



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**HÜCRE KÜLTÜRÜ TEMELLİ BİYOTEKNOLOJİK
ÜRETİMLERDE KULLANILMAK ÜZERE FARKLI
HÜCRE HATLARININ BİYOPROSES
VERİMLİLİKLERİNİN KİYASLANMASI**

Yüksek Lisans Tezi

SÜLEYMAN FURKAN DEMİRDEN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**HÜCRE KÜLTÜRÜ TEMELLİ
BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMLERDE
KULLANILMAK ÜZERE FARKLI HÜCRE
HATLARININ BİYOPROSES
VERİMLİLİKLERİNİN KİYASLANMASI**

Süleyman Furkan DEMİRDEN

Danışman: Doç. Dr. Suphi Şurişvan ÖNCEL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir
2023

Süleyman Furkan DEMİRDEN tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan **“Hücre Kültürü Temelli Biyoteknolojik Üretimlerde Kullanılmak Üzere Farklı Hücre Hatlarının Biyoproses Verimliliklerinin Kıyaslanması”** başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 12/09/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Doç. Dr. Suphi Şurişvan ÖNCEL	
Üye	: Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ	
Üye	: Prof. Dr. Zeynep ŞENYİĞİT	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Hücre Kültürü Temelli Biyoteknolojik Üretimlerde Kullanılmak Üzere Farklı Hücre Hatlarının Biyoproses Verimliliklerinin Kıyaslanması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

12 / 09 / 2023

Süleyman Furkan DEMİRDEN

ÖZET**HÜCRE KÜLTÜRÜ TEMELLİ BİYOTEKNOLOJİK
ÜRETİMLERDE KULLANILMAK ÜZERE FARKLI
HÜCRE HATLARININ BİYOPROSES
VERİMLİLİKLERİNİN KIYASLANMASI**

DEMİRDEN, Süleyman Furkan

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

Eylül 2023, 203 sayfa

Biyofarmasötiklere devamlı artan yüksek talep sebebiyle kısa sürede ve yüksek kalitede üretimini gerçekleştirmek biyoproses endüstrisinin hedefi haline gelmiştir. Biyoproseslerde elde edilmek istenen ürün göz önüne alınarak üretimlerde yer alacak olan ekspresyonel platformlar öne çıkmaktadır. Özellikle aşılar, monoklonal antikorlar ve büyüme faktörleri gibi kompleks üretim süreçlerine sahip ürünlerin üretiminde hayvan hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bu açıdan hücre hatlarının büyük ölçeğe uyarlanabilirliği, kültür ortamı ihtiyaçları ve ürün verimi gibi parametreler üzerinden bunların değerlendirilmesi yapılmaktadır. Ayrıca, otorite kurumlar endüstriyel üretimlerde hayvansal kaynaklı bileşenlerin kullanılmasını sakıncalı bulmaktadır. Bu nedenle, bu amaç için kullanılacak hücrelerin serumsuz besin ortamlarında üretilebilmeleri büyük önem taşımaktadır. Hücre hatlarının serumsuz ortama adaptasyonlarıyla beraber süspanse koşullara üremeye de adapte edilmeleri üretim kolaylığı ve maliyet açısından da avantaj sağlamaktadır. Bunlarla beraber hücre hatlarının endüstriye uyarlanabilirliklerinin değerlendirilmesinde nihai amaç ticari bir üretim olduğu için büyük ölçek çalışmaları ve birim zamanda hedeflenen ürünü üretim verimi diğer önemli değerlendirme kriterleridir. Böylelikle üretimde kullanılması planlanan ekspresyonel platform olan hücre hatlarının endüstriyel potansiyeli belirlenmektedir. Tüm bunlarla beraber biyofarmasötik ürünlerin hedef kitlesi insan olduğu için ekspresyonel platform olarak kullanılan hücre hatlarının insan kökenli olması ürünün yüksek doğrulukta olması açısından fayda sağlamaktadır.

Bu amaçla belirli üretimler için endüstriyel kullanımda veya üretim çalışmalarında yer alan ve diğer ürünlerin üretimi için de yüksek potansiyele sahip hücre hatları olarak seçilen CHO-K1, MDCK, HEK-293 ve THP-1 farklı adaptasyon yöntemleriyle serumsuz ortamda kültürlenmeye adapte edildi. Ayrıca THP-1 dışında orijinalinde adherent karakterde olan diğer hücre hatları aynı zamanda süspanse koşullarda üremeye de adapte edildi. Sonrasında tüm adepte hücre hatları sırasıyla erlen, spinner flask ve 1 L çalışma hacimli karıştırmalı tank biyoreaktöründe üretimleri yapılarak ölçek büyütme çalışmaları gerçekleştirildi. Bu hücre hatları endüstriyel uygunluklarının belirlenmesi adına adaptasyon süresi, ikilenme süresi, maksimum hücre konsantrasyonu, metabolit ve total protein analizleri üzerinden değerlendirmeler yapıldı. Son olarak, özellikle aşı üretimi açısından tüm hücre hatları H1N1 alt tipindeki influenza A virüsüyle enfekte edilerek virüs üretim başarısı üzerinden bu hücre hatlarının kıyaslaması yapıldı. Tüm bunlar sonucunda, çalışmada kullanılan her bir hücre hattının çeşitli amaçlardaki biyoproseslerde kullanılmak üzere endüstriyel üretimlere uygunluğu belirlendi.

Yapılan çalışmalar sonucunda tüm hücre hatlarının serumsuz ortama başarı ile adapte olduğu belirlendi. Doğrudan adaptasyon yönteminin özellikle adherent kültürlerin süspanse üremeye adapte edilmesindeki geçiş aşamasında hücre kümeleşmesi ve adherent karakterden uzaklaşma açısından daha başarılı olduğu gözlemlendi. Ölçek büyütme çalışmalarında biyoreaktörde kullanılan bıçak tipine uygun olarak spinner flaskta deneysel olarak belirlenen karıştırma hızlarında spesifik güç girişi üzerinden yapılan hesaplamalar sonucundan biyoreaktör için belirlenen karıştırma hızlarının anlamlı olduğu belirlendi. Tüm hücrelerin metabolit ve protein analizleriyle beraber yapılan influenza virüsü enfeksiyon çalışmalarında hücrelerin hem adapte hallerinin hem de orijinal hallerinin virüs ile enfekte olduğu görülerek bunlar TCID₅₀ ve RT-qPCR ile değerlendirildi. Tüm bunlar üzerinden bütün hücre hatları endüstriyel biyoproseslerde kullanılabilirlik açısından değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: biyoproses, hücre hattı, serumsuz ortama adaptasyon, ölçek büyütme çalışmaları, influenza virüsü

ABSTRACT**COMPARISON OF BIOPROCESS EFFICIENCIES OF
DIFFERENT CELL LINES TO BE POTENTIALLY USED IN
CELL CULTURE-BASED BIOTECHNOLOGICAL
PRODUCTIONS**

DEMİRDEN, Süleyman Furkan

MSc Thesis in Bioengineering

Supervisor: Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

September 2023, 203 pages

Due to the ever-increasing demand for biopharmaceuticals, it has become the target of the bioprocess industry to produce in a short time and at high quality. In this respect, expression platforms that will take place in productions come to the fore, considering the product desired to be obtained in bioprocesses. In particular, animal cell cultures are used in the production of products with complex structure and production process such as vaccines, monoclonal antibodies and growth factors. In this respect, they are evaluated on parameters such as adaptability of cell lines to large scale, culture medium requirements and product yield. In addition, institutions that have become the authority for the licensing of biopharmaceutical products find it objectionable to use of animal originated components in industrial production. For this reason, expression platforms should be produced in serum-free culture medium. Also, adaptation of cell lines to growth in suspension conditions along with their adaptation to serum-free culture provides advantages in terms of ease of production and cost. In addition, large-scale studies and production efficiency of the targeted product in certain time are other important evaluation criteria, since the ultimate goal is evaluating the industrial adaptability of cell lines in commercial production. Thus, the industrial potential of cell lines, which are the expression platforms planned to be used in production, is determined. With all these, since the target audience of biopharmaceutical products is human, the human origin of the cell lines used as the expression platform provides benefits in terms of high accuracy of the product.

For this purpose, CHO-K1, MDCK, HEK-293 and THP-1, which are selected cell lines with high potential for industrial use or production studies for certain productions and for the production of other products, were tried to be adapted to culture in serum-free medium with different adaptation methods. In addition, other cell lines that were originally adherent, except for THP-1, were also adapted to grow in suspension growth conditions. Afterwards, the adapted states of all these cell lines were produced in a flask, spinner flask and a stirred tank bioreactor with 1 L working volume, respectively, and scale-up studies were carried out. Afterwards, evaluations were made on adaptation time, doubling time, maximum cell concentration, metabolite and total protein analyzes to determine the industrial suitability of all cell lines. Finally, especially in terms of vaccine production, all cell lines were infected with H1N1 subtype influenza A virus and these cell lines were compared on the success of virus production. As a result of all these, it was determined that each cell line used in the study was suitable for industrial production to be used in bioprocesses for various purposes.

As a result of the studies, it was observed that all cell lines were successfully adapted to the serum-free medium. Among the two adaptation methods tested, the direct adaptation method was observed to be more successful in terms of cell aggregation and removal from non-adherent character, especially at the transition stage of adapting adherent cultures to suspension growth. As a result of the calculations made over the specific power input at the experimentally determined mixing speeds in the spinner flask in accordance with the blade type used in the bioreactor in scale-up studies, it was seen that the mixing speeds determined for the bioreactor were significant. Afterwards, in influenza virus infection studies performed with metabolite and protein analyzes of all cells, it was observed that both the adapted and original states of the cells were infected with the virus, and these were evaluated with TCID₅₀ and RT-qPCR. All cell lines were evaluated for usability in industrial bioprocesses.

Keywords: Bioprocess, cell line, adaptation to serum-free medium, scale-up studies, influenza virus

ÖNSÖZ

Günümüzde yaşam bilimleri olarak tek bir çatı altında toplanan biyolojik süreçler sadece ürün üretimini değil aynı zamanda hastalık modellemesi, ilaç denemesi ve kişiselleştirilmiş tedaviler gibi geniş bir açıdan insanın dahil olduğu her alandaki ihtiyaçları ele almak üzere genişletilmiştir. Hücre kültürü teknolojisi burada en önemli bilimsel araçlardan biri olarak gösterilmektedir. Böylelikle endüstriyel üretilere de taşınan hücre kültürleriyle gerçekleştirilen üretimler temel biyoproses işleyişi üzerinden kendine özel bir çalışma alanı bulmuştur.

Hücre kültürlerinin yer aldığı biyoprosesler, artan dünya nüfusuyla beraber çevresel sorunlara bağlı olarak gelişen hastalıkların tedavi edilmesi adına öne çıkmaktadır. Biyofarmasötik alanında gerçekleştirilen üretimlerin büyük kısmını oluşturan ürünler arasında özellikle monoklonal antikorlar kanser ve otoimmün rahatsızlıklar gibi kimyasal ilaçların yanıtızsız kaldığı hastalıkların tedavisi için tek çare olarak gösterilmektedir. Bununla birlikte uzun yıllardır toplum sağlığının korunmasını sağlayan temel dayanak olan ve Covid-19 pandemisiyle de önemini tekrardan insanlığa hatırlatan viral aşılarda hücre kültürleri tüm aşı üretiminin merkezinde yer almaktadır. Tüm bunlarla birlikte hücre kültürü temelli biyoproseslerin geliştirilmesi sürecinde gerçekleştirilen hücre mühendisliği çalışmaları ve üretim koşullarının optimizasyonunda çok farklı yaklaşımlar denenmekte olup özellikle artan talep ile beraber daha adaletli bir şekilde bu ürünlere ulaşılabilirliğin sağlanması adına en kısa zamanda en yüksek verimle kaliteli ürün üretimi hedeflenmektedir. Bu nedenle, biyoproseslerdeki üretim sürecinin iyileştirilmesi adına yakın gelecekte ve insan var olduğu sürece tüm dünya üzerindeki bilim insanlarının bu alanda çalışmayı sürdüreceği düşünülmektedir.

İZMİR

12/09/2023

Süleyman Furkan DEMİRDEN

İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK	ii
KABUL ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
TABLolar DİZİNİ.....	xxv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Biyoproses Endüstrisi	4
2.2 Hayvan Hücre Kùltürleri	9
2.3 Hücre Hatları	15
2.3.1 CHO hücre hattı	19

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.2 MDCK hücre hattı	20
2.3.3 HEK-293 hücre hattı.....	21
2.3.4 THP-1 hücre hattı	23
2.4 Biyofarmasötik Üretimlerde Ekspresyonel Platformlar Olarak Hücre Hatları .	24
2.4.1 Üretimde kullanılacak hücre hattının kökeni.....	26
2.4.2 Hücre hattının üreme özelliği	28
2.4.3 Güvenlik regülasyonları	30
2.4.4 Hücre hatlarının üretim koşulları.....	32
2.5 Hayvan Hücre Kültüründeki Besin Ortamlarının Önemi	34
2.5.1 Hayvan hücre kültürlerinde kullanılan besin ortamları	35
2.5.2 Besin ortamları çeşitleri.....	36
2.6 Hayvan Hücrelerinin Serumsuz Ortama ve Süspanse Çoğalmaya Adapte Edilmesi	49
2.6.1 Serumsuz ortama adaptasyon yöntemleri	52
2.6.2 Süspanse üreme koşullarına adaptasyon.....	56

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.7 Hücre Kültürü Temelli Viral Aşılar ve İnfluenza Aşıları.....	57
2.7.1 Hücre kültürü temelli viral aşılar.....	58
2.7.2 İnfluenza virüsü ve influenza aşıları.....	60
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	64
3.1 GEREÇ	64
3.1.1 Hücre hatları ve virüs.....	64
3.1.2 Besin ortamları	64
3.1.3 Çalışmada kullanılan farklı besin ortamları ve yıkama solüsyonu içerisine eklenen bileşenler	65
3.1.4 Gerçekleştirilen hücre kültürü işlemleri ve analizlerde kullanılan kimyasallar.....	65
3.1.5 Gerçekleştirilen çalışmada kullanılan sarf malzemeleri	66
3.1.6 Kullanılan araçlar ve cihazlar	67
3.2 YÖNTEM	68
3.2.1 Çalışmada kullanılan kimyasalların hazırlanması	69
3.2.2 Hücre kültürlerinin oluşturulması.....	69

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.3 Hücrelerin serumsuz besin ortamına ve süspanse üreme koşullarına adaptasyon çalışmaları.....	72
3.2.4 Ölçek büyütme çalışmaları	75
3.2.5 Hücre kültürü çalışmalarında kültürün değerlendirilmesi	82
3.2.6 İnfluenza virüsü enfeksiyon çalışmaları	88
3.2.7 İstatistiksel Analiz	93
4. BULGULAR	94
4.1 Hücre Hatlarının Kültür Karakterlerinin Belirlenmesi.....	94
4.1.1 THP-1 hücre hattı	94
4.1.2 CHO-K1 hücre hattı	97
4.1.3 MDCK hücre hattı	100
4.1.4 HEK-293 hücre hattı.....	103
4.2 Hücre Hatlarının Serumsuz Ortama ve Adherent Kültürlerin Süspanse Üreme Koşullarına Adaptasyonu	106
4.3 Ölçek Büyütme Çalışmaları	116
4.3.1 THP-1 hücre hattının ölçek büyütme çalışmaları	117
4.3.2 CHO-K1 hücre hattının ölçek büyütme çalışmaları	122
4.3.3 MDCK hücre hattının ölçek büyütme çalışmaları.....	128

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.3.4 HEK-293 hücre hattının ölçek büyütme çalışmaları	134
4.3.5 Tüm hücre hatlarının biyoreaktör üretimleri üzerinden kıyaslanması.....	141
4.4 Büyük Ölçek Üretiminde Hücre Hatlarının Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	142
4.5 Hücre Hatlarının İnfluenza Virüsü ile Enfekte Edilmesi ve Virüs Üretimi.....	144
5. TARTIŞMA.....	149
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	161
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	164
TEŞEKKÜR	198
ÖZGEÇMİŞ.....	200

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Biyoprosesler kullanılan hücre hatlarının üreme karakterleri	29
2.2 Serumsuz ortama doğrudan adaptasyon yöntemi	52
2.3 Serum içeriği azaltma ile yapılan kademeli adaptasyon yöntemi.....	53
2.4 Sekansiyel adaptasyon yöntemi ile serumsuz ortama adaptasyon.....	54
2.5 Kullanılmış besin ortamı ile adaptasyon ile serumsuz ortama adaptasyon	54
2.6 Kültür içinde adaptasyon ile serumsuz ortama adaptasyon	55
2.7 İnfluenza A virüsü yapısı.....	61
3.1 Tez kapsamında yapılan tüm çalışmaların görsel olarak gösterimi.....	68
3.2 Erlenler ile beraber kapaklarının otoklav sonrasında (a) ve erlenlerin inokülasyon yapıldıktan sonra orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edilirken (b) çekilmiş görüntüleri.....	76
3.3 Spinner flaskın otoklav sonrasında (a), kabin içerisinde inokülasyon yapılırken (b) ve manteyik karıştırıcı üzerinde inkübe edilirken (c) çekilmiş görüntüleri	77
3.4 Biyoreaktörde kullanılan 30°'ye ayarlı 3 bıçaklı segmentli tip karıştırıcının önden (a) ve üstten (b) çekilmiş görüntüleri.....	79
3.5 Biyoreaktörün otoklav sonrasında (a) inokülasyon yapılırken (b) ve inokülasyon sonrası inkübasyona başlamadan önce (c) çekilmiş görüntüleri.....	80

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.1 THP-1 hücrelerinin ters faz mikroskopta çekilmiş olan farklı büyütmelelerdeki görüntüleri 4x (a), 10x (b), 20x (c) ve 40x (d)	94
4.2 Büyüme kinetiği sırasında günlük olarak sayımı yapılan THP-1 hücrelerinin gün bazındaki değişimlerini gösteren mikroskop görüntüleri (10x)	95
4.3 THP-1 hücrelerinin gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler	96
4.4 CHO-K1 hücrelerinin ters faz mikroskopta çekilmiş olan farklı büyütmelelerdeki görüntüleri 4x (a), 10x (b), 20x (c) ve 40x (d)	97
4.5 Adherent CHO-K1 hücrelerine ait bilinen hücre konsantrasyonlarına karşı gelen absorbans değerlerinin gösterildiği standart grafiği.....	97
4.6 Büyüme kinetiği için günlük olarak MTT testi yapılan CHO-K1 hücrelerinin gün bazındaki değişimlerini gösteren mikroskop görüntüleri (10x)	98
4.7 CHO-K1 hücrelerinin büyüme kinetiğinde gün bazındaki hücre konsantrasyon (a), pH (b) ve metabolit (c) değerleri.....	99
4.8 MDCK hücrelerinin ters faz mikroskopta çekilmiş olan farklı büyütmelelerdeki görüntüleri 4x (a), 10x (b), 20x (c) ve 40x (d)	100
4.9 Adherent MDCK hücrelerine ait bilinen hücre konsantrasyonlarına karşı gelen absorbans değerlerinin gösterildiği standart grafiği	100

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.10 Günlük olarak MTT testi yapılan MDCK hücrelerinin gün bazındaki değişimlerini gösteren mikroskop görüntüleri (10x).....	101
4.11 MDCK hücrelerinin büyüme kinetiğinde gün bazındaki hücre konsantrasyon (a), pH (b) ve metabolit (c) değerleri.....	102
4.12 HEK-293 hücrelerinin ters faz mikroskopta çekilmiş olan farklı büyütmelerdeki görüntüleri 4x (a), 10x (b), 20x (c) ve 40x (d)	103
4.13 Adherent HEK-293 hücrelerine ait bilinen hücre konsantrasyonlarına karşı gelen absorbans değerlerinin gösterildiği standart grafiği.....	103
4.14 Kültür süresi boyunca MTT testi ile gün bazında HEK-293 hücrelerinin değişimlerini gösteren mikroskop görüntüleri (10x).....	104
4.15 HEK-293 hücrelerinin büyüme kinetiğinde gün bazındaki hücre konsantrasyon (a), pH (b) ve metabolit (c) değerleri.....	105
4.16 THP-1 hücrelerinin adaptasyon sırasında ters faz mikroskopta çekilmiş olan kontrol grubu a) ve adaptasyon demesi sırasında PROM-152 ortamında kültüre edilen hücrelerin b) görüntüleri (10x)	106
4.17 THP-1 hücrelerinin PROM-152 ortamına doğrudan adaptasyonunda hücrelerin konsantrasyon (a) ve % canlılık (b) açısından kontrol grubuyla kıyaslanması	107
4.18 Doğrudan adaptasyon yöntemi sırasında serumlu bazal ortamda kültürlen (a) ve sonrasında tiripsinizasyon ile kaldırılıp sayıldıktan sonra süspanse flaska alınak kültürlen (b) MDCK hücrelerinin görüntüleri (10x).....	108

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.19 Doğrudan adaptasyon yöntemi sırasında serumlu bazal ortamda kültürlen (a) ve sonrasında tripsinizasyon ile kaldırılıp sayıldıktan sonra süspanse flaska alınak kültürlen (b) CHO-K1 hücrelerinin görüntüleri (10x) 109

4.20 Doğrudan adaptasyon yöntemi sırasında serumlu bazal ortamda kültürlen (a) ve sonrasında tripsinizasyon ile kaldırılıp sayıldıktan sonra süspanse flaska alınak kültürlen (b) HEK-293 hücrelerinin görüntüleri (10x) 110

4.21 Adaptasyon çalışmaları sırasında devamlı pasajlar sırasında adherent karakterini koruyan CHO-K1 (a), HEK-293 (b) ve MDCK (c) hücre hatlarının farklı büyütmelelerdeki mikroskop görüntüleri (Sol sütun 10x, Sağ sütun 20x) .. 111

4.22 Kültür içinde adaptasyon yöntemi sırasında serumlu bazal ortamda kültürlen (a), flask yüzeyini kaplamış olan hücrelerin üzerine IXORA ortamı eklenip 2 gün bekledikten sonraki (b) ve 2 gün sonunda tripsinizasyon ile kaldırılıp sayıldıktan sonra süspanse flaska alınak kültürlen (c) CHO-K1 hücrelerinin görüntüleri (10x) 112

4.23 Kültür içinde adaptasyon yöntemi sırasında serumlu bazal ortamda kültürlen (a), flask yüzeyini kaplamış olan hücrelerin üzerine CAMELLIA ortamı eklenip 2 gün bekledikten sonraki (b) ve 2 gün sonunda tripsinizasyon ile kaldırılıp sayıldıktan sonra süspanse flaska alınak kültürlen (c) MDCK hücrelerinin görüntüleri (10x) 113

4.24 Kültür içinde adaptasyon yöntemi sırasında serumlu bazal ortamda kültürlen (a), flask yüzeyini kaplamış olan hücrelerin üzerine ORCHID-P ortamı eklenip 2 gün bekledikten sonraki (b) ve 2 gün sonunda tripsinizasyon ile kaldırılıp sayıldıktan sonra süspanse flaska alınak kültürlen (c) HEK-293 hücrelerinin görüntüleri (10x) 114

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.25 Adaptasyon çalışmalarında 15 pasaj sayısına ulaşmış MDCK (a), CHO-K1 (b), HEK-293 (c) ve THP-1 (d) hücre hatlarının farklı büyütmelerdeki mikroskop görüntüleri (Sol sütun 10x, Sağ sütun 20x)	116
4.26 Erlen üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenilen THP-1 hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler	117
4.27 THP-1 hücrelerinin erlen üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler	118
4.28 Spinner flask üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenilen THP-1 hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler.....	119
4.29 THP-1 hücrelerinin spinner flask üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler.....	120
4.30 THP-1 hücrelerinin karıştırmalı tank biyoreaktöründeki üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler	121
4.31 Erlen üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenilen CHO-K1 hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler.....	123
4.32 CHO-K1 hücrelerinin erlen üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler	124
4.33 Spinner flask üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenilen CHO-K1 hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler.....	124

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.34 CHO-K1 hücrelerinin spinner flask üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler.....	125
4.35 CHO-K1 hücrelerinin karıştırmalı tank biyoreaktöründeki üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler	126
4.36 Erlen üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenene MDCK hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler	128
4.37 MDCK hücrelerinin erlen üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler	130
4.38 Spinner flask üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenene MDCK hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler.....	130
4.39 MDCK hücrelerinin spinner flask üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler.....	132
4.40 MDCK hücrelerinin karıştırmalı tank biyoreaktöründeki üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler	133
4.41 Erlen üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenene HEK-293 hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler.....	135
4.42 HEK-293 hücrelerinin erlen üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler.....	136

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

4.43 Spinner flask üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenene HEK-293 hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler.....	137
4.44 HEK-293 hücrelerinin spinner flask üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler.....	138
4.45 HEK-293 hücrelerinin karıştırmalı tank biyoreaktöründeki üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler	139
4.46 Sterilite testi için önceden hazırlanmış TSB (solda) ve TGB (sağda) test tüpleri (a), her bir hücre hattı için ölçek büyütme işlemleri sırasında yapılan sterilite testinin 14 gün sonundaki görüntüsü (b)	142
4.47 Bilinen protein konsantrasyonlarına karşı gelen absorban değerlerinin gösterildiği standart grafiği.....	143
4.48 Viral enfeksiyon çalışmalarında kullanılacak olan stoğun viral yükünün belirlendiği TCID ₅₀ testi a), test sonucunda elde edilen pleytin şematize edilmiş görüntüsü b) ve testte belirlenen pozitif ve negatif pleyt gözlerinin mikroskop görüntüsü (10x)	144
4.49 MDCK (a), HEK-293 (b), CHO-K1 (c) ve THP-1 (d) hücre hatlarının hem orijinal (sol sütun) hem de adapte hallerinin (sağ sütun) çalışmada kullanılan H1N1 alt tipindeki influenza A virüsü ile enfekte edildikten 72 saat sonraki görüntüleri (20x).....	146
4.50 MDCK (a), HEK-293 (b), CHO-K1 (c) ve THP-1 (d) hücre hatlarının hem orijinal (üst satır) hem de adapte hallerinin (alt satır) kullanılan influenza A virüsü ile enfekte edildikten 72 saat sonraki immünfloresan görüntüleri (40x).....	147

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Endüstriyel biyoproses ürünleri ve bu ürünlerden bazıları.....	5
2.2 Serumun yapısındaki bileşenler ve konsantrasyonları.....	39
4.1 Hücre hatlarının adapte edilmek istenen koşullarda 15 kez pasajlanmaları için geçen süre	115
4.2 THP-1 hücre hattıyla yapılan çalışmalarda hücrenin hem orijinal hem de adapte edilmiş haliyle farklı üretim sistemlerinde yapılmış olan üreme kinetiklerinden elde edilen maksimum hücre konsantrasyonu ve ikilenme süresi değerleri.....	122
4.3 CHO-K1 hücre hattıyla yapılan çalışmalarda hücrenin hem orijinal hem de adapte edilmiş haliyle farklı üretim sistemlerinde yapılmış olan üreme kinetiklerinden elde edilen maksimum hücre konsantrasyonu ve ikilenme süresi değerleri	128
4.4 MDCK hücre hattıyla yapılan çalışmalarda hücrenin hem orijinal hem de adapte edilmiş haliyle farklı üretim sistemlerinde yapılmış olan üreme kinetiklerinden elde edilen maksimum hücre konsantrasyonu ve ikilenme süresi değerleri	134
4.5 HEK-293 hücre hattıyla yapılan çalışmalarda hücrenin hem orijinal hem de adapte edilmiş haliyle farklı üretim sistemlerinde yapılmış olan üreme kinetiklerinden elde edilen maksimum hücre konsantrasyonu ve ikilenme süresi değerleri	140
4.6 Çalışmada kullanılan tüm hücre hatlarının adapte edildikten sonra gerçekleştirilen biyoreaktör üretimlerine ait veriler	141
4.7 Hücre hatlarının biyoreaktör üretimleri sırasında toplanan örnekler üzerinden hesaplanan toplam protein konsantrasyonları.....	143
4.8 Viral enfeksiyon çalışmalarında kullanılacak olan stoğun virüs doğrulaması ve viral yükünün Ct olarak belirlendiği RT-qPCR sonucu	145

TABLÖLAR DİZİNİ (devam)TabloSayfa

4.9 RT-qPCR ve TCID ₅₀ testi sonucunda her bir hücre hattı için belirlenen değerler	148
--	-----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
\$	Amerikan Doları
dk	Dakika
%	Yüzde
>	Büyüktür
<	Küçüktür
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre
1X	Bir Kat Derişik
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
pH	Potansiyel Hidrojen (<i>Power Of Hydrogen</i>)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
μ_{cell}	Spesifik büyüme hızı
t_d	İkilenme süresi
V	Hacim
N_i	Karıştırıcı hızı
D_i	Karıştırıcı çapı
D_T	Biyoreaktör çapı
N_p	Güç sayısı (veya Newton sayısı)
ε	Enerji dağılım oranı
μ	Viskozite
ρ	Yoğunluk
σ	<i>Kolmogorov Eddy</i> uzunluğu

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ANOVA	Varyans Analizi
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (<i>American Type Culture Collection</i>)
BSS	Dengeli Tuz Solüsyonu (<i>Balanced salt solution</i>)
CHO-K1	Çin Yumurtalık Hücre Hattı (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSMZ	Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kùltürleri Koleksiyonu (<i>Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen Und Zellkulturen</i>)
EBV	Epstein Barr Virüsü
EACC	Avrupa Onaylanmış Hücre Kùltürleri Koleksiyonu (<i>European Collection Of Authenticated Cell Cultures</i>)
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EMA	Avrupa İlaç Ajansı (<i>European Medicine Agency</i>)
EMEM	Eagle's Minimal Essential Medium
FBS veya FCS	Fetal Sığır Serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (<i>Food And Drug Administration</i>)
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
HEPES	(4-(2-Hidroksietil)-1-Piperazintansülfonik Asit)
HEK-293	İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı (<i>Human embriyonic Kidney</i>)
HPV	İnsan Papilloma Virüsü (<i>Human Papilloma Virus</i>)
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (<i>International Council for Harmonisation</i>)
IGFs	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (<i>Insulin-like Growth Factors</i>)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
IL-1	İnterlökin 1 (<i>Interleukin 1</i>)
IL-6	İnterlökin 6 (<i>Interleukin 6</i>)
JCRB	Japon Araştırma Biyolojik Kaynakları Koleksiyonu (<i>Japanese Collection Of Research Bioresources</i>)
MDCK	Köpek Böbrek Epitelyal Hücre hattı
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü (<i>Platelet-derived Growth Factor</i>)
rpm	Dakikadaki devir sayısı (<i>Rotation per minute</i>)
RPMI-1640	Rosewell Park Memorial Institute 1640 medium
SV40	Simian Virüsü 40
THP-1	İnsan Monositik Hücre Hattı
vvm	Birim zamanda, birim hacimdeki sıvı ortamdan, birim hacimde geçen hava miktarı

1.GİRİŞ

Dünya çapında biyoteknolojik ürünlerin üretimi ve pazarlanması giderek daha büyük bir sektör haline gelmektedir. Bu ürünlerin katma değeri yüksek olduğundan dolayı üretim sonrasında ihraç edilmesi, üretiminin yapıldığı ülkenin ekonomik kazanımı açısından da önemli bir yere sahiptir. Biyoteknolojik ürünlerin üretimi ise biyoprosesler aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Biyoproses kısaca bir biyolojik sistem üzerinden hedeflenen bileşeni veya ürünü üretmek için gerçekleştirilen bütün işlem basamakları olarak tanımlanmaktadır. Biyoproses endüstrisinin en çok ürün talebinin olduğu ve tüm biyolojik temelli yüksek katma değerli ürünler içerisinde üretici firmalara en çok kazanç sağlayan sektör ise biyofarmasötik sektördür. Biyofarmasötik ürünlerin hedeflediği medikal sektörü dünya ekonomisinin en önemli sektörlerinden biridir. Yıllar içerisinde artan dünya popülasyonu ile birlikte bu sektörün gelişmesine bağlı olarak ortaya çıkan temel sağlık hizmetleri, hastalık teşhis hizmetleri ve tedavi edici ürünlere olan ihtiyaç nedeniyle tüm bunlara cevap verebilecek olan biyoteknoloji endüstrisi de paralel şekilde bir büyüme göstermiştir (Dawn and Seymour, 2020; Gupta et al., 2019; Jagschies et al., 2018).

Günümüzde modern moleküler biyoloji ve gen teknikleri sayesinde etkili bir şekilde üretilen biyofarmasötikler tüm ilaç endüstrisinin açık ara en hızlı büyüyen grubudur. Bu doğrultu da biyoteknolojik ilaçların sayısı son otuz yılda katlanarak artmıştır (Jagschies et al., 2018; Lokko et al., 2018). Artan dünya popülasyonuna bağlı olarak sürekli genişleyen talep miktarının yanında özellikle tüm dünyayı etkileyen Covid-19 pandemisi gibi bir senaryoda biyofarmasötik ürünlere olan ani ihtiyaç sebebiyle biyofarmasötik endüstrisine ve biyoproseslere olan ilgi de artmıştır. Büyük miktarlarda oluşan talep ve azalan çevresel kaynaklarla beraber dünya popülasyonunun tamamının aynı anda aşı veya ilaç gibi en önemli biyofarmasötik ürünlere ulaşamaması bu endüstrinin mevcut üretim kapasitesinin talepler karşısında yetersiz kaldığını göstermektedir. Bu bakımdan, en kısa sürede, yüksek miktarlarda ve kaliteli ürün üretimini ekolojik açıdan da sürdürülebilir bir şekilde mümkün kılan biyoproseslerin geliştirilmesine yönelik sürekli bir çaba harcanmaktadır (Ayati et al., 2020; Fröhling and Hiete, 2020; Ögmundarson et al., 2020; Shanmugaraj and Phoolcharoen, 2021).

