsantrasyonunun morfolojik ve miktar olarak canlılık incelemeleri, bu polimerin, PAA'dan (MA: 100,000 Da ve 2,000 Da) farklı olarak Ep39 hücreleri üzerinde toksik etki etmediğini göstermiştir.

4.3.6 Molekül Ağırlığı 1,000 Da Olan Polietilen Glikolün Ep39 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin İncelenmesi

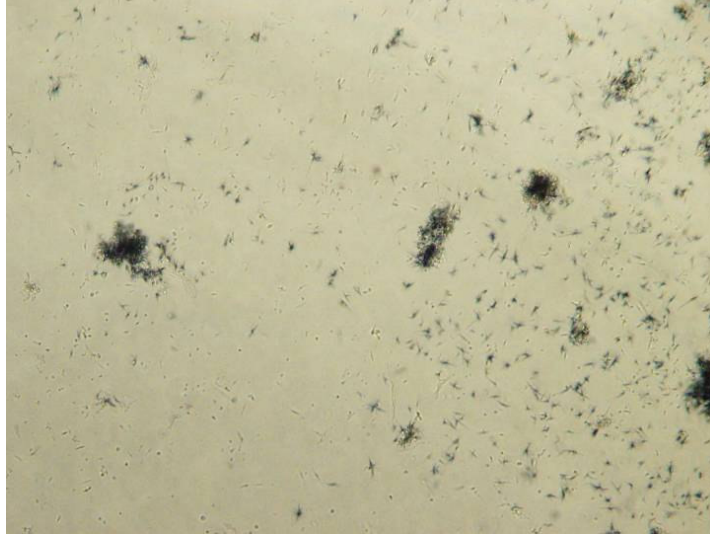
Polietilen glikolün denenen bütün konsantrasyonlarındaki hücreler morfolojik olarak incelenmiştir. İncelenen bütün konsantrasyonlarda Ep39 hücrelerinin normal, sağlıklı, hareketlilik açısından aktif oldukları tespit edildi. Ayrıca bütün konsantrasyonlardaki hücre ve küme karakterleri ile formazan oluşumlarının kontrole benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 4.75, 4.76, 4.77 ve 4.78).



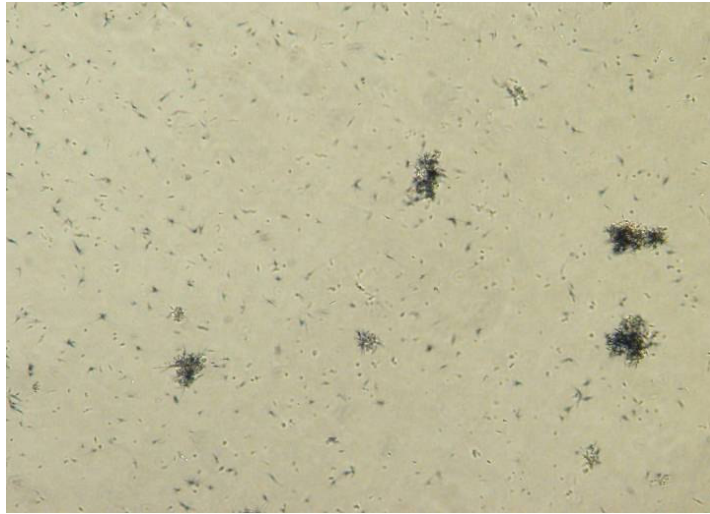
Şekil 4.75 PEG'in 15 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.76 PEG'in 10 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



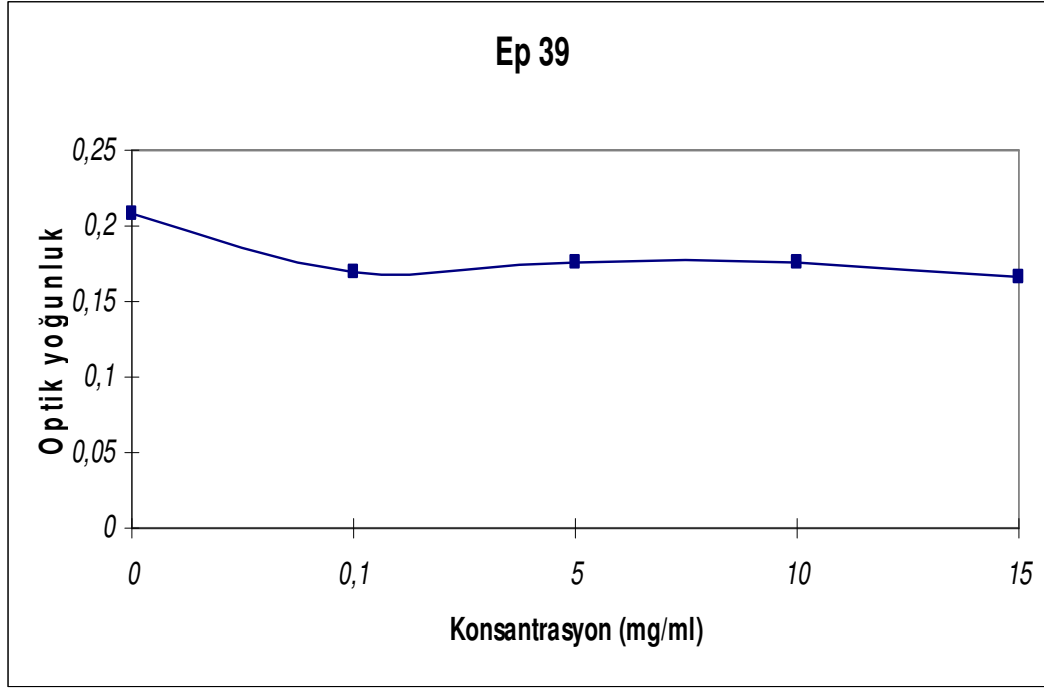
Şekil 4.77 PEG'in 5 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).



Şekil 4.78 PEG'in 0,1 mg/ml konsantrasyonunun Ep39 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x).

Çizelge 4.18'de PEG'in Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi verilmiştir. Molekül ağırlığı 1000 Da olan PEG'in bütün konsantrasyonlarında Ep39 hücrelerinin canlılığının kontrole yakın olduğu gözlenmiştir. Şekiller incelendiğinde düşük konsantrasyonlarda daha fazla mor renk görülmesine rağmen, MTT ile incelemede fark görülmemiştir. Bunun nedeni, görüntülerin kuyucukların farklı bölgelerinden alınması olabilir.

Çizelge 4.18 PEG'in (MA:1,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi



Sonuç olarak PEG'in bu konsantrasyonunun morfolojik ve canlılık incelemeleri, bu polimerin MCF 7 ve L-929 hücrelerinde olduğu gibi Ep39 hücrelerinde de toksik etki etmediğini göstermiştir. PEG'in denenen 3 molekül ağırlığında da Ep39 kültüründe diğer kültür modelleri ile aynı sonuçların alınması, bu kültür modelinin diğer kültürler gibi polimer etkisinin incelenmesinde kullanılabileceğini göstermiştir.

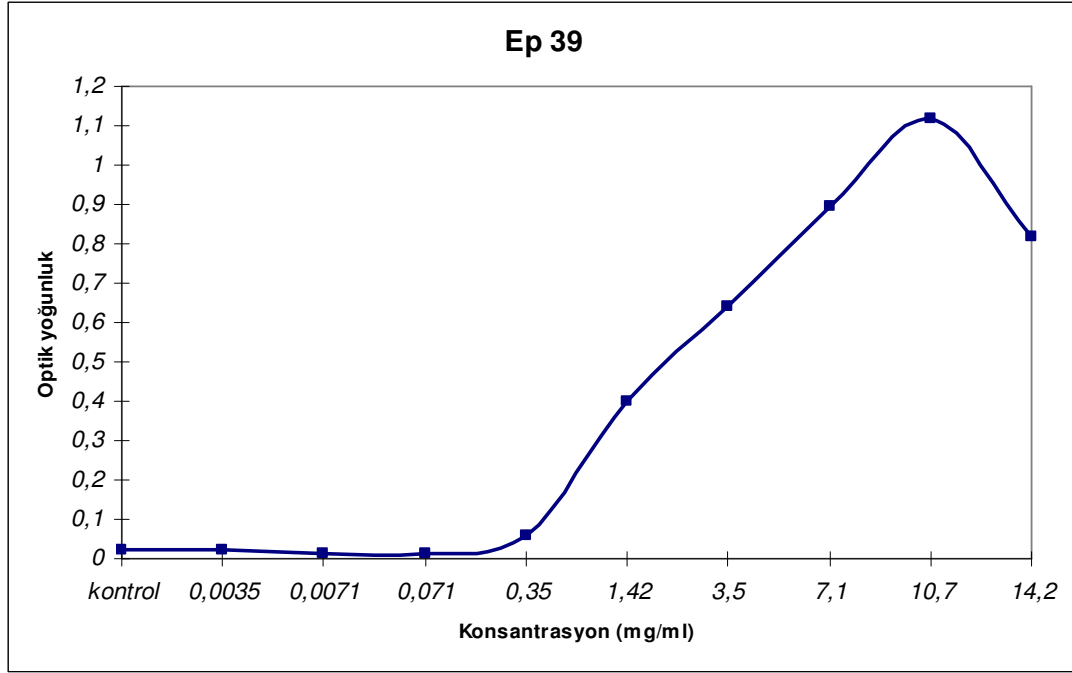
4.4 Polimerlerin 72 Saatlik Toksik Etkisinin Ep39 Hücre Kültüründe İncelenmesi

4.4.1 Molekül Ağırlığı 100,000 Da Olan Poliakrilik Asitin Ep39 Hücreleri Üzerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin İncelenmesi

Poliakrilik asitin Ep39 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi, farklı inkübasyon sürelerinde incelenmiştir. PAA (MA:100,000 Da) ile 48 saatlik inkübasyonun 5 mg/ml konsantrasyondan sonra toksik etki oluşturduğu tespit edilmişti. İnkübasyon süresi 72 saate çıkarıldığında Ep39 hücrelerinin canlılığını nasıl etkilediği Çizelge 4.19'da sunulmuştur.