Biyofarmasötik endüstrisindeki ürünlerin üretimindeki biyoproseslerde ekspresyonel platformların başında hayvan hücre kültürleri gelmektedir. Hayvan hücre kültürleri günümüzde kanser modellemesi, sitotoksikite çalışmaları, moleküler mekanizma çalışmaları gibi birçok araştırma alanında bilim insanları için temel bir araç haline gelmiştir. Ayrıca, tıp alanında kök hücre çalışmaları ve *in vitro* fertilizasyon başta olmak üzere bu gibi tedavi amaçlı uygulamalarda da kullanılmaktadır. Endüstriyel anlamda ise büyük ölçekte yüksek katma değere sahip biyoteknolojik ürünler olan viral aşılarda ve antikolar gibi terapötik bileşenlerin üretimi gibi birçok biyofarmasötiğin üretiminde kullanılmaktadır (Liu and Morrow, 2016; Freshney, 2011; Saha et al., 2016). Endüstriyel üretimlerde hücre kültürlerinin kullanılmasının en temel nedeni, ürün olarak hedeflenen biyofarmasötik bileşenlerin doğru bir şekilde fonksiyonellik göstermesi için hayvan hücrelerinin gerçekleştirdikleri post translasyonel modifikasyonlardır. Bununla birlikte, insan kullanımına sunulacak aşılarda ve özellikle tüm virüsün aşısı içerisinde yer aldığı üretimlerde temel bir adım olan virüsün üretimi basamağında, çoğalmaları için uygun bir konağa ihtiyaçları vardır. Bu açıdan da virüslerin hücre içi paraziter doğaları gereği bu aşılarda üretiminde hayvan hücrelerinin kullanımı bir zorunluluktur (Aubrit et al., 2015; Josefsberg and Buckland, 2012). Bu amaç doğrultusunda kültür stabiliteleri ve kontrollü yapay ortamlarda sonsuza kadar bölünme özellikleri sayesinde hücre hatları, endüstriyel üretim amacıyla sıklıkla tercih edilmektedir. Hücre hatlarının biyoprosesler ve özellikle de büyük ölçekte gerçekleştirilmesi planlanan ticari üretimlerdeki başarıları oldukça önemli bir hale gelmektedir. Bu üretimlerin başarısı ise büyük oranda hücrelerin kültürlendikleri kültür ortamı koşullarına ve kullanılan besin ortamının içeriğine bağlıdır. Bu nedenle de farklı hücre türü ve kültürlen bu hücrelerin sentezlediği ürünlerin yüksek verimde elde edilmesi için çok farklı besin ortamı formülasyonları oluşturulmuştur (Freshney, 2011; Yang and Xiong, 2012; T. Yao and Asayama, 2017).

Hayvan hücre kültürlerinde kullanılan besin ortamlarında kültür veriminin artırılması için genellikle serum kullanılmaktadır. Serum, hayvansal bir yan ürün olup kültür başarısını destekleyecek farklı bileşenleri içermesi nedeniyle kültür ortamlarına eklenmektedir. Hücre kültürü çalışmalarında genellikle sığır serumları kullanılmaktadır. Ancak endüstriyel boyutta, insan kullanımına sunulacak medikal

anlamdaki ürünlerin üretiminde kullanılacak hücrelerin Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (*Food and Drug Administration*, FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (*European Medicine Agency*, EMA) gibi yetkili kurumların belirlediği kurallar nedeniyle serumsuz ortamlarda kültürlenmesi gerekmektedir (Butler and Meneses-Acosta, 2012; Freshney, 2011; Nema and Khare, 2012). Bu nedenle endüstriyel üretimlerde kullanılma potansiyeline sahip hücre hatları, ancak serumsuz ortama adapte edildikten sonra bu tür üretimlerde kullanılabilmektedir. (Freshney, 2011; Morrow, 2016).

İnfluenza her yıl tekrarlı salgınla ortaya çıkan ve halk arasında grip olarak adlandırılan viral bir hastalıktır. Her yıl düzenli salgınlar olarak toplumu etkilemesinin dışında yüksek değişkenliğe sahip doğası gereği bazı evrimsel atlamalarla beraber tüm dünyayı ani olarak etkileyen pandemiler olarak tarihte kendini birçok kez göstermiştir (Demirden et al., 2022; Khanna et al., 2013). Sürekli meydana gelen salgınların önlenmesi ve toplum sağlığının korunması için her yıl dolaşımda baskın olan ilgili virüse karşı aşılar üretilmektedir. Bu üretimlerin en kısa sürede, düşük maliyetli ve yüksek miktarda yapılması hedeflenmektedir. Bu açıdan da tüm biyoproseslerde iyileştirmeler yapılarak bu hedeflere ulaşmaya çalışılmaktadır (Gallo–Ramírez et al., 2015; Khan, 2013).

Bu tez çalışmasında, biyoproses endüstrisine olan talep doğrultusunda endüstride büyük ölçekte üretilmek istenen biyofarmasötiklerin üretiminde kullanılan veya kullanılma potansiyeline sahip olan farklı hücre hatlarının biyoproses başarısının değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu değerlendirmeye, Covid-19 pandemisinde olduğu gibi şimdiye kadar çeşitli laboratuvar çalışmaları veya üretim denemeleri dışında kullanılmamış olan fakat üretimlerde kullanılma potansiyeli yüksek ekspresyonel platformların endüstriyel açıdan biyoproseslere uygunluğu ortaya konacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Biyoproses Endüstrisi

Biyoproses kelimesi temelinde canlı veya canlıdan köken alan bir bileşen veya bileşenler ile üretimin yapıldığı tüm süreci ifade etmektedir. Bu açıdan burada canlı sistemler olarak organizmanın tamamı, hücre, doku, enzim vb. birimler tüm bu sürece dahil edildiğinden endüstri ve biyoloji biliminin ortak paydada “ürün” elde edilmesine odaklandığı bir alan olarak ortaya çıkmaktadır (Butler and Meneses-Acosta, 2012; Jagschies, 2018a). Bununla birlikte biyoprosesler aynı zamanda enerji dönüşümü ve çevresel kirliliğin giderilmesi veya iyileştirilmesi gibi çalışma alanlarında da kullanılmaktadır (Ögmundarson et al., 2020; Usmani et al., 2021). Biyoproses temelli olarak günümüzde çok farklı ürünler üretilmekte olup bunlar çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Bunlar arasında kozmetik ürünlerin etken maddeleri, pigmentler, biyogübreler, gıda katkı maddeleri, gıda takviyeleri, çeşitli biyopolimerler, biyofarmasötik ilaçların etken maddeleri, monoklonal antikorlar (mAb), aşılar, büyüme faktörleri gibi geniş yelpazede ürünler bulunmaktadır (Cadwell, 2011; Cortesão et al., 2020; Jagschies, 2018b; Kiesslich et al., 2021). Bu açıdan da biyoprosesler sonucu elde edilen ürünler ekmek mayası ya da deterjanlar içerisindeki leke çıkarıcı enzimler gibi katkı maddeleri olarak günlük hayatta yer alırken diğer bir yandan birçok hastalığın önlenmesinde ve toplum sağlığının korunmasındaki en temel dayanak olan aşilar şeklinde de karşımıza çıkabilmektedir (Tablo 2.1). Bu yönleriyle aslında uzun yıllık bir geçmişe sahip olan biyoproses ürünleri hayatın her alanında kullanılan bir ihtiyaç haline gelmiştir. Bu açıdan da son yıllarda artan dünya popülasyonu ve meydana gelen çevresel, ekonomik ve kültürel değişimler göz önüne alındığında bu ürünlere olan ihtiyaç son 20 yıl göz önüne alındığında çok daha yüksek seviyelere ulaşmıştır (Cortesão et al., 2020; Jagschies and Łacki, 2018). Bunun nedeni artan popülasyondaki her bir bireyin yaşam kalitesini uygun şekilde devam ettirmek ve ihtiyaç halinde gıda, kozmetik veya medikal anlamdaki tüm ürünlere kolaylıkla erişebilmek istemesidir (Fröhling and Hiete, 2020; Lokko et al., 2018). Özellikle Covid-19 pandemisiyle birlikte de aşı ve ilaç üretimi endüstrisine olan ilgi ile beraber bu ürünlere olan talep de giderek artmıştır. Bu anlamda tüm bu talebi karşılamak adına da en kısa zamanda ve büyük miktarlarda bu ürünleri denetleyen otorite kuruluşların belirlediği koşulları

sağlayan uygun kalitedeki ürünleri üretmek biyoproses endüstrisi için temel bir amaç haline gelmiştir (Langer, 2022; Shanmugaraj and Phoolcharoen, 2021).

Tablo 2.1. Endüstriyel biyoproses ürünleri ve bu ürünlerden bazıları (Dumont et al., 2016; Sattley and Madigan, 2015; Zahoor et al., 2016)

Endüstriyel Biyoproses Ürünleri	
Antibiyotikler	Penisilin, Tetrasiklin, Klavulanik asit
Endüstriyel Enzimler	Proteazlar, Lipazlar, Glikoz izomeras
Gıda Takviyeleri/Katkı Maddeleri	Vitaminler, Amino asitler, Sitrik asit
Kimyasal Bileşikler	Etanol, Bütanol, Biyodizel, Steroidler
İnsan Hormonları	İnsülin, Somatotropin, Eritropoietin, Follitropinler, Osteogenik protein-I, Tirotropin α , Luteinleyiciler
Kan Proteinleri	Doku plazminojen aktivatörü, Faktör IIa, Faktör III, Katridekalog, Faktör VIII, Faktör IX
Bağışıklık Düzenleyiciler	İnterferonlar, Tümör nekroz faktörleri, Epoetinler, Romiplostim, Filgastim
Terapötik Toksin	İncobotulinumtoksini A
Terapötik Enzimler	DNAaz, Kollajenaz, Okiriplazmin, Peglotikaz, Glukarpidaz, Agalsidaz β , Hiyalüronidaz, Elosülfaz α , Laronidaz, Taligluseraz α
Monoklonal Antikorlar	Bevacizumab, Palivizumab, Cetuximab, Adalimumab, Rituximab, Transtuzumab
Aşılar	Hepatit A, Hepatit B, Meningokok, Pnömonok, Kızamık, Kabakulak, Suçiçeği, Tetanoz, İnfluenza, Servikal kanser aşıları

Biyoproses endüstrisindeki ürünler aynı zamanda katma değeri yüksek olan ürünler sınıfına dahil edilmektedir. Bu açıdan da dünya üzerinde oluşan talep düşünüldüğünde katma değeri yüksek olan bu ürünler, hem ülke bazında ekonomik kazanç sağlaması adına hem de ülkede istihdam yaratılması nedeniyle önemli bir kaynak olduğu görülmektedir. Aynı zamanda gelişen ve değişen küresel piyasada da özellikle de son yıllarda bir trend haline gelen biyoteknolojik ürün üretiminin, ilerleyen yıllar içerisinde de sürekli bir artış içerisinde olacağı tahmin edildiğinden

bu alanda yapılacak olan yatırımların ülke ekonomisi açısından da büyük fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Bunu yaparken aynı zamanda bu tür üretimlerde kullanılan ve üretim girdileri olarak kabul edilen materyallerin, yerli kaynaklardan veya yerli üreticilerden temin edilmesi de ülke ekonomisi açısından fayda sağlamaktadır (Berg et al., 2020; Lokko et al., 2018).

Endüstriyel ürün üretimine yönelik olan biyoproseslerde ve özellikle ilaç endüstrisinde dünyada “Tasarım Yoluyla Kalite” (*Quality by Design*, QbD) yaklaşımı kullanılmaktadır. Bu yaklaşıma göre elde edilmesi tasarlanan ürünün kalitesi, saflığı, özellikleri ve etkinliği bir bütün olarak üretim sürecinin de dahil edilmesiyle ele alınmaktadır. Bu anlamda da QbD yaklaşımı ile biyoproseslerdeki son ürün eldesine kadar olan süreçteki her bir girdi ve çıktı uygunluk açısından değerlendirmektedir (Josefsberg and Buckland, 2012; Pramod et al., 2016). Biyoproses temelli biyoteknolojik ürünlerin üretimi ise yukarıda da bahsedildiği üzere canlı sistemlerin kullanımına dayanmaktadır. Bunun için bakteriler, mayalar, filamentöz funguslar, bitkiler, böcek hücreleri, memeli hayvan hücreleri ve transgenik organizmalar gibi çeşitli canlılar üretimlerdeki ekspresyonel platformlar kullanılabilir. Hedeflenen veya üretilmek istenen ürün düşünüldüğünde ise QbD yaklaşımına göre de bunun üretim sürecinde kullanılması planlanan ekspresyonel platform da değişiklik göstermektedir. Bu açıdan geliştirilen biyoproses de kullanılan canlı sisteme göre değişiklik göstermektedir. Bunun temel nedeni de kullanılan canlı sistemin ürün üretmek için ihtiyaç duyduğu koşulların sağlanmasındaki farklılıklardır (Demain and Vaishnav, 2009; Dumont et al., 2016; Jagschies et al., 2018; Kesik-Brodacka, 2018; Saxena et al., 2016). Hammadde girdileri, besin ortamı hazırlığı, kullanılacak canlı sistemin eğer gerekliyle geliştirilmesi, seçilmesi veya rekombinant DNA (rDNA) teknolojisi ile genetik transformasyonu, proses koşullarının geliştirmesi, ölçeklendirme gibi üst akım işlemleri de tüm biyoprosesin işleyişiyle birlikte hedeflenen son ürünün ön görülen kalite ve miktarda üretilmesi açısından oldukça önemlidir. Bunlarla birlikte son ürünün kullanım alanı, saflık derecesi veya raf ömrü gibi parametreler de göz önüne alınarak tüm biyoprosesin alt akım işlemleri de bunlar etrafında şekillenmektedir (Jagschies, 2018b; Lindskog et al., 2018; O’Flaherty et al., 2020; Pramod et al., 2016). Tüm bunlar göz önüne alındığında ise üretilmek istenilen ürünün sahip olması gereken özelliklere göre ekspresyonel platform seçimi ve bunun etrafında

da biyoproses geliştirme yapılmaktadır. Bu açıdan öncelikli olarak ekspresyonel platformların seçimi yapılmakta ve bunlar ise endüstriyel anlamda özellikle işletim maliyeti, kültür koşulları, gerekli besin ortamlarının hazırlığı, kullanılan platformun ürün sentezi sırasında gerçekleştirmesi gereken modifikasyonlar, her bir üretim partisindeki maksimal ürün eldesi, her bir üretim sürecinin gerçekleşmesi için gerekli olan zaman, son ürünün katma değeri gibi parametreler üzerinden değerlendirilmektedir (Jagschies and Łacki, 2018; Tripathi and Shrivastava, 2019).

Biyoproseslerde seçilen ekspresyonel platformun ise istenilen ürünü ürettiği yer biyoreaktörlerdir. Bu üretimler küçük ölçekte statik hücre kültürü sistemleriyle gerçekleştirilebilse de özellikle üretimlerin büyük hacimlerde gerçekleştiği endüstriyel üretimlerde sağladığı üstün avantajlar nedeniyle biyoreaktörler kullanılmaktadır (Gallo–Ramírez et al., 2015; Genzel et al., 2014a; Zhou et al., 2010). Biyoreaktörler özellikle ölçek büyütme için oldukça elverişli sistemler olup yüksek kontrol edilebilirlik ve otomatizasyon özellikleri sayesinde biyoproseslerde gerekli olan güvenlik regülasyonlarının ve İyi Üretim Uygulamaları (*Good Manufacturing Practices*, GMP) koşullarının sağlanabilmesinde öne çıkmaktadırlar. Bu açıdan da biyoproseslerin merkezi veya kalbi olarak tanımlanan biyoreaktörler üst akım ile alt akım arasındaki geçiş noktasıdır (M. Butler and Meneses-Acosta, 2012; Eibl et al., 2010; Fernandes et al., 2016; Junker, 2009). Burada istenilen ürünü sentezleyecek olan platformun tüm ihtiyaçları yüksek kontrol edilebilirlik ile sağlanarak bulk şekilde ürün üretimi gerçekleştirilmektedir. Biyoreaktörler, üretimi yapacak olan ekspresyonel platformun ilgilenilen ürünü üretmek için gerçekleştirdiği biyokimyasal reaksiyonun veya reaksiyonların en verimli şekilde meydana gelmesini sağlamak amacıyla gerekli koşulları oluşturan kapalı bir sistem olarak tanımlanır. Bir biyoreaktörün temel rolü sensörler ve kontrol sistemleri aracılığıyla hedeflenen ürün biyokütle ise hücre büyümesini, hedeflenen ürün sadece biyokütle değil ise de hücre büyümesiyle beraber hücrenin sentezlediği ürünün oluşumu için uygun koşulları sağlamak ve bunları üretim süreci boyunca devam ettirmektir (Jossen et al., 2019; Kaiser et al., 2015; Komives and Parker, 2003). Bununla birlikte her bir üretimin gerçekleştirilebileceği ideal bir sistem ve üretim koşulu veya üretim stratejisi yoktur. Bu nedenle üretimlerde kullanılacak olan biyoreaktör sistemleri de üretimde kullanılacak ekspresyonel platformun ihtiyaçlarına, üretimde kullanılan besin ortamı özelliklerine, işletim

parametrelerine ve elde edilecek ürüne göre şekillendirilmektedir. Aynı zamanda biyoreaktör sistemlerinin tasarımları bunlar etrafında şekillendirilirken tüm üretim ortamında homojen bir dinamikliğin sağlanması gerekmektedir. Bu anlamda da özellikle biyoreaktör sistemlerinin oldukça iyi kütle ve ısı transferi sağlaması istenmektedir (Müller et al., 2017; Rathore et al., 2016; Zhou et al., 2010). Aynı zamanda biyoreaktörler çoğunlukla karıştırmanın olduğu dinamik sistemler oldukları için de sistemde gerçekleştirilen karıştırma ile oluşan kayma gerilmesinin ve eğer kullanılan ekspresyonel platform aerobik ise de yapılan havalandırmanın üretim için kullanılan canlı sisteme zarar vermeyecek şekilde ayarlanması gerekmektedir (Merten, 2015; Rathore et al., 2016; Shekhawat et al., 2018). Günümüzde bu anlamda en çok tercih edilen biyoreaktör sistemi karıştırmalı tank biyoreaktörüdür (STR). Bu biyoreaktör temelde içerisinde bir karıştırıcının bulunduğu silindirik tanklar olarak şematize edilmektedir. Bununla birlikte bunlara yapılan farklı modifikasyonlar ile STR' lar farklı ekspresyonel platformların üretimi için değiştirilmektedir. Bununla birlikte hava kaldırmalı, sabit yataklı ve orbital çalkalamalı biyoreaktörler de benzer şekilde yapılacak üretime göre modifiye edilebilmektedir. Ayrıca, özellikle de son yıllarda artan biyolojik ürün talebinin hızla karşılanmasına yönelik olarak sterilizasyon için gereken zamanın ortadan kaldırıldığı ve böylece iş yükünü de azaltan tek kullanımlık biyoreaktör sistemleri de endüstride sıklıkla tercih edilmeye başlamıştır (Eibl et al., 2010; Jossen et al., 2019; Warnock and Al-Rubeai, 2006; Zhang et al., 2010; Zhou et al., 2010).

Günümüzde hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için kimyasal ilaçların başarısının, geliştirilen biyoteknolojik ilaçlara göre oldukça geride kalması biyoproses endüstrisi içerisinde yer alan biyofarmasötik ürünlere olan talebi arttırmıştır. Bu nedenle de biyofarmasötikler pazar payı, kimyasal ilaç endüstrisinin diğer tüm sektörlerini geride bırakmaktadır. Küresel biyofarmasötik pazarının sürekli artarak 2020 yılı ve sonrasında 500-600 milyar \$' a yaklaşacağı tahmin edilmektedir (Liu and Morrow, 2016; Butler & Acosta, 2012; Butler, 2004; Jagschies et al., 2018; Kuystermans & Al-Rubeai, 2015; Lokko et al., 2018). Biyofarmasötik ürünler arasından önemleri giderek artan ve kullanım alanları oldukça genişleyen mAb' lara ise devamlı bir şekilde artan bir talep vardır. Özellikle mAb' ların farklı kanser türleri ve otoimmün hastalıklar gibi birçok

hastalığın tedavisi için tek seçenek olması önemlerini arttırmaktadır. Ayrıca tek bir kişinin tedavi süresi boyunca oldukça yüksek düzeyde (6-12 gr kadar) mAb kullanılması gerektiği düşünüldüğünde bunların yüksek miktarlarda hızla üretilmesi gerekmektedir. Bu durum aynı zamanda mAb dışındaki çeşitli aşılar ve eritropoietin gibi diğer hayati öneme sahip biyofarmasötik ürünler için de geçerlidir (Jagschies and Łacki, 2018; Jossen et al., 2019; Shukla and Gottschalk, 2013). Bunlarla birlikte dünyada hastalıkların meydana gelmeden önlenmesinde aşılar kadar etkili bir ürünün bulunmaması aşılarda önemini arttırmaktadır. Bu anlamda mevcut olan bulaşıcı hastalıkların sürekli olarak ve yeni meydana gelebilecek hastalıkların da hızlıca kontrol altına alınmasında kullanılan aşılarla devamlı bir ihtiyaç vardır. Meydana gelen Covid-19 pandemisi ise aşılarla olan sürekli ihtiyacın nasıl bir anda çok daha fazla arttığının görülmesi açısından bir örnek teşkil etmektedir. Pandemi süresince de üretilen aşılara tüm bireylerin aynı anda ulaşamaması ve aşı sonrasında ikinci dozların uygulanmasında dünyada birim zamanda oluşan yüksek miktardaki talebin karşılanmasında yaşanan sıkıntı bu durumu gözler önüne sermiştir (Ayati et al., 2020; Dawn and Seymour, 2020; Shanmugaraj and Phoolcharoen, 2021). Tüm bunlar düşünüldüğünde dünyada her yıl artan insan popülasyonunda toplum sağlığının korunması için gerekli olan aşı ihtiyacı ve bununla birlikte biyoteknolojik ilaca ihtiyacı olan hasta sayıları düşünüldüğünde yıllık olarak yüz binlerce gram biyoteknolojik ürün üretimin yapılmasına gerektiği anlamına gelmektedir. Biyofarmasötik üretiminde ise özellikle tüm ekspresyonel sistemler arasından en fazla hayvan hücre kültürleri kullanılmaktadır. Dünyada onaylanan ve satışa sunulan biyofarmasötiklerin yaklaşık % 58' i ise sadece hayvan hücre kültürü temelli olarak üretilmektedir. Hücre kültürleri endüstriyel boyutta temel olarak viral aşı üretimi ve terapötik özelliği olan moleküler bileşenler (antikorlar, hormonlar, büyüme faktörleri vb.) gibi biyofarmasötiklerin üretimi için kullanılmaktadır (Dawn and Seymour, 2020; Jagschies and Łacki, 2018; Kodati and Darbha, 2016; Tripathi and Shrivastava, 2019; Verma et al., 2020).

2.2 Hayvan Hücre Kültürleri

Hücre kültürü, hücrenin yaşamsal fonksiyonları için gerekli olan bileşenleri içeren, kontrollü ve yapay bir ortamda hücrelerin canlılığının korunmasını

sağlayan, bunu yaparken de aynı zamanda hücrelerin büyütülmesinin (üretilmesinin) gerçekleştirildiği teknik olarak tanımlanmaktadır (Freshney, 2005). Hayvan hücrelerinin kültürlenmesi için, hücre kültüründen daha kesin bir tanım olarak “**Hayvan Hücre Kültürü**” tanımı kullanılmaktadır. Bu tanım; filogenetik sınıflandırmaya göre hayvanlar (*animalia*) sınıflandırmasına dahil olan memeliler, böcekler veya sürüngenler gibi ökaryotik organizmalardan köken alan hücrelerin *in vitro* olarak kültüre edilmesini ifade eder. Hayvan hücre kültürü tekniğinde, kültüre edilen hayvan hücreleri, kültürlendiği ortam içerisinde kompleks organizasyonellik göstermeyen bakteri gibi basit yapılı, tek hücreli canlılar olarak bağımsız birimler şeklinde bulunur (Alberts et al., 2008; Freshney, 2005; Jedrzejczak-Silicka, 2017; Karp, 2009; Verma et al., 2020). Hayvan hücre ve doku kültürü çalışmalarına dair ilk adımlar 1800’lerin sonunda gerçekleştirilse de ilk olarak 1907’de Ross Granville Harrison, “asılı damla yöntemi” ile lenf sıvısında birkaç hafta boyunca kurbağa sinir hücrelerini *in vitro* olarak geliştirebildiği için hücre kültürünün kurucusu olarak kabul edilmektedir. Daha sonrasında ise aseptik tekniklerin geliştirilmesi, kültürlenme işlemi için kullanılan kültür kaplarının (flask) ve diğer kültürlenme için gerekli olan ekipmanların keşfedilmesi/geliştirilmesi, laminar akışlı biyogüvenlik kabinlerinin geliştirilmesi, uygun pasajlamanın nasıl gerçekleştirileceğinin anlaşılması, antibiyotiklerin keşfi, devamlı hücre hatlarının geliştirilmesi, hücrelerin gelişebileceği temel besin ortamlarının keşfedilmesi gibi büyük ilerlemeler ile hayvan hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar çok daha sağlam bir temele oturtulmuştur. İlerleyen zaman içerisinde daha birçok öncül keşiflerin yapılmasıyla, bu çalışmalar hızla büyüyen sürekli bir gelişim halinde günümüze kadar gelmiştir (Freshney, 2005; Jedrzejczak-Silicka, 2017; Rodríguez-Hernández et al., 2014).

Hayvan hücre kültüründe, kültürlenmiş hücreler çok çeşitli kaynaklardan ve farklı şekillerde elde edilebilmektedir. Kültüre edilen bu hücreler üreme kinetiği, kültür süresi, metabolik ürünler ve morfoloji bakımından birbirinden çok farklı şekillerde bulunabilmektedir. Hücrenin elde edilişi bakımından primer kültürler ve halihazırda bulunan hücre hatlarının kullanımı düşünülebilir. **Primer kültürler**; canlı organizmadan alınan doku ve organların enzimatik veya mekanik yöntemler ile parçalanması ve bu parçalanma sonunda elde edilen hücrelerin kültürlenmesidir. Bu kültürler, direkt canlı bir kaynaktan elde edildikleri için bu kaynak

organizmadaki hücrelere benzerliklerinden dolayı tercih edilmektedir. Özellikle toksisite çalışmalarında ve *in vitro* modellemede, ilerleyen kültür sürelerinde hücresel karakterleri farklılaşsa da köken aldıkları orijinal hücre özelliklerinden tam anlamıyla uzaklaşmadıkları için deneme yapılan bileşene verdikleri yanıtın canlı vücudundaki yanıtı büyük oranda benzemesinden dolayı tercih edilmektedir (Davis, 2011; Freshney, 2005; Verma et al., 2020). Genel anlamda **hücre hatları** ise kültür ortamı elverişli olduğu sürece sürekli olarak bölünebilen hücrelerdir. Sürekli olarak bölünme yeteneği, kimyasal uygulaması ve viral DNA entegrasyonu gibi uygulamalarla bu hücrelere kazandırılmaktadır. Bunun dışında eğer hücreler kanserli bir dokudan izole edilmiş ise elde edilen bu hücreler sınırsız bölünme özelliğini doğal olarak sergileyebilmektedirler. Farklı şekillerde elde edilen hücrelerin sürekli olarak bölünme yeteneği kazandırılıp karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmesiyle devamlı hücre hatları meydana getirilebilmektedir (Butler, 2004; Davis, 2011; Freshney, 2005; Gupta et al., 2016; Nema and Khare, 2012; Pauwels et al., 2007). Hayvan hücre kültürü çalışmalarında farklı kökenlere sahip birçok hücre çalışılmaktadır. Kültürlenen tüm hücreler, izole edildiği hayvan orjinli kaynağın kökenine bakılmaksızın morfolojik açıdan en temel şekilde adherent ve süspanse olarak iki gruba ayrılmaktadır (Davis, 2011; Freshney, 2005).

Adherent hücreler, üremek ve kültürlenebilmek için bir yüzeye tutunma ihtiyacı olan hücrelerdir. Bu hücreler ancak bir yüzeye tutundukları takdirde büyüme, gelişim ve fonksiyonelliğini devam ettirebilmektedir. Bu hücreler aynı zamanda monolayer veya yüzey bağımlı olarak da adlandırılabilir. Birçok kültür hücresi ve canlı vücudundan direkt elde edilerek kültürlenen (primer kültür) hücrelerin birçoğu adherent hücre tipindedir. Adherent hücrelerin kültürlenebilmesi için yüzeyi özel tekniklerle hücrelerin tutunabileceği hale getirilmiş kültür kapları kullanılması gerekmektedir (Butler, 2004; Freshney, 2005; Nema and Khare, 2012). Adherent hücreler ise kendi içerisinde 4 ana başlık altında sınıflandırılabilir. Bunlar;

➤ **Epitelyal hücreler**; ters faz mikroskop altında bakıldıklarında hücre sınırları parlak şekilde belli olan, genellikle düzgün poligonal yapılar şeklinde bulunan hücrelerdir. Düzgün yapıları nedeniyle kültür kabı yüzeyindeki

yayılımları, taş bir duvar veya kaldırımda kullanılan taşlar şeklinde betimlenmektedir (Freshney, 2005; Gupta et al., 2016; MERCK®, 2020).

➤ **Endotelyal hücreler;** epitelyal benzeri özellik gösteren hücrelere benzemektedir. Bu tipteki hücrelerde düzgün şekilli poligonal yapıdadır. Ancak bu yapıdaki hücreler daha yassıdır ve ters faz mikroskop altında bakıldığında epitel benzeri hücrelerin sınırları parlak ve kesin gözlenirken endotel benzeri hücrelerin sınırları daha buğulu bir parlaklıkta gözlenir (Davis, 2011; Freshney, 2005; MERCK®, 2020).

➤ **Nöronal hücreler;** bu tipteki hücreler gerçek bir sinir hücresinde bulunan akson ve dendrit benzeri yapılara sahiptir. Bu nedenle bu isimle adlandırılmaktadır (Butler, 2004; Qin, 2012; MERCK®, 2020).

➤ **Fibroblastik hücreler;** ince uzun yapılı olan bu hücreler bipolar veya multipolar şekilde bulunabilmektedir. Bu tipteki hücrelerin birçoğu, diğer hücre tiplerine göre kültür kabında hızlı bir yayılım gösterir (Davis, 2011; Freshney, 2005; Gupta vd., 2016; MERCK®, 2020).

Süspanse hücreler ise kültür ortamında askıda kalarak kültürlenebilen, yani herhangi bir yüzeye tutunmadan canlılıklarını ve çoğalma özelliklerini koruyan hücrelerdir. Genellikle sonradan geliştirilen hücre hatları ve çoğu dolaşım sistemi hücresi süspanse üreme özelliği göstermektedir. Ayrıca normal olarak adherent bir gelişim gösteren bazı hücreler süspanse olarak kültürlenmeye adapte edilebilmektedir. Ancak bu durum sadece bazı hücreler için geçerli olup adherent kültürlenme özelliği gösteren her hücre süspanse kültürlenmeye adapte edilememektedir (Freshney, 2005; van Wielink vd., 2011; MERCK®, 2020)

Hayvan hücre kültürü teknolojisi ve tekniği özellikle yaşam bilimleri ve tıp alanlarında, hücresel-moleküler biyoloji, biyokimya, biyoteknoloji gibi çeşitli uygulamalarda birçok bilim insanı için temel bir araç haline gelmiştir. Bu teknikler ile canlı vücudunda hem teknik hem de etik anlamda rahatlıkla gerçekleştirilemeyen hücresel morfoloji, fizyoloji, metabolizma, biyokimya, mutajenez veya karsinogenez ve enfekte edici patojenlerin incelenmesi,

araştırılması ve bunların modelleme çalışmalarının laboratuvar ortamında büyük ölçüde gerçekleştirilebilmesini mümkün kılmaktadır (Freshney, 2011; Gomez-Lechon et al., 2008; Jordan and Sandig, 2014; Price, 2017; Verma et al., 2020). Bu anlamda da en çok hücre hatları tercih edilmektedir. Bunun nedeni; hücre hatlarının yapay koşullarda büyümek için standartlaştırılmıştır olmasıdır. Böylece hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilen araştırma, üretim veya çalışmaya dayalı yapılan uygulamaların, hücre hatlarının tek bir hücre klonundan oluşturulduğu için dünya üzerinde o hücre hattı ile çalışma yapan kişi veya kişilerin elde ettikleri sonuçların tutarlılığı ve tekrarlanabilirliğidir. Bu nedenle bilimsel anlamda gerçekleştirilen hayvan hücre kültürü çalışmalarının çoğunda, çalışma stabilizasyonunu sağlamak ve diğer çalışma gruplarıyla birlikte paralel bir değerlendirme yapabilmek için hücre hatları tercih edilmektedir (Gomez-Lechon et al., 2008; Nema and Khare, 2012; Verma et al., 2020; Yao and Asayama, 2017). Ayrıca yeni keşfedilen ve potansiyel farmasötik değeri olan bileşiklerin hücre üzerindeki etkilerini değerlendirmede sıklıkla kullanılan başarı tekniklerin olması da hücre kültürlerini vazgeçilmez kılmaktadır. Buna bağlı olarak aynı zamanda ilaç deneme çalışmalarında hücre kültürü kullanımı, yapılan denemelerin çok daha kolay bir şekilde ve denek hayvanları üzerinde gerçekleştirilmesi gerekli olan *in vivo* (canlı vücudunda yapılan çalışmalar) çalışmaların azaltılmasını sağlayarak büyük avantaj sağlamaktadır (Butler, 2004; Freshney, 2005; Gupta et al., 2016; Kumar et al., 2021).

Bununla birlikte hayvan hücre kültürleri yukarıda da bahsedildiği üzere biyofarmasötik alanında endüstriyel ölçekteki biyoreaktörlerde rekombinant protein, monoklonal antikor (mAb) ve aşı üretimi başta olmak üzere çeşitli biyolojik terapötikleri üretmek için kullanılmaktadır. Tarihte hayvan hücre kültürlerinin endüstriyel anlamda ilk kez büyük ölçekli üretime uygulanması viral aşılara duyulan yüksek ihtiyaç nedeniyle ortaya çıkmıştır (Butler, 2004; Jagschies, 2018b; Jedrzejczak-Silicka, 2017). Buradaki talebi oluşturan ise 1940' larda polio virüsünün neden olduğu çocuk felci (*poliomyelit*) salgınlarının artış göstermesidir. Bu salgınları önlemek için çözüm yolları aranması sırasında Enders, Robbins ve Weller' ın 1949 yılında yaptığı ve polio virüsünün hücre kültüründe üretilbildiğinin gösterildiği Nobel ödüllü çalışmayla aşı üretiminde kullanılmak üzere hücre kültürü tekniğine odaklanılmıştır (Barrett et al., 2009; Stacey and

Hawkins, 2016). Aşı üretiminde hücre kültürünün kullanıldığı ilk üretimi ise 1954 yılında geliştirdiği çocuk felci aşısıyla Jonas Salk yapmıştır. Salk bu aşığı maymun böbreği hücrelerini kullanarak elde ettiği primer kültürden gerçekleştirmiştir (Aubrit et al., 2015; Plotkin and Plotkin, 2017). Elde edilen bu başarı sonrasında ise 1960' lardan itibaren büyük ölçekli hayvan hücre kültürlerinden rutin olarak hem insanlar hem de hayvanlar için çeşitli hastalıklara karşı aşılar üretilmiştir (Aubrit et al., 2015; Kuystermans and Al-Rubeai, 2015). Günümüzde gelişen teknikler sayesinde endüstriyel anlamdaki aşı ve birçok terapötik protein hayvan hücre kültürü kullanılarak üretilmektedir (Freshney, 2005; Kuystermans and Al-Rubeai, 2015; Warnock and Al-Rubeai, 2006). Özellikle dünyadaki rekombinant protein üretiminin % 70'i sadece hayvan hücre kültürü temelli olarak gerçekleştirilmesi bu alanın ilaç sanayindeki öneminin altını çizmektedir (Gupta et al., 2016).

Biyofarmasötik üretiminde mikrobiyal sistemler gibi daha ucuz ve üretim açısından hızlı sistemler yerine hayvan hücrelerinin ekspresyonel platform olarak tercih edilmesinin temel nedeni hayvan hücrelerinin bu kompleks yapıdaki ürünlerin fonksiyonellik kazanması için meydana getirdiği post-translasyonel modifikasyon (PTM) larıdır. Mikrobiyal sistemler ise bu PTM' leri gerçekleştirebilecek mekanizmaya sahip olmadıkları için istenilen ürünün biyolojik olarak aktif halde sentezlenmesi için hayvan hücre kültürleri kullanılmaktadır (M. Butler and Meneses-Acosta, 2012; Freshney, 2005; Kuystermans and Al-Rubeai, 2015). Bu PTM' lerden özellikle glikozilasyon, fonksiyonellik açısından kritik bir role sahiptir. Glikozilasyon işlemi; protein yapısının, stabilitesinin ve aktivitesinin korunması için büyük bir önem taşımasının yanında proteinin farmakokinetik özellikleri ve immünojenisitesini de önemli ölçüde etkilemektedir (Dumont et al., 2016; Fliedl et al., 2015) Son yıllarda daha hızlı ve düşük maliyetli endüstriyel üretimler için hayvan hücrelerinin yerine benzer glikozilasyon mekanizmasına sahip, ilgili proteine ait geni taşıyacak şekilde transfekte edilmiş ökaryotik maya hücreleri kullanılmaktadır. Ancak mayada ekprese olan ilgili terapötik özellikteki protein glikozillenirken eklenen karbonhidrat sonucu oluşan glikoprotein, hayvan hücresi tarafından oluşturulan glikoproteinden büyük ölçüde farklı olduğundan elde edilen ürünün biyolojik aktivitesi büyük ölçüde azalmaktadır (Butler and Meneses-Acosta, 2012; Freshney, 2005; Gupta et al., 2019, 2016). Ayrıca viral aşı üretimi açısından bakıldığında da tüm virüs üretimine dayalı olan aşılarda üretilmesinde ilk

basamak ilgili hastalık etkeni virüsün çoğaltılmasıdır. Virüslerin zorunlu hücre içi yaşam döngüsü gereğince de virüsler sadece kendilerine spesifik olan hücrelerde çoğalmaktadırlar. Bu açıdan viral aşı üretimi için gerekli olan virüslerin üretilmesinde hayvan hücre kültürlerinin kullanımı bir zorunluluktur (Josefsberg and Buckland, 2012; Khan, 2013; Kiesslich and Kamen, 2020; Vlecken et al., 2013).

2.3 Hücre Hatları

Primer kültürler endüstriyel biyoproseslerde ve özellikle de aşı üretiminde uzun yıllar tercih edilmiştir. Bu primer kültürleri elde etmek için de çoğunlukla maymun, hamster, fare ve tavuk kullanılmıştır (Aubrit et al., 2015; Horowitz et al., 2004; Jordan and Sandig, 2014; Zahoor et al., 2016). Ancak bu kültürlerin her process döngüsünde yeniden elde edilmeleri gerekliliğine bağlı olarak oldukça fazla sayıda canlı materyalin kurban edilmesi gerekmesi, hücre bankalamasındaki sorunları, oldukça kısa pasajlama ömürleri, belirsiz karakterleri ve elde edildiği canlıdan gelebilecek potansiyel kontaminantların varlığı gibi sakıncaları bulunmaktadır (Aubrit et al., 2015; Hess et al., 2012; Horowitz et al., 2004). Bu nedenle primer kültürlerin dezavantajlarını elimine adına çeşitli hücre hatları geliştirilerek biyofarmasötiklerin üretimi için kullanılmaya başlanmıştır (Barrett et al., 2009; Gallo–Ramírez et al., 2015; Horowitz et al., 2004; Rodrigues et al., 2015; Verma et al., 2020). Hücre hatları, karakterizasyonu zor ve sürekli değişken kültür yapısına sahip olan primer kültürlerin dezavantajlarını elimine etmek için geliştirilmişlerdir. Primer kültürlerden farklı bir üretim platformu arayışının diğer bir nedeni de 1955-1963 yılları arasında primer maymun böbrek hücreleriyle üretilen birçok polio aşısının aslında simian virus 40 (SV40) ile enfekte olduğunun saptanmasıdır (Barrett et al., 2009; Stacey and Hawkins, 2016). Bu nedenle böyle bir durumun tekrarlanması engellemek için güvenlik açısından tam karakterizasyonu yapılmış hücre kültürleri oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu anlamda da öncelikle primer kültürlerin pasajlanmasıyla oluşturulduğundan aslında primer kültür olarak da sayılabilen diploid hücre hatları (veya diploid hücre suşları) geliştirilmiştir (Aubrit et al., 2015; Gallo–Ramírez et al., 2015; Horowitz et al., 2004; Verma et al., 2020). Daha sonrasında ise diploid hücre hatlarının da kısıtlı pasajlama sayısı, hassas yapıları ve kompleks besin ortamı bileşenlerine

bağımlılıkları gibi dezavantajlarının üstesinden gelmek için devamlı hücre hatları geliştirilmiştir. Devamlı hücre hatları; stabil, sürekli olarak bölünebilen ve uygun koşullar altında *in vitro* olarak sonsuza kadar kültüre edilebilen hücreler olarak tanımlanabilmektedir (Horowitz et al., 2004; Merten, 2006; Merten et al., 2014). Ancak ilk başlarda devamlı hücre hatlarının “ölümsüz” olmaları onların üretimlerde kullanılmalarının sakıncalı olacağı yönünde düşüncelere neden olmuştur (Horowitz et al., 2004; Sheets and Petricciani, 2004; Stacey and Hawkins, 2016). Bu açıdan da hem kullanımlarının güvenli olduğunu kanıtlayacak tekniklerin o yıllar için yetersiz oluşu hem de bu konuda yapılan virüs üretimine yönelik çalışmaların azlığı nedeniyle biyofarmasötik üretiminde ekspresyonel platform olarak kullanılmaları uzun zaman almıştır (Aubrit et al., 2015; Hess et al., 2012; Horowitz et al., 2004; Rodrigues et al., 2015; Stacey and Hawkins, 2016). Ancak gelişen teknoloji ile birlikte devamlı hücre hatları kullanılarak yapılacak üretimlerdeki potansiyel risklerin elimine edilmesi için gerekli kurallar belirlendikten sonra bunları sağlayacak şekilde bir üretim gerçekleştirebilecek devamlı hücre hatları ile endüstriyel üretim çalışmaları başlamıştır. Devamında da gerekli tüm onaylar alındıktan sonra devamlı hücre hatlarının büyük ölçekli üretimlerde kullanılabileceği gösterilmiştir (Aubrit et al., 2015; Jordan and Sandig, 2014; Merten et al., 2014).

Günümüzde hayvan hücre kültürü kullanılarak yapılan birçok araştırma ve endüstriyel üretim için iyi karakterize edilmiş olmaları nedeniyle hücre hatları kullanılmaktadır. Hücre hattı terimi genellikle sürekli olarak bölünebilen ve karakterizasyonu yapılmış stabil hücreler için kullanılsa da detaylı terminoloji açısından incelendiğinde primer kültürün ilk pasajının ardından elde edilen yeni kültür, hücre hattı olarak adlandırılmaktadır. Bu nedenle de hücre hatları genel olarak ikiye ayrılmaktadır. Bunlar **devamlı (sürekli)** ve **sınırlı hücre hatlarıdır** (Freshney, 2011; Jordan and Sandig, 2014; Kuystermans and Al-Rubeai, 2015). Sınırlı hücre hatları genellikle normal sağlıklı dokudan elde edilen, canlı türüne özgü düzgün kromozom dizilimi ve sayısına sahip hücreleridir. Bunlar aynı zamanda literatürde diploit hücre hatları olarak da isimlendirilmektedir. Özellikle bunlar arasından insan fetal akciğer hücrelerinden geliştirilen WI-38 ve MRC-5 diploit hücre hatları en fazla çalışılan ve üretimlerde kullanılan sınırlı hücre hatlarıdır (Genzel, 2015; Jordan and Sandig, 2014; Ma et al., 2015). Sürekli hücre

hatları ise düzgün sağlıklı dokudan elde edilen ve normal kromozomal sayısına sahip veya normale yakın olanların da aralarında bulunduğu fakat çoğunlukla tümör benzeri özellik gösteren dokulardan elde edilen ve kromozomlarında meydana gelen mutasyona bağlı olarak gelişen dizilim ve sayı anormalilerine sahip hücrelerden geliştirilmiştir. İlk devamlı hücre hattı olarak kabul edilen fare fibroblast hücre hattı L929 ve ilk insan hücre hattı olan ve servikal adenokarsinomaya sahip bir hastadan köken alan HeLa hücre hattının ortaya çıkmasının ardından oldukça fazla sayıda devamlı hücre hattı geliştirilmiştir (Freshney, 2005; Nema and Khare, 2012; Rodríguez-Hernández et al., 2014; Tripathi and Shrivastava, 2019; Verma et al., 2020).

Hücre hattı gelişimi için çoğunlukla canlılardaki tümörleşmiş dokular tercih edilse de sağlıklı normal dokulardan da hücre hattı geliştirilmektedir. Ancak bu durumda, istenilen doku veya organlardan izole edilen hücreler sürekli olarak bölünmelerini sağlamak amacıyla ölümsüzleştirilmektedir (Butler, 2004; Davis, 2011; Freshney, 2011). Bunun için iki farklı kavram kullanılmaktadır. Bunlar **ölümsüzleştirme (immortalizasyon)** ve **transformasyon** kavramlarıdır. Aslında ölümsüzleştirme, transformasyonun kapsadığı bir kavramdır. Transformasyon; ölümsüzleştirme, anormal büyüme ve malignansi özelliklerinin tamamını sergileyecek şekilde değiştirilen hücreleri belirtir ve bunlar “transforme hücre” olarak adlandırılır (Freshney, 2011; O’Flaherty et al., 2020; Stacey and Hawkins, 2016; Verma et al., 2020). Ölümsüzleştirmede ise hücreler çeşitli yöntemlerle ölümsüz hale getirilirken aynı zamanda köken aldığı canlıdaki orijinal doku veya organda yer alan hücrelerin morfoloji, kromozom sayısı, gen işlevi ve büyüme modeli gibi karakteristik özellikleri bakımından tamamen aynı olmaz ancak yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Transformasyonda ise hücreler ölümsüz hale gelir fakat kanser hücrelerinde olduğu gibi köken aldıkları orijinal dokudaki hücre büyüme özellikleri ve morfolojisi açısından çok büyük farklılıklar gösterebilmektedir (Davis, 2011; Freshney, 2011; Gupta et al., 2016; Hahn, 2002). Ölümsüzleştirme işlemi hücrelerin *in vitro* olarak uzun süreler boyunca kültürlenmesiyle spontan olarak gelişebilmektedir. Bunun dışında ölümsüzleştirme için viral vektörler veya kimyasal transfeksiyon ile gen aktarımı da tercih edilmektedir. Viral vektörler ile hücrelere telomeraz genleri (hTERT), onkogenler veya bazı özel viral genler (maymun virüsünün T bölgesi geni gibi) transfekte

edilmektedir. Bu vektörlere örnek olarak; simian (maymun) virüsü 40 (SV40), adenovirüs, İnsan Papilloma Virüsü (*Human Papilloma Virus*, HPV) ve Epstein–Barr virüsü (EBV) gibi virüsler verilebilir (Freshney, 2011; Giri and Bader, 2014; Hahn, 2002; Hess et al., 2012; Stacey and Hawkins, 2016). Transformasyon işlemi de ölümsüzleştirme gibi kendiliğinden gerçekleşebilmesine rağmen (örneğin kanser hücreleri) bazı durumlarda hücrelerin transforme edilmesi için başka uygulamalar da yapılmaktadır. Bu uygulamalar arasında ölümsüzleştirmede olduğu gibi onkogen transfeksiyonları ve viral vektörlerin dışında iyonize edici radyasyon uygulaması (gama, UV, X ışını gibi), kimyasal mutajen ve karsinojen uygulaması yer almaktadır (Davis, 2011; Freshney, 2011; Giri and Bader, 2014; Nema and Khare, 2012).

Endüstriyel üretim denemelerinde ve araştırma çalışmalarında günümüzde çok farklı kökene sahip birçok hücre hattı kullanılmaktadır. Ancak bunlardan bazıları özellikle endüstriyel anlamda yapılan ticari biyofarmasötik üretimlerinde sıklıkla tercih edilmektedir (Dumont et al., 2016; Ergen and Tüfekçi, 2022; Tripathi and Shrivastava, 2019). Bu üretimlerden özellikle mAb üretimi gibi farklı biyofarmasötiklerin üretimi için genellikle devamlı hücre hatları tercih edilirken viral aşılarda üretiminde de benzer şekilde devamlı hücre hatları ön plandayken sınırlı bölünme özelliğine sahip hücre hatları da aşı üretimlerinde tercih edilebilmektedir. Endüstriyel biyofarmasötik üretimlerinde en çok kullanılan hücre hatlarının başında çin hamster yumurtalık hücre hattı CHO gelmektedir. Günümüzde neredeyse tüm mAb' ların üretimlerinde CHO hücreleri ve bunun türevleri kullanılmaktadır (Jayapal et al., 2007; O'Flaherty et al., 2020; Reinhart et al., 2019; Tihanyi and Nyitray, 2020). Bununla birlikte, terapötik protein üretimi dışında biyofarmasötik endüstrisinin diğer bir ana üretim ayağı olan viral aşılarda üretiminde ise afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı Vero en çok tercih edilen hücre hattıdır (Barrett et al., 2009; Genzel, 2015; Shen et al., 2019). Bunlarla beraber özellikle insan diploit akciğer fibroblast hücre hattı MRC-5, Madin-Darby köpek böbrek hücre hattı MDCK, sonbahar tırtılı yumurtalık hücre hattı Sf9 ve insan embriyonik böbrek hücre hattı HEK-293 gibi diğer hücre hatları da çeşitli endüstriyel üretimlerde sıklıkla tercih edilen hücre hatlarıdır (Granados et al., 2007; Jordan and Sandig, 2014; Kuystermans and Al-Rubeai, 2015; Tan et al., 2021; Tripathi and Shrivastava, 2019; Wei et al., 2020).

2.3.1 CHO hücre hattı

Bu hücre hattı orijinalinde 1956 yılında Theodore Puck ve ekibi tarafından yetişkin bir dişi çin hamsterının (*Cricetulus griseus*) yumurtalık dokusundan geliştirilmiştir. Vero ve MDCK' ya benzer şekilde spontan immortalizasyon ile oluşan bu hücre hattını doğrudan "Chinese Hamster Ovary" nin kısaltması şeklinde CHO olarak isimlendirmiştir (Reinhart et al., 2019; TJIO and PUCK, 1958). Daha sonra orijinal CHO kültüründen tek hücre klonlaması yöntemiyle oluşturulduğu için atasal olarak kabul edilen CHO-K1 ile birlikte zaman içinde meydana gelen genetik açılım ve farklı kültür koşullarına adaptasyon yöntemleriyle birlikte farklı özelliklere sahip birçok spesifik CHO hücre subklonu geliştirilmiştir (Reinhart et al., 2019; Xu et al., 2011). Bunlardan en popüler olanları CHO-DG44, CHO-S, CHO-DXB11 ve CHO-*dhfr* dir. Bununla birlikte hepsi "CHO" başlığı altında toplanabilmektedir (Wurm and Hacker, 2011). CHO hücre hattı orijinalinde epitelyal benzeri bir hücre morfolojisine sahip olup adherent üreme özelliği göstermektedir. Adherent halinin 12-26 saatlik çok kısa bir ikilenme süresi vardır (Marusak et al., 2007). Bu hücre hattı aynı zamanda süspanse üreme şekline adapte olabilmektedir. Bununla birlikte CHO hücrelerinin süspanse üremeye adapte edilmiş halinin ikilenme süresinin adherent haline kıyasla benzer veya çok daha düşük olabileceği farklı çalışmalarla gösterilmiştir (Benton et al., 2002; Hunter et al., 2019; Lakshmanan et al., 2019; T. Sun et al., 2020). Bununla birlikte adapte edilen hücrelerin ikilenme süresinin uygulanan hücre mühendisliği yaklaşımı, kullanılan yöntem ve serumsuz ortam içeriğinde bağlı olarak oldukça değişiklik gösterdiği bilinmektedir (Merten et al., 2014; Puente-Massaguer et al., 2019; S. Wu et al., 2021).

CHO hücre hattı biyoproses endüstrisindeki en popüler hücre hattı olup birçok biyoterapötüğün üretiminde kullanılmaktadır (O'Flaherty et al., 2020; Tihanyi and Nyitray, 2020). Bu popülerliğin sebeplerinin başında rekombinant DNA tekniklerinin kullanımına uygunluğu, üretilen terapötik ürünün insanda aktif olarak fonksiyonellik gösterebilmesi için gereken uygun PTM' leri gerçekleştirebilmesi ve yüksek ürün verimi gelmektedir. Farklı üretim stratejileri kullanılarak CHO hücre hattından 10 g/L' a kadar ürün eldesi sağlanabilmektedir (Tihanyi and Nyitray, 2020; Zhu et al., 2017). Bu açıdan da bazı mikrobiyal sistemlerdeki üretim verimine rakip olabilecek potansiyele sahiptir (O'Flaherty et

al., 2020; Zhu et al., 2017). Ayrıca, bu hücre hattı tür bariyeri sayesinde birçok insan virüsüne karşı duyarlı değildir ve üretim güvenliğinin geliştirilmesi adına hücre mühendisliği ile beraber üretimlerde bulunması olası kontaminant virüslere karşı dayanıklılığı arttırılan CHO hücreleri geliştirilebilmektedir (Chiang et al., 2019). Ancak, bu durum rekombinant terapötik proteinlerin üretiminde bir avantaj haline gelirken viral aşılarda ve özellikle de tüm enfektif virüs üretimine dayalı olanların üretiminde CHO hücre hattının doğrudan kullanılmasını engellemektedir (Berting et al., 2010). Bununla birlikte, CHO hücreleri her ne kadar gerekli olan viral duyarlılığa sahip olmasa da mAb üretimine benzer şekilde rekombinant DNA teknolojisi ile birlikte özellikle insan hücrelerine benzer şekilde gerçekleştirdiği PTM sebebiyle viral antijenlerin yapısını da yüksek doğrulukta sentezleyebildiği gösterilmiştir (O’Flaherty et al., 2020; Tihanyi and Nyitray, 2020; Zhu et al., 2017). Bu açıdan, sağladığı diğer üstün endüstriyel özelliklerden göz önüne alındığında subunit viral aşı üretiminde kullanılmaktadır (Li et al., 2020). Tüm bunlara ek olarak, hepatit B aşılardının etkinliğinin belirlenmesi için yapılan birkaç klinik çalışmada recombinant aşı üretimi için çoğunlukla tercih edilen maya ekspresyonel sistemlerine kıyasla CHO hücreleri kullanılarak yine recombinant olarak üretilen hepatit B aşılardının immün sistemi uyarda daha etkili olduğu gösterilmiştir (Diaz-Mitoma et al., 2021; Vesikari et al., 2021).

2.3.2 MDCK hücre hattı

MDCK hücre hattı 1958’ de Stewart Madin ve Norman Darby tarafından geliştirilmiştir. Yetişkin bir dişi Cocker Spaniel cinsi köpekten (*Canis lupus familiaris*) alınan böbreğin primer kültürünün devam ettirilmesi ile oluşturulan bu hücre hattı da spontane immortalizasyon sonucu meydana gelmiştir (Dukes et al., 2011; Gregersen et al., 2011). İsimlendirilmesi de onu geliştirilen kişilerin soyadlarının ve köken aldığı dokunun hepsini kapsayacak şekilde “Madin-Darby Canine Kidney” yani kısaca MDCK olacak şekilde yapılmıştır (Gregersen et al., 2011; Jordan and Sandig, 2014; Suderman et al., 2021; Vlecken et al., 2013). MDCK hücre hattı orijinalinde epitelyal morfolojiye sahip olup adherent büyüme özelliği göstermekte olup 20-25 saatlik ikilenme süresine sahiptir (Cho et al., 1989; JCRB Cell Bank, 2023). Bununla birlikte süspanse olarak üremeye adapte edilebilen bu hücre hattının adapte edildiği haliyle ikilenme süresinin 20 ila 50 saat

arasında değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (Aubrit et al., 2015; Bissinger et al., 2019; Lohr et al., 2010; Y. Wu et al., 2021). Yapılan çalışmalarda bu değişkenliğinin sebebinin farklı biyoreaktör sistemlerindeki işletim parametrelerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Lohr et al., 2010). Bununla birlikte Vero ile benzer şekilde MDCK hücreleri kullanılarak yapılan üretimlerde yüksek pasaj numarasına sahip hücrelerin kullanımı tercih edilmemektedir (Horowitz et al., 2004). Tüm bunlarla birlikte özellikle viral aşı üretimlerinde tercih edilmesinin nedeni nerdeyse tüm influenza virüsü tiplerine (hem avian hem human) oldukça duyarlı olmasıdır. Bu açıdan da influenza virüsü çalışmalarda, aşı gelişim süreçlerinde ve aşı üretimlerinde sıklıkla tercih edilen bir ekspresyonel platformdur (Jordan and Sandig, 2014; Suderman et al., 2021; Takada et al., 2019). Bununla birlikte yapılan moleküler genetik çalışmalarıyla MDCK hücreleri influenza virüslerine daha duyarlı hale getirilmesinin yanında insansılaştırma uygulaması (Takada et al., 2019) ve influenza aşı üretim sürecinde iyileştirilmesi için bu hücre hattı üzerinde farklı genetik modifikasyonlar literatürde yer almaktadır (Suderman et al., 2021). Özellikle üretim sürecinin iyileştirilmesi adına influenza virüslerinin üretim sürecinde hemagglutininin aktif forma geçmesi için üretim ortamında ekstra bir proteaz enzimi eklenmesi gerekliliğini (Seitz et al., 2012) ortadan kaldırmak için doğal enfeksiyonda bunun aktif forma geçmesini sağlayan TMPRSS2 (transmembrane protease, serine S1 family member 2) (Feng et al., 2016) ve HAT (human airway trypsin-like protease) proteazlarını eksprese edecek şekilde değiştirilen MDCK hücreleriyle yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Böttcher-Friebertshäuser et al., 2010).

2.3.3 HEK-293 hücre hattı

Covid-19 pandemisiyle birlikte ilk kez viral aşı üretimi için kullanılmaya başlayan HEK-293 halihazırda CAR-T hücre tedavisi, gen terapisi ve recombinant terapötik proteinlerin üretimi için onay alarak ticari üretimlerde ekspresyonel platform olarak yer alan insan kökenli bir hücre hattıdır (Tan et al., 2021). İnsan kökenli olması ise bu hücre hattının istenmeyen immünolojik yanıt ve misfolding gibi olasılıkları elimine ederek insan yapısındaki PTM' leri doğru bir şekilde gerçekleştirmesine olanak sağlamaktadır (Abaandou et al., 2021; Hu et al., 2018). Bu açıdan da özellikle rekombinant DNA teknolojisiyle beraber hem terapötik

protein hem de subunit ve VLP gibi aşı platformlarının üretimi için oldukça uygundur (Abaandou et al., 2021; Loignon et al., 2008; Pulix et al., 2021; Tan et al., 2021). İnsan kökenli olduğundan dolayı yapılan çalışmalarda polio (Campbell et al., 2005), influenza (Le Ru et al., 2010) ve kuduz (Madhusudana et al., 2010) gibi virüslere de duyarlı olduğu gösterildiğinden tüm virüs üretimine dayalı aşılar için de ekspresyonel platform olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Bunlarla birlikte düşük duyarlılıkta da olsa SARS-COV-2 ile enfekte olabildiği gösterilmiştir (Modrof et al., 2020). Bu açıdan da biyoteknoloji endüstrisinde son yıllarda oldukça popüler bir hale gelmiştir. Ayrıca bu hücre hattı modelleme, toksikoloji ve ilaç denemesi çalışmalarında da sıklıkla tercih edilmektedir (Abaandou et al., 2021; Hu et al., 2018).

HEK-293 hücre hattı 1972’ de Alex Van der Eb tarafından bir kız fetüsünün böbrek hücrelerinden oluşturulan primer kültürden köken almaktadır. Daha sonrasında Frank Graham tarafından adenovirüslerin insandaki kanser oluşturma potansiyelini anlamak için yapılan çalışmalarda bu primer kültür kullanılmıştır. Graham’ ın orijinal olarak 1973 yılında gerçekleştirdiği çalışmalarda Adenovirüs Tip 5 (AdV 5)’ in tüm genomu izole edilip parçalandıktan sonra elde edilen bu genom fragmentleri ile primer böbrek kültürdeki hücreler transfekte edilmiştir. Bu transfeksiyonların gerçekleştirildiği 293. deneyde HEK-293 devamlı hücre hattı oluşturulmuştur. Bu nedenle elde edilen bu hücre hattının adı da İnsan Embriyonik Böbrek hücrelerinin 293. denenmesinde oluşturulduğu için kısaca HEK-293 olarak belirlenmiştir (Graham et al., 1977; Hu et al., 2018). Daha sonrasında gelişen teknikler ile birlikte HEK-293 hücre hattının daha detaylı olarak parçalanarak AdV 5 genomuyla transfeksiyon sonucunda 19. Kromozoma E1A ve E1B gen bölgelerini içeren yaklaşık olarak 4.35 kbp uzunluğundaki bir fragmentin entegre olmasıyla immortalize edildiği gösterilmiştir (Haeussler et al., 2011; Malm et al., 2020). Bu anlamda HEK-293 hücrelerinin AdV 5’ e ait E1A ve E1B genlerine sahip olarak devamlı şekilde bunların eksprese olması onların hücresel döngü ile beraber apoptoz sürecine müdahale ederek ölümsüz olmasını sağlamasının yanında replikasyon-deficient adenovirüs ve adeno-associated viral vektör üretimi için de bu hücre hattını spesifik olarak öne çıkarmaktadır (Abaandou et al., 2021; Hu et al., 2018; Malm et al., 2020; Tan et al., 2021). HEK-293 hücre hattının genel olarak adherent üreme özelliği gösteren epitelyal hücre morfolojisine sahip olduğu kabul

edilse de yapılan çalışmalarda bu hücre hattının ayrıca nöron hücrelerine ait özellikler sergilediği gösterilmiştir (Hu et al., 2018; Shaw et al., 2002). Bu hücre hattının ikilenme süresinin ise 30-40 saat aralığında olduğu ve süspanse üremeye kolaylıkla adapte edilebildiği birçok farklı çalışma ile gösterilmiştir. Süspanseye adapte edildiği halinin de benzer veya daha kısa bir ikilenme süresine sahip olduğu yine bu çalışmalarda yer almaktadır (Jang et al., 2022; Malm et al., 2020). Tüm bunlarla birlikte yıllar içerisinde farklı çalışmalar ve üretimde kullanılma amacına yönelik olarak farklı uygulamalar yapılarak değişik hücresel karakterlerde farklı HEK-293 hücre türevleri üretilmiştir. Bunlardan en bilineni ise SV40 large T antijenine sahip olacak şekilde değiştirilerek ekspresyonel kapasitesi arttırılan HEK-293T'dir (Abaandou et al., 2021; Pulix et al., 2021).

2.3.4 THP-1 hücre hattı

THP-1 hücre hattı, 1980 yılında Tsuchiya ve arkadaşları tarafından geliştirilip karakterize edilen, insan monositik lösemi hücre hattıdır. Bu hücre hattı, akut monositik lösemiye sahip 1 yaşındaki erkek hastanın periferik kanından izole edilen hücreler ile oluşturulmuştur (Tsuchiya et al., 1980). THP-1 hücre hattı *in vitro* olarak çeşitli makrofaj türlerine veya dendritik hücrelere farklılaşabilen bir pro-monositik hücre hattıdır. Bu nedenle THP-1 hücreleri, morfoloji ve farklılaşma özellikleri bakımından monositlere ve makrofajlara benzemektedir (Chanput et al., 2015, 2014; Tsuchiya et al., 1980; Verhoeckx et al., 2015). Bunlarla birlikte, THP-1 hücre hattı, ölümsüzleştirilmiş (immortalize) bir hücre hattıdır. Bu hücre hattı 25 pasaj ve hatta ilerleyen pasaj numaraları da dahil olmak üzere yapısında, hücre duyarlılığında ve hücresel aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmadan kültürlenebilmektedir (Verhoeckx et al., 2015). THP-1 hücreleri kültürlendikleri ortamda adherent özellik göstermeden süspanse olarak çoğalmaktadır ve morfolojik olarak büyük, yuvarlak ve tek hücre halinde bulunmaktadır. Bu hücre hattının ikilenme süresinin ise 40-70 saat gibi geniş bir aralığa sahip olduğu gösterilmiştir (DSMZ, 2023; Tsuchiya et al., 1980). THP-1 hücreleri kültür ortamında herhangi bir uyarıcı bileşen olmadığı sürece süspanse bir şekilde üremeye devam etmektedir (Aldo et al., 2013; Bosshart and Heinzelmann, 2016; Chanput et al., 2015, 2014; Daigneault et al., 2010; Verhoeckx et al., 2015). Günümüzde THP-1 hücre hattıyla herhangi bir endüstriyel üretim gerçekleştirilmese de ölçeklendirilebilirliği ve

serumsuz ortama adapte edilebildiği gösterilmiştir (Kimiz-Gebologlu et al., 2022; Mimura et al., 1986). Bununla birlikte THP-1 hücrelerinin halihazırda süspanse karakterde ve insan kökenli olması gibi avantajlara sahip olması da bu hücre hattının büyük ölçekli endüstriyel üretimlerde kullanılma potansiyelinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir (Kimiz-Gebologlu et al., 2022).

2.4 Biyofarmasötik Üretimlerde Ekspresyonel Platformlar Olarak Hücre Hatları

Biyofarmasötik üretimlerde yukarıda bahsedildiği üzere çok farklı ekspresyonel platform üretim için tercih edilebilmektedir. Ancak istenilen ürünün özelliğine bağlı olarak günümüzde birçok biyoterapötik bileşenin üretiminde hücre hatları kullanılmaktadır. Tüm üretim süreci ise ürün ve dolayısıyla da kullanılan hücre üzerinden şekillendirildiğinden uygun ekspresyonel platformun seçimi oldukça önemlidir ve geliştirilen üretim prosesi planının en önemli aşamasıdır. Bu seçim birçok parametrenin ele alınmasını gerektirdiğinden titizlikle yapılmaz. Çünkü üretilmek istenilen biyofarmasötik eğer terapötik bir bileşense bunu aktif yapıda veya ürün bir aşı ise de bunu yeterli immünojenisiteye sahip olması için doğru konformasyonel formda sentezlenmesi gerekmektedir (Demain and Vaishnav, 2009; Gupta et al., 2019; Saxena et al., 2016; Tripathi and Shrivastava, 2019). Aynı zamanda ürünün fonksiyonel özellikleri ve insan vücudundaki hedeflenen etkisi göz önüne alınmalıdır. Özellikle üretilmesi planlanan biyofarmasötüğün insan vücudu tarafından doğal üretici organ, doku veya hücre tipleri varsa üretimde seçilecek insan hücre hattı da bu doğrultuda seçilmelidir (Fliedl et al., 2015) Ayrıca bunlarla beraber üretimde bir ticari kaygı söz konusu olduğundan üretilen bileşenin aynı zamanda yeterli miktarlarda da sentezlenmesi gerekmektedir. Bunu gerçekleştirecek ekspresyonel platformlar olan hücre hatları ise üreme, PTM yapıları ve ekspresyonel kapasite gibi oldukça farklı özelliklere sahip olduğundan mevcut beklentiye karşılayacak olan hücre hattı seçilmeli veya geliştirilmelidir. Bu açıdan da hedeflenen üretimdeki biyofarmasötik ürünün özellikleri ile bunu sentezlemek için seçilen platformun sahip olduğu özellikler yeterli olmaz ise başarılı bir üretim gerçekleştirilemez (Gomez and Robinson, 2018; Josefsberg and Buckland, 2012; Merten et al., 2014; Reinhart et al., 2019).

Hücre kültürü temelli gerçekleştirilen tüm ticari uygulamaların temelinde ekspresyon platformu olarak veya kişiselleştirilmiş tıp alanında doğrudan tedavi için kullanılacak hücrelerin yüksek miktarda üretilmesine odaklanılmaktadır (Genzel et al., 2014a; Josefsberg and Buckland, 2012; MilliporeSigma and SAFC, 2021; Zhou et al., 2010). Bunun nedeni bu üretimler sonunda elde edilmek istenen biyokütle, mAb, büyüme faktörü, hormon ve viral aşı gibi son ürünlerin miktarları ile üretim sırasında ulaşılabilen total hücre sayısı arasında doğru bir orantı olmasıdır (Cadwell, 2011; Flickinger and Birch, 2010; Hunter et al., 2019; Josefsberg and Buckland, 2012; MilliporeSigma and SAFC, 2021; Verma et al., 2020). Bu açıdan hücre kültürü temelli üretimlerde üretilmek istenen terapötik bileşenin, mAb' ın veya aşının üretim stratejisi belirlendikten sonra bunu üretecek olan ekspresyonel platformun doğru bir şekilde seçilmesinin yanında seçilen bu hücrelerin mümkün olduğunca yüksek miktarda çoğaltılması gerekmektedir. Bunun için de aynı zamanda yüksek konsantrasyonda kültürlenmeyi gerçekleştirebilecek uygun biyoreaktör sistemleri tercih edilmelidir (Genzel et al., 2014a; Josefsberg and Buckland, 2012; Khan, 2013; Merten, 2015; Merten et al., 2014). Tüm bunlar kısaca bir örnek üzerinden bahsedilecek olursa geleneksel şekilde yıllardır üretimi yapılan inaktif aşılarda üretimindeki cell-expansion aşaması ve devamındaki virüs inokülasyonu ile birlikte başlayan virüs çoğaltım süreci bu açıdan iyi bir örnektir. Burada seçilen ekspresyonel platformun ilgili virüsün çoğaltılmasında veya doğru yapıda sentezlenmesinde uygun hücresel mekanizmaya sahip olması gerekmektedir. Aksi takdirde viral enfeksiyon mümkün olmayacağından herhangi bir üretim gerçekleşmeyecek veya enfeksiyon gerçekleşse de sentezlenen virüsler enfektif olmayacağından aşı materyali olarak kullanılmak üzere uygun immünojen özellik göstermeyecektir (Aubrit et al., 2015; Dumont et al., 2016; Genzel, 2015; Rodrigues et al., 2015). Buna benzer şekilde terapötik proteinlerin üretimi açısından bakıldığında geçmişten günümüze kadar geliştirilmiş ve geliştirilmekte olan birçok hücre hattı arasından uygun ekspresyonel kapasiteye sahip olanlar tercih edilmelidir. Bu açıdan da terapötik ürünlerin üretimi ve ekspresyon sonrasında gerçekleştirilen PTM' ler bakımından yüksek potansiyele sahip, ribozomal sistemler, golgi cisimciği ve endoplazmik retikulum gibi organellerinin gelişmiş olduğu hücrelerden türevlenen hücre hatlarının seçilmesi önemlidir (Freshney, 2005; Geraghty et al., 2014). Bunların dışında seçilen hücrenin yüksek oranda üremesi için gerekli olan mikro-çevre koşullarını en uygun şekilde sağlayabilen

biyoreaktör sistemleri arasından da yine seçilen platform göz önüne alınarak bir seçim yapılmalıdır (Barrett et al., 2009; Gallo–Ramírez et al., 2015; Vlecken et al., 2013).