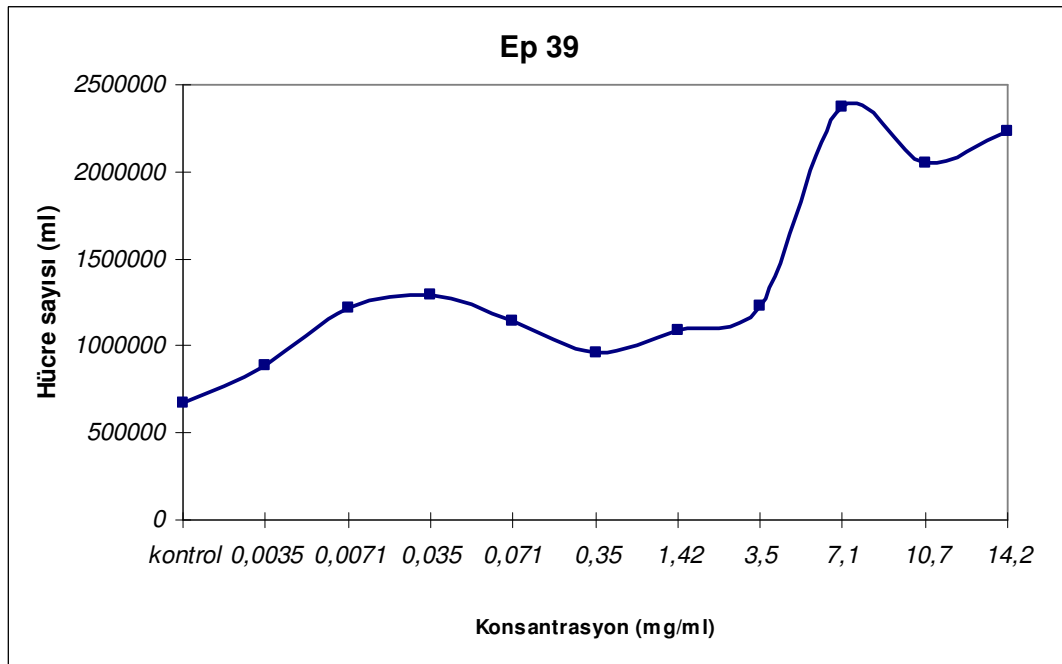
Çizelge 4.19'da da görüldüğü gibi artan polimer konsantrasyonlarında hücrelerin canlılığında büyük bir artış vardır ($p < 0,05$). Bu durum özellikle de 0,35 mg/ml'den sonra belirginleşmektedir.

Çizelge 4.19. PAA'nın (MA:100,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi (72 saat)



Polimerin 72 saatlik etkisi aynı konsantrasyonlar kullanılarak sayım yöntemi ile incelenmiştir. Çizelge 4.20'de, parazit sayısı kontrolde 6×10^5 hücre/ml iken en yüksek konsantrasyonda 2×10^6 civarında olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.20 Sayım yöntemi ile PAA'nın (MA:100,000 Da) konsantrasyonuna bağlı olarak Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi (72 saat)



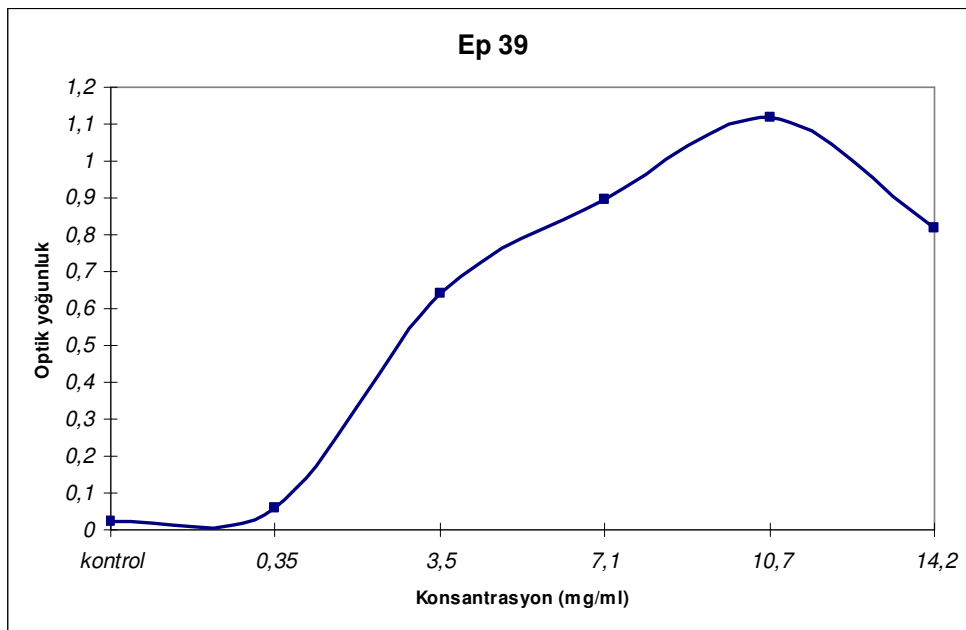
Bu da hücrelerin 72 saatlik inkübasyonda polimer konsantrasyonunun artmasıyla daha fazla çoğaldığını göstermektedir. MTT yöntemi ile elde edilen bulgular sayım yöntemi ile de doğrulanmıştır.

Polimer ile 48 saat etkileşim de toksik etki görülmekteyken 72. saatte hücre canlılığının kontrole göre bu kadar yüksek olması oldukça şaşırtıcı bir bulgudur. Bu durum PAA'nın bilinmeyen bir özelliğini ortaya çıkarmaktadır. Literatürde bu molekül ağırlığı ve bu konsantrasyonda oldukça toksik olduğu bilinen PAA'nın herhangi bir ökaryotik hücre tipinde böyle bir etkisi olduğu ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Ortaya konulan bu hücre kültür modeli ile vücutta enfeksiyon oluşturabilecek enfektif bir ajanla polimerlerin etkileşimleri gösterilmiş ve polimerlerin hücreler ile farklı inkübasyon saatlerinde farklı etkiler oluşturduğu tespit edilmiştir.

4.4.2 Molekül Ağırlığı 30,000 Da Olan Poliakrilik Asitin Ep39 Hücreleri Üzerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin İncelenmesi

PAA'nın 48 saatlik inkübasyonunun ardından inkübasyon süresini 72 saate çıkartarak PAA Ep39'un etkileşimi MTT yöntemiyle incelendi. Çizelge 4.21'de PAA'nın artan konsantrasyonlarında Ep39 hücre canlılığının arttığı görülmektedir. PAA'nın 10,7 mg/ml'lik konsantrasyonunda canlılık en üst seviyeye ulaşmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda Ep39 hücrelerinin canlılığı kontrole göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$).

Çizelge 4.21 PAA'nın (MA:30,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi (72 saat)



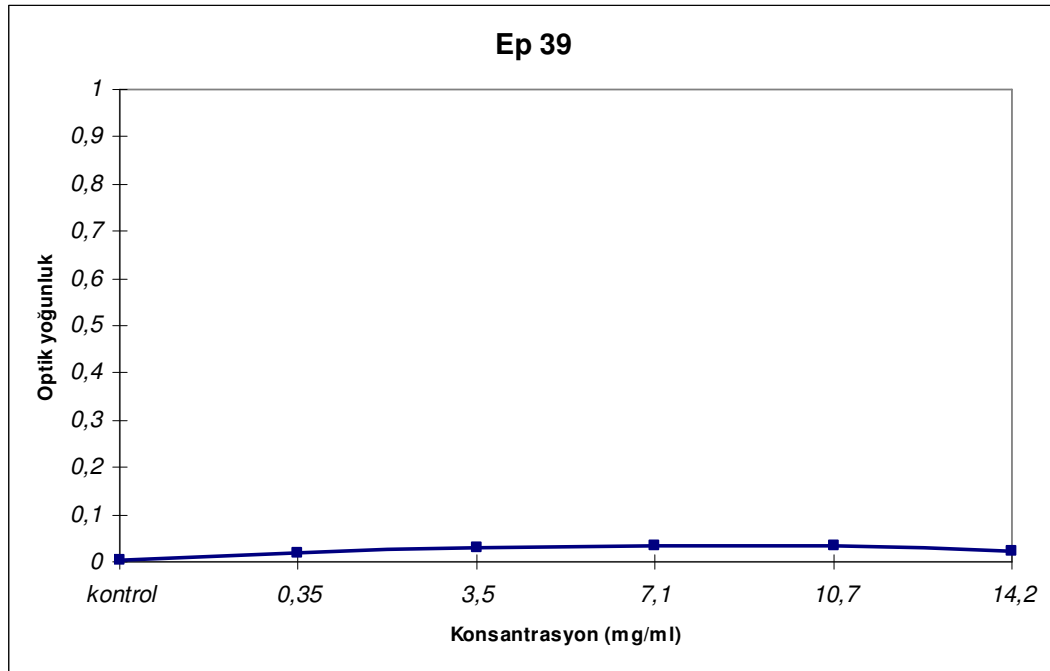
Çizelge 4.21’de görüldüğü gibi PAA’nın 30,000 Da molekül ağırlığında 72 saatlik inkübasyonunda polimer konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığında artış görülmektedir. Bu durum polimerin 100,000 Da molekül ağırlıklı formu ile benzerdir.