Tüm bunlarla birlikte biyofarmasötik üretimindeki üstün amaç insan sağlığının korunması ve hastalıkların tedavi edilmesi veya engellenmesi olmasının yanında aynı zamanda özellikle özel şirketler açısından ticari bir kaygıyı da barındırmaktadır. Bu anlamda da üretim yapan şirketler aynı zamanda bir kar amacı da gütmektedir (Dumont et al., 2016; Ozturk et al., 2003; Zhou et al., 2010). Bu açıdan en kısa zamanda yüksek verim elde edilmesi adına biyofarmasötik üretimi için kullanılması istenen hücresel platformun yüksek doğrulukta ekspresyonel kapasiteye, kısa ikilenme süresine, uygun biyoreaktör sisteminde yüksek maksimum hücre konsantrasyonu değerlerine çıkabilme ve yüksek ürün titrelerine ulaşabilme gibi özelliklere sahip olması istenmektedir (Aubrit et al., 2015; Dumont et al., 2016; Gallo–Ramírez et al., 2015; Genzel, 2015; Merten et al., 2014; Nichols et al., 2016). Aynı zamanda fikri mülkiyet hakları kapsamında bazı hücre hatları patentlendiği için bunların ticari üretimlerde kullanılmaları ek maliyet oluşturmaktadırlar. Bu nedenle hücre hattı seçiminde bu durum da göz önüne alınmalıdır (van der Pol and Bakker, 2014).

2.4.1 Üretimde kullanılacak hücre hattının kökeni

Biyofarmasötik endüstrisinde ürünlerin hedef kitlesi insan olduğu için bunların üretiminde kullanılan ekspresyonel platformların insan kökenli olmasının daha uygun bir yaklaşım olacağı görüşü bulunmaktadır. Özellikle terapötik proteinlerin üretimi için CHO hücreleri, bebek hamster böbrek hücreleri BHK ve kemirgen miyelom hücreleri NS0 veya Sp2 kullanılması insan hücrelerine kıyasla glikosilasyon desenlerinde iki önemli farklılık meydana getirmektedir. Bunlar; N-glikozilasyonu sırasında meydana gelen, proteinin N terminal ucuna eklenen galaktoz- α -1,3-galaktoz (α -gal) ve N-glikolilnöraminik asit glikomotifleridir. Bu motifler, insan vücudunda tanınmadığı için bu motiflere sahip terapötik proteinler, insan vücudunda istenmeyen immünojenik etki gösterirler. Böylece istenmeyen immünojenisiteye yol açan ve düşük yarılanma ömrü ile sonuçlanan bu şekildeki insan dışı PTM' ler arasında yer alan bu glikomotifler, özellikle son yıllarda dikkat

çekmiştir. Bunların giderilmesi ve hedeflenen ürün kalitesinin sağlanması anlamında insan proteinlerindeki doğal fonksiyonel yapıya benzer PTM'leri gerçekleştiren insan hücre hatlarını endüstride kullanılmaya başlamıştır (Caron et al., 2018; Dumont et al., 2016; Ergen and Tüfekçi, 2022; Fliedl et al., 2015). Ancak şu anda gerçekleştirilen terapötik proteinlerin üretiminin birçoğu memeli, fakat insan dışı bir hücre hattı olan CHO' da gerçekleştirilmektedir. Bu hücre hattı hücre yukarıda sayılan hücre dayanıklılığı, süspanse ve serumsuz ortamda kültürlenebilirlik, yüksek üretim verimi gibi avantajları nedeniyle tercih edilmektedir. Bu anlamda da bu hücre platform yerine insan hücre hatlarının kullanılması planlandığında bu insan hücre hatlarının ticari olarak kazanç sağlayabilmelidir (Fliedl et al., 2015; Gupta et al., 2019; Lindskog et al., 2018; Tripathi and Shrivastava, 2019). Bu açıdan da terapötik proteinlerin üretimi kapsamında, üretimde kullanılması düşünülen insan hücre hatlarının endüstriyel boyutta gerçekleştirilen üretimlerine ait ürün veriminin kritik değer aralığı 2 - 5 g/L olarak belirtilmiştir. Sadece bu değer aralığında veya bu aralığın üzerindeki üretim verimlerine sahip insan hücre hatlarının üretimde kullanılması da bir diğer önemli kriterdir. Bunun nedeni ise belirtilen bu kritik değer aralığının altındaki üretim verimlerinin, ilgili işletmenin ticari anlamda uzun ömürlü olmasını imkansız hale getirmesidir (Horowitz et al., 2004; Mirasol, 2018)

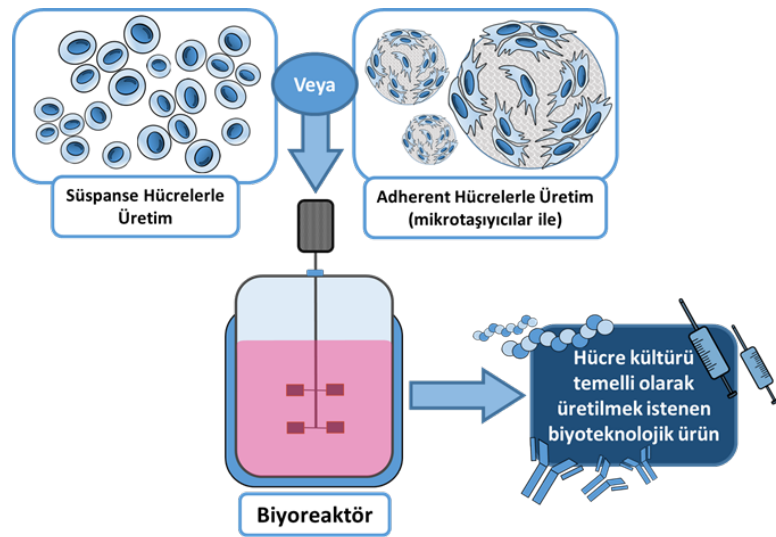
Aynı zamanda hücre hatlarının hepsinin köken aldığı hücreler gereğince bu hücrelerin ürettiği farklı yan ürünleri de bulunmaktadır. Bunların bazıları büyüme faktörleri, sitokinler ve hormon benzeri yapılardır. Üretim için kullanılacak insan hücre hattının seçimi sırasında da bunların istenilen ürün ile olan etkileşimi de dikkate alınması gereken bir unsurdur. Hücresel yan ürünlere benzer şekilde her insan hücre hattı da farklı hücre reseptörler ve diğer farklı yapıdaki yüzey moleküllerine sahiptir (Greenblatt, 2017; Seddon et al., 2009; Verma et al., 2020). Bu nedenle de hedeflenen terapötik ürün ile bu ürünü üretecek olan hücrenin istenmeyen etkileşimleri de bazı durumlarda söz konusudur. Bunun nedeni terapötik proteinlerin üretiminde temel alınan rekombinant DNA teknolojisidir. Çünkü hücreler kendilerine aktarılan bu genin eksprese edilmesi sonucu sentezledikleri ürünleri normalde üretemezler. Örneğin; kansere karşı geliştirilen bir antikoru üretmek için antikorun geliştirildiği ilgili kanser türünden köken almış bir hücre hattının kullanılması, istenmeyen hücre - ürün etkileşimine sebep

olabilmektedir. Bu nedenle de istenmeyen bu olası etkileşimlerin önüne geçmek için insan hücre hattı seçiminde tüm bunlar dikkatli bir şekilde ele alınmalıdır (Fliedl et al., 2015; Mirasol, 2018; Noh et al., 2019) Tüm bunlarla birlikte, aşı üretimi açısından insan kökenli hücre hatları kullanılarak üretilen aşı materyali viral spesifite açısından virüse duyarlı orijinal konakta sentezlendiği için daha yüksek miktarda ve daha doğru formlarda eksprese edeceği ve dolayısıyla daha etkili bir immünizasyon sağlayacağı bazı çalışmalar ile gösterilmektedir (Dumont et al., 2016; Genzel, 2015; Jordan and Sandig, 2014; Tan et al., 2021).

2.4.2 Hücre hattının üreme özelliği

Hücre kültürü temelli üretimlerde kullanılan hücre hatlarının neredeyse hepsinin üreme karakteri adherenttir (Merten, 2015). Bu açıdan da adherent kültürlerin üremek için uygun yüzeylere ihtiyaç duymaları sebebiyle ölçek büyütmede mikrotasıyıcı gibi destek materyallerinin kullanımını gerektirmektedir (Genzel et al., 2014a; Kiesslich et al., 2021). Bu durum üretimlerde ek maliyet oluşturmasıyla birlikte üretime hazırlıkta ön işlem süresinin uzaması gibi diğer dezavantajları da bulunmaktadır. Ayrıca her adherent hücrede olduğu gibi hücre üremesi mevcut yüzey alanı ile sınırlandığından yüksek miktarlarda hücre elde edilmesi bu özellikteki hücrelerin kullanıldığı sistemler için zordur (Caron et al., 2018; Genzel et al., 2014a; Kiesslich and Kamen, 2020; Merten et al., 2014). Özellikle primer kültürlerin ve diploid hücre hatlarının adherent üreme karakterlerini korudukları ve süspanse koşullara adapte edilebilirliklerinin kısıtlı olduğu bilindiğinden bunlar viral aşı üretimleri özelinde adherent halde ya mikrotasıyıcılar kullanılarak karıştırmalı tank biyoreaktörlerinde ya da diğer uygun destek materyallerinin kullanıldığı packed-bed biyoreaktörlerde (iCellis® gibi) üretilmektedirler (Bellani et al., 2020; Merten, 2015; Merten et al., 2014). Bununla birlikte süspanse üreme özelliği gösteren herhangi bir yüzeye bağımlı olmadığından dolayı özellikle biyoreaktör üretimleri için ölçek büyütmede kolaylık, daha az iş gücü gerekliliği, büyümenin sadece üretim ortamındaki kültür bileşenlerinin yeterliliği ve hücre konsantrasyonu ile sınırlandırılması, üretim ortamındaki hücresel mikro-çevrenin daha homojen olması gibi avantajlara sahiptir (Kuystermans and Al-Rubeai, 2015; Merten et al., 2014; Moreira et al., 2020; Saha et al., 2016). Bu nedenle de sağladığı avantajlar nedeniyle genel anlamda

endüstriyel üretimlerde süspanse kültürlerin kullanımına yönelik bir ilgi bulunmaktadır (Flickinger and Birch, 2010; Gallo–Ramírez et al., 2015; Josefsberg and Buckland, 2012; Merten, 2015; Merten et al., 2014). Ancak bahsedildiği üzere üretimlerde kullanılan ekspresyonel platformların neredeyse hepsi adherent özellik gösterdiğinden üretimlerde süspanse kültürlerin kullanımı hedefleniyor ise hücresel substratların süspanse üreme koşuluna adapte edilmesi gerekmektedir (Caron et al., 2018; Merten et al., 2014). Bu adaptasyon yüzey bağımlı hücrelerin bu yüzeyden mahrum bırakıldığı dinamik sistemlerde kültüre alınması, serumsuz ortamlarda kültürlenmeye alınması veya bu şekilde adapte edilebilmesi için o hücre hattına özel geliştirilmiş serumsuz besin ortamlarının kullanımı ile mümkün olabilmektedir (Caron et al., 2018; Merten et al., 2014; Sinacore et al., 2000; S. Wu et al., 2021). Bu açıdan da özellikle adherentten süspanse üremeye adaptasyonda devamlı hücre hatlarında oldukça yüksek başarı sağlanmaktadır (Aubrit et al., 2015; Horowitz et al., 2004; Verma et al., 2020). Ayrıca, bu adaptasyon sırasında hücresel karakter büyük ölçüde değiştiğinden diğer bir yandan hücre mühendisliğiyle geliştirilen süspanse kültürün hala daha ürün olarak kullanılacak bileşeni endüstriyel anlamda kullanmak üzere yeteri miktarda ve uygun formda sentezlediği sürekli olarak kontrol edilmelidir (Hess et al., 2012; Merten et al., 2014; Sinacore et al., 2000). Bunlarla birlikte günümüzde adherent hücreler hala daha üretimlerde tercih edilmektedir. Bu açıdan da hücre kültürü temelli üretimlerde hem adherent hem de süspanse hücre hatları kullanılarak (Şekil 2.1) birçok üretim gerçekleştirilmektedir (Khan, 2013; Merten, 2015).



Şekil 2.1. Biyoprosesler kullanılan hücre hatlarının üreme karakterleri

2.4.3 Güvenlik regülasyonları

Hücre hatlarının ekspresyonel platformlar olarak kullanıldığı hücre kültürü temelli üretimlerde özellikle kullanılan hücre tipi de göz önüne alınarak güvenlik açısından birçok farklı parametre ele alınmalıdır. Bu anlamda, eğer üretilen son ürünün ve bu ürünün üretildiği hücresel substratın gerekli regülasyonlara uygun şekilde kullanılabilirliğinin ortaya konması açısından yeterli dokümantasyon yapılmazsa ilgili ürün onay alamayacağından ticarileştirilememektedir (Herman and Pauwels, 2015; Hess et al., 2012; Sheets and Petricciani, 2004; Stacey and Hawkins, 2016). Bunun için biyoteknolojik ürünlerin ticarileştirilme sürecinde bunların onayını veren otorite kuruluşlar birkaç temel husus ile bunların güvenliğinin ortaya konmasını zorunlu kılmışlardır. Bunlardan en temel olanı kullanılan hücresel platformun son ürün içerisinde yer almamasının garanti edilmesidir (Aubrit et al., 2015; Hess et al., 2012; Horowitz et al., 2004). Özellikle devamlı hücre hatlarının sadece yüksek hücresel konsantrasyonlarda yapılan enjeksiyonlarının tümör oluşumunu indüklediğinin gösterilmesine rağmen bu hücrelerin kullanılarak yapıldığı üretimlerdeki mevcut potansiyel risk nedeniyle bunun giderilmesi gerekmektedir. Bu anlamda da biyofarmasötik üretimi için hazırlanan farmakopelerde yer alan standartlara göre son ürün içerisinde hiçbir şekilde üretimde kullanılan ekspresyonel platform yer almamalıdır (Aubrit et al., 2015; Gallo–Ramírez et al., 2015; Hess et al., 2012; Horowitz et al., 2004). Bunun dışındaki diğer bir önemli güvenlik regülasyonu da son ürünün herhangi bir biyolojik kontaminantı içermediğinin gösterilmesi gerekliliğidir. Ayrıca üretimde hücre kaynaklı olası bir patojenin son ürün içerisinde yer alması ihtimali sonucunda oluşabilecek ciddi yan etkiler düşünüldüğünde üretimde kullanılan ekspresyonel platformun tüm zararlı kontaminatlardan (aşı içeriği dışındaki virüs, bakteri, mikoplazma vb.) arı olduğunun kanıtlanması gerekmektedir (Luckert et al., 2017; van der Pol and Bakker, 2014). Bu anlamda özellikle primer kültürlerle hazırlanan aşılarda en riskli gruba oluşturmaktadır. Bunun nedeni bu kültürlerin her defasında yeniden oluşturulurken kökenlerinden kaynaklı olan varyabilitenin oldukça yüksek olmasıdır (Horowitz et al., 2004; Jordan and Sandig, 2014; Verma et al., 2020). Bu anlamda ise iyi karakterize edilmiş diploid ve devamlı hücre hatları en güvenli gruba oluşturmaktadır (Dumont et al., 2016; Horowitz et al., 2004; Merten, 2015; Rodrigues et al., 2015). Ancak devamlı hücre hatları özelinde oluşan bir diğer

güvenlik endişesi de devamlı hücre hatları kullanılarak yapılan üretimlerdeki son ürünün kanser oluşumunu tetikleyebileceğinin düşüncesidir. Bunun nedeni bunların çoğunlukla köken aldıkları orijinal canlıdan uzaklaşarak kanser hücrelerine daha çok benzediklerinden kaynaklanmaktadır. Bu anlamda da devamlı hücre hattının kendisinden gelen (HeLa gibi) ve eğer varsa bu hücre hattı oluşturulurken kullanılan spesifik onkogenik özellikteki virüslerin (HEK-293 gibi) veya viral genomun üretim ortamına salınmadığının kanıtlanması gerekmektedir (Gallo–Ramírez et al., 2015; Herman and Pauwels, 2015; Hess et al., 2012; Jordan and Sandig, 2014; Verma et al., 2020). Bu nedenle devamlı hücre hatlarına kıyasla diploid hücre hatları tümörjenik olmadıkları gösterilmiş olduğundan ve güvenlik anlamında çok iyi karakterize edildikleri için öne çıkmaktadırlar (Aubrit et al., 2015; Herman and Pauwels, 2015; Horowitz et al., 2004; Luckert et al., 2017). Bunun dışında, hem tümör oluşumunu tetikleme açısından hem de arzu edilmeyen immünojenik yanıt oluşturabilmesi açısından kullanılan tüm hücresel substratlarla yapılan üretimlerde elde edilen son ürün olan aşı içerisinde 10 ng’ dan daha fazla hücresel genomik materyal bulunmaması gerekmektedir (Horowitz et al., 2004; Shen et al., 2008; Sheng-Fowler et al., 2009). Bununla birlikte özellikle tümörjenik ve tümör fenotipine sahip devamlı hücre hatlarıyla yapılan üretimlerde bu limit değer sağlansa bile bunların güvenli olduğu daha ileri moleküler testlerle gösterilmelidir (Sheng-Fowler et al., 2009; Stepanenko and Dmitrenko, 2015). Ayrıca tümörjenik nükleik asit sekansları dışında hücrelerin kültür ortamına salgıladıkları farklı proteinik yapıların veya hücresel faktörlerin kanser tetikleyici özelliklerinin olmadığı ve eğer böyle bileşenler varsa da bunların son üründe bulunmadığının kanıtlanması gerekmektedir (Horowitz et al., 2004; Pauwels et al., 2007; Shen et al., 2008). Bunlarla birlikte bazı hücresel substratların orjinleri ve özellikle insan kökenli olanlar etik, psikolojik ve dini açıdan sorun oluşturabilmektedir (Aubrit et al., 2015; Jordan and Sandig, 2014).

Gerekli güvenlik regülasyonlarının sağlanmasında kolaylık sağlamanın yanında üretim için tercih edilecek hücresel substrat seçilirken diğer önemli kriterler de tür bariyeridir (Berting et al., 2010; Herman and Pauwels, 2015; Merten et al., 2014; Verma et al., 2020). Tür bariyeri tüm biyofarmasötiklerin üretimindeki hücre hattı seçiminde önemli bir güvenlik parametresidir. Tür bariyeri yakın akraba olan türlerin aynı virüslerle enfekte olabilirken uzak olanların bu virüslerle enfekte

olamayacağını ifade etmektedir (Luckert et al., 2017; Pauwels et al., 2007). Bu açıdan da biyofarmasötik üretiminde kullanılan hücresel platformların kökenlerine göre ise artan risk sıralaması; kanatlı ve omurgasız hücre hatları, primat ve insan olmayan memeli hücre hatları, primat hücre hatları ve insan hücre hatları şeklindedir (Herman and Pauwels, 2015). Bu anlamda özellikle insan kullanımına yönelik mAb üretiminin hedeflendiği biyoproseslerde CHO hücrelerinin kullanımı bu açıdan avantaj sağlamaktadır. Bunun nedeni CHO hücreleri hamster orijinli olduğundan dolayı birçok farklı insan virüsüne karşı enfektivite açısından geçirgen olmayışdır. Böylelikle üretimdeki potansiyel bir viral kontaminasyon riski azalmaktadır (Berting et al., 2010; Genzel, 2015; Horowitz et al., 2004). Ancak insan kullanımına yönelik viral aşı üretimi açısından bakıldığında bu durum daha detaylı bir şekilde ele alınmalıdır. Diğer biyofarmasötiklerin ve recombinant DNA teknolojisi temeline dayanan viral aşılarda üretiminde bu durum avantaj sağlarken, tüm virüsün üretilmesine dayanan aşı üretim proseslerinde tür bariyeri bir engel teşkil edebilmektedir. Bunun nedeni burada üretilmek istenen asıl ürün insanda patojenik özellik gösteren virüsün kendisi olmasıdır. Bunun için de üretimde kullanılmak istenen hücre hattının bu virüsü çoğaltmak için onunla doğrudan enfekte olması gerekmektedir (Gomez and Robinson, 2018; Merten et al., 2014; Rodrigues et al., 2015). Bu anlamda da özellikle tüm virüs üretiminin hedeflendiği üretimlerde insan kökenli hücrelerin kullanılması diğer potansiyel viral kontaminasyon riskini arttırsa da asıl aşı içeriğinde kullanılmak üzere üretilen virüs için de konformasyonel doğruluk ve enfektive açısından doğal bir avantaj sağlamaktadır (Aubrit et al., 2015; Dumont et al., 2016; Tan et al., 2021).

2.4.4 Hücre hatlarının üretim koşulları

Son yıllarda hücre kültürü temelli endüstriyel üretimlerde serumsuz ortamların kullanımına yönelik bir trend oluşmuştur. Bunun nedeni Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (*Food and Drug Administration*, FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (European Medicine Agency, EMA), Beşeri İlaçların Teknik Gerekliliklerinin Uyumlaştırılması Uluslararası Konseyi (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) gibi otorite kuruluşlar tarafından yayınlanan yönetmeliklerde insan sağlığında kullanılmak üzere biyoteknolojik ürün üretiminin gerçekleştirildiği proseslerde serum

kullanımının önerilmemesidir (Sinacore et al., 2000; Subbiahanadar Chelladurai et al., 2021; S. Wu et al., 2021). Üretimlerde serum kullanımının tamamen kaldırılması veya azaltılmasının üretim ve onaylanma için gerekli regülasyonların daha kolay sağlamanın yanında maliyet, alt akım işlemlerinde kolaylık ve sığır ürünlerine alerjisi olan bireyler açısından da avantajlı olduğu gösterilmektedir (Butler, 2015; Minonzio and Linetsky, 2014; Subbiahanadar Chelladurai et al., 2021). Serumsuz ortamlar ayrıca bahsedildiği üzere adherent özellikteki kültürlerin süspanse üreme koşullarına adapte edilmesinde de kullanılmaktadırlar (Caron et al., 2018; Merten et al., 2014; Sinacore et al., 2000). Bu açıdan üretimlerde kullanılması planlanan adherent özellikteki kültürlerin süspanseye geçişlerinde de kolaylık sağlamaktadırlar. Bu anlamda da özellikle son yıllarda üretim için kullanılacak hücresel platformların serumsuz ortamlarda kültürlenmeye adapte edilmesine çalışılmaktadır (Caron et al., 2018; Merten et al., 2014; Ozturk et al., 2003; Verma et al., 2020). Ancak hücrelerin tamamen serumsuz ortamlarda kültürlenmeye adapte edilmesi zor bir işlemdir. Özellikle primer kültürlerin ve diploid hücre hatlarının kompleks besin ortamı bileşenlerine ihtiyaç duyması onların çok daha zengin içerikleri ortamlarda kültürlenmesinin bir gereklilik haline getirmektedir. Ayrıca bu hücresel substratların spesifik hücresel karakterlerinin korunarak serumsuz ortamlara adapte edilmesi oldukça zor olduğundan bu adaptasyon büyük oranda sadece serum içeriğinin düşürülmesiyle gerçekleştirilmektedir (Lee et al., 2020). Bununla birlikte devamlı hücre hatları serumsuz ortama adaptasyon işlemlerinde diğer hücresel platformlara göre oldukça yüksek başarı sağlamaktadır (Dumont et al., 2016; Horowitz et al., 2004). Bu açıdan da başarılı bir adaptasyon sonucunda devamlı hücre hatları serumlu ortamlarda gösterdikleri çoğalma performanslarına benzer veya daha iyi şekilde üretilbildiğinden bu hücre hatlarıyla yapılan endüstriyel üretimler de doğrudan serum içermeyen besin ortamları kullanılabilmektedir (Genzel et al., 2014a; Merten et al., 2014; Price, 2017). Özellikle günümüzde Çin hamster yumurtalık hücresi (CHO) ve Afrika yeşil maymun böbrek hücresi (Vero) gibi birçok farklı biyofarmasötik ticari üretiminde kullanılmak üzere onaylanan devamlı hücre hattı için birçok farklı markaya ait serumsuz besin ortamı çeşidi bulunmaktadır (Lee et al., 2020; Vlecken et al., 2013; S. Wu et al., 2021). Tüm bunlarla birlikte kullanılacak üretim sistemi ile beraber yapılacak üretimin amacına da bağlı olarak burada kullanılması planlanan hücresel substratların serumsuz ortama adaptasyonundaki başarı büyük oranda geliştirilen

serumsuz ortamın formülasyonuna ve hücresel karaktere bağlıdır (Kim and Lee, 2009; Merten et al., 2014; Price, 2017; S. Wu et al., 2021).

2.5 Hayvan Hücre Kültüründeki Besin Ortamlarının Önemi

Hayvan hücre kültürü tekniğinde hücrelerin kültürlendiği besin ortamı, gerçekleştirilen çalışmalar, araştırmalar ve endüstriyel üretim için en önemli bileşendir. Besin ortamı temel olarak, hücre canlılığını devam ettirip proliferasyonu sağlayarak kültürleme işlemini sağlamasının yanında içeriğindeki bileşenler ile hücresel fonksiyonları da desteklemektedir. Ayrıca kullanılan besin ortamının ve içeriğindeki maddelerin kalitesi, uygunluğu ya da miktarı yapılan araştırmaların sonuçlarını, üretimin hızını ve kalitesini, hücre kültürü temelli gerçekleştirilen tedavinin sonuçlarını doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, hücre kültürü temelli yapılan araştırma veya üretimlerde kullanılan besin ortamlarının kompozisyonu, kültürlen hücrelere uygunluğu ve besin ortamı içerisine eklenen bileşenlerin güvenilirliği elde edilecek sonuçlar açısından çok büyük önem taşımaktadır (Jedrzejczak-Silicka, 2017; Saha et al., 2016; Yao and Asayama, 2017).

İlk olarak 1887 yılında Sydney Ringer, vücut sıvılarına yakın bir kompozisyona sahip bir tuz çözeltisi geliştirmiş ve kurbağadan alınan kalpleri bu çözelti içerisinde belli bir süre hala atar durumda tutmayı başarmıştır (van der Valk et al., 2010; Yao and Asayama, 2017). Ringer' in bu solüsyonu geliştirmesinin ardından birçok araştırmacı (Earle ve Hanks gibi) da farklı türde solüsyonlar geliştirmiştir ve bu solüsyonların hepsi dengeli tuz solüsyonu (BSS) olarak adlandırılmıştır. BSS solüsyonları inorganik tuzların belirli oranlarda birleşiminden meydana gelmektedir. Ardından hücre kültürünün kurucusu olarak da bilinen Harrison'un lenf sıvısı içerisinde kurbağa sinir hücrelerini geliştirmesiyle basit tuz çözeltilerinin dışında hayvanlardan alınan kan, lenf, serum gibi vücut sıvılarını veya bu canlılardan alınan vücut parçalarının ekstrakte edilmesiyle oluşturulan sıvılarda hücrelerin kültürlenebildiği anlaşılarak ilginin bu bileşenlere kaymasına neden olmuştur. Daha sonrasında bu bileşenlerin yarattığı kontaminasyon, stabilizasyon sorunları ve elde edilme zorlukları nedeniyle hücrelerin kültürlenebileceği yapay ortamlara doğru bir yönelim gerçekleşmiştir. Bu yönelimle kullanılan hayvan orjinli kaynaklar incelenerek içeriğindeki hormon, vitamin, pepton, nükleik asitler gibi bazı kilit bileşenler tanımlanmıştır (Davis, 2011; Freshney, 2011). Bunların

tanımlanmasının ardından ilk defa devamlı hücre hatlarının da bulunmasıyla hücrelerin kültürlenmesi için tanımlanan bu bileşenleri optimum düzeyde bir araya getirmek için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarla beraber hücre kültürü çalışmalarında besin ortamı olarak tamamen doğal doku ekstratları ya da vücut sıvılar kullanılmasının yerine, bu tür bileşenlerin sadece katkı maddesi olarak belirli oranlarda kullanıldığı yapay besin ortamlarına bir geçiş olmuştur. Sonrasında ise yapay besin ortamlarına katkı maddesi veya tamamlayıcı bileşen olarak eklenen serumun yarattığı olumsuzluklar ve bu konudaki otorite kuruluşların belirlediği regülasyonlar nedeniyle serumsuz besin ortamının kullanımı için itici bir güç oluşmuş ve bu nedenle, içeriğindeki bileşenlerin tam kimyasal tanımlaması yapılmış olan serumsuz besin ortamı geliştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Pilgrim et al., 2022; Subbiahanadar Chelladurai et al., 2021; Van Der Valk et al., 2017). Yapılan bu çalışmalar sonucunda birçok besin ortamı geliştirilmiş olup bunların dışında var olan besin ortamlarının bazıları da modifiye edilerek içerisinde ek olarak seruma gerek duymayacak şekilde kültürde kullanılabilir hale getirilmiştir. Ancak geliştirilen besin ortamları sadece hücreye veya istenen hücresel ürüne spesifik olarak formüle edilebilmiştir. Bu durum hem serumsuz hem de hücresel aktiviteyi teşvik etmek için serumun katkı maddesi olarak eklendiği besin ortamlarında geçerlidir. Bu nedenle hayvan hücre kültürü temelli gerçekleştirilen çalışmalarda veya üretimlerde tüm hücrelerin kolaylıkla kültüre edilebileceği tek bir besin ortamı bulunmamaktadır (Butler, 2004; Davis, 2011; Freshney, 2011; Kuystermans and Al-Rubeai, 2015; Yao and Asayama, 2017).

2.5.1. Hayvan hücre kültürlerinde kullanılan besin ortamları

Hücre kültüründe kullanılan besin ortamlarında çok çeşitli bileşenler kullanılmakta ve basitçe ikiye ayrılmaktadır. Bunlar:

- 1. Temel bileşenler:** Hücre için temel gereksinimlerini karşılamak, hücrelerin canlılığının korunmasını sağlamak ve kültürleme için gerekli olan bileşenlerdir. BSS' lerin içeriğinde bulunan bileşenlerin hepsi temel bileşendir ve bunlar aynı zamanda bazal ortamların temelini oluşturur (Freshney, 2011; Gupta et al., 2016; Price, 2017; Yao and Asayama, 2017).

2. Tamamlayıcı, zenginleştirici ya da destekleyici olarak tanımlanan bileşenler: Hücresel büyüme ve hücre fonksiyonelliğini destekleyerek çok daha zengin içerikli bir besin ortamı ve daha başarılı bir kültürleme süreci için kullanılan bileşenlerdir (Gupta et al., 2016; Price, 2017; Yao and Asayama, 2017).

2.5.2 Besin ortamları çeşitleri

Besin ortamı, hücre kültürü çalışmalarını mümkün kılan en önemli bileşendir, çünkü kültürün pH'sını ve ozmotik basıncını düzenlemenin yanı sıra hücre büyümesi için gerekli besinleri, büyüme faktörlerini ve hormonları içerir. Gerçekleştirilen ilk hücre kültürü deneyleri, doku özlerinden ve vücut sıvılarından elde edilen doğal kaynaklı bileşenler kullanılarak gerçekleştirilmiş olmakla birlikte standardizasyon gerekliliği, kaliteli kültür ortamı ihtiyacı ve artan ihtiyaç sebebiyle yapay besin ortamlarının geliştirilmiştir. Günümüzde tüm hayvan hücre kültürü çalışmalarının temelini oluşturan bu yapay besin ortamları, ortam bileşimine eklenen katkıların tipine bağlı olarak birkaç gruba ayrılmaktadır. Bunlar; bazal ortam, serumu azaltılmış ortam, yabancı orijinli madde içermeyen (*Xeno-free*) ortam, serum içermeyen (serumsuz) ortam'dır. Serum içermeyen ortamların da; protein içeren ortam, protein içermeyen ortam ve kimyasal olarak tanımlanmış ortam şeklinde çeşitleri bulunmaktadır (Gstraunthaler et al., 2008; Nema and Khare, 2012; Price, 2017; Yao and Asayama, 2017).

1. Bazal ortam: Amino asitler, vitaminler, inorganik tuzlar ve glukoz gibi temel bileşenlerin büyük bir çoğunluğunu içermektedir. Bu ortamlar birçok hücrenin üretilmesi için kullanılır ve genellikle bu ortamların içerisine hücre büyümesini desteklemek için insan, sığır, at veya diğer canlılardan elde edilen serum ilave edilir. Ayrıca kültürlenecek olan hücrenin ihtiyacına göre L-Glutamin, antibiyotik gibi bileşenler de eklenir.

2. Serumu azaltılmış ortam: Serumun istenmeyen etkilerini azaltmak için ortaya çıkan bir kültür ortamı çeşididir. Bu ortamların genel içeriği de bazal ortamlar ile aynıdır. Bazal ortamlarda kullanılanlardan daha düşük miktarlarda serum kullanılır ve serum miktarı ortamda yeterince besleyici olmadığı için çeşitli nutrientler bu ortamlara eklenir.

3. Yabancı orijinli madde içermeyen (*xeno-free*) ortam: Bu ortam tipinde genellikle insan kökenli hücre hatları kültürlenmekte olup, insan serum albümini veya insan serumu gibi sadece insan kökenli bileşenler bu ortamların zenginleştirilmesi için kullanılmaktadır. İnsan dışında sığır, at veya çeşitli başka hayvanlardan köken alan hiçbir destekleyici bileşen bu ortamlara eklenmemektedir. Bu ortamlarda eğer insan serumu kullanılmaz ise, bunlar da aynı zamanda serumsuz ortam olarak da sayılabilmektedir.