4.4.3 Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Poliakrilik Asitin Ep39 Hücreleri Üzerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin İncelenmesi

Poliakrilik asitin (MA: 2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının bulunduğu kültür ortamında Ep39 hücrelerinin 72 saat inkübe edildi. Canlılıkları MTT yöntemi ile kolorimetrik olarak ölçüldü.

Çizelge 4.22’de görüldüğü gibi, bu molekül ağırlığındaki PAA’nın farklı konsantrasyonları ile 72 saatlik etkileşimdeki Ep39 hücrelerinin canlılığı kontrolle benzerdir. 48 saatlik inkübasyon süresinde görülen toksik etki bu inkübasyon süresinde görülmemektedir. Ancak diğer iki molekül ağırlığında görülen konsantrasyona bağlı artış da görülmemiştir. Bunun nedeni henüz tam olarak açıklanamamıştır.

Çizelge 4.22 MTT yöntemi ile PAA’nın (MA:100,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinde canlılık etkisi (72 saat)

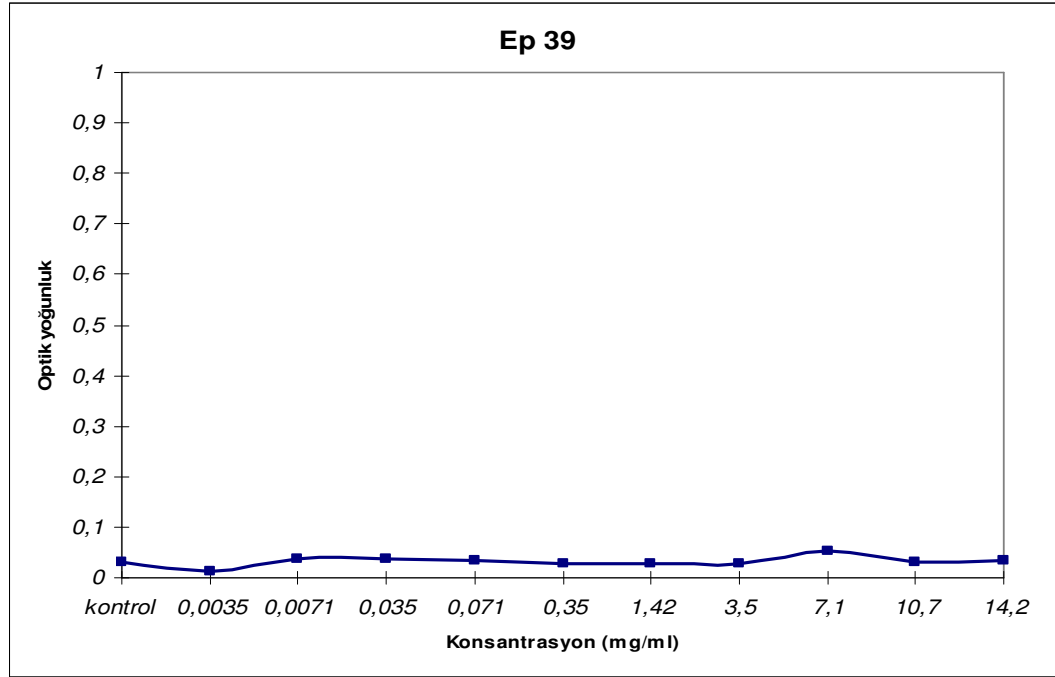


4.4.4 Molekül Ağırlığı 4,600 Olan Polietilen Glikolün Ep39 Hücreleri Üzerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin İncelenmesi

Polietilen glikolün en yüksek molekül ağırlığındaki 10 farklı konsantrasyonunun, Ep39 hücrelerine 72 saatlik etkisi MTT yöntemi ile incelenmiştir.

Çizelge 4.23’de polimerin tüm konsantrasyonlarında Ep39 hücrelerinin canlılığı birbirlerine benzer olup kontrole göre anlamlı bir fark oluşmamıştır. PEG’in 48 saatlik inkübasyonu ile oluşan etki, 72 saatte de devam etmektedir. PEG 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresince toksik veya hücrelerin çoğalmasını uyarıcı bir etki göstermemiştir.

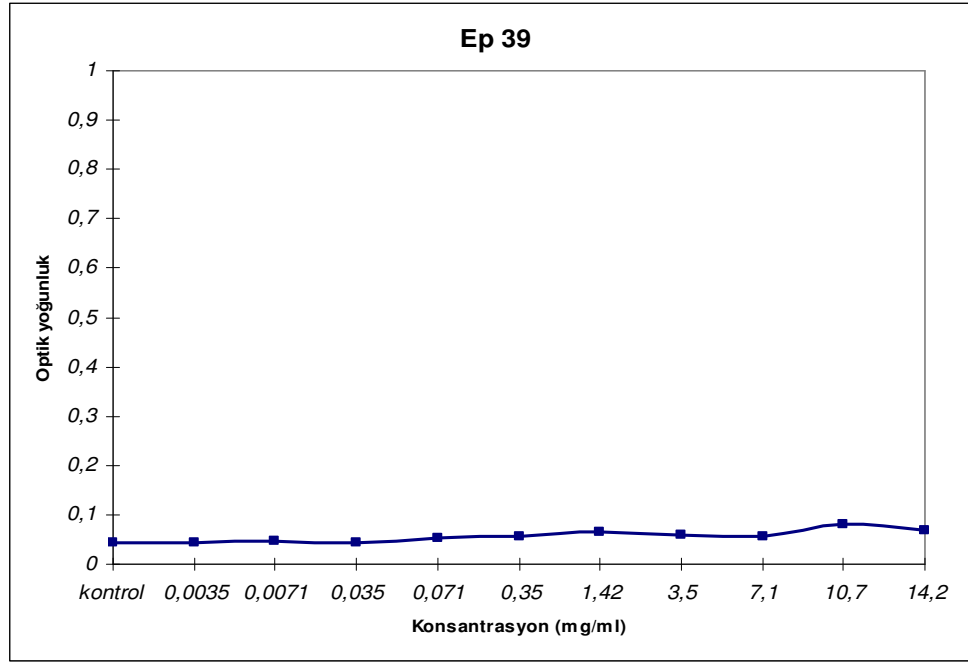
Çizelge 4.23 PEG’in (MA:4,600 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi (72 saat)



4.4.5 Molekül Ağırlığı 2,000 Da Olan Polietilen Glikolün Ep 39 Hücreleri Üzerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin İncelenmesi

PEG’in (MA:2,000 Da) Ep39 hücreleri üzerindeki 72 saatlik toksik etkisi MTT yöntemi ile incelendi. Çizelge 4.24’de PEG’in konsantrasyonuna bağlı olarak Ep39 hücreleri üzerindeki 72 saatlik etkisi gösterilmiştir. PEG’in denenen konsantrasyonlarında, hücrelerdeki canlılıklarda kontrole nazaran farklılık görülmemiştir.

Çizelge 4.24 PEG'in (MA:2,000 Da) farklı konsantrasyonlarının Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi (72 saat)

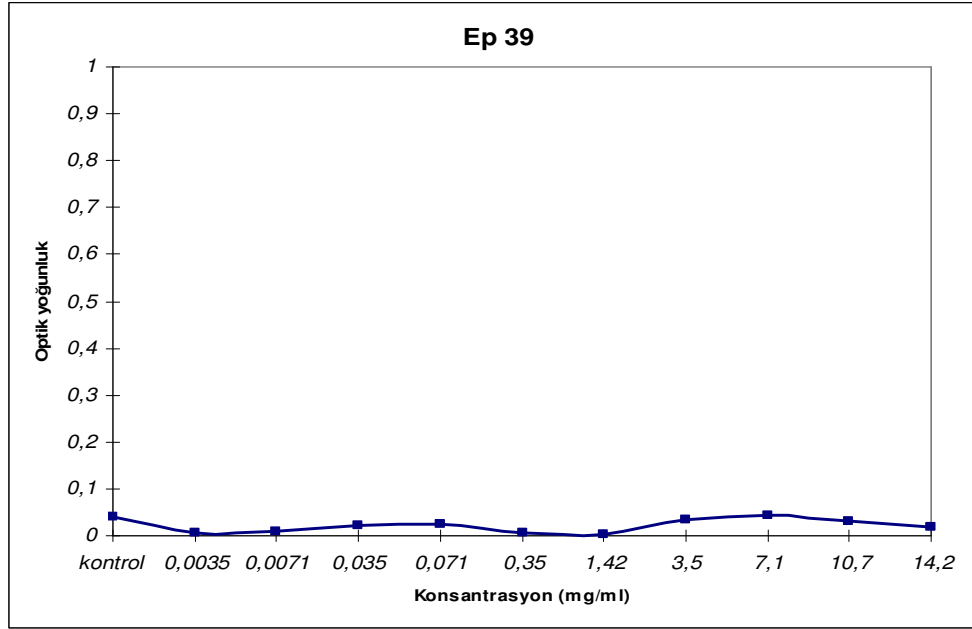


4.4.6 Molekül Ağırlığı 1,000 Da Olan Polietilen Glikolün Ep39 Hücreleri Üzerindeki 72 Saatlik Toksik Etkisinin İncelenmesi

Polietilen glikolün en düşük molekül ağırlıklı formunun Ep39 hücrelerine 72 saatlik etkileri MTT yöntemi ile incelendi ve sonuçlar Çizelge 4.25'de verildi. Çizelgede görüldüğü gibi PEG'in farklı konsantrasyonları bulunan kültür ortamındaki hücrelerin canlılıklarında kontrole nazaran önemli bir fark oluşmamıştır.

PEG'in incelenen bütün molekül ağırlığı ve konsantrasyonlarda, 72 saatlik inkübasyonun Ep39 hücrelerinin canlılığına etkisi olmadığı tespit edildi. Bu durum polietilen glikolün Ep39 hücreleri üzerindeki 48 saatlik etkisinin incelendiği çalışma sonuçlarını da desteklemektedir.

Çizelge 4.25 MTT yöntemi ile PEG'in (MA:1,000 Da) konsantrasyonuna bağlı olarak Leishmania hücrelerinin canlılığına etkisi (72 saat)



Polietilen glikolün 2 farklı inkübasyon süresinde de etkinin aynı yönde devam etmesine karşılık poliakrilik asitte durum 48 ve 72 saatlerde birbirlerinden farklıdır. Poliakrilik asit ile Ep39 hücrelerinin 72 saat inkübasyonunda hücrelerin kontrole göre aşırı derecede çoğalmaları, PAA ile Ep39 hücre metabolizması arasında bazı farklı etkileşimlerin olduğunu düşündürmektedir.

Bu deney sonuçları poliakrilik asitin Ep39 hücreleri ile şimdiye kadar denenmemiş ve bilinmeyen bir etkileşimi olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu deney sonuçları polimerlerin bir hücre kültürünü öldürürken, inkübasyon süresi artırıldığında başka bir ökaryotik hücrenin proliferasyonuna neden olabileceğini de göstermiştir.

Özellikle de denenen bu Ep39 hücrelerin enfektif özelliği olan ve ciddi bir hastalığa yol açan bir ökaryotik hücre olması önemli bir soruyu ortaya koymaktadır. Bir polimerin hücre kültürlerinde veya *in vivo* testlerde toksik olmadığı ortaya konulduğu için insanda kullanıldığında vücutta başka bazı enfekte edici ajanları uyarıcı özellikte olabilir mi?

4.5 Polimerlerin Toksik Etkisinin Ep 39 Hücrelerinin (Promastigotların) Hareketliliğine Göre İncelenmesi

Ep39 hücrelerinin flagellar hareketleri, ters mikroskop altında 20x ve 40x büyütmede rahatlıkla görülmektedir. Ayrıca bu hücreler genel durumlarına bağlı olarak farklı küme oluşturma özellikleri de göstermektedir. Kümelerin genel durumları gözlenerek hücrelerin biyolojileri hakkında fikir sahibi olmayı mümkün kılar.

Bu özelliklerden yola çıkarak daha önce MCF 7 ve L-929 hücrelerinde 0,1 mg/ml konsantrasyondan sonra artan konsantrasyonlarda toksik etkisi arttığı gösterilen poliakrilik asitin 100,000 Da molekül ağırlıklı formu kullanılarak polimer toksisitesinin incelenmesinde ekspres bir yöntem geliştirmek için Ep39 hücre hareketliliğindeki değişimler incelendi. Gözlemler polimer eklenmesini takiben 1. dakikadan itibaren ters mikroskop kullanılarak yapıldı.

Bunun için 6 kuyucuklu mikropalak kullanıldı ve polimerin son konsantrasyonu 20 mg/ml olacak şekilde hücrelerin üzerine ilave edildi. Polimer ilave edilip pipetle karıştırılmasını ilk dakikada promastigotların hareketlerinin ve kümelerdeki aktifliğin tamamen durduğu gözlemlendi.

İlk 2 dakika boyunca tamamen hareketsiz kalan promastigotlar 2. dakikadan sonra hafif titreşim tarzı hareketlere başlamıştır. Promastigotlar yerlerini değiştiremeyip sadece hafif kıpırtılar göstermiş ve kamçılarını hareket ettirmeye başlamıştır. 10 dakika geçtikten sonra promastigotlardan bazılarının çok yavaş hareketlerle yer değiştirebildikleri gözlemlendi.

15 dakika geçtikten sonra hafif hareketlilik kümelerde de başlamıştır. Yarım saat geçtikten sonra durumun 15. dakika ile benzer olduğu, kümelerin ve tek promastigotların hareketliliğinin düşük olduğu ancak kamçılarında aşırı hareketlilik başladığı gözlemlendi.

1,5 saatlik inkübasyon ardından kümelerin sayıca arttığı, aktifliklerini ilk yarım saate nazaran artırdıkları, tekli hücrelerin yer değiştirmeye başladıkları ve hareketlerinin hızlandığı gözlemlendi.

24 saat geçtikten sonra promastigotların durumlarının oldukça iyi, kümelerin aktif, hareketliliğin yüksek olduğu ve bazı hücrelerin şişkinleştikleri gözlemlendi.

48 saat sonra incelendiğinde hareketlilik ve canlılıklarının ilk güne nazaran arttığı, ancak durumlarının normal kültüre göre oldukça kötü olduğu tespit edildi.

Bu gözlemlerden, bir polimerin toksik özellik gösterdiği konsantrasyonun, Ep39 hücre kültüründe sadece mikroskopik gözlem yaparak tespit edilebileceğini düşündürmektedir. PAA

ile Ep39 hücrelerinde yapılan gözlemler, bir polimerin toksik özelliğini yarım saat içerisinde hiçbir boya maddesi veya ekstra bir yöntem uygulamadan sadece mikroskopik olarak incelenebileceğini göstermiştir.

Aynı polimerin 33 mg/ml konsantrasyonunu deneyerek 20 mg/ml konsantrasyonu ile elde edilen gözlemleri kıyasladık. Aynı yöntemle belli zaman aralıklarında hücresel hareketliliği gözlemledik.

Gözlemlerimize göre 33 mg/ml PAA eklenmesini takip eden ilk dakikalarda hareketlilik tek tek olan hücrelerde de kümelerde de tamamen durmuştur. 5. ve 10. dakikalarda durum ilk dakika ile aynıdır. 20 mg/ml konsantrasyonda 15. dakikada düşük de olsa hareketlilik varken burada hiçbir hareket gözlenmemiştir. Bu durum daha yüksek konsantrasyondaki polimerin daha toksik etki etmesine göre hareketlilik yeteneklerinde ve tekrar eski hale dönmelerinde farklı cevaplar oluşturduğunu göstermektedir. Hareketsizlik 20. dakikada da devam etmiştir.

Polimer ilavesini takiben 50 dakika geçmesine rağmen hiçbir hareketlilik gözlenmemesi promastigotların canlılığını tamamen kaybettiklerini düşündürmüştür. Hareketsiz hücrelerin bulunduğu bu sıvı ortamdan 0,5 ml alınıp 2,5 ml besiyeri bulunan ortama ilave edildiğinde promastigotların tekrar hareketlendiği, aktifleştiği ve çoğunun ortam değişimiyle beraber bölünmeye başladıkları gözlenmiştir. Ep39 hücrelerinin polimer etkisi ile sadece hareketliliklerinin durduğu ancak canlılıklarının devam ettiği tespit edilmiştir.

2 saat geçtikten sonra 33 mg/ml PAA içerisindeki promastigotların çok hafif hareketlenmeye başlamaları da bu durumu desteklemiştir.

24 saat sonra hareketliliğin başladığı ancak çok yavaş olduğu, hücre morfolojilerinin genelde bozuk olduğu, genelinin kümeleşme eğilimi gösterdiği, tek tek canlı promastigot miktarının yok denecek kadar az olduğu gözlenmiştir.