4. Serumsuz ortam: Genel tanımıyla ortam formülasyonlarında serum içeriğinin yerine, serum içeriğinin zenginleştirici özelliğini taklit etmek için çeşitli besin, mineral, protein, hormon veya büyüme faktörleri gibi destekleyici bileşenlerin kullanıldığı ortamlardır. Bu ortam türünün en önemli avantajı, hücre tipine göre ortam formülasyonunda istenilen temel veya destekleyici bileşenlerin ortamdaki konsantrasyonlarına müdahale edilebilmesidir. Dolayısı ile her hücre tipine özel besin ortamı üretimi söz konusu olabilmektedir.

a. Protein içeren ortam: Serum içerisinde bulunan tanımlanmış proteinler destekleyici bileşen olarak kullanılmaktadır (örneğin; sığır serum albümini ve globülinler).

b. Protein içermeyen ortam: Çeşitli protein hidrolizatları (peptidler) gibi tanımlanmamış bileşenler kültür ortamına ilave edilmektedir.

c. Kimyasal olarak tanımlanmış ortam: Protein fraksiyonları, serum ve doku özütleri gibi tanımlanmamış bileşenlerin yer almadığı, sadece rekombinant proteinler gibi yüksek oranda saflaştırılmış bileşenlerin ortam içerisine takviye olarak kullanılabildiği besin ortamlarıdır. Bu ortamlar hücre kültürü temelli endüstriyel üretimlerde güvenlik ve regülasyon açısından en çok tercihe edilen ortamlardır (Brunner et al., 2010; Butler, 2015; Price, 2017; Van Der Valk et al., 2017; Yao and Asayama, 2017).

2.5.2.1. Serum içeren besin ortamları

Bazal ortamlar hücre kültürü çalışmalarının başladığı tarihten itibaren geliştirilmiş olan ve adlarından da anlaşılacağı gibi hücre kültürünün temelini oluşturan besin ortamlarıdır. Bu ortamlar zaman içerisinde birçok hücre çeşidinin geliştirilmesi için ortak bir besin ortamı hazırlama amacıyla geliştirilmeye

başlanmış olsa da hala daha günümüzde tüm hücrelerin kültürlenebileceği bir besin ortamı bulunmamıştır. Ancak süreç içerisinde geliştirilen bu bazal ortamlarda farklı birçok hücre tipi kültürlenebilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı da hala daha günümüzde en çok kullanılan besin ortamları bazal ortamlardır. Ayrıca bazal ortamlar, istenildiği şekilde kolaylıkla modifiye edilmesi ve birçok firma tarafından ticari olarak satılması nedeniyle de tüm hücre kültürü çalışmaları için başlangıç ortamları olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle de herhangi bir hücre kültürü çalışmasına başlanmadan önce yine ticari olarak hücrelerin veya hücre hatlarının satıldığı yerlerden bir satın alım söz konusu olduğunda genellikle o hücreye uygun olarak hücre bilgileri içerisinde hangi ortamda kültürlenmesi gerektiği yer almaktadır. Günümüzde en çok kullanılan bazal besin ortamları EMEM, DMEM, RPMI-1640, Ham's F-12 gibi içeriğindeki bileşenlerin konsantrasyonları açısından oldukça farklı içeriklere sahip ortamlardır (Davis, 2011; Freshney, 2011; Jedrzejczak-Silicka, 2017; Verhoeckx et al., 2015).

Serum, hücre kültürü çalışmaları için ilk kez Theodore Puck tarafından 1950'lerin sonunda besin ortamlarına eklendiğinden beri tarihsel sürecin başından itibaren kültürlenme işlemleri için vazgeçilmez bir bileşen olmuştur. Bunun temel nedeni; serum içeriğinde birçok farklı bileşenlerin bulunması (Tablo 2.2) ve bu bileşenlerin kültürlenmiş hücreler üzerinde hem koruyucu hem de yüksek mitojenik (hücre bölünmesini teşvik edici) etki göstermesidir. Serum çok farklı canlılardan elde edilebilmektedir. Ancak hücre kültürlerinde en çok kullanılan serumlar genellikle sığır, at ve insan kaynaklı serumlardır. Özellikle de sığır kaynaklı olan serumlar ve bunlar arasından fetal sığır serumu en yaygın kullanılan serum çeşididir (Butler, 2004; Davis, 2011; Freshney, 2011; Van Der Valk et al., 2017; Yang and Xiong, 2012). Serum, genellikle kültüre başlanacağı sırada bazal besin ortamlarına belirli oranlarda eklenmektedir ve besin ortamlarına eklenen serum oranı genellikle % 10'dur. Ancak kullanım amacına göre bu oran %5 ile %20 arasında değişebilmektedir. Hücrenin hızlı büyümesi veya yavaş büyümesine, serumun eklendiği temel besin ortamının içeriğindeki hücre büyümesini destekleyici bileşenlerin miktarına göre serum oranı da değişmektedir (Davis, 2011; Freshney, 2011; Van Der Valk et al., 2017; Yao and Asayama, 2017).

Tablo 2.2 Serumun yapısındaki bileşenler ve konsantrasyonları (Freshney, 2011)

Bileşen	Konsantrasyon aralığı
Proteinler ve polipeptitler (40 - 80 mg/mL)	
Albümin	20 - 50 mg/mL
Fetuin*	10 - 20 mg/mL
Fibronektin	1 - 10 µg/mL
Globulinler	1 - 15 mg/mL
Proteaz inhibitörleri: α1-antitripsin, α2-makroglobulin	0,5 - 2,5 mg/mL
Transferrin	2 - 4 mg/mL
Büyüme faktörleri (EGF, PDGF, IGF-I ve -II, FGF, IL-1, IL-6) (1 - 100 ng/mL)	
Amino Asitler (0,01 - 1,0 µM)	
Lipidler (2 - 10 mg/mL)	
Kolesterol	10 µM
Yağ asitleri	0,1 - 1,0 µM
Linoleik asit	0,01 - 0,1 µM
Fosfolipidler	0,7 - 3,0 mg/mL
Karbonhidratlar (1,0 - 2,0 mg/mL)	
Glikoz	0,6 - 1,2 mg/mL
Heksosamin**	0,6 - 1,2 mg/mL
Laktik asit***	0,5 - 2,0 mg/mL
Pirüvik asit	2 - 10 µg/mL
Poliaminler (Putresin, spermidin) (0,1 - 1,0 µM)	
Üre (170 - 300 µg / mL)	
İnorganikler (0,14 – 0,16 M)	
Kalsiyum	4 - 7 mM
Klorürler	100 µM
Demir	10 - 50 µM
Potasyum	5 - 15 mM
Fosfat	2 - 5 mM
Selenyum	0,01 µM
Sodyum	135 - 155 mM
Çinko	0,1 – 1,0 µM

Hormonlar (0,1 - 200 nM)	
Hidrokortizon	10 - 200 nM
İnsülin	1 - 100 ng/mL
Triiyodotironin	20 nM
Tiroksin	100 nM
Vitaminler (10 ng - 10 µg/mL)	
A Vitamini	10 - 100 ng/mL
Folat (Folik asit)	5 - 20 ng/mL
*Sadece FBS içinde bulunmaktadır. **İnsan serumunda en yüksek konsantrasyonda bulunur. *** FBS' te en yüksek konsantrasyonda bulunur.	

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan bazal ortamlarının ve diğer serumu azaltılmış veya yabancı orijinli madde içermeyen besin ortamlarının birçoğuna başta sığır olmak üzere farklı canlılardan elde edilen serumlar eklenmektedir. Bu anlamda besin ortamları içerisinde serum kullanılmasının avantajları, serumun besin ortamı içerisinde gösterdiği destekleyici fonksiyonları da düşünüldüğünde;

- Serum içerisindeki çeşitli amino asitler, vitaminler, inorganik mineraller, lipid ve nükleik asit türevleri ile kültür ortamını çok daha zengin bir hale getirmesi,
- İçerisinde bulunan fibronektin ve laminin gibi bileşenler ile hücrelerin kültür kabına daha kolay tutunmalarını ve yayılmalarını sağlaması,
- İçerisinde bulunan bağlayıcı ve taşıyıcı proteinler sayesinde hücrelerin bulundukları kültür ortamındaki nutrientleri daha kolay hücre içine almalarını (örneğin; albümin vitaminleri, yağ türevlerini ve hormonları taşıyarak transferrin hücre içine demir alımını) sağlaması,
- Ortamın viskozitesini artırır ve böylece hücreleri karıştırma sırasında oluşan kayma gerilmesinin mekanik hasarından hücreleri koruması,
- Besin ortamında bulunan proteazları inhibe eder ve benzer şekilde serumun pasajlamada kullanılan tripsinin etkisini sonlandırmak için yaygın olarak kullanılması,
- Ortamda bulunma ihtimali olan veya hücreler tarafından salgılanan hücreye toksik etki gösterebilecek bileşenleri bağlayarak detoksifikasyon özelliği göstermesi,

- Aynı zamanda ortamdaki pH stabilizasyonu için düşük kapasiteli bir tampon görevi görmesi,
- Serum içeren ortamlarda kültürlenmiş hücrelerin proliferasyon hızını artırır ve hücrenin canlılığının uzun süreler boyunca korunmasını sağlaması,
- Serum eklenen ortamlarda birçok hücrenin kendini fizyolojik ortamda sanarak *in vivo* ortama yakın hücresel cevap vermelerini sağlaması,
- Birçok hücre tipinin hücre-hücre etkileşimlerinde düzenleyici görevi görür.
- Serumlu ortamların kullanımı her hücre tipi için spesifik bir ortam formülasyonu geliştirme ihtiyacını azaltarak eklendiği bazal ortamı birçok hücre tipi için doğrudan kullanılabilir hale getirerek kültürleme açısından hazırlık ve iş yükü ihtiyacını azaltması, şeklinde sıralanabilir (Brunner et al., 2010; Butler, 2004; Davis, 2011; Gstraunthaler et al., 2008; Price, 2017; Van Der Valk et al., 2017; Verhoeckx et al., 2015; Warnock and Al-Rubeai, 2006; Yang and Xiong, 2012; Yao and Asayama, 2017).

Ancak çoklu fonksiyonelliğe sahip olmasına rağmen, serumun kültür ortamında kullanılmasının bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar;

- Serumun içerisinde bulunan ana bileşenlerden bazıları (albümin ve transferrin gibi tanımlansa da içeriğindeki birçok bileşen hala daha tam olarak tanımlanmamıştır. Bu durum çalışmalarda ve üretimlerde bir belirsizlik yaratır.
- Serumun içeriği, alındığı hayvanın beslenmesine, mevsime ve çevresel koşullara bağlı olarak değişebilir. Sürekli olarak tekrar eden bu varyasyon, serumun bileşiminde ve dolayısıyla da serum özelliklerinde önemli farklılıklara neden olabilir. Bu durum kültür verimi ve tekrarlanabilirlik açısından olumsuzluk yaratmaktadır.
- Serum içeriğinin tam tanımlanmış olmaması ve sürekli değişen içeriği nedeniyle de üretim ve laboratuvar çalışmaları için bir standardizasyon oluşturmak çok zordur. Buna bağlı olarak da çalışma sonuçları sürekli olarak değişebilir ve elde edilen verilerin doğru olmama ihtimali yüksektir. Bu nedenle, hücre kültürü ile yapılan *in vitro* hastalık modellerinde veya sitotoksikite testlerinde aynı şekilde yanıltıcı sonuçlar elde edilebilmektedir.

➤ Serum, farklı miktarlarda endotoksinler, hemoglobin ve diğer istenmeyen bileşenleri içerebilir.

➤ Serum elde edildiği kaynağa bağlı olarak fungi, bakteri, mikoplazma, virüsler veya prionlar gibi kontaminantları içerebilir. Gelişen teknikler ile bu kontaminantlar büyük oranda engellense de özellikle virüsler, prionlar ve mikoplazmalar için risk tamamen elimine edilememektedir. Bu durum büyük endişelere neden olmaktadır. Özellikle FBS içerisinde, bir prionun neden olduğu, bu nedenle de fark edilmesi çok zor olan ve günümüzde de hala daha tedavisi bulunmayan “Deli Dana Hastalığı” etkeninin taşınma olasılığı yüzünden bu serumun kullanıldığı çalışma ve üretimlerde olası bulaş nedeni ile büyük risk oluşturmaktadır. Ayrıca insan serumu kullanılması durumunda da HIV ve Hepatit B virüslerinin bu serum içerisinde bulunabilmesi söz konusudur.

➤ Serumun içerdiği kontaminantları elimine etmek, serumun bunları içermediğini kanıtlamanın dışında büyüme faktörü, hormon, vitamin gibi istenen bileşenlerinde uygun oranda serum içerisinde var olduğunu göstermek için çok sayıda analiz gerektirmektedir.

➤ Özellikle primer kültürlerde serum ile zenginleştirilmiş bir ortam, asıl istenilen spesifik hücre tipleri yerine fibroblast gibi hızlı büyüyen hücrelerin aşırı büyümesini sağlayabilir.

➤ Serumun raf ömrü kısadır. Uzun süreli bekletilmiş serumların yapısındaki büyümeyi teşvik edici bileşenler bozulur. Böyle serumlar kültür verimi açısından istenilen başarıyı sağlayamaz.

➤ Normalde hücre kültürü temelli bir üretim sırasında ortamdaki protein miktarı zamanla yükselmektedir. Bu üretim ortamında ayrıca serumun kullanılması ise ortamdaki protein konsantrasyonunu daha da yükseleceğinden, bu durum ürünün saflaştırılmasında büyük bir engel oluşturmaktadır. Ayrıca ortamdaki serumun varlığı bu ürünün farmasötik anlamda ticarileştirilmesini, mevcut regülasyonlardan dolayı da sınırlayabilir. Bunlara ek olarak, özellikle ortamda spesifik bir monoklonal antikor üretiliyor ise burada serumun kullanılması, serumda bulunan diğer spesifik olmayan antikorlarla üretilen spesifik antikoru karışmasına neden olabilir. Böyle bir durumda son üründe istenmeyen etkiler ve safsızlık meydana getirir.

➤ Maliyet genellikle serum takviyesinin bir dezavantajı olarak belirtilir. Bunun nedeni bir kültür ortamının maliyetinin büyük kısmını serumun

oluşturmasıdır (kimyasal bileşenlerin maliyetinin 10 katından fazla). Ancak serumsuz ortamlarda, serumu taklit etmek için yüksek saflıktaki tanımlanmış rekombinant bileşenlerin ortam bileşimine eklenmesiyle bunların maliyeti serumun maliyeti kadar yüksek olabilmektedir.

➤ Serumun büyümeyi teşvik edici aktivitesinin yanı sıra büyümeyi inhibe edici özelliği de bulunmaktadır. Serum bazı hücre tipleri için olumsuz etkilere sahiptir.

➤ Serum, aslen et endüstrisinin bir yan ürünüdür. Seruma artan taleple beraber (dünya çapında her yıl yaklaşık olarak 800.000 litre FBS tüketildiği ve bunun devamlı olarak arttığı tahmin edilmektedir), bu talebi karşılamak için mevcut üretimde de artışa gidilmektedir. Ancak bu durum küresel anlamda, üretim için gerekli olan kaynakların (yem fiyatları, işçilik maliyetleri vb.) maliyetlerini arttırmanın yanında, bu endüstri büyük oranda tatlı su kaynaklarını tükettiği için de kuraklık ve sera gazlarının salınımında bir artış meydana gelmektedir.

➤ Serum, kaynağı (her yıl FBS ihtiyacını karşılamak için 2 milyondan fazla sığır fetüsünden kan alınmaktadır) ve toplanma şekli (serum eldesi için anestezi yapılmadan, fetüsün atan kalbine büyük bir iğne saplanarak kan alınmaktadır) nedeniyle hayvanın acı çekmesi veya ölümü söz konusu olduğundan etik açıdan olumsuzluklar yaratmaktadır (Brunner et al., 2010; Butler, 2015; Davis, 2011; Freshney, 2011; Karnieli et al., 2017; Subbiahanadar Chelladurai et al., 2021; Tüfek and Özkan, 2018; Van Der Valk et al., 2017).

Sayılan bu dezavantajlar da göz önüne alındığında özellikle, hayvan hücre kültürü temelli yapılan antikör veya aşı gibi terapötik ürünlerin üretimlerinde serumda gelen kontaminant materyallerin bulunmasının potansiyel sonuçları konusundaki endişeler nedeniyle, FDA ve EMA gibi düzenleyici otoritelerin çoğu bu tür ürünlerin üretimleri için, serum içeren ortamların kullanılmasını büyük ölçüde kısıtlamıştır. Bu nedenle hücre kültürü temelli olarak üretilen bu tür terapötik ürünlerin, yönetmelikler nedeniyle, üretim için kullanılacak olan hücrelerin serumsuz besin ortamlarında kültürlenmeleri gerekmektedir (Brunner et al., 2010; Butler, 2015; European Medicines Agency, 2013; Gstraunthaler et al., 2008; van der Valk et al., 2010).

2.5.2.2. Serumsuz ortamlar

Serumdan kaynaklanan dezavantajların ve güvenlik endişelerinin giderilmesi adına serumsuz ortamların kullanımları bir gereklilik haline gelmektedir. Ayrıca otorite kuruluşlar tarafından belirlenen bu regülasyonlar sayesinde de özellikle son yıllarda serumsuz ortam çalışmaları hız kazanmış ve bu doğrultuda birçok serumsuz ortam formülasyonu geliştirilmiştir. Bu formülasyonlar geliştirilirken, özellikle serumun eksikliğinden kaynaklan kültür performansındaki düşüşlerini minimize etmek için serum içerisinde bulunan bileşenlerin etkileri çalışılmış, bunların ayrı ayrı yüksek saflıkta üretimlerine ve serumun dezavantajlarına sahip olmayan, serum yerine geçebilecek bileşenlerin bulunmasına odaklanılmıştır. Bu doğrultuda, geliştirilen serumsuz ortamlarda, serum içerisinde bulunan bileşenlerin (albümin, transferrin vb.) yüksek saflıkta serumsuz ortamlara eklenerek serumsuz ortamların performansı iyileştirilmeye çalışılmıştır (Gstraunthaler et al., 2008; Sinacore et al., 2000; Subbiahanadar Chelladurai et al., 2021). Bu anlamda da serumsuz ortam geliştirilmesi sırasında serum içeriğini taklit edecek şekilde yüksek saflıkta çeşitli bileşenler eklenmektedir. Bunlar; proteinler, hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler, peptonlar, poliaminler, proteaz inhibitörleri, adezyon faktörleri, lipid türevleri, iz elementler şeklinde sıralanabilmektedir. Ayrıca bunların dışında serumdan farklı bileşenlerin de kullanımları denenmiştir. Serumsuz ortamların zenginleştirilmesi için bu ilaveler ve denemeler yapılırken de üretimi yapılacak olan ürün ya da kültürlenecek olan hücre temel alınmıştır. Günümüzde ise bu tür serum içermeyen, kimyasal olarak tanımlı, hücre veya ürüne spesifik besin ortamları ticari şirketler tarafından geliştirilmektedir (Davis, 2011; Freshney, 2011; Gstraunthaler et al., 2008; Karnieli et al., 2017; Van Der Valk et al., 2017).

Serumsuz besin ortamı tasarımında özellikle serumun yokluğunda hücrelerin bu durumdan olumsuz şekilde etkilenmesini en az seviyede tutmak adına normalde besin ortamları içerisinde yer alan temel bileşenlerinde konsantrasyonlarında değişiklikler yapılmaktadır. Bunların başında ortama eklenen amino asit konsantrasyonlarının artırılması gelmektedir. Bunlar arasında esansiyel bir amino asit olan L-glutamin özellikle önemlidir. Ayrıca, L-Glutamin, hayvan hücrelerindeki hücresel metabolizma sürecinde ikincil bir enerji kaynağı olarak da kullanılır. Bunun dışında, özellikle glikozu verimsiz kullanan bazı hücreler için L-Glutamin, şeker bazlı diğer enerji kaynaklarının yanında besin ortamında ana enerji

kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Freshney, 2011; Yang and Xiong, 2012). Diğer amino asitlerde olduğu gibi L-Glutamin, bazal besin ortamında çok farklı konsantrasyonlarda kullanılsa da genellikle besin ortamı formülasyonlarında 2-4 mM konsantrasyon aralığında olacak şekilde kullanılır. Aynı zamanda serumsuz besin ortamı formülasyonlarında çok daha yüksek konsantrasyonlarda (6-10 mM aralığında) eklenebilmektedir (Butler, 2004; Cruzat et al., 2018; Price, 2017; Sartorius, 2020). Buna benzer şekilde temel bileşenler arasında yer alan vitaminler özellikle serumdan gelen vitaminlerin yokluğundan bu eksikliğin giderilmesi açısından, daha yüksek konsantrasyonlarda ve tüm vitamin çeşitleri içerecek şekilde serumsuz ortamlar formülasyonlarına eklenmektedir (Price, 2017; Schnellbaecher et al., 2019; Verhoeckx et al., 2015). Bunlarla beraber özellikle de serumsuz ortamın kullanıldığı çalışmalarda ve üretimlerde hem hücre büyümesini olumsuz etkileyebildiği hem de hedeflenen ürün ile çapraz reaksiyon verebildiği için sadece gentamisin gibi belirli birkaç tür güvenli antibiyotiğin kullanımına izin verilerek ya bunların ortam içerisindeki konsantrasyonları azaltılmış ya da tamamen ortam içeriğinden çıkarılmıştır (Hassan and Ahmad, 2020; Jedrzejczak-Silicka, 2017; Price, 2017; van der Valk et al., 2010).

Bahsedildiği üzere serumsuz ortamların geliştirilmesi ve hücrelerin başarılı bir şekilde besin ortamında serum olmadan kültürlenebilmesi için temel bileşenlerin konsantrasyonlarında yapılan değişiklikler veya serum içerisindeki bileşenlerin rekombinant olarak yüksek saflıktaki muadili olan bileşenlerin eklemenin yanına diğer birçok destekleyici bileşen ve bunların kombinasyonu da denenmektedir. Seruma bir alternatif olarak denenmiş ve bu konuda oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiş bu bileşenlerden birkaçı:

- **İnsan Platelet (trombosit) Lizatı (*Human platelet lysates*, hPL):** Seruma en iyi alternatiflerden biri olarak görülen hPL, protein açısından zengin bir içeriğe sahip olmasa da çok sayıda büyüme faktörü ve sitokin içermektedir. hPL, sağlıklı insanlardan alınan kanın santrifüj edildikten sonra plateletçe zengin olan jel kısmın alınıp mekanik veya kimyasal olarak parçalanmasıyla elde edilir. Bu maddenin kökeni insan olduğu için, seruma göre immün reaksiyon riski çok daha düşüktür. Yapılan çalışmalarda da bunların üretimlerde kullanılması haline hiçbir yan etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir. Ayrıca etik açıdan da seruma göre daha ılımlı bakılmaktadır. Bu nedenle günümüzde birçok ticari firma kültür ortamı destekleyici

bileşen olarak hPL'yi satışa sunmaktadır. Ancak hPL'de seruma benzer olarak sürekli tam tanımlı olmaması ve değişken içeriğe sahip olması nedeniyle standardizasyon problemleri gibi dezavantajlara sahiptir (Brunner et al., 2010; Gstraunthaler et al., 2008; Karnieli et al., 2017; Tekkatte et al., 2011; Van Der Valk et al., 2017).

- **ITS (İnsülin, Transferin, Selenyum):** ITS adından da anlaşılacağı üzere insülin, transferrin ve selenyumun bir karışımı şeklinde besin ortamlarına eklenmektedir. ITS içerisinde bulunan insülin ve transferrin ise insan kökenli olup bu bileşenler rekombinant DNA teknikleriyle yüksek saflıkta üretilmektedir. ITS'in kullanımı serumsuz ortamlarda büyük bir başarı sağladığı gösterildiğinden ve içerisinde tanımlanmamış hiçbir bileşen bulunmadığından dolayı da güvenli olduğu için sıklıkla tercih edilmekte ve birçok firma tarafından ticari olarak satılmaktadır (Brunner et al., 2010; Gstraunthaler et al., 2008; Van Der Valk et al., 2017).

- **Kullanılmış Besin Ortamı:** Özellikle serumsuz ortam geliştirilmesinde sürdürülebilirlik kavramı etrafında gerçekleştirilen geri dönüşüm düşüncesi için kullanılmış besin ortamları ile ilgili birçok deneme yapılmıştır. Hücrelerin kültürlendikten sonra ortama proteinler ve ekstraselüler matriks bileşenleri, büyüme faktörleri ve bazı hormonları salgıladıkları bilinmektedir. Bu nedenle kullanılmış besin ortamlarının hem kolajen, fibronektin ve proteoglikanlar gibi hücre yüzey bağımlı hücrelerin üremesini kolaylaştıran ekstraselüler matris bileşenlerini hem de çeşitli büyüme faktörlerini içermektedir. Bu nedenle bu ortamların besin ortamlarına eklenmesi hücre proliferasyonunu olumlu yönde etkiler. Bununla birlikte kullanılmış besin ortamlarının zenginleştirici bileşen olarak kullanılması kontaminasyon riskini arttırmaktadır (Freshney, 2011; Freshney et al., 2007; Pawitan, 2014).

Bunlarla birlikte serumsuz ortamlarda hücre büyümesini ve canlılığını desteklemek için serum içeriğindeki benzer bileşenlerin dışında kullanılan daha farklı bileşenler bulunmaktadır. Bunlar yapılan çalışmalar sonucunda pozitif etkisi görülmüş olan diğer bileşenler olarak tanımlanmaktadır.

- **Yüzey gerilimini değiştiren katkı maddeleri:** Bu katkı maddeleri serumsuz ortamlarda genellikle hücreleri korumak veya lipid yapılı nutrientlerin ortamda çözünmesi için kullanılırlar. Genellikle hücre kültürlerinde kullanılan

yüzey gerilimini değiştiren katkı maddeleri; **karboksimetil selüloz, polivinil piroolidon, Pluronik F68 ve Tween 80**'dir. En çok kullanılanı ise Pluronik F-68'dir. Biyoreaktörler gibi karıştırmanın olduğu dinamik kültür sistemlerindeki hücreler ortamdaki karıştırma nedeniyle kayma gerilmesine maruz kalır. Ortamda serumun varlığı hücreleri bu etkiden korur. Ancak serumsuz ortamda böyle bir etki yoktur. Bu nedenle serumsuz ortamlarda serumun gösterdiği etkiye benzer bir etki gösteren Pluronik F-68, biyoreaktörler içerisinde üretilen hücreleri hem kayma gerilmesinden korumak hem de ortamdaki köpük oluşumunu gidermek için kullanılmaktadır (Freshney, 2011; Hu et al., 2008; Yao and Asayama, 2017).

- **İndirgeyici maddeler:** Hücre kültürlerindeki metabolik aktivite sonucunda oksijen kullanımına bağlı olarak reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Bunların birikimi sonucunda da kültür içerisindeki hücreler zarar görmektedir. Bu açıdan indirgeyici bileşenler besin ortamına salınan reaktif oksijen türlerini tutarak kültürlenen hücrelerin zarar görmesini önler. Bunun için en çok kullanılanlar; **2-merkaptoetanol, a-tiyogliserol ve indirgenmiş glutatyon**'dur. Bunlar arasında da özellikle 2-mercaptoethanol ve indirgenmiş glutatyon serumsuz ortam formülasyonlarında kullanılmaktadır (Grodzki et al., 2013; Harris et al., 1976; Yao and Asayama, 2017).

Bu açıdan yapılan çalışmalarda ve biyofarmasötik üretimlerde geliştirilen serumsuz besin ortamlarını kullanılmanın avantajları;

- Serumsuz ortamlar tam tanımlıdır. Bu nedenle daha kolay tekrarlanabilirlik ve standardizasyon sağlanmaktadır (özellikle de serumsuz ortam çeşitlerinden biri olan kimyasal olarak tanımlanmış ortam en yüksek tekrarlanabilirliğe ve en kolay standardizasyona sahiptir).
- Hücresel fonksiyon ve üretim çalışmalarında daha doğru çalışma sonuçları elde edilmektedir.
- Kültürün gerçekleştirildiği kültürün fizyolojik parametreleri daha kolay kontrol edilmektedir.
- Hücre spesifik geliştirildikleri için ilgili hücre tipinde daha yüksek proliferasyon veya ürün üretimi sağlanmaktadır.
- Kontaminasyon riski serumlu ortama göre daha düşüktür.

- Hücresel fonksiyonlar tam olarak analiz edilmektedir.
- İçerik bakımından daha stabil yapılıdır.
- Hücresel cevabın kontrolü daha kolay ve tahmin edilebilmektedir

(Brunner et al., 2010; Davis, 2011; Freshney, 2011; Gstraunthaler et al., 2008; Marigliani et al., 2019; Price, 2017; Usmani et al., 2021; Yang and Xiong, 2012; Yao and Asayama, 2017).

Bunlarla beraber her ne kadar çok farklı bileşenlerin eklenmesiyle çeşitli zenginleştirmelerle formülize edilen serumsuz besin ortamlarının bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar;

- Serumsuz ortamlar genellikle hücre veya ürün spesifik olarak geliştirildikleri için tek bir ortamda sadece belirli tipte hücreler kültürlenebilmektedir. Bu nedenle çok fazla ortam formülasyonu geliştirilmesi gerekmektedir.

- Benzer şekilde her hücrenin ihtiyacı farklı olduğu için özellikle üretim için, hücrenin gelişme ve üreme aşamasında hücre ihtiyaçları farklı olurken, hücre ürün üretmek için daha farklı bileşenlere ihtiyaç duyabilmektedir. Bu nedenle tek bir hücre tipi için tek bir ortam formülasyonu yeterli değildir.

- Serum içerisini taklit etmek için serumsuz ortamlara eklenen bileşenler yüksek saflıkta olmalıdır ve bu durum ortam maliyetlerini arttırmaktadır.

- Serumsuz ortamlarda, serumun ortamda sağladığı koruyucu (detoksifikasyon, antioksidan, kayma gerilmesinden koruma gibi) özellikleri ortadan kalkacağı için formülasyonlarda ve çalışmalarda bunlar için ek bileşenler eklenmesi veya önlemler alınması gerekmektedir.

- Serumsuz ortamlarda büyüme genellikle serumlu ortamlara göre daha yavaş olmaktadır.

- Özellikle bazı hücre ürününe yönelik geliştirilen serumsuz besin ortamları, serumla desteklenen bazal ortamlara göre çok pahalı olabilmektedir (Butler, 2015; Davis, 2011; Freshney, 2011; Gstraunthaler et al., 2008; Marigliani et al., 2019; Subbiahanadar Chelladurai et al., 2021; van der Valk et al., 2010; Yang and Xiong, 2012).

Tüm bunlar göz önüne alındığında serumsuz ortamların bazı dezavantajları olmasına rağmen serumlu ortamların sahip olduğu dezavantajlar düşünüldüğünde özellikle serumlu ortamlarla yapılacak olan üretimlerdeki artan risk ve maliyet sebebiyle serumsuz besin ortamlarının kullanımı daha baskın gelmektedir. Bunlara ek olarak otorite kuruluşların da serumsuz ortamlarda üretimi teşvik etmesi ve bu şekilde üretilen hücre kültürü ürünlerindeki regülasyonların daha kolay bir şekilde sağlanacağını belirtilmesi bu anlamda serumsuz ortam kullanımı için bir itici güç oluşturmaktadır (Butler, 2015; Gstraunthaler et al., 2008; van der Valk et al., 2010; Yang and Xiong, 2012).

2.6. Hayvan Hücrelerinin Serumsuz Ortama ve Süspanse Çoğalmaya Adapte Edilmesi

Hücreler genellikle serum ile zenginleştirilmiş ortamlarda yüksek proliferasyon göstermektedir. Ayrıca serum, eklendiği ortamlarda sadece ortam içeriği zenginleştirmeyip hücreleri olumsuz mekanik, kimyasal veya biyolojik etmenlerden de korumaktadır. Bu nedenle hücreler serum içeren ortamlarda yüksek konsantrasyonlara kısa sürelerde ulaşılırken canlılıkları da korunmaktadır. Ancak yukarıda bahsedildiği üzere özellikle de endüstriyel ölçekte bir üretim planlandığında sahip olduğu dezavantajlar nedeniyle hücrelerin serum içermeyen ortamlarda kültürlenmeleri önerilmektedir (Hess et al., 2012; O’Flaherty et al., 2020; Sartorius, 2020; Tripathi and Shrivastava, 2019). Bu anlamda özellikle son yıllarda ototrite kuruluşlar tarafından yayınlanan yönetmeliklerde serumsuz ortam kullanımı artık bir öneriden çok giderek bir gereklilik haline getirilmektedir. Bunun için de ekspresyonel platformlar olarak hayvan hücre kültürlerinin kullanılacağı biyofarmasötik üretimlerin öncesinde üst-akım işlemleri kapsamında hücrelerin serum içermeyen ortamlara adapte edilmesi gerekmektedir (Caron et al., 2018; European Medicines Agency, 2013; van der Valk et al., 2010; Yang and Xiong, 2012). Bunlarla beraber endüstriyel açıdan sıklıkla tercih edilen hücre hatlarının aynı zamanda süspanse üreme özelliğine sahip olması istenmektedir. Bunun nedeni süspanse kültürlerin sağladığı avantajlar ve özellikler iş yükü ve maliyet açısından adherent kültürlerle göre daha kolay ölçeklendirilebilir olmalarıdır. Bu anlamda da adherent kültürler süspanse üremeye adapte edilebilmektedir. Bu süreç ise genellikle serumsuz ortama adaptasyon ile paralel olarak gerçekleştirilmektedir

(Caron et al., 2018; Sinacore et al., 2000). Bunun nedeni serumsuz ortama adaptasyon sırasında serum içeriğinin ortadan kaldırılmasıyla serumun içeriğinde bulunan adezyon faktörleri ve Ca veya Mg iyonları gibi tutunmayı teşvike eden bileşenler de ortadan kalkacağından hücrelerin yüzeye olan etkileşimlerinin kendiliğinden azalmasıdır. Bu açıdan da özellikle süspanse kültürlenmeye adapte edilmek istenen adherent kültürlerin adaptasyon sürecinde ön aşama olarak ya serum içeriği tamamen ortadan kaldırılmakta ya da mümkün olduğunca azaltılmaktadır. Ayrıca kullanılan besin ortamının kendisinde bulunan Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarını içeren tuzların da konsantrasyonlarının azaltılması da diğer bir yaklaşımdır (Caron et al., 2018; Merten et al., 2014; Price, 2017; Subbiahanadar Chelladurai et al., 2021). Ayrıca literatürde insan *siat7e* geni ile transfekte edilen hücrelerin süspanse koşullarda üreyecek şekilde karakter değişikliğinin gerçekleştirilebildiği görülmektedir (Chu et al., 2009). Bunlarla beraber adherent kültürlerin süspanse üreme koşullarındaki en temel yaklaşım tutunmanın gerçekleştiği hücre-yüzey etkileşimini ortadan kaldırmaktır. Bu açıdan da normalde adherent hücrelerin tutunması için uygun yüzeye sahip kültür kapları yerine hücrelerin tutunmasına elverişli olmayan kültür kapları kullanılabilmektedir. Böylece herhangi bir yüzeye tutunamayan hücre yaşamak için süspanse üreme şeklini benimseyebilmektedir. Ayrıca bu yaklaşımla beraber dinamik kültür sistemlerinin kullanımı da bu süreçte yer almaktadır. Özellikle de üretim amacıyla kullanılacak olan süspanseye adapte hücreler için nihai hedef biyoreaktör gibi büyük ölçekli üretim sistemleri olduğundan adaptasyon sürecinde dinamik kültür sistemlerinin kullanılması daha başarılı sonuçlar verebilmektedir. Çünkü burada hücreler sürekli bir karıştırmanın etkisinde oldukları için yüzey ile bağlanmaları için yeterli olan sürece etkileşimde kalamamaktadır. Bu nedenle de özellikle yüksek adezyon özelliği gösteren adherent kültürlerin dinamik kültürlerdeki adaptasyon süreciyle beraber bunlar süspanse olarak çoğalmaya daha kısa sürede adapte olabilmektedir (Caron et al., 2018; Kiesslich et al., 2021; Merten, 2015; Merten et al., 2014; Moreira et al., 2020; Sinacore et al., 2000). Günümüzde başta CHO olmak üzere birçok hücre hattı o hücrenin kültürlenme ihtiyaçlarına göre formülasyonu geliştirilen spesifik serumsuz besin ortamında ve dinamik kültür sistemleri yardımıyla hem serumsuz ortama hem de süspanse olarak kültürlenmeye adapte edilebilmektedir. Gerçekleştirilen tüm bu genel adaptasyon süreci, serumsuz veya süspanse ya da her ikisine birden adapte edilmek istenen hücre

popülasyonundan, serumla desteklenmiş besin ortamında ve eğer hücre adherent ise de bu haliyle sahip olduğu dayanım ve üreme özelliği gösterebilecek olan azınlık hücre veya hücrelerin istemli seçilimine dayanan uzun bir süreçtir (Caron et al., 2018; van der Valk et al., 2010). Ayrıca bu uzun adaptasyon süreleri boyunca adapte edilen hücrelerin ikilenme süresi ve ilgilenilen ürün olan bileşeni eksprese etmesi gibi spesifik özelliklerinin de kaybolmamasını sağlamak oldukça önemlidir (Freshney, 2011). Ancak hücrelerin serumsuz ortama, süspanse üreme koşullarına veya bunların her ikisine birden aynı anda adapte edilmesi her zaman mümkün olmamaktadır. Bu durumda her bir adaptasyon süreci de ayrı ayrı ele alınmalıdır. Ayrıca günümüzde geliştirilen tüm hücre hatları serumsuz ortama, süspanse üremeye veya bunların her ikisine birden adapte edilebilir şeklinde bir genelleme yapılamamaktadır. Bu nedenle de ekspresyonel platform olarak kullanılması planlanan hücrenin seçiminde bu durum da göz önüne alınmalıdır (Caron et al., 2018; Lee et al., 2020; Vlecken et al., 2013).