Ep39 hücreleri gözlemsel olarak elde edilen verilere göre başlangıçta hareketlerini kaybedip olumsuz etkilenmelerine rağmen belli bir süre sonra ortama adapte olup polimer toksisitesinden minimum etkilenirken ilerleyen zamanlarda polimerin toksik etkileri proliferasyonu uyarıcı bir özelliğe dönüşmüştür. Bu durum 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerini kıyasladığımız MTT deneylerinde tespit edilmiştir. Hareketliliğe göre yapılan incelemelerde de benzer sonuçlara ulaşılmıştır.

4.6 Sonuç

Son 30 yıl boyunca polimerlerin tıptaki ve biyoteknolojideki önemi artmıştır (Davis vd., 1978; Duncan, 2003). Ancak polimerlerin tıpta kullanılmaları için biyouyumlu olmaları, toksik etki göstermemeleri gereklidir. Günümüzde çeşitli hücre kültür modelleri, polimer toksisitesini incelemek için kullanılır (Lestari vd., 2004). Mevcut kültür sistemleri, polimerlerin toksik özelliğini ve biyouyumluluğunu inceleme olanağı sağlar, ancak bu kültür sistemleri masraflı, zor ve zaman alıcıdır. Ayrıca herhangi bir polimer organizmaya verildiğinde organizmada bulunması muhtemel bir enfeksiyon ajanı ile nasıl bir etkileşime gireceği hakkında bilgi verememektedir. Vücutta kronik seyreden bazı bakterial, viral, parazit, fungal menşeli enfeksiyonlar bulunabilir [3]. Bu enfeksiyonlara yol açan ajanların vücuda verilen bir polimer ile nasıl etkileşime gireceği konusunda literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu sebeple bu tez çalışmasında ilk kez olarak tıpta kullanılan veya kullanılacak olan polimerlerin sadece toksisitesi ve biyouyumluluğu hakkında değil aynı zamanda organizmada hastalık oluşturabilecek enfeksiyonlarla (protozoan) etkileşimi konusunda da bilgi verebilecek daha hızlı, daha ekonomik ve kolay yeni bir kültür modeli geliştirmeyi amaçladık.

Bu tezin kapsamında, farklı molekül ağırlıklarındaki poliakrilik asit ve polietilen glikolün toksik etkisi ve enfektif bir ajanla (*Leishmania*) etkileşimi, farklı hücre kültürlerinde (MCF 7, L-929, Ep39) incelendi. Çalışmalarımızda, tıbbın çeşitli alanlarında uygulanmakta olan polimerlerden PAA ve PEG seçildi (Mustafaev vd., 1998; Kope'cek 2000). Bu polimerlerden PAA'nın toksik, PEG'in ise toksik olmaması, toksisite çalışması için karşılaştırmalı inceleme yapmaya olanak verdi. Hücre hatlarından MCF 7 ve L 929 hücrelerinin kullanılma sebebi, ismi geçen polimerlerin toksisitesinin tayin edilmesinde bu hücre kültürleri üzerinde bazı çalışmaların yapılmış olması ve bu sayede kıyaslı çalışma yapmaya uygun olmasıdır. Ayrıca birinin (MCF 7) insan, diğerinin (L 929) hayvan kaynaklı hücreler olmasıdır (Shafie ve Brooks, 1977; Sakaguchi vd., 2007).

Çalışmalarımızda *Leishmania* parazitlerinden olan *L. tropica*'nın promastigot formu kültürünün seçilmesinin esas nedeni ise *Leishmania* protozoalarının da kültür çalışmalarında kullanılan MCF 7, L 929 gibi tek hücreli, ökaryot olmalarıdır (Lye vd., 2002). *Leishmania* protozoanları diğer hücre kültür modellerinden farklı olarak daha zengin DNA içeriğine (nüklear ve kinetoplast DNA'sı) sahip olduğu için polimerlerin genetik yapı üzerindeki toksik etkisinin incelenmesinde oldukça önemli olabilir. Bu hücreler sıvı kültür ortamında çok hareketlidir, ortam koşullarına bağlı olarak hareket ve küme oluşturma özelliğini değiştirir.

Olumsuz ortam koşullarına gösterdiği hücresel tepkiler, invert mikroskop altında anlık olarak gözlemlenebilir. Ayrıca kültürünün yapılmasının oldukça pratik ve ekonomik olması her koşulda deneysel çalışmalar için kolaylık getirir. Süspanse bir kültür olduğu için tripsinizasyon gibi zahmetli işlemlere gerek duymadan kolayca pasajı yapılabilir, pasajı yapılırken çok daha az besiyeri harcar ve CO₂ etüvüne ihtiyaç duymadan inkübe edilebilir.

Bu açıdan polimerlerin toksik özelliğinin ve biyouyumluluğunun tayin edilmesinde diğer ökaryot hücre kültürleri yanında promastigot kültürünün de incelenmesinin uygun olacağını düşündük.

Literatürde, promastigot kültürü sadece yeni anti-leishmanial ilaçların geliştirilmesinde kullanılmaktadır [2]. Ancak biyopolimerin toksisitesinin incelenmesi amacıyla *Leishmania* kültür modeli kullanımına ait bir bilgi bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, PAA ve PEG'in farklı molekül ağırlıklarının toksik etkileri MCF 7, L-929 ve Ep39 hücre kültür modellerinde kıyaslı olarak incelendi. Deneysel çalışmalarda, öncelikle molekül ağırlığı 100,000 olan PAA'nın farklı konsantrasyonlarının toksik etkisi üç kültür modelinde de incelendi. Elde edilen sonuçlar, incelenen bütün kültür modellerinde PAA'nın toksik etkisinin konsantrasyona bağlı olarak yükseldiğini gösterdi. Ancak PAA'nın 30,000 molekül ağırlığının toksik etkisi, Ep 39 kültüründe; 2,000 molekül ağırlığının toksik etkisi ise L 929 kültüründe çok belirgin görülmemiştir. Bunun nedeni tam olarak açıklanamasa da, literatüre uygun olarak, PAA'nın incelenen bütün molekül ağırlıklarında toksik etki gösterdiği tespit edildi (Billiau vd., 1970). Promastigot kültüründe de benzer sonuçların elde edilmesi önerilen bu kültür modelinin PAA toksisitesini incelemek için uygun olduğunu göstermektedir.

PEG'in insan ve diğer deneysel hayvanlar için toksik olmadığı bilinmektedir (Jackson,1962). İncelediğimiz her üç hücre kültür modelinde PEG'ün, toksik ve sitopatik etki etmediği gözlemlendi. PAA ile elde edilen sonuçlardaki gibi, PEG'de de Ep 39 kültürünün MCF 7 ve L 929 hücrelerine uygun sonuçlar gösterdiği tespit edildi.

MCF 7, L-929 ve Ep39 hücre hatlarında PEG'in toksik etkilerinin kıyaslı olarak incelenmesi ve üç kültür modelinde de aynı sonuçların elde edilmesi, *Leishmania* promastigotlarının polimer toksisitesinin incelenmesinde bir model olarak kullanılmasının mümkün olduğunu gösterdi.

Tez çalışmamızın diğer bölümünde, Ep 39 hücre hattında daha önce incelediğimiz polimerlerin toksisitesinin hızlı bir şekilde tayin edilmesini geliştirmeye çalıştık. Bunun için kültürdeki promastigotların, sürekli hareket halinde olması ve ortam şartlarına göre küme

karakterlerini değiştirmesi gibi özelliklerinden faydalandık. Kùltür ortamına PAA'in yüksek konsantrasyonunları (20 ve 33 mg/ml) eklendi, promastigotların hareketlerindeki değişiklikler invert mikroskobunda incelendi. Polimer eklendiğinde hareketlilikte geçici inhibisyon olduğu ancak belli bir süre sonra hareketliliğin yeniden başladığı görüldü. Tekrar aktif hale gelme sürelerinde 20 mg/ml ve 33 mg/ml konsantrasyonlarda fark olduğu; polimer konsantrasyonu arttıkça, tekrar hareketlenme sürelerinin uzadığı tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar Ep 39'un diğer hücre hatlarından farklı olarak polimerlerin toksisitesini tayin etmek için 72 saat değil, birkaç saat gerektiğini göstermiştir. Böylece uzun süre PAA ile inkübasyon sonrasında Ep39 hücre hattında ortaya çıkan, morfolojik ve fizyolojik değişimin (hareketsizleşmesi ve sonra aktifleşmesi) aynı zamanda kısa inkübasyon süresinde de ortaya çıkması, incelenen polimerlerin toksisitesinin tayin edilmesinde hızlı bir yöntem olarak kullanılabileceğinin uygun olduğunu göstermiştir.

Leishmania promastigotlarının kùltür ortamına eklenen toksik polimerin konsantrasyonuna bağlı olarak hareketlerini durmasının ve belli bir süre sonra tekrar aktifleşmesinin sebebi tam olarak bilinmemektedir. Bunun nedeni polimer ile promastigotlar arasındaki etkileşimin promastigotları geçici olarak hücre siklusunun G0 aşamasına girmesi olabilir. Belli bir süre sonra ise promastigotların kendilerini yeniden yapılandırması onların aktifleşmesine sebep olur. Böyle düşünmemizin temel nedeni yüksek konsantrasyonda hareketsizleşmiş promastigotların normal besiyeri ortamına alındıklarında, büyük çoğunun bölünmeye başladığının gözlenmesidir. Ancak bunun başka nedenleri de olabilir ki bunlar ileriki çalışmalarda incelenecektir.