Hücrelerin serumsuz ortama veya süpanseye adaptasyonu ise hücre karakterinin stabil hale gelmesi adına seri alt kültürleme işlemi üzerinden yapılmaktadır. Gerçekleştirilmek istenen tüm bu adaptasyon için ve özellikle de serumsuz ortam adaptasyona için için farklı yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerin hangisinin başarılı olacağı ise büyük ölçüde adapte edilecek hücreye bağlıdır. Gerçekleştirilecek tüm adaptasyon çalışmalarında adaptasyon başarısını arttırmak için;

- Oluşturulan çalışma stoklarındaki hücrelerin, logaritmik üreme fazının ortalarında olduğu zaman adaptasyona başlamak,
- Kültür ortamındaki yüzdesel hücre canlılığının % 90' ın üzerinde olduğunda adaptasyona başlamak,
- Serumsuz ortama ilk hücre inokülasyonu sırasında normal pasaj konsantrasyonundan yüksek hücre konsantrasyonlarında başlamak,
- Ortamdaki serum miktarı azaltıldıkça, hücrelerin adapte edilmeye çalışıldığı ortama uygun temel ya da destekleyici bileşenleri (örneğin serum içeriği azaldıkça ortama L-glutamin eklemek) veya bunların bir karışımını (ITS gibi) eklemek,
- Aynı şekilde bazı ortam bileşenlerinin miktarlarını azaltmak veya bazılarını çıkarmak (genellikle, serumsuz ortamlarda antibiyotiklerin kullanımları hiç istenmez veya çok düşük konsantrasyonlarda kullanılır), tüm bu bileşen ekleme ve

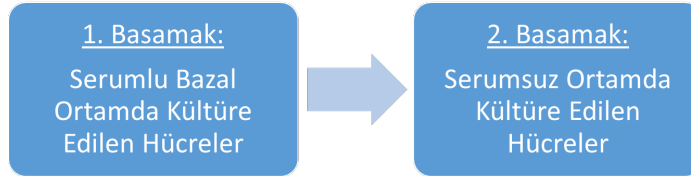
çıkarmasını yaparken de bunların hücre için uygun olan güvenli konsantrasyonlarını iyi belirlemek,

- Adaptasyonlar sırasında hücreler yüksek konsantrasyon ve canlılığa ulaştığı zaman pasajlama gibi işlemleri yapmak, gerekmektedir (Freshney, 2011; Sinacore et al., 2000; van der Valk et al., 2010; Yang and Xiong, 2012; Yao and Asayama, 2017).

2.6.1. Serumsuz ortama adaptasyon yöntemleri

2.6.1.1. Doğrudan (direkt) adaptasyon yöntemi

Bu adaptasyon yöntemi, en kolay ve kısa süren adaptasyon yöntemi olmasına rağmen adaptasyon başarısı en düşük yöntemdir. Çünkü hücreler ani değişen koşullar nedeniyle yüksek oranda strese girmektedirler. Bu yöntemde hücreler ilk başta kültürlendikleri serum içeren bazal ortamdan alınarak doğrudan istenilen ve içerisine serum eklenmemiş ortama inoküle edilir (Şekil 2.2). Sonrasında ise gerekli aralıklarda yine bu serumsuz ortam ile pasajlama yapılarak hücrelerin bu serumsuz ortama adapte olması beklenir (Sinacore et al., 2000; van der Valk et al., 2010).

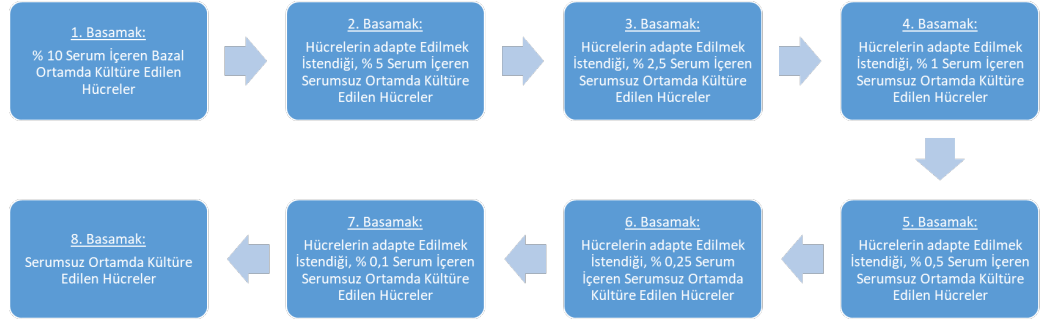


Şekil 2.2. Serumsuz ortama doğrudan adaptasyon yöntemi (Davis, 2011; van der Valk et al., 2010; Thermo-Fisher®, 2019)

2.6.1.2. Serum içeriği azaltma ile yapılan kademeli adaptasyon yöntemi

Bu yöntemde hücreler en başta serum içeren uygun bazal besin ortamı içerisinde kültürlenir. Sonrasında, hücrelerin adapte edilmek istendiği serumsuz ortama, ilk baştaki bazal ortamdan daha az olacak şekilde belirli bir oranda serum eklenir ve sonrasında bu ortamdaki serum içeriği zamanla (genellikle bir sonraki basamağa geçilirken serum içeriği yarıya düşürülür) azaltılır. Genellikle, bazal ortamlardaki serum içeriği % 10 olduğu için bir sonraki basamakta hücrelerin inoküle edileceği serumsuz ortama % 5 serum eklenmektedir. Daha sonra adapte

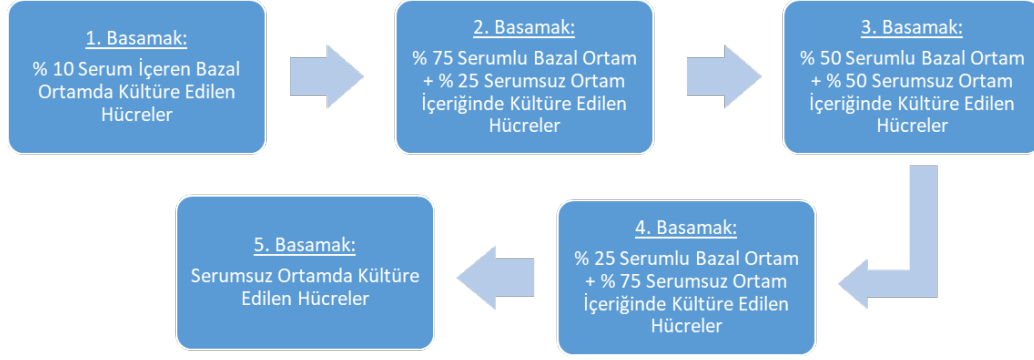
edilmek istenen serumsuz ortamdaki serum içeriği her basamakta düşürülecektir. Bu kademeli azaltma sonucunda ortamdaki serum miktarı % 0,1'in altına düştüğü zaman, hücreler bir sonraki basamakta tamamen serumsuz ortama (% 0 serum) inoküle edilir ve adaptasyon süreci tamamlanmış olur (Şekil 2.3). Ancak hücrelerin bir anda strese girme ihtimali nedeniyle yarı yarıya olan bu serum azaltma oranı değiştirilebilmektedir (Sinacore et al., 2000; van der Valk et al., 2010; Thermo-Fisher®,2019).



Şekil 2.3. Serum içeriği azaltma ile yapılan kademeli adaptasyon yöntemi (Davis, 2011; van der Valk et al., 2010; Thermo-Fisher®,2019)

2.6.1.3. Sekansiyel adaptasyon yöntemi

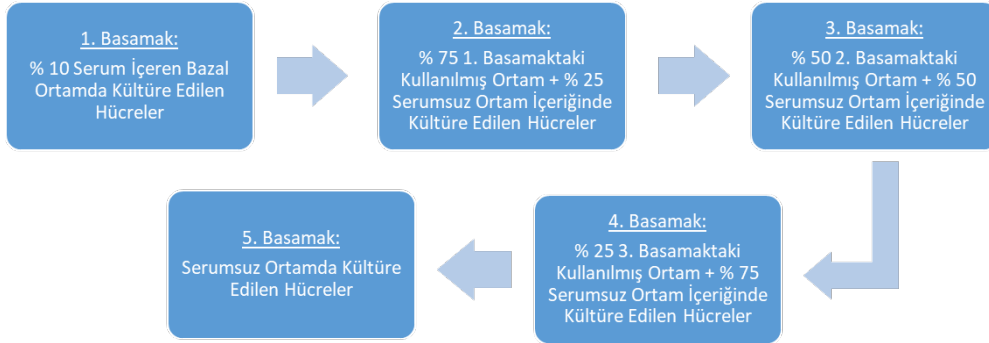
Serum içeriği azaltma yöntemine benzer olarak, hücreler her bir adaptasyon basamağında serumlu ortam ile serumsuz ortamın belirli orandaki bir karışımına inoküle edilir. Adaptasyon basamağı ilerledikçe serum içeren ortamın yüzdesi azaltılırken, serumsuz ortamın yüzdesi artırılır. Bu adaptasyon sürecinde, besin ortamındaki toplam serumlu ortamın yüzdesi sürekli olarak %25 azaltılırken serumsuz ortamın %25 artırılır. Bu sürecin ilk basamağına ise genellikle %75 serumlu ortam, %25 serumsuz ortam ile başlanır. Tamamen serumsuz ortama geçmeden önceki basamakta ise hücreler bu oranın tam tersi olan besin ortamına inoküle edilir ve bir sonraki basamakta hücreler sadece serumsuz ortama inoküle edilerek adaptasyon süreci tamamlanmış olur (Şekil 2.4). Ancak bazı durumlarda hücrelerin fazla strese girmesi nedeniyle başarı sağlanmaması durumunda toplam besin ortamındaki serumlu ortam yüzdesi % 10'luk olarak azaltılırken, aynı şekilde serumsuz ortam yüzdesi % 10'luk şekilde artırılır(Sinacore et al., 2000; van der Valk et al., 2010).



Şekil 2.4 Sekansiyel adaptasyon yöntemi ile serumsuz ortama adaptasyon (Davis, 2011; van der Valk et al., 2010; Thermo-Fisher®, 2019)

2.6.1.4. Kullanılmış besin ortamı ile adaptasyon yöntemi

Bu adaptasyon yöntemi sekansiyel adaptasyon yöntemi ile aynı prensibe dayanmaktadır. Buradaki tek fark bu adaptasyon sürecinde sürekli olarak serum içeren taze besin ortamı yerine, bir önceki basamakta kullanılmış olan besin ortamı ile serumsuz besin ortamının sekansiyel adaptasyonda olduğu gibi aynı yüzdelerde karıştırılarak hücrelerin bu ortama inoküle edilmesidir (Şekil 2.5). Bu yöntemde sürekli olarak bir önceki basamakta kullanılan besin ortamı, yeni ortam içerisine eklendiği için çalışmalar sırasında kontaminasyon riskini nedeniyle çok dikkatli çalışılmalıdır (Sinacore et al., 2000; van der Valk et al., 2010).



Şekil 2.5. Kullanılmış besin ortamı ile adaptasyon ile serumsuz ortama adaptasyon (Davis, 2011; van der Valk et al., 2010; Thermo-Fisher®, 2019)

2.6.1.5. Kültür içinde adaptasyon yöntemi

Bu adaptasyon yöntemi monolayer kültürler için kullanılır ve direkt adaptasyon yöntemine benzerlik gösterir. Bu yöntemde monolayer üreme özelliği gösteren hücreler, öncelikle serumlu ortamda tüm kültür kabı yüzeyini kaplayana kadar çoğaltılır. Ardından hücreler kültür kabı yüzeyinden kaldırılmadan, kültür

kabı içerisindeki besin ortamı atılarak yerine serumsuz besin ortamı ilave edilir. Hücreler bu şekilde bir süre daha kültürlenir ve sonrasında kalan hücrelerin yüksek hücre konsantrasyonlarda yeni kültür kaplarına serumsuz ortam ile pasajlanmasıyla adaptasyon süreci tamamlanmış olur (Şekil 2.6). Yeni kültür kaplarına, serumsuz ortam ile pasajlanan bu hücreler serumsuz ortama adapte edilmiş hücrelerdir (Sinacore et al., 2000; van der Valk et al., 2010).



Şekil 2.6. Kültür içinde adaptasyon ile serumsuz ortama adaptasyon (van der Valk et al., 2010)

Bahsedilen bu yöntemler ile birçok hücre hattı serumsuz ortama adapte edilebilse de tüm hücreler bu şekilde serumsuz ortamlara tam olarak adapte edilememektedir. Ayrıca adaptasyon çalışmaları, yukarıda da bahsedildiği üzere, seçilen yönteme de bağlı olarak çok uzun ve dikkatli çalışılması gereken bir süreçtir ve çalışılan ilgili hücrenin tam serumsuz ortama adaptasyonu her zaman sağlanamayabilir. Bu durum ise hem zaman hem de ekonomik kayba neden olmaktadır. Bunun önüne geçmek için bu çalışmaların başında ilgili hücre hattına spesifik olarak geliştirilmiş veya o hücre hattının kullanılan besin ortamında başarıyla kültürlenebileceğinin gösterildiği besin ortamlarının kullanılması gerekmektedir (Subbiahanadar Chelladurai et al., 2021; Usmani et al., 2021). Bunun nedeni bu ortamların sadece belirli hücre tiplerine spesifik olarak geliştirildiği için sadece o hücre (veya hücrelerin) başarılı bir şekilde kültürlenebilmesini sağlayacak tüm temel ve destekleyici bileşenleri içermesidir. Bu şekilde uzun ve riskli bir süreç olan adaptasyon süreci uygun serumsuz besin ortamlarının kullanımıyla kolaylaştırılabilmektedir. Tüm bunlarla birlikte son zamanlarda popüler hale gelen bir başka yaklaşım ise doğrudan serumsuz

ortamlarda kültürlenebilecek hücre hatlarının geliştirilmesidir. Bunun için çeşitli ileri moleküler teknikler (gen mühendisliği teknikleri gibi) uygulanarak serumsuz ortamda kültürlenebilecek farklı hücre tipleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (Brunner et al., 2010; Kim and Lee, 2009; van der Valk et al., 2010; Van Der Valk et al., 2017).

2.6.2. Süspanse üreme koşullarına adaptasyon

Endüstriyel biyofarmasötik üretiminde ve özellikle de aşı üretiminde biyoreaktörler içerisinde büyük ölçekte mikrotasıyıcılar kullanılarak veya sabit yataklı biyoreaktörler kullanılarak adherent hücreler ile üretimler gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte adherent hücreler kullanılarak hollow fiber gibi sistemlerle de yüksek konsantrasyonlarda terapötik protein üretimlerinin gerçekleştirildiği çalışmalar bulunmaktadır (Gallo–Ramírez et al., 2015; Gobin et al., 2021; Merten, 2015). Ancak özellikle endüstriyel açıdan bahsedildiği avantajları sebebiyle hücrelerin süspanse karakterde üremesi istenmektedir. Bunun için de adherent hücreler süspanse üreme karakterine adapte edilmektedir. Bu adaptasyon sırasında yukarı da anlatıldığı şekliyle genellikle hücrelerin kültür ortamındaki serum içeriği düşürülmekte veya tamamen serumsuz ortamlarda kültürlenmesi için yapılan çalışmalara paralel bir yol izlenmektedir. Bu yaklaşımla birlikte adherent hücreler kültürlendikleri statik koşullardan tutunmanın gerçekleşebileceği bir yüzeyin olmadığı kültür kaplarına veya dinamik kültür sistemlerine aktarılmaktadır. Bu şekilde de hücreler süspanse üreme koşullarına adapte edilebilmektedir (Caron et al., 2018; Dumont et al., 2016; Merten et al., 2014; Sartorius, 2020; Sinacore et al., 2000). Bu adaptasyon gerçekleşikten sonra ise diğer önemli bir parametre hücrelerin kültür ortamı içerisinde “tek hücre” olarak bulunmalarının istenmesidir. Bunun nedeni özellikle adherent karakterden süspanse karaktere adapte edilen hücrelerin yüksek oranda agregat oluşturma eğilimleridir. Oluşan bu agregatlar ise özellikle üretimde istenmemektedir. Bunun nedeni agregat oluşumu sebebiyle agregatların merkezinde bulunan hücrelerin besin ve oksijen ulaşamadığı ölü bir alanın oluşmasıdır. Aynı zamanda özellikle terapötik protein üretimini gerçekleştirildiği üretimlerde oluşan değerli ürün de bu ölü alana hapsolacağı için verim kayıpları yaşanmaktadır. Bu durum viral aşı üretimleri için de geçerlidir. Çünkü oluşan agregatlar sebebiyle ilgili virüs-hücre etkileşimi daha

az gerçekleşeceğinden dolayı birim zamanda üretilen virüs titresinde düşüş meydana gelmektedir (Genzel et al., 2014b; Merten et al., 2014; Usmani et al., 2021). Bu açıdan da özellikle adherent kültürler süspanse üremeye adapte edilirken kullanılan bileşenler veya karıştırma hızları hücrelerin tek hücre olarak kültürlenebildiği koşulları sağlamaya yönelik olarak belirlenmektedir. Hücrelerin agregat oluşumunu engellemek adına agregat önleyici kimyasallar kullanılabilirken, karıştırma hızının artırılmasıyla da bu agregatlar önlenilmektedir. Bununla birlikte özellikle bu kimyasalların besin ortamındaki konsantrasyonu ve karıştırma hızları hücrelerin etkilenmeyeceği güvenli aralıkta olmalıdır. Özellikle dinamik sistemlerdeki karıştırmanın etkisiyle oluşan kayma gerilmesi ve bunun bir sonucu olarak meydana gelen eddy burgaçlarının kültür ortamındaki hücrelere zarar vermeyecek boyutta tutulması gerekmektedir. Bu nedenle agregat oluşumunu engellemek için karıştırma hızı artırılırken bu artış kontrollü bir şekilde yapılmalıdır (Berry et al., 2016; Karimi Alavijeh et al., 2022; Merten, 2015; Rathore et al., 2016; Usmani et al., 2021; Yang et al., 2019).

2.7 Hücre Kültürü Temelli Viral Aşılar ve İnfluenza Aşıları

Aşılar insanlığın hastalıklara karşı elde ettiği başarıların en önemlileri arasında yerini almıştır. Özellikle çiçek hastalığıyla birlikte gelişen “aşı” kavramı daha sonrasında tarihsel süreçte ortaya çıkan hastalıklar ve bu hastalıklar sonucu meydana gelen büyük çaplı salgınlar sonucunda daha da ilgi çekici bir hale gelmiştir. Bu ilgi sonucunda ise tarihte birçok hastalığa karşı farklı bilimsel yöntemler temel alınarak çeşitli aşılar geliştirilmiştir (Esparza et al., 2020; Ghattas et al., 2021; Plotkin and Plotkin, 2017). Geliştirilen bu aşıların klinik uygulamaya geçilmesi sonucunda aşılarla olan bu ilgi halk sağlığı kavramının da oluşması ile beraber sadece bilimsel bir uğraş olmakla kalmamış ve bir gereklilik haline gelmiştir. Bu açıdan aşıların hastalıkların ve salgınların oluşmasını engellemedeki klinik çalışmalara ait veriler değerlendirildiğinde aşılama kavramının da önemi ortaya çıkmaktadır (Gallo–Ramírez et al., 2015; Li et al., 2021). Böylelikle toplumda yer alan tüm bireylerinin sosyal, ekonomik ve kültürel yaşantılarının sağlıklı bir şekilde devamlılığının sağlanması adına aşıların hayati öneme sahip olduğu uzun yıllardır birçok çalışma tarafından gösterilmektedir (Aubrit et al., 2015; Ghattas et al., 2021; Jordan and Sandig, 2014; Plotkin and Plotkin, 2017;

Rodrigues et al., 2015). Tüm dünyayı etkisi altına alan Covid-19 pandemisi ve öncesinde meydana gelen epidemiler ile birlikte de aşırıya olan bu ilgi ve ihtiyaç giderek artmıştır. Bu anlamda da Covid-19 pandemisi bir kez daha tüm insanlığa aşının ve aşılanmanın önemini hatırlatmıştır (Al-Jighefee et al., 2021; Alagheband Bahrami et al., 2022; Kiesslich and Kamen, 2020).

2.7.1 Hücre kültürü temelli viral aşılar

Aşı kavramı kısaca; hastalıkların önlenmesi adına uygulandığı canlıda immün sistemi uyarak ilgili patojen ile karşılaşıldığında güçlendirilmiş bir yanıtın tetiklenmesini sağlayan biyolojik ürün olarak tanımlanabilmektedir (Demirden et al., 2022; Ghattas et al., 2021; Verma et al., 2020). Günümüzde hastalık etkeni olarak tanımlaması yapılmış birçok patojene karşı çeşitli aşılar geliştirilmiştir. Bu anlamda da hem bakteriyel hem de viral patojenlere karşı geliştirilen bu aşılardan ise üretim yöntemleri oldukça farklılık göstermektedir. Özellikle bakteriyel patojenlere karşı geliştirilen aşılar, doğrudan hastalık etkeninin kendisi veya hastalıkla ilişkili olan bakteriyel toksinin üretimi yapılabilirken viral patojenler için bu durum daha komplekstir (Al-Jighefee et al., 2021; Fang et al., 2022; Josefsberg and Buckland, 2012; Stacey and Hawkins, 2016). Bunun nedeni viral patojenlerin hücre içi paraziter doğaları gereği, kendi kendilerine çoğalacak mekanizmalara sahip olmadıklarından bunların kendilerini replike edebilecekleri uygun bir canlı konağa ihtiyaç duymasındır (Aubrit et al., 2015; Farzaneh et al., 2017; Ghattas et al., 2021; Horowitz et al., 2004; Rodrigues et al., 2015). Bu anlamda tarihsel süreçte ilk önce ilgili viral etkenin çoğaltılması için sığır gibi canlı hayvanların kendisi veya tavuk yumurtası gibi canlı materyaller kullanılsa da zamanla bu uygulamanın sakıncaları ortaya konmuştur (Esparza et al., 2020; Stacey and Hawkins, 2016; Verma et al., 2020). Böylelikle bütün bir organizma yapısından uzaklaşarak sadece hücre düzeyinde çalışmaların gerçekleştirilebildiği hücre kültürü tekniğinin aşı gibi biyolojik ürünlerin üretiminde kullanımının için bir itici güç oluşmuştur (Aubrit et al., 2015; Genzel, 2015; Rodrigues et al., 2015; Zahoor et al., 2016). Özellikle genetik, moleküler biyoloji ve hücre kültürü tekniğinin entegre bir şekilde ilerlemesine bağlı olarak geliştirilen “hücre hatları” bu anlamda öne çıkmaktadır. Uzun yıllardan beri birçok aşı çeşidi yumurta temelli olarak aşı üretilse de özellikle ilk kez büyük ölçekte polio aşısı üretiminde hücre hatları kullanılarak yapılan üretimden sonra endüstrinin ilgisi işletim kolaylığı nedeniyle hücre kültürü alanına

yönelmiştir. Bundan sonra da hem araştırmacıların hem de üreticilerin ortak çabalarıyla birlikte biyofarmasötik sanayisindeki aşı üretimleri için hayvan hücre kültürleri kullanılmaya başlanmıştır. Hücre kültürü temelli aşı üretimlerinde basitçe enfektif virüsün yüksek titrasyonda çoğaltılmasına odaklanılmaktadır. Tüm virüs üretimine odaklanan biyoproseslerde öncelikle virüs ile enfekte olacak hücrenin maksimum konsantrasyonda üretilmesiyle başlamaktadır. Ardından üretilen hücrelerin virüs ile enfekte edilmesi ve elde edilen virüslerin aşı çeşidine göre işlem görerek formüle edilmesi şeklinde bir işlem sıralamasıyla hücre kültürü temelli aşılar üretilmektedir. Bununla beraber subunit aşılar gibi özellikle tüm virüs yerine herhangi bir viral antijen veya antijenlerin sentezlenmesine odaklanılan aşı çeşitlerinde ise terapötik protein üretimi ve tüm virüs aşılarında olduğu gibi yine bunu sentezleyecek olan hücrenin en fazla şekilde üretilmesine odaklanılmaktadır (Aubrit et al., 2015; Genzel, 2015; Horowitz et al., 2004; Rodrigues et al., 2015; Zahoor et al., 2016).

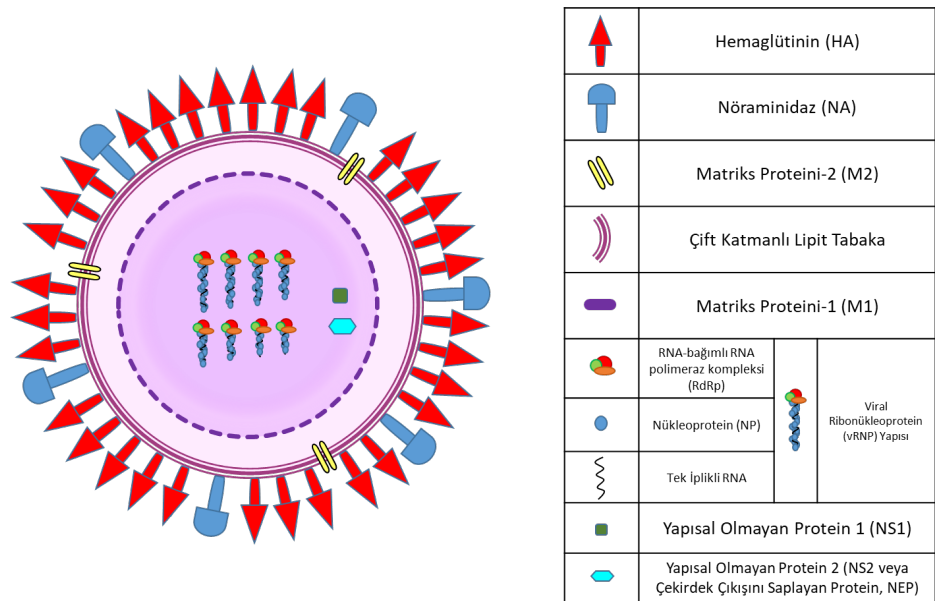
Günümüzde üretimi yapılan oldukça farklı aşı çeşitleri bulunmaktadır. Bunların birçoğu ise hücre kültürü temelli olarak üretilmektedir. Bunlardan en bilineni ise uzun yıllardır güvenle kullanılan inaktif aşılardır (Fang et al., 2022; Li et al., 2021). İnaktif aşıların dışında atenüe ve recombinant subunit aşılar da uzun yıllardır güvenle toplum sağlığının korunmasında tercih edilmişlerdir. Bunlar geleneksel aşı platformları olarak kabul görmektedir. Bununla birlikte Covid-19 pandemisiyle beraber viral vektör, nükleik asit (DNA ve mRNA aşıları), virüs benzeri parçacık aşıları gibi farklı tipteki aşılar da günümüzde klinik kullanımda yer almıştır (Al-Jighefee et al., 2021; Alagheband Bahrami et al., 2022). Ancak bu aşıların yeni nesil olması ve pandemi sebebiyle acil kullanım onayı alarak onaylandıkları için de uzun vadedeki etkilerinin yeterli klinik veri ile ortaya konamaması bunların güvenlikleriyle ilgili endişelerin oluşmasına neden olmuştur. Bu anlamda da geleneksel olarak kabul edilen aşılar hala daha güvenlikleri uzun yıllardır kanıtlandığı için dünyada en çok tercih edilen aşı platformları olarak karşımıza çıkmaktadır (Acevedo-Whitehouse and Bruno, 2023; Al-Jighefee et al., 2021; Li et al., 2021).

2.7.2 İnfluenza virüsü ve influenza aşıları

İnfluenza (veya daha yaygın kullanımıyla grip); burun, boğaz ve bazen akciğerleri etkileyen bulaşıcı bir solunum yolu hastalığıdır. Grip hastalığı çok eski tarihlerden itibaren insanlarda ve hayvanlarda birçok pandemi ve epidemiye yol açmıştır (Barberis et al., 2016; Moghadami, 2017). Grip hastalığı ise genel olarak pandemik ve epidemik (veya mevsimsel) şeklinde ikiye ayrılmaktadır. Mevsimsel grip her yıl birçok insanı etkilemektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne ait verilere (WHO) göre mevsimsel grip salgınları sebebiyle her yıl dünya çapında tahmini olarak 3 - 5 milyon kişi hastaneye kaldırılmakta ve 290.000 - 650.000 kişi de sadece grip nedeniyle hayatını kaybetmektedir (Du et al., 2019; Kim et al., 2018; Krammer, 2019; Plotkin et al., 2017; W. Sun et al., 2020; Vemula et al., 2016). Dünya üzerindeki hiçbir bulaşıcı hastalık, grip hastalığı kadar kapsamlı bir şekilde küresel nüfusun sağlığını ve ekonomisini yıllık salgınlar bazında düzenli olacak şekilde olumsuz etkileyememektedir. Tüm bunlarla birlikte insan dışında hayvanlarda meydana gelen grip vakaları nedeniyle de özellikle kanatlı kümes hayvanları ve domuzlar itlaf edilmektedir. Bunların büyük miktarlarda itlafı da ekonomik anlamda ve gıda ulaşılabilirliği anlamında sorun yaratması sebebiyle de influenza virüslerinin oluşturduğu zarar oldukça büyüktür (Harrington et al., 2021; Moghadami, 2017; Mostafa et al., 2018; Paules and Subbarao, 2017; Plotkin et al., 2017). Pandemi grip ise mevsimsel gripten farklı olarak birden ortaya çıkan farklı tip ve özellikteki grip virüsleri nedeniyle meydana gelmektedir. Bunun nedeni bu virüslerle daha önce karşılaşmadığı için toplumda bunlara karşı hiçbir bağışıklığın olmamasıdır. Bu şekilde de tüm toplum aniden etkilenmektedir. Mevsimsel grip ise bu tür yeni meydana gelen pandemilerin ardından buna neden olan hastalık etkeninin çok az değişikliğe uğrayarak devam eden yıllarda kendini göstermesi şeklinde meydana gelir. Bu süreçte mevsimsel grip etkeni de değişikliğe uğrar fakat bu değişim pandemilerdeki gibi büyük çaplı değildir. Bu nedenle de toplumda bu etkene karşı bağışıklık yüksek olduğundan pandemilerdeki gibi bir etki söz konusu değildir (Harrington et al., 2021; Hayden and Palese, 2016; Mostafa et al., 2018; Paules and Subbarao, 2017). Tüm bunlarla birlikte dünyayı etkisi altına almış olan Covid-19 pandemisinin başlangıcında tüm bilim camiasındaki uzmanlar coronavirüslerden kaynaklanan bir hastalık için dünyanın daha hazırlıksız olduğunu, çünkü bu tür bir pandeminin tarihsel süreçte olduğu gibi yine değişime

uğramış bir influenza etkeni nedeniyle meydana geleceğini beklediklerini belirtmişlerdir (Du et al., 2019; Karlsson et al., 2021; Olsen et al., 2021).

İnfluenza ya da grip hastalığı, influenza virüsleri nedeniyle meydana gelen bir hastalıktır. Birçok farklı konağı enfekte edebilen influenza virüsleri viral bir zarfa sahip, parçalı (veya segmentli) tek iplikli RNA virüsleridir (Şekil 2.7). *Orthomyxoviridae* virüs sınıfına dahil edilmiş olan influenzanın ise 4 farklı tipi bulunmaktadır. Bunlardan ise en çok A tipi ve devamında B tipi insanda hastalık oluşturmaktadır. Virüslerin hücreyi enfekte etmesi ise virüsün hücre üzerindeki galaktoz zincilerine bağlı sialik asitlerin (insan influenza virüsleri $\alpha 2,3\text{Gal}$ motifine spesifik olup kuş influenza virüsleri de $\alpha 2,6\text{Gal}$ motifine spesifiktir) reseptör görevi görerek virüslerin buraya bağlanmasıyla gerçekleşmektedir (Demirden et al., 2022; Javanian et al., 2021). İnfluenza A virüsü dünya genelindeki mevsimsel grip vakalarının birçoğundan sorumludur. İnfluenza B virüsleri ise mevsimsel grip vakalarının (yıllara göre değişmekle beraber) % 15-30' undan sorumlu olduğu klinik araştırmalarla gösterilmektedir (Mostafa et al., 2018; Nyirenda et al., 2016). Bununla birlikte influenza B virüsleri daha stabil yapıda oldukları için ve bunun aksine influenza A virüsleri de oldukça değişken bir yapıya sahip olduklarından geçmişten günümüze kadar meydana gelmiş tüm grip pandemilerinden sadece influenza A virüsleri sorumludur (Khanna et al., 2013; Kim et al., 2018; Mostafa et al., 2018; Rioux et al., 2020).



Şekil 2.7. İnfluenza A virüsü yapısı (Demirden et al., 2022)

İnfluenza virüsleri çok hızlı bir şekilde sürekli olarak değişen virüslerdir. Bu değişim onların antijenik özelliklerini de etkilemektedir ve devamlı olarak gerçekleşen antijenik değişimle birlikte virüs, daha önce enfekte ettiği organizmayı tekrar enfekte ettiğinde organizmanın bağışıklık sistemi tarafından tanınmadığı veya çok az tanındığı için enfeksiyonu büyük oranda engelleyecek etkili bir ikincil bağışık yanıt meydana gelememektedir. Bu durum ise sürekli olarak yeni mevsimsel grip vakalarının (veya epidemilerin) ve daha ileri düzeydeki değişimlerle de yeni grip pandemilerinin meydana gelmesine neden olmaktadır (Harrington et al., 2021; Khanna et al., 2013; Salomon and Webster, 2009; van der Sandt et al., 2012). İnfluenza virüslerinin antijenik yapılarının değişmesini sağlayan iki mekanizma bulunmaktadır. Bunlar antijenik drift (antijenik sürüklenme) ve antijenik shift (antijenik değişim) mekanizmalarıdır. Antijenik drift daha çok virüsün devamlı evrimini sağlayan mekanizmadır. Bu mekanizmada oluşan nokta mutasyonları, tüm influenza genomunda kodlanan amino asitlerde ve özellikle de HA ve NA antijenik yüzey glikoproteinlerinde (Şekil 2.7) değişikliklere yol açmaktadır. Antijenik drift ile meydana gelen değişim her yeni virüs jenerasyonunda artarak devam eder ve çok sık bir şekilde meydana gelmektedir (Francis et al., 2019; Harrington et al., 2021; Hayden and Palese, 2016; Khanna et al., 2013; Krammer, 2019; Paules and Subbarao, 2017; van der Sandt et al., 2012). Antijenik shift olarak adlandırılan ve influenza virüsünün segmentli genomunun diğer bir influezan virüsüyle değişimiyle gerçekleşen bu süreçte ise değişim tek bir seferde çok hızlı olarak gerçekleşmektedir. Bu şekilde de normalde insanları enfekte etmeyen veya insandan insana geçişi olmayan bazı hayvan kaynaklı influenza virüslerinin insanları enfekte edebilir hala gelmesi mümkün olabilmektedir. Bunun gerçekleşmesi sonucunda da yeni virüs alttipleri oluşabilmekte ve büyük küresel pandemiler meydana gelebilmektedir. Genel olarak tarihte meydana gelen tüm pandemilerden de influenza virüslerinin sahip olduğu bu antijenik shift mekanizması sorumludur (Cox et al., 2004; Francis et al., 2019; Hayden and Palese, 2016; Herold et al., 2015; Kosik and Yewdell, 2019; Paules and Subbarao, 2017; Wei et al., 2020). Dünyadaki birçok grip vakası ve tek başına pandemilerden sorumlu olan influenza A virüsü ise daha detaylı olarak virüsün yüzeyinde bulunan hemaglütinin (HA) ve nöraminidaz (NA) yüzey glikoproteinlerinin antijenik karakterizasyonu ile alt gruplara ayrılır. Şu ana kadar 18 HA ve 11 NA alttiپی tanımlanmıştır. Ancak Dünya Sağlık Örgütü (*World Health*

Organisation, WHO) insan influenza virüsleri olarak H1N1, H2N2 ve H3N2' yi tanımlamaktadır. Bunlarda H2N2 artık dolaşımda değildir ve 1968' den beri görülmemiştir. Günümüzdeki güncel verilere göre sadece H1N1 (2009 grip pandemisini oluşturan virüse benzer) ve H3N2 virüsleri şu anda grip virüsü dolaşımında yer almaktadır. Bu sebeple de özellikle bu virüs türlerine yönelik olarak antiviral ilaçlar ve aşı geliştirme çalışmaları sürdürülmektedir (Francis et al., 2019; Khanna et al., 2013; Rioux et al., 2020).

Günümüzde çeşitli tiplerde influenza aşıları üretilmektedir. Ancak bunların birçoğu yumurta temelli olarak gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte hem hayvan hücre kültürü hem de yine hücre kültürü temelli olarak rekombinant subunit influenza aşılarının da ticari olarak üretimi yapılmaktadır (Demirden et al., 2022). Tüm bunlarla birlikte artan dünya popülasyonu ile birlikte endüstriyel talebi karşılamak ve sürekli olarak değişen influenza virüslerine karşı hem mevsimsel hem de olası bir pandemi senaryosunda yüksek miktarda aşı üretilmesi gerekmektedir (Fang et al., 2022; Langer, 2022). Bunun için daha hızlı ve kontrol edilebilirliği yüksek üretim sistemlerinde influenza aşılarının üretilmesi gerekmektedir. Bu nedenle de hücre kültürü sistemleri diğer viral aşılarda üretiminde olduğu gibi en elverişli ekspresyonel platformdur. Bu açıdan da istenilen aşı üretim teknolojisi kullanılarak farklı tiplerdeki koruyuculuğu yüksek aşılarda en kısa zamanda ve en fazla miktarda üretecek olan ekspresyonel platformlar olan hücre hatları öne çıkmaktadır. Bu anlamda da endüstriyel üretim açısından uygun ve üretilen aşı tipine bağlı olarak da aşı materyali olarak kullanılacak bileşeni en kısa zamanda, en doğru şekilde, yüksek miktarlarda üretecek olan hücre hattını belirlemek veya geliştirmek için çalışmalar yapılmaktadır (Chen et al., 2020; Gallo–Ramírez et al., 2015; Jagschies and Lacki, 2018; Kodati and Darbha, 2016; Kumar et al., 2018; Merten et al., 2014; Nachbagauer and Palese, 2020; Vlecken et al., 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü ve Ege Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji ve Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hücre hatları ve virüs

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda atasal çin hamsterı yumurtalık hücre hattı (CHO-K1), Madin-Darby köpek böbrek hücre hattı (MDCK), insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK-293) ve insan monositik hücre hattı (THP-1) kullanılmıştır. Bu hücre hatları, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nde bulunan Hayvan Hücre Mühendisliği ve Biyoproses Laboratuvarı hücre kültürü ana stoğundan alınmıştır. Viral enfeksiyon çalışmalarında kullanılan virüs suşu ise Ege Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji ve Hücre Kültürü Laboratuvarı'ndaki virüs stoklarından alınmıştır.

3.1.2. Besin ortamları

Gerçekleştirilen çalışmada yukarıda bahsedilen hücrelerin kültürlenmesi için CHO-K1, MDCK ve HEK293 hücre hatlarının ana stoklarının ve çalışma stoklarının oluşturulmasında DMEM-High Glucose (DMEM-HG, Serox, SLD-526-500, Almanya) bazal besin ortamı kullanıldı. THP-1 hücre hattı için ana stok ve çalışma stoğu oluşturulmasında RPMI-1640 (Florabio, PROM147, Türkiye) bazal besin ortamı kullanıldı. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının serumsuz ortama adaptasyonunda adapte edilmek istendiği kimyasal olarak tanımlanmış serumsuz besin ortamları, kullanılan hücre hattı ile birlikte aşağıda yer almaktadır.

- CHO-K1 için IXORA (Florabio, XRA58-L1, Türkiye)
- MDCK için CAMELLIA (Florabio, CML57-L05, Türkiye)
- HEK-293 için ORCHID-P (Florabio, ORDP45-L05, Türkiye)
- THP-1 için PROM-152 (Florabio, PROM152-L1, Türkiye)

3.1.3 Çalışmada kullanılan farklı besin ortamları ve yıkama solüsyonu içerisine eklenen bileşenler

- Fetal Sığır Serum (FBS) (Serox, SF101H, Almanya)
- L-Glutamin (25 g/L) (Florabio, GLN70-L01, Türkiye)
- Penisilin/Streptomisin, (100X) (Gibco, 15140-122, ABD)
- Gentamisin-Sülfat (50 mg/ml) (Biological Industries, 03-035-1C, İsrail)
- Amfoterisin-B (250 µg/ml) (PAA Cell Culture Company, P11-001, Almanya)
- Tripsin-EDTA (% 0,25) solüsyonu (Multicell, 325-043-CL, Kanada)
- Rekombinant Tripsin-EDTA Solüsyonu (Sartorius, 03-079-1B, İsrail)
- HEPES Solüsyonu (1M) (Sigma, H0887, ABD)

3.1.4 Gerçekleştirilen hücre kültürü işlemleri ve analizlerde kullanılan kimyasallar

- Tripsin - EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) (% 0,25) solüsyonu (Multicell, 325-043-CL, Kanada)
- Dulbecco PBS (DPBS) (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) (1X) Kalsiyum, Magnezyum ve fenol kırmızısı içermeyen (Capricorn Scientific, PBS-1A, Almanya)
- MTT (3-4,5-dimetiltiyazolil-2,5difeniltetrazolyum bromür) (Sigma, M5655, ABD)
- Hücre kültürü işlemlerinde kullanılan DMSO (Dimetil sülfoksit, Sigma, D2650, ABD)
- Yapılan analizlerde kullanılan DMSO (Dimetil sülfoksit, Merck, 1.02952.2511, Almanya)
- Tripan Mavisi % 0,5 solüsyon (Biological Industries, 03-102-1B, İsrail)
- Sodyum Klorür (NaCl) (Merck, 1.064.04, Almanya)
- Potasyum Klorür (KCl) (Merck, 1.049.36, Almanya)
- Sodyum Fosfat Dibazik (Na₂HPO₄) (Merck, 1.065.86, Almanya)
- Potasyum Fosfat Monobazik (KH₂PO₄) (Merck, 1.048.73, Almanya)
- Hücre kültürü uyumlu toksik olmayan silikon (Merck, 1.07921, Almanya)
- Silikon Çözücü Solüsyon (Novus, PC-10, ABD)

- Pluronic F68 (AppliChem, A1288, Almanya)
- Kristal Violet Solüsyonu % 0,5' lik (AppliChem, A0577, Almanya)
- İnfluenza A virüsüne spesifik floresan işaretli antikor, Flu A DFA (Direct fluorescent antibody) Reagent (Merck, 5017, Almanya)
- Kapatma Solüsyonu, Mounting solution (Merck, 5013, Almanya)
- Teksoll® (Etil Alkol) (Tekkim, TK.200650, Türkiye)
- EZ1&2 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, 955134, Hollanda)
- Bio-Speedy® Solunum Yolu ID-2 RT-qPCR Kit (Bioeksen, BS-RIDK-2, Türkiye)
- L-Glutamin ve Amonyak Belirleme Kiti (Megazyme, K-GLNAM, İrlanda)
- L-Laktik Asit Belirleme Kiti (Megazyme, K-LATE, İrlanda)
- D-Glukoz-HK Belirleme Kiti (Megazyme, K-GLUHK-110A, İrlanda)
- BCA (Bikinkoninik Asit) Test Kiti (Thermo-Fisher, 23227, ABD)
- pH Probu Kalibrasyon Tamponları (pH: 4,01; 7,0; 9,21) (Hamilton, HA-238217; HA-238218; HA-238219, İsviçre)
- Tiyoglukolat Broth (TGB) (Condalab, 1508, İspanya)
- Triptik Soy Broth (TSB) (Merck, 1.05459.05, Almanya)

3.1.5 Gerçekleştirilen çalışmada kullanılan sarf malzemeleri

- Pleytler (24 gözlü, 48 gözlü, 96 gözlü) (SPL Life Sciences, Kore)
- Monolayer Flasklar (T-25 ve T-75) (SPL Life Sciences, Kore)
- Süspanse Flasklar (T-25, T-75 ve T-175) (Greiner, Almanya)
- Kriyotüp (SPL Life Sciences, Kore)
- Hücre Kazıyıcı (TPP, Almanya)
- Pipet Ucu (10 µL, 200 µL, 1000 µL) (tbiolife, Almanya)
- Pastör Pipeti (Isolab, Türkiye)
- Serolojik Pipetler (2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL) (Isolab, Türkiye)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf) Tüpü (2 mL) (Isolab, Türkiye)
- Santrifüj Tüpü (15mL, 50 mL) (Isolab, Türkiye)
- Luerlock Şırınga (10 mL, 20 mL) (Ayset, Türkiye)
- PES (polietersülfon) 0,22 µm por çaplı şırınga filtre (Molgen, Hollanda)
- pH Kağıdı (Merck, Almanya)

- Lam için filtre kartuşları (Tharmac, Almanya)
- Yazılabilir buzlu yüzeye sahip lam (Huida, Çin)
- Lamel (Isoterm, Çek Cumhuriyeti)
- Kontaminasyon Kontrol Tüpleri (Sarstedt, Almanya)

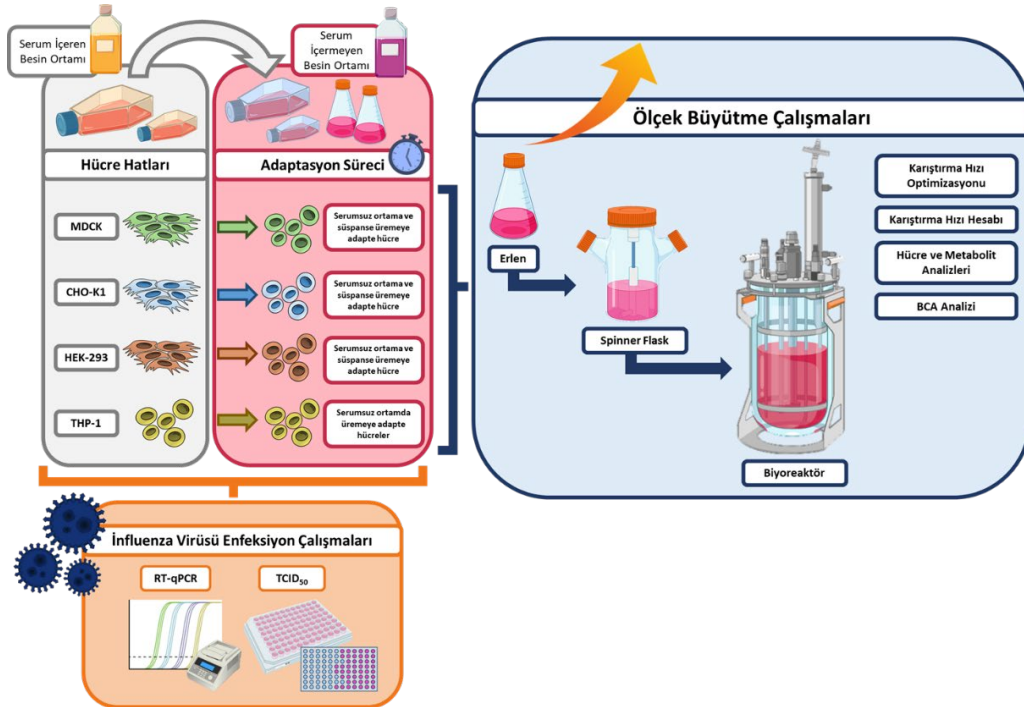
3.1.6. Kullanılan araçlar ve cihazlar

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü'nde ve Tıbbi mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarında bu tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar:

- Otomatik pipet seti (Eppendorf, Almanya)
- Otomatik pipet seti (Axygen, ABD)
- Serolojik Pipet Tabancası (Axygen, ABD)
- Hassas terazi (Sartorius, Almanya)
- Vorteks karıştırıcı (Heidolph, Almanya)
- Mikropleyt çalkalayıcı (Heidolph, Almanya)
- +4 °C Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- -20 °C derin dondurucu (Beko, Türkiye)
- -86°C derin dondurucu (Thermo Scientific, ABD)
- Sıvı azot stok tankı (60 L) (Thermo Scientific, ABD)
- Su banyosu (Mettler, Almanya)
- Virüs çalışmalarında kullanılan su banyosu (GFL, Almanya)
- Otoklav (Hirayama, Japonya)
- Laminer hava akışlı kabin (biyogüvenlik seviyesi 2) (Heraeus, Almanya)
- Virüs çalışmalarının yapıldığı laminer hava akışlı kabin (biyogüvenlik seviyesi 2) (Nuair, ABD)
- Karbondioksitli (CO₂) inkübatör (Thermo Scientific, ABD)
- CO₂' siz inkübatör (HeraCell, ABD)
- Virüs çalışmalarında kullanılan CO₂' li inkübatör (Binder, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj (Eppendorf, Almanya)
- Virüs çalışmalarında kullanılan soğutmalı santrifüj (Sigma-zentrifugen, Almanya)

- Hunili ve sabitleyicili lam-filtre aparatı 1662 (Hettich, Almanya)
- Lam-filtre aparatı 1662 için uygun santrifüj (Hettich, Almanya)
- EZ1 Advanced XL (Qiagen, Hollanda)
- Rotor-Gene Q (Qiagen, Hollanda)
- Ters faz ışık mikroskobu (Motic, Çin)
- Ters faz ışık mikroskobu, Florasan aparatlı (Zeiss, Almanya)
- Erlenmayer flask (125 ml hacimli) (Bellco, ABD)
- Orbital Çalkalayıcı (Sartorius Certomat-SII, Almanya)
- Orbital Çalkalayıcı (Biosan, Letonya)
- Spinner Flask (250 ml hacimli) (Corning, ABD)
- Çoklu Manyetik Karıştırıcı Tabla (DLAB, Çin)
- 2L çalışma hacimli biyoreaktör (Sartorius, Biostat B Plus, Almanya)
- Biyoreaktör Kontrol Paneli (Sartorius, Biostat A Plus, Almanya)
- Spektrofotometrik mikroyok okuyucu (BioTek, ABD)
- Neubauer Hemasitometresi (Isolab, Türkiye)

3.2. YÖNTEM



Şekil 3.1. Tez kapsamında yapılan tüm çalışmaların görsel olarak gösterimi

3.2.1 Çalışmada kullanılan kimyasalların hazırlanması

3.2.1.1 Kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, 1X) hazırlığı

8 g NaCl, 0,2 g KCl ve 1,44 g Na₂HPO₄ ve 0,245 g KH₂PO₄ hassas terazide tartılarak 1 L saf suyun içinde çözündürüldü. Elde edilen çözelti temiz bir cam şişede oda sıcaklığında saklandı.

3.2.1.2 MTT solüsyonunun hazırlanması

Toz formdaki MTT ışıksız bir ortamda son çözeltideki konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde PBS içerisinde çözündürüldü. Elde edilen MTT solüsyonu kabin içerisine alındı. Kabin içerisinde yine ışıksız bir ortamda 0,22 µm' lik filtreden geçirilerek steril hale getirildikten sonra steril eppendorf tüplerine paylaştırıldı. Hazırlanan tüpler -20 °C'de karanlıkta saklandı.

3.2.1.3 Pluronic F68® solüsyonunun hazırlanması

Katı pellet formundaki 10 gram Pluronic F68® 100 mL saf su içerisinde çözündürüldü. Elde edilen % 10' luk Pluronic F68® solüsyonu kabin içerisine alındı. Kabin içerisinde 0,22 µm' lik filtreden geçirilerek steril hale getirildikten sonra steril santrifüj tüplerine paylaştırıldı. Hazırlanan tüpler oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.

3.2.2 Hücre kültürlerinin oluşturulması

Çalışmalarda Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Hayvan Hücre Mühendisliği ve Biyoproses Laboratuvarı hücre kültürü ana stoklarında bulunan HEK-293, MDCK, CHO-K1 ve THP-1 hücre hatları kullanıldı.

3.2.2.1 Hücre kültürlerin oluşturulmasında kullanılan besin ortamlarının hazırlanması

Hücre kültürlerinin oluşturulmasının öncesinde uygun büyüme ortamlarını hazırlamak için bazal besin ortamları içerisine gerekli tamamlayıcı bileşenler

eklendi. Bu çalışmada kullanılan HEK-293, MDCK ve CHO-K1 hücreleri için % 10 FBS, % 1 L-glutamin, % 0,1 gentamisin ve % 0,1 penisilin/streptomisin tamamlayıcı bileşenlerini içerecek şekilde oluşturulan DMEM-HG büyüme ortamı kullanıldı. THP-1 hücrelerinin kültürlenmesinde de aynı oranda tamamlayıcı bileşenleri içeren RPMI-1640 büyüme ortamı kullanıldı. Büyütme ortamlarının hazırlanması sırasında gerekli olan miktarlardaki tamamlayıcı bileşenlerin eklenmesi sterilitenin korunması adına laminar kabin içerisinde gerçekleştirildi.

3.2.2.2 Hücrelerin çözündürülmesi

Çözdürülecek olan donmuş haldeki hücreleri içeren kriyotüp, bulunduğu sıvı azot veya -86°C' den alınarak bekletmeksizin 37°C'deki su banyosunda bir kısmı (yaklaşık % 70-75' i) buz kalacak şekilde çözündürüldü. Kriyotüp, dış yüzey dezenfeksiyonu için alkol ile iyice temizlenerek laminar hava akışlı kabine alındı. Daha sonra kriyotüp içerisine pastör pipeti yardımı ile damla damla 1-2 ml FBS eklendi. Ardından yine pastör pipeti kullanılarak kriyotüp içerisindeki hücreler homojenize edildikten sonra santrifüj tüpüne aktarıldı. Santrifüj tüpüne de 2 ml FBS eklenerek homojenizasyon işlemi tekrarlandı ve dondurma ortamı içerisinde bulunan DMSO' nun tamamen uzaklaştırılması için santrifüj tüpündeki hücreler 4 °C' de 1000 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında ise süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpün dibinde oluşan pellet yeterli miktardaki uygun özellikteki taze besin ortamı eklenerek homojenize edildi. Tüm bu işlemlerin ardından hücreler uygun kültür kabına aktarılıp hücre kültürü çalışma koşullarına sahip 37 °C' de %5 CO₂'li ve % 90 - 95 nemli atmosfer koşullarını sağlayan bir inkübatörde kültüre edildi.

3.2.2.3 Hücrelerin pasajlanması

Gerçekleştirilen çalışmada hem adherent hem de süspanse üreme özelliğine sahip hücreler kullanılmıştır. Üreme özelliği açısından farklılık göstermeleri sebebiyle iki farklı pasajlama yöntemi uygulanmıştır. Adherent büyüme özelliğine sahip hücrelerin pasajlanması için bulundukları kültür kabı yüzeyini % 80' den fazla kapladıkları gözlemlendiği zaman pasajlama işlemi yapılmıştır. Süspanse üreme

özelliğine sahip hücrelerin büyümesinin belirlenmesi için hücre sayımı yapılarak bu sayı 1×10^6 hücre/mL' yi geçtiği zaman pasajlama işlemi yapılmıştır.

- **Adherent hücrelerin pasajlanması**

Kültür kabı yüzeyinin % 80 - 90' nını kaplamış halde bulunan hücrelerin üzerindeki besin ortamı tamamen uzaklaştırıldı. Daha sonra ortamdan tripsin enziminin aktivitesini inhibe edebilecek olan FBS, kalsiyum ve magnezyumun mümkün olduğunca uzaklaştırılması için kültür kabı DPBS ile dikkatlice yıkandı. Sonrasında yıkama için eklenen DPBS de uzaklaştırılıp kültür kabına Tripsin-EDTA eklendi. Sonrasında CO₂' siz inkübatörde 4 - 7 dakika inkübe edildi. Bu süre boyunca hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadıklarının belirlenmesi adına ters faz mikroskopta hücreler incelendi. Hücrelerin yüzeyden kalktığı zaman inkübasyon sonlandırıldı.

İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin yüzeyden kalkmadığının gözlenmesi halinde ise hücreler hücre kazıyıcı ile dikkatlice kültür kabı yüzeyinden kazındı. Daha sonrasında ortama eklenen tripsin enziminin inaktive edilmesi için kültür kabına koyulan tripsin-EDTA miktarının 1-2 katı olacak şekilde hazırlanan büyütme ortamı eklenerek tüm kültür kabı içeriği santrifüj tüpüne alınarak 4 °C' de 1000 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet üzerine gerekli miktarda büyütme ortamı eklenerek her bir hücre için belirlenen pasaj oranları aralığında tekrardan kültür kaplarına alındı. HEK-293 için pasajlama oranı 1:6 ile 1:10 (ATCC, 2023a), CHO-K1 için 1:4 ile 1:8 (ATCC, 2023b) ve MDCK için 1:2 ile 1:6 (ATCC, 2023c) olarak belirlendi.

- **Süspanse hücrelerin pasajlanması**

Kültürlenen süspanse haldeki hücreler kültür kabındaki besin ortamı ile homojenize edildikten sonra santrifüj tüpünde toplanıp 4°C'de 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen hücre pelleti, uygun miktarda taze besin ortamı ile homojenize edilerek belirlenen başlangıç hücre konsantrasyonunda olacak şekilde kültür kabına alındı. Çalışmada kullanılan ve

süspanse üreme özelliği gösteren THP-1 hücre hattı için başlangıç hücre konsantrasyonu $2 - 4 \times 10^5$ hücre/ml (ATCC, 2023d) olacak şekilde belirlendi.

3.2.2.4 Hücrelerin dondurulması

Kültür kaplarında tripsinizasyon ile kaldırılan veya hazlihazırda süspanse üreme özelliği gösteren hücreler pastör pipeti yardımı bulundukları kültür ortamıyla ile iyice homojenize edilip santrifüj tüpünde toplanarak 4°C’de 1000 rpm’ de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra pellet dondurma ortamı (% 90 FBS + % 10 DMSO) ile homojenize edildi. Sonrasında ise hücreler daha önceden etiketlenmiş kriyotüplere hacimce 1 ml olarak dağıtıldı. Hazırlanan kriyotüp -86 °C’deki derin dondurucuda 1 gece bekletildikten sonra sıvı azot tankına (-196°C) alındı.

3.2.3 Hücrelerin serumsuz besin ortamına ve süspanse üreme koşullarına adaptasyon çalışmaları

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan 4 farklı hücre hattının her biri için 3.1.2’ de bahsedildiği şekilde kimyasal olarak tanımlanmış serumsuz besin ortamında kültürlenmesi ile birlikte adherent karakterde olan hücre hatları için de süspanse üreme koşullarına adaptasyon çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalar yöntem olarak birbirlerini kapsayan şekilde uygulandığı için denemeler birbirlerine paralel şekilde gerçekleştirildi. Tüm bu adaptasyon çalışmalarında her bir hücre hattı için kullanılan spesifik besin ortamları MDCK için CAMELLIA®, HEK-293 için ORCHID-P®, CHO-K1 için IXORA® ve THP-1 için PROM152® şekilde olup, hepsi % 3 L-Glutamin ve % 0,1 gentamisin tamamlayıcı bileşenlerini içerek şekilde hazırlandı.

Adaptasyon sonucunda serumsuz besin ortamlarına adapte edilen hücrelerin kültürlenmeleri ise yukarıda hücre kültürlerinin oluşturulması kısmında anlatıldığı şekilde yapıldı. Burada dondurma işleminde FBS’in, çözündürme ve pasajlama işlemlerinde de serumlu büyütme ortamlarının yerine doğrudan kültürlenmiş hücrelere özgü olarak hazırlanmış olan kimyasal olarak tanımlı serumsuz büyütme ortamları kullanıldı.

3.2.3.1. Serumsuz ortama adaptasyon

Hücrelerin serumsuz ortama adapte edilmesi için iki farklı yöntem denendi. Bu denemelerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda bunlara paralel olarak süspanse üreme koşullarına adaptasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

- **Doğrudan adaptasyon yöntemi**

Kullanılan 4 farklı hücre hattının adaptasyon çalışmalarına başlanması için bunların serum içeren uygun büyüme ortamında kültürlemeleri yapıp yeterli yoğunluğa ulaşmaları beklendi. Daha sonrasında süspanse hücrelerin pasajlanmasında anlatıldığı gibi süspanse üreme karakterine sahip THP-1' in tüm flask içeriği pipetleme ile homojenize edildikten sonra alınarak santrifüj tüpüne aktarıldı. Adherent karakterde olan diğer 3 hücre hattı ise tripsinizasyon işlemi ile kültür kabı yüzeyinden kaldırılarak pasajlama işlemlerinde olduğu gibi büyüme ortamıyla tripsin inaktive edildi. Daha sonra tüm hücreler 4°C' de 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelletler üzerine bir miktar büyüme ortamı eklenerek buradan alınan örnekten hücre sayımı yapıldı.

Yapılan sayım sonrasında tüm hücreler her bir hücre hattına spesifik adapte edilmek istenilen ve yukarda bahsedilen kimyasal olarak tanımlanmış serumsuz besin ortamına başlangıç hücre konsantrasyonu 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde inoküle edildi. İnokülasyonun ardından hücreler ilgili kültür ortamında 37°C' de % 5 CO₂' ye ayarlı inkübatörde inkübe edildi. Daha sonra ters faz mikroskopta günlük gözlemler ve hücre sayımları ile kültürün yoğunluk takibi yapıldı (Caron et al., 2018; Jang et al., 2022; Kimiz-Gebologlu et al., 2022; van der Valk et al., 2010).

- **Kültür içinde adaptasyon yöntemi**

Doğrudan adaptasyon yöntemi ile hücrelerin doğrudan serumsuz ortamlarda kültüre alınmasını içeren bu yöntemin yapılışı gereği bu adaptasyon yöntemi sadece adherent karakterdeki hücelere uygulandı. Burada adherent karakterdeki hücrelerin serum içeren büyüme ortamlarında kültürlendiği flaskları tamamen kaplamaları beklendi. Daha sonrasında tüm kültür kabı yüzeyini kaplayan

hücrelerin üstündeki serumlu büyütme ortamı dökülerek hücreler yavaşça iki kez DPBS ile yıkandı. Daha sonrasında ise büyütme ortamı ile aynı miktarda kimyasal olarak tanımlanmış serumsuz besin ortamı flaska eklenerek hücreler kültüre edildi. Inverted mikroskopta günlük gözlem yapılarak hücrelerin durumları incelendi.

Daha sonra hücrelerin canlılıklarını koruduğu görüldüğünde yukarıda anlatıldığı şekliyle kültür durumuna göre pasajlama işlemi yapıldı fakat bu aşamadan sonra hücrelerin kültürlenmesi için sadece serumsuz ortamlar kullanıldı. Sonrasında da günlük gözlemler ve gerekli durumlarda sayım ile kültür durumu takip edildi (van der Valk et al., 2010).

3.2.3.2 Süspanse üreme karakterine adaptasyon çalışmaları

Bu çalışma kapsamında kullanılan adherent karakterdeki MDCK, HEK-293 ve CHO-K1 hücrelerinin süspanse karakterde üremeye adaptasyon çalışmaları serumsuz ortama adaptasyon çalışmalarıyla paralel şekilde gerçekleştirildi. Hücre kültürlerinde serumun besin ortamlarından çıkarılmasıyla hücrelerin süspanse karakter kazanabildiği için bu denemelerde de serumsuz ortamlar kullanıldı. Bunun için farklı adaptasyon yöntemleriyle serumsuz ortama adaptasyon çalışmalarının paralelinde hücreler tripsinizasyon sonrasında sayım yapılarak doğrudan adaptasyon denemesindeki aynı hücre konsantrasyonunda olacak şekilde süspanse flasklarda inkübe edildi. Bu şekilde süspanse flasklarda kültüre alınan her 3 hücre hattının da ters faz mikroskopta yapılan günlük gözlemler ile kültür durumları incelendi. Gözlemler ile birlikte kültürlerin her 3-4 günde bir sayımları yapılarak hücrelerin süspanse üreme karakterine adaptasyon başarıları değerlendirildi.

Süspanse üreme koşullarına daha iyi adaptasyon sağlanması için bu çalışmaların bir kısmı ölçek büyütme kısmında anlatılan erlenlerde üretimler üzerinden gerçekleştirildi. Süspanse üremeye adaptasyon çalışmalarında uygun yoğunluğa gelen kültürler ise süspanse hücrelerin pasajlanması kısmında anlatıldığı şekilde kültürün hücre yoğunluğu 1×10^6 hücre/mL' yi geçtiği zaman tekrardan başlangıç hücre konsantrasyonu 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde her bir hücre hattına özgü belirtilen kimyasal tanımlı serumsuz besin ortamı kullanılarak devamlı olarak pasajlandı (Caron et al., 2018; Merten et al., 2014; Moreira et al., 2020).

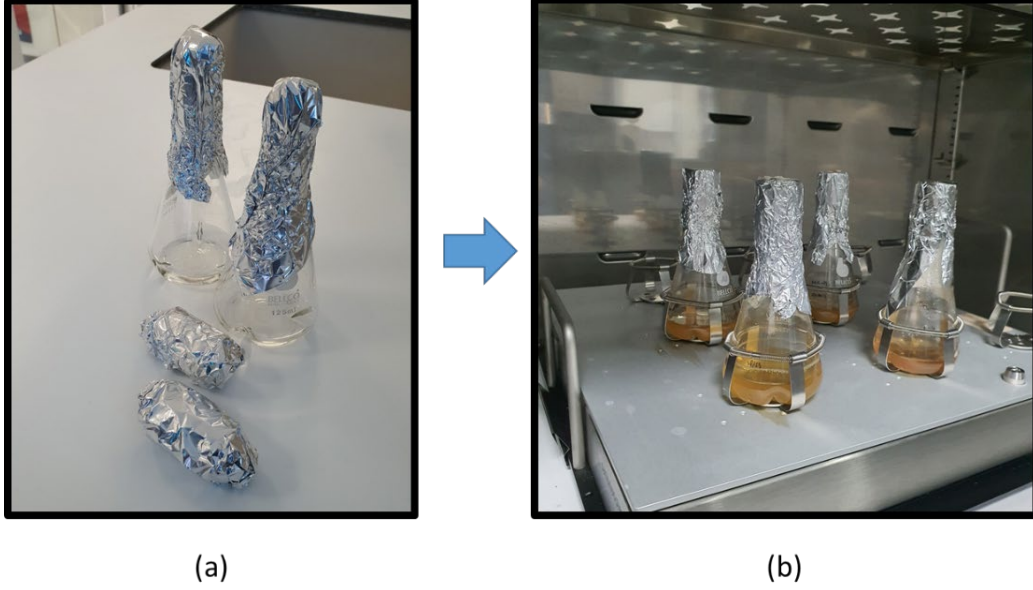
3.2.4 Ölçek büyütme çalışmaları

Gerçekleştirilen tez kapsamında kullanılan hücre hatlarının biyoproseslerde kullanım potansiyelinin ortaya konması için ölçek büyütme işlemleri gerçekleştirildi. Bunlar ise küçük ölçekten büyük ölçeğe doğru sırasıyla erlen, spinner flaskta ve biyoreaktörde üretim sıralamasıyla yapıldı. Ölçek büyütme çalışmalarının tamamındaki üretim ortamları ise her bir hücre hattı için kullanılan kimyasal olarak tanımlı serumsuz büyütme ortamlarının içerisinde % 1 HEPES ve % 0,1 Pluronic F68® eklenmesiyle hazırlandı. Bu çalışmalarda serumsuz ortamda ve orijinalinde adherent karakterde olanlarının süspanse üremeye adapte edilmiş halleri kullanıldı. Ayrıca influenza virüsü üretimi için endüstriyel ölçekte kullanılması planlanan MDCK, HEK-293 ve THP-1 hücre hatlarının ölçek büyüme çalışmalarında üretim koşullarının daha doğru simüle edilebilmesi için üretim ortamına virüs enfeksiyon çalışmalarında kullanılan aynı konsantrasyonda rekombinant tripsin-EDTA eklendi. Pasajlama işlemleri sonrasında ve büyüme kinetiklerinin başlatılmasında bu sistemler CO₂' siz inkübatörlerde kültürlendiği veya biyoreaktör sistemi için doğrudan *bench-top* olarak çalıştırıldığından dolayı tüm üretim sistemlerinin başlangıç pH değerleri 7,0 olarak ayarlandı. Sonrasında bu kültür sistemlerinin pH değişimleri günlük alınan örnek üzerinden pH kağıdı yardımıyla veya biyoreaktör sisteminin bağlı olduğu kontrol panelinden izlenerek gerekli görüldüğünde güvenli çalışma konsantrasyonunu geçmeyecek şekilde HEPES ilavesi yapıldı.