Çalışmamızın sonraki bölümünde *Leishmania* kùltür modeli ile sadece polimer toksisitesini değil, aynı zamanda vücutta bulunması muhtemel protozoa enfeksiyonları ile etkileşim sonrası, enfeksiyöz ajanlarda oluşabilecek değişimleri incelemeyi amaçladık. İnsan ve hayvan organizmasında bulunması muhtemel enfeksiyon ajanlarından birisi de *Leishmania* parazitidir. Bu sebeple biz aynı modeli bu amaçla da kullandık. Bunun için deneyler 48 ve 72 saatlik farklı inkübasyon sürelerinde yapıldı. Polimer ile 48 saat inkübe edilen Ep 39 hücreleri MCF 7 ve L 929 gibi PAA'in yüksek konsantrasyonlarında toksik etki gösterirken, inkübasyon süresi artırıldığında (72 saat) oldukça şaşırtıcı bir bulgu elde ettik. PEG ile 72 ve 48 saatlik inkübasyon süresinde elde edilen bulgularda bir fark gözlenmezken, molekül ağırlığı 30,000 ve 100,000 olan PAA ile Ep 39 hücrelerinin 72 saatlik etkileşimi ile hücrelerin canlılığının kontrole nazaran oldukça yüksek olduğu görüldü. Bu durum *Leishmania* ile enfekte ve hastalığın tanısı konulmamış bireylere, farklı bir amaçla bu polimerin veya bununla yapılmış ilaç konjugatı verildiğinde, vücutta aktif veya latent dönemdeki parazitlerin

aktifleşmesine neden olabileceğini düşünmekteyiz. Bu açıdan değerlendirildiğinde polimerlerin sadece toksik etkisi ve insan hücreleri ile etkileşimi değil, insanda bulunması muhtemel herhangi bir enfektif ajanla olan ilişkisinin incelenmesinin önemli olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada ilk kez olarak, tıpta ve biyoteknolojide kullanılan veya kullanılacak polimerlerin toksisitesini, biyouyumluluğunu ve organizmada hastalık oluşturabilecek enfeksiyonlarla (protozoan) etkileşimi sonucunda ortaya çıkacak değişimleri tayin etmeye imkan sağlayacak daha hızlı, daha ekonomik ve daha kolay yeni bir kültür modeli geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

Abe, A., Albertsson, A.C., Duncan, R., Dusek, K., de Jeu, W.H., Joanny, J.F., Kausch, H.H., Kobayashi, S., Lee, K.S., Leibler, L., Long, T.E., Manners, I., Möller, M., Nuyken, O., Terentjev, E.M., Voit, B., Wegner, G. ve Wiesner, U., (2006), *Advances in Polymer Science*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Akan, E., (1994), *Özel ve Genel Viroloji*, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Watson, J.D., (1994), "Molecular Biology of the Cell", Garland Publishing Inc, USA.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, P.(2002), "Isolating Cells and Growing Them in Culture", *Molecular Biology of the Cell*, New York.

Alfred, P. ve Steve, C.P., (1986), "*Leishmania Mexicana*: Comparative Fine Structure of Amastigotes and Promastigotes *In Vitro and In Vivo*", *Exp. Parasitol.* 62:256-265.

Alfred, P., (1983), "Development Life Cycle of *Leishmania* Cultivation and Chracterization of Cultured Extra Cellular Amastigotes", *J. Microbiol.*, 40(2):213-215.

Allahverdiyev, A.M., Bagirova, M., Uzun, S., Alabaz, D., Aksaray, N., Kocabas, E. ve Koksall F., (2005), "The Value of a New Microculture Method for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis by Using Bone Marrow and Peripheral Blood", *Am. J. Trop. Hyg.*, 73(2): 276-80.

Allen, T.M., (2002), "Ligand-Targeted Therapeutics in Anticancer Therapy", *Nat. Rev. Cancer*, 2: 750-763.

Ashford, R.W. ve Betini, S., (1987), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, London Academic Pres, London.

Bailon, P. ve Berthold, W., (1998), "Polyethylene Glycol-Conjugated Pharmaceutical Proteins", *Pharm. Sci. Technol. Today*, 1: 352-6.

Bailon, P., Palleroni, A., Schaffer, C.A., Spence, C.L., Fung, W-J., Porter, J.E., Ehrlich, G.K., Pan, W., Xu, Z-X., Modi, M.W., Farid, A., ve Hoffmann, B.W., (2001), "Rational Design of a Potent, Long-Lasting Form of Interferon: a 40 kDa Branched Polyethylene Glycol-Conjugated Interferon R-2a for the Treatment of Hepatitis C", *Bioconjugate Chem.*, 12:195-202.

Baker, F.J. ve Breach, M.R., (1980), *Medical Microbiology Techniques*, Great Britain.

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

Bard, E., (1985), "Molecular Biology of *Leishmania*", *Biochem. Cell Biol.*, 67: 516-24.

Barreiro-Iglesias, R., Bromberg, L., Temchenko, M., Hatton, T.A., Concheiro A. ve Alvarez-Lorenzo, C., (2004), "Solubilization and Stabilization of Camptothecin in Micellar Solutions of Pluronic-G-Poly(Acrylic Acid) Copolymers", *J. Control Release*, 97(3):537-49.

Baysal B., (1994), Polimer Kimyası, ODTÜ, ANKARA.

Bell, C.L. ve Peppas, N.A., (1995), "Biomedical Membranes from Hydrogels and Interpolymer Complexes", Adv. Polym. Sci., 122: 126-172.

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

Billiau, A., Desmyter J. ve De Somer P., (1970), "Antiviral Activity of Chlorite-Oxidized Oxyamylose, a Polyacetal Carboxylic Acid", Cancer Research, 197: 792-99.

Bogdan, C., Rölinghoff, M. ve Solbach, W., (1990), "Evasion Strategies of *Leishmania* Parasites", Parasitol Today, 6(6):183-7.

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

Bray, R.S., (1985), Immunodiagnosis of Leishmaniosis, Elsever Amsterdam-New York-Oxford.

Breslow, D.S., (1976), "Biologically Active Synthetic Polymers", Pure Appl. Chem., 46:103-13.

Bromberg, L.E., (2001), "Interactions Among Proteins and Hydrophobically Modified Polyelectrolytes", J. Pharm. Pharmacol., 53: 541-547.

Chandrasekhar, C., (2005), Inorganic and Organometallic Polymers, Indian Institute of Technology Department Chemistry, Kanpur.

Chang, K.P. ve Bray, R.S., (1985a), Biology of *Leishmania*. Leishmaniosis, Elsever Amsterdam-New York-Oxford.

Chang, K.P., ve Bray, R.S., (1985b), Laboratory Cultivation and Maintenance of *Leishmania*. Leishmaniosis, Elsever Amsterdam-New York-Oxford.

Chang, K.P., Fong, D. ve Bray, R.S. (1985), The Biology of *Leishmania* and Leishmaniasis, Leishmaniasis, Amsterdam.

Charles, L.J. ve McMahan P.D., (1984), The Cultivation and Cloning of *Leishmania*. Genes and Antigens of Parasites. UNDP/World Bank, WHO, Brasil.

Chaudhuri, G., Chaudhuri, M., Pan, A. ve Chang, K.P., (1989), "Surface Acid Proteinase (Gp63) of *Leishmania Mexicana*. A Metalloenzyme Capable of Protecting Liposome-Encapsulated Proteins from Phagolysosomal Degradation by Macrophages", J. Biol. Chem., 264(13):7483-9.

Chen, D.H. ve Huang, S.H., (2003), "Fast Separation of Bromelain by Polyacrylic Acid-Bound Iron Oxide Magnetic Nanoparticles", Process. Biochem., 39:2207-2211.

Davis, F.F., Abuchowski, A., Van Es, T, Palczuk, N.C., Chen, R., Savoca, K. ve Wieder, K. (1978), "Enzyme-Polyethylene Glycol Adducts: Modified Enzymes with Unique Properties", Enzyme Eng, 4: 169-173.