3.2.4.1 Erlenlerde üretim

Erlenlerde üretimin öncesinde adapte edilen hücrelerin cam yüzeye tutunmasını engellemek adına erlen iç yüzeyi çok ince bir tabaka halinde silikon ile kaplandı. Daha sonra erlenler saf su ile iki kez yıkandı. Erlenlerin içerisinde daha etkili bir sterilizasyon sağlamak adına bir miktar saf su eklenip erlenlerin ağızları tülbente sarılmış hidrofobik pamuk ile boşluk kalmayacak şekilde tıklandıktan sonra alüminyum folyo ile kapatıldı. Ardından erlen kapakları da dikkatlice hiçbir yüzeyi açıkta kalmayacak şekilde alüminyuma sarıldı. Sonrasında erlenler 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril hale getirildi (Şekil 3.2a). Steril erlenler kabin

içerisinde alınarak inokülasyon gerçekleştirildi ve erlenler orbital çalkalayıcı üzerinde 37°C' ye ayarlanmış CO₂' siz inkübatörde inkübe edildi (Şekil 3.2b).



Şekil 3.2. Erlenler ile beraber kapaklarının otoklav sonrasında (a) ve erlenlerin inokülasyon yapıldıktan sonra orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edilirken (b) çekilmiş görüntüleri

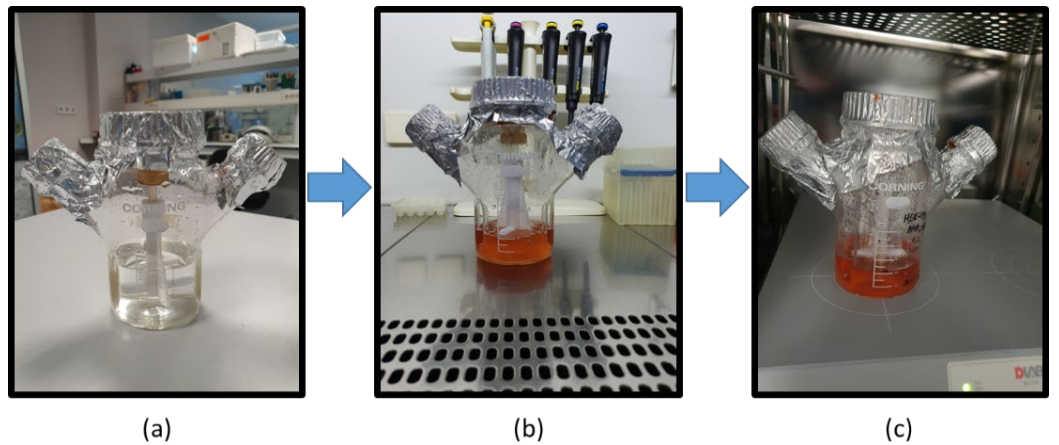
Erlen çalışmalarının başlangıcında hücrelerin statik koşullardan dinamik koşullara geçişini sağlamak adına 8-10 pasaj boyunca erlen üretimleri devam ettirildi. Bu üretimler başlangıç konsantrasyonu 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 20 mL çalışma hacminde gerçekleştirildi. Erlenlerin karıştırma hızları ise her bir hücre hattı için litratördeki benzer çalışmalara bakılarak farklı aralıklar denendi (Bissinger et al., 2019; Chaturvedi et al., 2014; Correia Ramos et al., 2022; Culture and Collection, 2006; Jang et al., 2022; Kimiz-Gebologlu et al., 2022; Sartorius, 2020; Schmitz et al., 2021; Seidel et al., 2023; Tsao et al., 2001; Wisnuwardhani et al., 2017; Wu et al., 2020).

Üretimler boyunca yapılan günlük sayımlar ile hücrelerin statik koşullarda üretimin ilk basamağı olan erlenlerde üretim başarısı değerlendirildi. Bununla birlikte sayım sonuçlarına ve sayımlar sırasında alınan örneklerdeki hücre morfolojilerine bakılarak gerekli görüldüğü halde karıştırma hızlarında değişiklikler yapıldı. Daha sonrasında erlenlerde her bir hücre hattının büyüme kinetiği çıkarıldı. Bunun için her bir hücre hattının 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 ve 5×10^5 hücre/mL başlangıç hücre konsantrasyonları denendi. Daha sonrasında belirlen başlangıç

hücre konsantrasyonunda erlende başlatılan büyüme kinetiklerinden günlük örnekler alındı ve bu örneklere sayım yapılarak sonrasında analizler gerçekleştirildi.

3.2.4.2 Spinner flasklarda üretim

Spinner flasklarda gerçekleştirilen üretimlerin öncesinde kullanılan spinnerlar iki kez saf su ile yıkandı. Daha sonrasında spinner flaskın içerisinde bir miktar su bırakılarak spinnerların karıştırıcısının olduğu üst kapağı, sağ ve sol kolunun kapakları alüminyum folyo ile açıklık kalmayacak şekilde kapatıldı. Ancak otoklava atılırken sağ veya sol kolun kapağı otoklav sırasında iç basınç kontrolünü sağlamak ve buharın tüm spinner içinde daha etkin bir sterilizasyon sağlaması için gevşek bırakıldı. Bu şekilde spinnerlar 121°C’de 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril hale getirildi (Şekil 3.3a). Otoklav işlemi bitince spinnerlar otoklavdan çıkarılmadan gevşek bırakılan kapak sıkıca kapatılarak spinnerlar otoklavdan alındı. Sonrasında spinnerlar kabin içerisine alınarak (Şekil 3.3b) erlen çalışmalarında olduğu gibi hücrelerin endüstriyel biyoreaktörlerdeki karıştırma tipine daha çok benzeyen spinner karıştırma koşullarına alışması için 7-8 pasaj boyunca üretimler yapıldı. Üretimlerde spinner flasklar 37°C’ ye ayarlanmış CO₂’ siz inkübatördeki manyetik karıştırıcı tabla üzerine yerleştirilerek inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.3c).

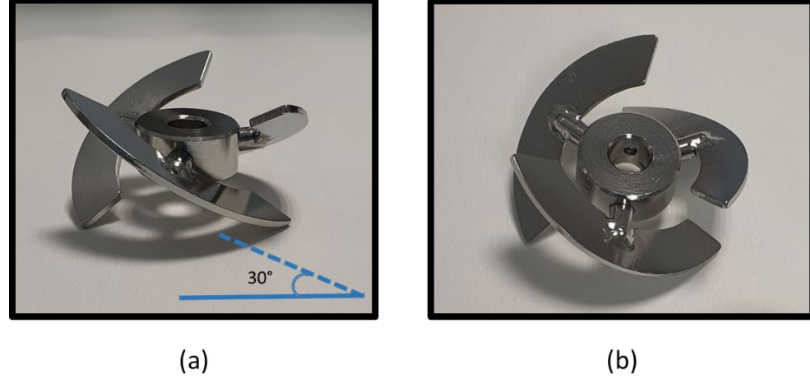


Şekil 3.3. Spinner flaskın otoklav sonrasında (a), kabin içerisinde inokülasyon yapılırken (b) ve manyetik karıştırıcı üzerinde inkübe edilirken (c) çekilmiş görüntüleri

Yapılan bu üretimler erlen çalışmalarında olduğu gibi başlangıç hücre konsantrasyonu ise 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde gerçekleştirildi. Spinner flaskların çalışma hacmi ise spinner flasktaki manyetik karıştırıcının tam olarak besin ortamının içinde kaldığı hacim olan 100 mL olarak ayarlandı. Spinner flasklarda yapılan bu üretimlerdeki karıştırma hızları da literatür çalışmalarıyla birlikte hücrelerin çökme ve kümeleşme durumlarına göre empirik olarak belirlendi. Yapılan üretimlerde hücre sayımları ve hücre morfoloji incelemeleri alınan günlük örnekler üzerinden gerçekleştirildi. Alınan bu örneklerdeki sonuçlar üzerinden karıştırma hızlarında değişiklikler yapıldı. Tüm bunlar değerlendirilerek her bir hücre hattı için karıştırma hızları THP-1 için 60 rpm, HEK-293 için 80 rpm, CHO-K1 için 90 rpm ve MDCK için 100 rpm olarak belirlendi (Anleitung, 2019; Fanelli, 2016; Harada et al., 2020; Kimiz-Gebologlu et al., 2022; Lohr et al., 2010; Negrete et al., 2008; Schmitz et al., 2021; Zainul Abidin and Anuar, 2011). Daha sonrasında erlende büyüme kinetiği için yapılan başlangıç konsantrasyonu denemelerinde her bir hücre hattı için alınan en iyi sonuçlar esas alınarak burada da aynı konsantrasyonlarda her bir hücre hattı için spinner flasklarda büyüme kinetiği çıkarıldı. Büyüme kinetiği üretim süresi boyunca da alınan günlük örnekler üzerinden hücre sayımı ve analizler gerçekleştirildi.

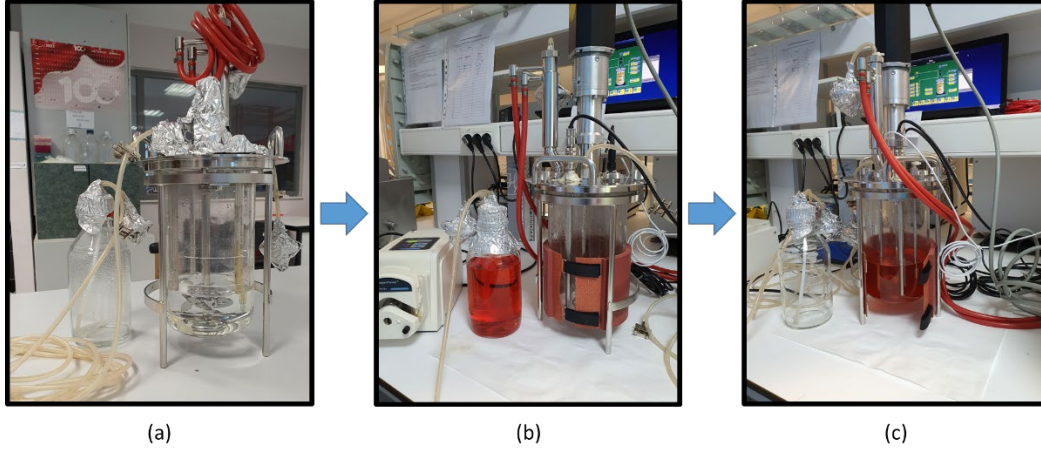
3.2.4.3 Bivoreaktörlerde üretim

Biyoreaktörde üretimin öncesinde erlen ve spinner flaskta olduğu gibi biyoreaktör de üretime hazırlandı. Bunun için pH ve çözünmüş oksijen problemleri biyoreaktör kontrol paneline bağlanarak distile su içinde polarizasyona bırakıldı. Bununla birlikte biyoreaktörün bütün parçaları tek tek % 70 alkol ile silindikten sonra 2 kez saf su ile yıkandı. Çalışma hacmi 1 litre olarak belirlenen biyoreaktörde bulunan 3 bıçaklı segmentli tip karıştırıcının yüksekliği literatürde benzer çalışmalarda yer alan reaktör geometrisi ölçülerine uygun olarak konumlandırıldı (Kaiser et al., 2017; van Eikenhorst et al., 2014; Wyrobnik et al., 2022). Ayrıca bu karıştırıcının bıçak açıları da hayvan hücre kültürlerinin üretiminde kullanılan endüstriyel biyoreaktörlerdekine uygun olarak 30°'ye ayarlandı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Biyoreaktörde kullanılan 30°'ye ayarlı 3 bıçaklı segmentli tip karıştırıcının önden (a) ve üstten (b) çekilmiş görüntüleri

Daha sonra reaktör içerisinde bir miktar saf su bırakılarak dekontaminasyon için problemleri takılmadan kör tıplar ile 121°C' de 45 dakika otoklavlandı. Otoklavlamaya verilmeden önce biyoreaktörün sparger ve örnek alma hattının olduğu borular metal kelepçeler ile iyice sıkıldı ve sistemde yer alan tüm filtrelerin ıslanmaması için hepsi alüminyum folyo ile iyice sarıldı. Sonrasında pH probu biyoreaktör kontrol panelinin bağlı olduğu bilgisayar sistemi üzerinden belirli pH değerlerinde olan kalibrasyon solüsyonları ile kalibre edildi. Otoklav sonrasında biyoreaktöre her iki prob da takılarak biyoreaktör tekrardan 121°C' de 20 dakika otoklavlandı. Otoklav sonrasında steril hale gelen biyoreaktörün prob ve rotor bağlantıları yapıldıktan sonra sterilite kontrolü için bazal bir besin ortamı örnek alma hattı üzerinden biyoreaktöre beslendi (Şekil 3.5). Besleme sonrasında oksijen probunun kalibrasyonu için sırasıyla biyoreaktöre önce saf N₂ gazı ve sonrasında hava verilerek prob kalibrasyonu tamamlandı. Daha sonra biyoreaktör bu şekilde 1 gün boyunca polarizasyona bırakıldı. Bu süre sonunda biyoreaktörün sterilitesinden ve problemlerin doğru değer aralıklarında çalıştığından emin olduktan sonra 1 litre çalışma hacminde her bir hücre hattı için erlen ve spinner flask üretimlerinde çıkartılan büyüme kinetiği için belirlenen başlangıç hücre konsantrasyonlarında inokülasyon yapılarak tüm hücre hatlarının büyüme kinetikleri çıkartıldı. Bu üretimler sırasında biyoreaktöre bağlı ısıtıcılı ceket sistemiyle reaktör iç sıcaklığı 37°C'de sabit tutuldu.



Şekil 3.5. Biyoreaktörün otoklav sonrasında (a) inokülasyon yapılırken (b) ve inokülasyon sonrası inkübasyona başlamadan önce (c) çekilmiş görüntüleri

Biyoreaktörde büyüme kinetiği çıkarılması için gerçekleştirilen üretimlerde her bir hücre hattının kültürlenmesinde gerekli olan spesifik karıştırma hızı ise spinner flask üretimlerindeki karıştırma hızları üzerinden ölçek büyütme yaklaşımıyla hesaplandı. Bunun için ölçek büyütme kriteri olarak literatürde ve endüstriyel üretimlerde oldukça başarılı bir yaklaşım olduğu için sıklıkla tercih edilen “spesifik güç girişi (P/V)” seçildi (Böhm et al., 2022; Karimi Alavijeh et al., 2022). Hesaplamalarda öncelikle spinner flask sisteminde gerçekleştirilen üretim üzerinden bir Güç Sayısı (*Power Number*, N_p) veya diğer adıyla Newton Sayısı hesaplandı. Spinner flask literatürde yer alan herhangi bir biyoreaktör sisteminin geometrisine tam uymadığı için N_p hesaplamasında ve devamındaki güç girişi hesabında aşağıdaki formüller kullanıldı (denklem 1-6) (Borys et al., 2018; Ponnuru et al., 2014; Shafa et al., 2019).

$$N_p = \frac{K_1}{N_{Re}} + K_2 \left(\frac{10^3 + 1,2(N_{Re}^{0,66})}{10^3 + 3,2(N_{Re}^{0,66})} \right)^{K_4} \quad (\text{denklem 1})$$

$$K_1 = 14 + \left(\frac{W}{D_T} \right) \left[670 \left(\frac{D_i}{D_T} - 0,6 \right)^2 + 185 \right] \quad (\text{denklem 2})$$

$$K_2 = 10^{K_3} \quad (\text{denklem 3})$$

$$K_3 = 1,3 - 4 \left(\frac{W}{D_T} - 0,5 \right)^2 - 1,14 \left(\frac{D_i}{D_T} \right) \quad (\text{denklem 4})$$

$$K_4 = 1,1 + 4 \left(\frac{W}{D_T} \right) - 2,5 \left(\frac{D_i}{D_T} - 0,5 \right)^2 - 7 \left(\frac{W}{D_T} \right)^4 \quad (\text{denklem 5})$$

$$N_{Re} = \frac{N_i \cdot Di^2}{\nu} = \frac{N_i \cdot \rho \cdot Di^2}{\mu} \quad (\text{denklem 6})$$

Sonrasında, hesaplanan N_p değeri üzerinden spinner flaskta üretim için belirlenen karıştırma hızının spesifik güç girişi ve bunun üzerinden karıştırma sırasında oluşan *Kolmogorov eddy* burgaçların boyutu aşağıdaki formüller üzerinden hesaplandı (denklem 7-9) (Ebrahimi et al., 2019; Ponnuru et al., 2014; Rotondi et al., 2021; Shafa et al., 2019).

$$\frac{P}{V} = \frac{N_p \cdot \rho \cdot Ni^3 \cdot Di^5}{V} \quad (\text{denklem 7})$$

$$\varepsilon = \frac{P}{V \cdot x \cdot \rho} \quad (\text{denklem 8})$$

$$\sigma = \left(\frac{\mu^3}{\rho^3 \cdot x \cdot \varepsilon} \right)^{1/4} \quad (\text{denklem 9})$$

Daha sonra spinner flask için hesaplanan P/V değeri üzerinden yine aynı denklem kullanılarak biyoreaktörde gerçekleştirilecek üretimlerdeki karıştırma hızı hesaplandı. Bu hesaplarda 30° lik bıçak açısında sahip olan 3 bıçaklı segmentli tip karıştırıcıya ait N_p değeri ise literatürde bu tipteki karıştırıcıya sahip benzer biyoreaktör sistemleri üzerinden yapılan çalışmalarda gösterilen çeşitli değerler incelendikten sonra her bir çalışmadaki belirlenen verilerin Reynolds sayısına (Re) karşı oluşturulan N_p değerlerinin ve diğer hesaplanan N_p değerlerinin modellemedeki doğruluğu ile beraber uygulamadaki işlevselliği ele alınarak 0,8375 olarak belirlendi. Bunun belirlenmesinde biyoreaktör geometrisi de göz önüne alındı (Kaiser et al., 2017; van Eikenhorst et al., 2014; Wyrobnik et al., 2022).

Ayrıca bu hesapların yapılması sırasında gerekli olan kimyasal olarak tanımlanmış serumsuz besin ortamlarının yoğunluk (ρ) ve dinamik viskozite (μ) değerleri için literatürde yer alan serum içermeyen bazal DMEM-HG besin ortamının 37°C 'de yapılan ölçümleri sonucunda belirlenmiş olan deneysel değerler kullanıldı (Poon, 2022). Ölçek büyütme kriteri olarak seçilen spesifik güç girişi üzerinden yapılan hesaplar doğrultusunda biyoreaktör üretimlerindeki karıştırma hızları MDCK için 144 rpm, CHO-K1 için 130 rpm, HEK-293 için 117 rpm ve THP-1 için 90 rpm olarak belirlendi. Biyoreaktörde büyüme kinetiği çıkarılması sırasında günlük olarak yapılan sayım üzerinden hesaplanan hücre konsantrasyonu

ve hücre morfolojileri üzerinden hesaplanan karıştırma hızı değerleriyle birlikte tüm üretimin başarısı değerlendirildi. Üretim boyunca ayrıca pH değerleri hem kontrol panelinden hem de pH kağıdı ile manuel olarak izlendi. Aynı zamanda kontrol paneli üzerinden çözünmüş oksijen değeri % 40' ın altına düştüğü zaman 0,1 vvm havalandırma hızında biyoreaktör sistemine hava beslemesi yapıldı. Bu şekilde çözünmüş oksijen değeri % 40 ± 12 , 2 aralığında sabit tutuldu. Kültür süresince sırasında toplanan günlük örnekler bölüm 3.2.5' te belirtilen analizler yapılarak farklı hücre hatlarının endüstriyel biyoproseslere uyarlanabilirliği bunların en iyi şekilde simüle edilebildiği biyoreaktör sistemindeki üretim başarısı üzerinden değerlendirildi.

3.2.5 Hücre kültürü çalışmalarında kültürün değerlendirilmesi

Gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında kültür durumu ve hücresel büyüme davranışlarının uygun şekilde değerlendirilmesi için ters faz mikroskop yardımıyla yapılan gözlemlerle birlikte çeşitli analizler de gerçekleştirildi. Bunlar tüm tez çalışmasının başından itibaren endüstriyel üretimlerin simülasyonu için büyük ölçeğe geçişe kadar tüm basamaklarda uygulanarak değerlendirildi.

3.2.5.1. Hemositometre ile hücre sayımı

Hücre sayımında tripan mavisi boyama tekniği ile canlı ve ölü hücre ayırımı gerçekleştirildi. Hücreler mikroskopta yapılan gözlem sonucunda görülen yoğunluğuna göre seyreltildi ve tripan mavisi boyası ile boyandıktan sonra Neubauer hemasitometresi ile ters faz ışık mikroskopunda canlı ve ölü hücre sayımı gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen sayımın ardından mililitredeki canlı ve ölü hücre sayısı (enklem 10), % canlılık oranı (denklem 11), spesifik büyüme hızı (μ_{cell}) (denklem 12) ve ikilenme süresi (t_d) (denklem 13) aşağıdaki formüller ile hesaplandı (Anitha et al., 2020; Hunt et al., 2014; Jang et al., 2022):

$$\text{Hücre konsantrasyonu (hücre/mL)} = \frac{\text{Sayılan Canlı Hücre Sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 10^4}{\text{Sayım Yapılan Büyük Kare Sayısı}} \quad (\text{denklem 10})$$

$$\text{Yüzde (\%)} \text{ canlılık} = \frac{\text{Canlı Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100 \quad (\text{denklem 11})$$

$$\text{Spesifik büyüme hızı } (\mu_{\text{cell}}) = \frac{\ln(C_2) - \ln(C_1)}{(t_2 - t_1)} \quad (\text{denklem 12})$$

$$\text{İkilenme (doubling) süresi } (t_d) = \ln(2) / \mu_{\text{cell}} \quad (\text{denklem 13})$$

3.2.5.2 Hücre sayımı ile THP-1 hücrelerinin büyüme kinetiğinin çıkartılması

THP-1 hücreleri orjinalinde süspanse karakterde olduğu için bu hücre hatının büyüme kinetiği çalışmaları, hücre sayımı ile gerçekleştirildi. Bunun için hazırlanmış olan RPMI-1640 büyüme ortamı kullanılarak 24 gözlü pleytlere göz başına çalışma hacmi 2 mL ve hücre konsantrasyonu da 1×10^4 hücre/mL olacak şekilde inokülasyon yapıldı. Gün başına iki tekrarlı olacak şekilde pleyt gözleri işaretlenerek o günlerde pleytin ilgili gözlerinden günlük olarak örnek alınarak hücre sayımları gerçekleştirildi. Bununla beraber yapılan sayımlarla beraber yine günlük olarak pH ölçümleri de yapıldı.

3.2.5.3 MTT analizi ile adherent hücre büyüme kinetiğinin çıkartılması

Adherent karakterde olan hücrelerin büyüme kinetiğinin çıkarılmasında tercih edilen bir yöntem olan MTT testi ile günlük olarak hücre konsantrasyonları belirlendi. Bunun için öncelikle her bir hücre hattının gün bazındaki hücre konsantrasyonunun absorbans üzerinden değerlendirilebilmesi için kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Bunun için her bir hücre hattı tripsinizasyon ile kaldırılıp sayıldı ve sonrasında 96 gözlü pleytte 3 tekrarlı olacak şekilde en yüksek konsantrasyon 2×10^6 hücre/mL olacak şekilde ekildi. Daha sonrasında her satırda 2 kat olacak şekilde en yüksek konsantrasyondan başlanarak $7,8 \times 10^4$ hücre/mL değerine kadar seri dilüsyon yapıldı. Bunun için pleytin ilk satırına 2×10^6 hücre/mL konsantrasyonda hücre içeren büyüme ortamından 200 μ L eklendi. Sonrasında pleytin diğer tüm satırlarına da sadece 100 μ L DMEM-HG büyüme ortamı eklendi.

Daha sonra hücrelerin bulunduğu ilk satırdan 100 μ L çekilerek bir sonraki satırdaki 100 μ L besin ortamı üzerine eklenerek 3-5 kez pipetleme yapıldı. Bu işlem sonrasında tekrardan 100 μ L çekilerek bir sonraki satıra eklendi ve bu şekilde $7,8$

$\times 10^4$ hücre/mL değerine kadar devam edildi. En son aşamada pipette kalan 100 μ L çekilerek atıldı. Pleyte belirlenen miktarlarda hücre ekimi yapıldıktan sonra pleyt ekilen hücrelerin tamamının tutunması için 1 gece 37°C' de CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Daha sonrasında MTT testinin uygulamasına geçildi. Bunun için öncelikle her bir gözdeki üst sıvı dikkatlice çekildi ve hazırlanan MTT solüsyonundan (%10 serumsuz DMEM-HG bazal besin ortamı ve % 90 MTT) göz başına 100 μ L eklenerek pleyt 3 saat boyunca karanlıkta 37°C' de CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Bu süre sonunda eklenen MTT inkübasyon ortamı da çekilerek her bir göze 100 μ L DMSO eklendi pleyt 5-10 dakika boyunca orbital çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Son olarak da 570 nm'ye ayarlanmış pleyt okuyucuda okutma yapıldı. Yapılan bu okuma sonucunda bilinen hücre konsantrasyonlarına karşı gelen absorbands değerleri üzerinden her bir hücre hattı için kalibrasyon grafiği oluşturuldu.

Büyüme kinetiği çıkarılmasında ise 24 gözlü pleylere 1×10^4 hücre/mL konsantrasyonda olacak şekilde 1,5 mL çalışma hacimlerinde hücre ekimi yapıldı. Daha sonrasında belirlenen her bir gün iki tekrarlı olacak şekilde pleyt gözleri işaretlenerek o günlerde pleytin o gözlerine günlük olarak MTT testi yapıldı. Bunun öncesinde ise ilgili günde MTT testi yapılacak olan gözlerin pH'ları ölçüldü. MTT testinin yapımı için ise yukarıda bahsedildiği şekliyle aynı oranda MTT inkübasyon ortamı hazırlandı ve her bir göze 500 μ L bu ortamdan eklendi. Pleytin diğer günler için de ekim yapılmış olan gözlerinin aseptik olarak devam ettirilmesi gerekli olduğundan tüm işlemler kabin içinde yapıldı.

Ortam eklemesinin ardından pleyt 3 saat boyunca hücre kültürü koşullarına ayarlı inkübatörde inkübe edildi. Sonrasında MTT testinin yapıldığı bu gözlere yine kabin içerisinde 250 μ L DMSO eklendi ve 5 dakika boyunca yavaşça karıştırıldı. Daha sonra MTT testinin yapıldığı her bir gözden de 2 tekrar olacak şekilde 100 μ L örnekler alınarak 96 gözlü pleyte eklendi. Sonrasında bu pleyt okutularak absorbands değerleri kaydedildi ve oluşturulan standart grafiği üzerinden bu absorbandsa denk gelen hücre konsantrasyon değeri hücre/mL cinsinden belirlenerek kaydedildi. Bu işlemler üreme kinetiği boyunca tekrarlandı.

3.2.5.4 pH ölçümü

Kültür süpernatantından alınan 50 µl örnek pH kağıdı üzerine damlatılarak ölçüm gerçekleştirildi. Biyoreaktör sistemi için ise bu ölçüm pH probunun bağlı olduğu kontrol paneli üzerinden gerçekleştirildi.

3.2.5.5 Amonyak ve L-glutamin analizi

Gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında ve üretimlerde, belirlenen günlerinde toplanan örneklerdeki L-Glutamin ve amonyak konsantrasyonlarının değişimini belirlemek için Megazyme'ın geliştirdiği L-Glutamin/Amonyak kiti kullanıldı. Kit üreticisinin testin yapılışını anlattığı şekilde testi gerçekleştirmek için 96 gözlü pleyt kullanıldı. Öncelikle analiz edilecek her bir örnekten 10 µL tekrarlarıyla birlikte dikkatlice gözlere eklendi. Blank olarak belirlenen gözlere ise analiz edilecek herhangi bir örnek eklenmedi. Daha sonra L-glutamin analizi için olan gözlere 20 µL' şer Solüsyon 1'den eklendi. Sonrasında bu gözler üzerine 2 µL' şer Süspansiyon Çözelti 4 eklenerek pleyt orbital çalkalayıcı üzerine eklendi. Örneklerin eklendiği pleyt orbital çalkalayıcı üzerinde 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra amonyak analizi için olan örneklerin eklendiği gözlerin üzerine sırasıyla oda sıcaklığında 172 µL distile su, 30 µL Solüsyon 2 ve 20 µL Solüsyon 3 eklendi. Amonyak analizinin blank olarak seçilen gözlerine örnek yüklenmediği için işlemler sonunda tüm kuyulardaki hacmin aynı olması için 10 µL daha fazla distile su eklendi. Bununla birlikte L-Glutamin analizi için olan kuyulara ise sırasıyla 150 µL distile su, 30 µL solüsyon 2 ve 20 µL solüsyon 3 eklendi. Burada da blank olarak seçilen gözlere fazladan 10 µL distile su eklendi. Daha sonrasında yine orbital çalkalayıcı üzerinde 4 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda pleyt 340 nm dalga boyuna ayarlanmış plate okuyucuda okutuldu. Alınan sonuçlar A1 olarak kaydedildi. Sonrasında ise tüm gözlere 2 µL Süspansiyon Çözelti 5 eklenerek yine karıştırıcı üzerinde 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra aynı dalga boyuna ayarlı pleyt okuyucuda tekrar okutulan pleytteki değerler A2 olarak kaydedildi. Sonrasında A1 ve A2 değerleri kit üreticisinin okunan absorbans değerlerine karşı konsantrasyon hesabı için geliştirdiği denklem üzerine yerleştirilerek her bir örnek için L-Glutamin ve amonyak değerleri hesaplandı.

3.2.5.6 Glikoz analizi

Yapılan hücre kültürü çalışmaları ve üretimlerinde her bir üretim sisteminden belirlenen günlerinde toplanan örneklerdeki glikoz konsantrasyonlarının değişimini belirlemek için Megazyme' ın geliştirdiği kit kullanıldı. Kit üreticisinin verdiği mikroplyt prosedürü üzerinden glikoz analizi gerçekleştirildi. Pleyt üzerinde örnekler ve blank olan bölümler işaretlendikten sonra öncelikle her bir örnekten 10 µL alınarak blank ve standart dışındaki tüm gözlere eklendi. Standart olarak belirlenen gözlere de 10 µL standart solüsyonu eklendi. Daha sonra blank olan gözlere 210 µL ve diğer tüm gözlere de 200 µL distile su eklendi. Sonrasında sırasıyla tüm gözlere solüsyon 1 ve solüsyon 2'den 10 µL eklenerek pleyt orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi. Bunun ardından pleyt 340 nm Dalga boyunda pleyt okuyucuda okutularak elde edilen absorbans değerleri A1 olarak kaydedildi. Ardından pleyt alınarak bütün gözlerine 2 µL süspansiyon 3 eklendi ve yine orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüm gözlerdeki total hacim 232 µL olan pleyt aynı dalga boyunda okutularak elde edilen sonuçlar A2 olarak kaydedildi. Son olarak kaydedilen A1 ve A2 değerleri üzerinden kit üreticisinin geliştirdiği denklem kullanılarak analiz edilen her bir örnek için glikoz değerleri hesaplandı.

3.2.5.7 Laktik asit (Laktat) analizi

Tez kapsamında yapılan hücre kültürü çalışmaları ve ölçek büyütme işlemlerinin belirlenen günlerinde toplanan örneklerdeki laktik asit miktarı Megazyme'ın geliştirdiği kit ile ölçüldü. Bunun için 96 gözlü pleyt kullanıldı ve pleyt üzerinde örnek blank eklenecek kısımlar işaretlendi. Analizin yapılması için öncelikle blank ve standart olarak belirlenen gözler dışındaki tüm gözlere tekrarları da dahil olmak üzere 10 µL örnek eklendi. Standart olarak belirlenen gözlere de 10 µL laktik asit standartı eklendi. Daha sonra blank olarak belirlenen gözlere 160 µL, örnek ve standart konulan gözlerin ise üzerine 150 µL distile su eklendi. Daha sonrasında ise tüm gözlere sırasıyla 50 µL solüsyon 1, 10 µL solüsyon 2 ve 2 µL süspansiyon 3 eklendi. Daha sonra orbital çalkalayıcıda 3 dakika bekletilen pleyt 340 nm' ye ayarlı pleyt okuyucuda okutularak değerler A1 olarak kaydedildi. Ardından yine pleytin tüm gözlerine 2 µL süspansiyon 4 eklendi ve pleyt oda

koşullarında orbital çalkalayıcı üzerinde 10 dakika inkübe edildi. Bunun sonunda ise aynı dalga boyunda pleyt okuyucuda okutulan pleytteki absorbans değerleri A2 olarak kaydedildi. Tüm bunların sonunda kaydedilen A1 ve A2 değerleri kullanılarak kit üreticisi tarafından geliştirilen absorbans değerleri üzerinden laktik asit konsantrasyonunun hesaplandığı denklem yardımıyla örneklerdeki laktik asit miktarları belirlendi.

3.2.5.8 BCA analizi

Biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimler sonucunda toplanan örneklerle BCA analizi yapıldı. Bunun için öncelikle bilinen protein konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans değerlerinin belirlenmesi için bir standart eğri oluşturuldu. Sığır albüminli standart solüsyonunu içeren ampülden kit üreticisinin anlattığı şekilde seri dilüsyonlar yapılarak seyreltmeler hazırlandı. Daha sonra hem