- Davis, J.M., (1994) Basic Cell Culture, Oxford Uni. Pres.
- Decoteaux, A. ve Turco S.J., (2002), "Functional Aspects of the *Leishmania Donovan* Lipophosphoglycan During Macrophage Infection", *Microbes and Infection*, 4(9): 975-981.
- Dickson, R.B., Bates, S.E., Mc Manaway, M.E. ve Lippman, M.E., (1986), "Characterization of Estrogen Responsive Transforming Activity in Human Breast Cancer Cell Lines", *Cancer Res*, 46: 1707-1713.
- Doyle, A., Griffiths, J.B. ve Newell, D.G., (1995), *Cell and Tissue Culture, Laboratory Procedures*, John Wiley and Sons Ltd, England.
- Doyle, P.S., Engel, J.C., Pimenta, P.F., Da Silva, P.P. ve Dwyer, D.M., (1991), "*Leishmania Donovan*: Long-Term Culture of Axenic Amastigotes at 37 Degrees C", *Exp. Parasitol*, 73(3):326-34.
- Duncan, R. ve Kwon, G.S., (2005), *N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymer, Polymeric Drug Delivery Systems*, Dekker, New York. 1-92.
- Duncan, R., (2003), "The Dawning Era of Polymer Therapeutics", *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2: 347-60.
- Duncan, R., Bumdan, D., Calvert, H. ve Rowinsky, E., (2003), *Polymer-Drug Conjugates, Book of Anticancer Drug Development*, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Finegold, S.M. ve Baron E.J.,(1986), *Diagnostic Microbiology*, The C V Mosby Company, 643-46, USA.
- Freshney R.I., (1987), "Culture of Animal Cells", Alan R. Liss, Inc, USA.
- Freshney R.I., (1994), *Culture of Animal Cells, A manual of Basic Technique*, USA
- Fuchs, W., Veits, J., Helferich, D., Granzow, H., Teifke, J.P. ve Mettenleiter, T.C., (2007), "Molecular Biology of Avian Infectious Laryngotracheitis Virus", *Vet. Res.*, 38(2):261-79.
- 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.
- Genç, L., Oğuzlar, C. ve Güler, E., (2000), "Studies on Vaginal Bioadhesive Tablets of Acyclovir", *Pharmazie*, 55: 297-299.
- Gholamhosseinian, A. ve Vassef, A., (1988), "Superiority of Hemoglobin to Hemin for Cultivation of *Leishmaniosis Tropica* Promastigotes in Serum-Free Media", *J Protozool*, 35(4):446-449.
- Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Conndly, T.N. ve Singh, R.M.M.,(1996), "Hydrogen Ion Buffers for Biological Research", *Biochemistry*, 5: 467-77.
- Gözükara, E. M. (1997), *Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul.

- Graham, L.M., (2003), "Pegaspargase: A Review of Clinical Studies", *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 55 (10): 1293-1302.
- Grimaldi, G-Jr., Tesh, R.B. ve McMahon, D.P., (1989), "A Review of the Geographic Distribution and Epidemiology of Leishmaniasis in the New World", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 41(6): 685-89.
- Gürtürk S., (1977), *Viroloji*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- Halvorsen, T.L., Leibowitz, G. ve Levine, F., (1998), "Telomerase Activity is Sufficient to Allow Transformed Cells to Escape from Crisis", *Molecular and Cellular Biology*, 19(3): 1864-70.
- Harris, J.M. ve Chess, R.B., (2003), "Effect of Pegylation on Pharmaceuticals", *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 214-221.
- Higgs, P.G. ve Joanny, J.F., (1991), "Theory of Polyampholyte Solutions", *J. Chem. Phys.*, 94, 2, 1543.
- Hileman, R.E., Fromm, J.R., Weiler, J.M. ve Linhardt, R.J., (1998), "Glycosaminoglycan-Protein Interactions: Definition of Consensus Sites in Glycosaminoglycan Binding Proteins", *Bioessays*, 20(2): 156-67.
- 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.
- Isenberg, H.D., (1992), "Clinical Microbiology Procedures Handbook American Society for Microbiology", USA.
- Jackson, J.E., Tally, J.D. ve Tang, D.B., (1989), "An *In Vitro* Micromethod for Drug Sensitivity of *Leishmania*", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 41(3): 318-30.
- Jackson, Wm.T., (1962), "Use of Carbowaxes (Polyethylene Glycols) as Osmotic Agents", *Plant Physiol.*, 37(4): 513-519.
- Jatzkewitz, H., (1955), "Peptamin (Glycyl-L-Leucyl-Mescaline) Bound to Blood Plasma Expander (Polyvinylpyrrolidone) as a New Depot Form of a Biologically Active Primary Amine (Mescaline)", *Naturforsch Z* 10:27-31.
- Kinstler, O., Moulinex, G., Treheit, M., Ladd, D. ve Gegg, C., (2002), "Mono-N-Terminal Poly(Ethylene Glycol)-Protein Conjugates", *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 54(4): 477-485.
- Kirkpatrick, C.J., Peters, K., Hermanns, M.I., Bittinger F., Krump-Konvalinkova V., Fuchs, S. ve Unger, R.E., (2005), "*In Vitro* Methodologies to Evaluate Biocompatibility: Status Quo and Perspective", *ITBM-RBM*, 26(3): 192-199.
- Kiyama, Y., Nagahara, N., Kashihara, T., Hirai, S. ve Toguchi, H., (1995), "*In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of Mucoadhesive Microspheres Prepared for the Gastro Intestinal Tract

Using Polyglycerol Esters for Fatty Acids and a Poly(Acrylic) Acid Derivative”, *Pharm. Res.*,12: 397-405.

Komori, K., Nada, J., Miyajima, S., Ono, Y., Tatsuma, T. ve Sakai, Y., (2008), “Development of New Cytotoxicity Testing Systems That Include Toxicokinetic Processes”, *Takugahu Zasshi*, 128(1):29-35.

Koneman, W.E., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger P.C. ve Winn, W.C., (1992), *Diagnostic Microbiology*, J.B. Lippincott Company, *PHILADELPHIA*

Kopeček, J., Kopeckova, P., Minko, T. ve Lu, Z., (2000), “HPMA Copolymer–Anticancer Drug Conjugates: Design, Activity, and Mechanism of Action”, *Eur. Pharm. J. Biopharm.*, 50: 61-81.

Kuchler R.J., (1977), *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, Dowden, Hutchinson and Ross. Inc., USA.

Lehn, J.M., (1995), *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, Wiley, New York.

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

Lestari, F., Green, A.R., Chattopadhyay, G. ve Hayes, A.J. (2006), “An Alternative Method for Fire Smoke Toxicity Assessment Using Human Lung Cells”, *Fire Safety Journal*, 41: 605–615.

Lye, L.F., Cunningham, M.L. ve Beverley, S.M., (2002), “Characterization of Quinonoid-Dihydropteridine Reductase (QDPR) from the Lower Eukaryote *Leishmania Major*” *J. Biol. Chem.*, 277(41): 38245-53.

Ma, Z., Mao, Z. ve Gao, C., (2007), “Surface Modification and Property Analysis of Biomedical Polymers Used for Tissue Engineering”, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 60(2):137-57.

Maeda, H., (1998), “Recent Advances in Research on SMANCs”, *Gan To Kagaku Ryoho*, 1:1-9.

Maeda, H., Konno, T., Iwai, K., Maki, S. ve Tashiro, S., (1984), “Tumor Selective Drug Delivery with Lipid Contrast Medium (SMANCs/Lipiodol): Sustained Antitumor Effect, Enhanced Diagnostic Value and Quantification of Dosage Regimen”, *Gan To Kagaku Ryoho*, 11(4): 814-26.

Mcneely, T.B., Rosen, G., Londner, M.V. ve Turco S.J., (1989), “Inhibitory Effects on Protein Kinase C Activity by Lipophosphoglycan Fragments and Glycosylphosphatidylinositol Antigens of the Protozoan Parasite *Leishmania*”, *Biochem J.*, 259(2):601-4.

Mehvar, R., (2000), “Modulation of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Proteins by Polyethylene Glycol Conjugation”, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 3(1):125-36.

Merle, Y., (1987), “Synthetic Polyampholytes. 5. Influence of Nearest-Neighbor Interactions

on Potentiometric Curves”, H.Phys.Chem., 91, 3092-3098.

Morawetz, H., (1985), *Polymers: The Origins and the Growth of a Science*. Wiley, New York

Mukhopadhyay, R., Theriault, R.L. ve Price, J.E. (1999), “Increased Levels of Alpha6 Integrins are Associated with the Metastatic Phenotype of Human Breast Cancer Cells”, *Clin Exp Metastasis*, 17: 325-332.

Mukkada, A.J., Meade, J.C., Glaser, T.A. ve Bonventre, P.F., (1985), “Enhanced Metabolism of *Leishmania Donovanii* Amastigotes at Acid Ph: An Adaptation for Intracellular Growth”, *Science*, 229(4718):1099-101.

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.

Mustafaev, M.I., Mustafaeva, Z., Bermek, E. ve Osada, Y.J., (1998), “New Amphiphilic Immunogens by Cu⁺²-mediated complexes of water-born Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) and Bovine Serum Albumin”, *Biact. Compat. Polymers*, 13, 33-49.

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

Nucci, M.L., Schorr, R. ve Abuchowski, A., (1991), “The Therapeutic Value of Poly (Ethylene Glycol)-Modified Proteins”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 6: 133-151.

Okamoto, C.T., (1998), “Endocytosis and Transcytosis”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 29: 215-28.
Pack, D.W., Hoffman, A.S., Pun, S. ve Stayton, P.S., (2005), “Design and Development of Polymers for Gene Delivery”, *Nature Rev. Drug Discov.*, 4: 581–593.

Osborne, C.K., Hobbs, K. ve Trent, J.M., (1987) “Biological Differences Among MCF-7 Human Breast Cancer Cell Lines from Different Laboratories. *Breast Cancer Res. Treat.*, 9: 111-121.

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

Ramkinssoon, G.C., Gutowska, A., Liu, F., Baudys, M. ve Kim, S. W., (1999), “Polymer Molecular Weight Alters Properties of pH/Temperature- Sensitive Polymeric Beads”, *Pharm. Res.*, 16: 819-827.

Rao, R.R., Mahajan, R.C. ve Ganguly, N.K., (1984), “Modified Media for In Vitro Cultivation of *Leishmania Donovanii* Promastigotes- A Comparative Study”, *Bul. PGI*, 18(3): 125-128.

Reddy, K.R., Modi, M.W. ve Pedder, S., (2002), “Use of Peginterferon Alfa-2a (40kd) (Pegasys) for the Treatment of Hepatitis C”, *Adv. Drug Del. Rev.*, 54: 571-86.

Regelson, W., (1986), “Advances in Intraperitoneal (Intracavitary) Administration of Synthetic Polymers for Immunotherapy and Chemotherapy”, *J. Bioact. Compat. Polymers.*, 1:84–106.

Rheinberger, H.J., (2007), "Cultures of experiment", Ber. Wiss., 30(2):135-44.

Richard, D.K., Bradley, J.C., Fred, C.K., Wigdahl, B. ve Schengrund, C-L., (2004), "Novel Polysulfated Galactose-Derivatized Dendrimers As Binding Antagonists of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(5): 1614-1623.

Ringsdorf, H., (2004), "Hermann Staudinger and the Future of Polymer Research: Jubilees – Beloved Occasions for Cultural Piety", Angew. Chem. Int., 43:1064–76.

Robinson, J.R., (1989), "Ocular Drug Delivery Mechanisms of Corneal Drug Transport and Mucoadhesive Delivery Systems", S.T.P. Pharmasciences, 5: 839-46.

Russell-Jones, G.J., (1996), "The Potential Use of Receptor-Mediated Endocytosis for Oral Drug Delivery", Adv. Drug Deliv. Rev. 20:83–97.

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

Sacks, D.L. ve Perkins, P.V., (1989), "Identification of an Infective Stage of *Leishmania* Promastigotes", Science, 223(4643):1417-9.

Sacks, D.L., (1989), "Metacyclogenesis in *Leishmania* Promastigotes", Exp. Parasitol., 69(1):100-3.

Sadigursky, M. ve Brodskyn, C.,(1986), "A New Liquid Medium without Blood and Serum for Culture of Hemoflagellates" Am J Trop Med Hyg,35(5):942-944

Sakaguchi, S., Furusawa, S., Wu, J. ve Nagata, K., (2007), "Preventive Effects of a Biscoclaurine Alkaloid, Cepharanthine, on Endotoxin or Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Septic Shock Symptoms: Involvement of from Cell Death in L929 Cells and Nitric Oxide Production in Raw 264.7 Cells", Int Immunopharmacol,7(2):191-7.

Saran, R., Gupta, A.K., Shrivastava, S.N. ve Prasad, L.S.N., (1986), "Use of Modified Grace's Insect Medium for the Primary Isolation of *Leishmania Donovanii* in Bihar India", Am. J. Trop. Med. Hyg., 35(3):488-90.

Satchi-Fainaro, R., Puder, M., Davies, J.W., Tran, H.T., Sampson, D.A., Grene, A.K., Corfas, G. ve Folkman, J., (2004), "Targeting Angiogenesis with a Conjugate of HPMa Copolymer and Tnp-470", Nature Med., 10: 255–261.

Shafie, S.M. ve Liotta, L.A., (1980), "Formation of Metastasis by Human Breast Carcinoma Cells (MCF-7) in Nude Mice. Cancer Lett., 11: 81-87.

Scott, P., Pearce, E., Natovite, P. ve Alan, S., (1987), "Vaccination Against Cutaneous Leishmaniasis in a Murine Model. Immunological Properties of Protective and Non-Protective Subfractions of a Soluble Promastigote Extract", Infect. Dis., 139: 3118-25.

Serres, A., Baudys, M. ve Kim, S.W., (1996), "Temperature and pH-sensitive polymers for human calcitonin derivate", Pharm. Res., 13: 196-201.

Seymour, L.W., (1991), "Synthetic Polymers with Intrinsic Anticancer Activity", J. Bioact. Comp. Polymers, 6:178-216.

Shafie, S. ve Brooks, S.C., (1977) "Effect of Prolactin on Growth and the Estrogen Receptor Level of Human Breast Cancer Cells (MCF-7)", Cancer Res., 37(3):792-9.

Somana, A., Mundodi, V. ve Gedamu V., (2002), "In Vitro Cultivation and Characterization of *Leishmania Chagasi* Amastigote-Like Forms", Acta Tropica 83: 37-42.

Takakura, Y., Mahoto, R.I. ve Hashida, M., (1998), "Extravasation of Macromolecules", Adv. Drug Deliv. Rev., 34:93-108.

Thompson, E.W., Paik, S., Brunner, N., Sommers, C.L., Zugmaier, G., Clarke, R., Shima, T.B., Torri, J., Donahue, S. ve Lippman, M.E., (1992), "Association of Increased Basement Membrane Invasiveness with Absence of Estrogen Receptor and Expression of Vimentin in Human Breast Cancer Cell Lines", J Cell Physiol, 150: 534-544.

Tanya, L.H., Leibowitz, G. ve Levine, F., (1998), "Telomerase Activity is Sufficient to Allow Transformed Cells to Escape from Crisis", Molecular and Cellular Biology, 19(3): 1864-1870.

Tong, D., Czerwenka, K., Sedlak, J., Schneeberger, C., Schiebel, I., Concin, N., Leodolter, S. ve Zeillinger, R., (1999), "Association of In Vitro Invasiveness and Gene Expression of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, pS2 and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Human Breast Cancer Cell Lines", Breast Cancer Res Treat, 56: 91-97.

Trabelsi, S. ve Langevin, D., (2007), "Co-Adsorption of Carboxymethyl-Cellulose and Cationic Surfactants at the Air-Water Interface", Langmuir, 23(3): 1248-52.

Trainer, P.J., Drake, W.M., Katznelson, L., Freda, P.U., Herman-Bonert, V., Van Der Lely, J.A., Dimaraki, E.V., Stewart, P.M., Friend, K.E., Vance, M.L., Beser, G.M. ve Scarlett, J.A., (2000), "Treatment of Acromegaly with the Growth Hormone-Receptor Antagonist Pegvisomant", N. Engl. J. Med., 342: 1171-77.

Turco, S.J. ve Descoteaux, A., (1992), "The Lipophosphoglycan of *Leishmania* Parasites", Annu. Rev. Microbiol., 46:65-94.

Ustaçelebi ř., (1991), Genetic Virology, Hacettepe Taş Kitapılık, ANKARA.

Veronese, F.M., (2001), "Peptide and Protein Pegylation: A Review of Problems and Solutions", Biomaterials, 22:405-417.

Wang, Y.S., Youngster, S., Grace, M., Bausch, J., Bordens, R. ve Wyss, D.F., (2002), "Structural and Biological Characterization of Pegylated Recombinant Interferon Alpha-2b and Its Therapeutic Implications", Adv. Drug. Deliv. Rev., 54(4): 547-70.

Watson, J.D. ve Crick, F.H. (1953), "Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid", Nature, 171: 737-8.

Webster, R., Didier, E., Harris, P., Siegel, N., Stadler, J., Tilbury, L. ve Smith, D., (2007), "PEGylated Proteins: Evaluation of Their Safety in the Absence of Definitive Metabolism Studies", *Drug Metabolism and Disposition Fast Forward*, 35:9-16.

Werle, M., (2007), "Natural and Synthetic Polymers as Inhibitors of Drug Efflux Pumps", *Pharmaceutical Research*, 25(3): 500-11.

Williams, J.E., (1998), "Diagnostic medical parasitology", *Parasitol Today*, 14(3):125-6.

Wiley J., (1964) "Encyclopedia of Polymer Science and Technology", Interscience Publishers, Division of John Wiley and Sons. Inc., Newyork.

Zange, R. ve Kissel, T., (1997), "Comparative In Vitro Biocompatibility Testing of Polycyanoacrylates and Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Using Different Mouse Fibroblast (L929) Biocompatibility Test Models", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 44: 149-157.

Zaplisky, S. ve Harris, J.M., (1997), *Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly(Ethylene Glycol)*, American Chemical Society, San Francisco.

İNTERNET KAYNAKLARI

1. <http://www.research.umbc.edu/~jwolf/method5.htm>
2. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.asp?body=Frames/G-L/Leishmaniasis/body_Leishmaniasis_page1.htm
3. <http://www.mayoclinic.com/health/hiv-aids/DS00005/DSECTION=7>
4. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/85011425>
5. <http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/cl3154.html>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	20.10.1985	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1999-2002	Süleyman Nazif Lisesi
Lisans	2002-2006	İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü
Yüksek Lisans	2006-2008	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı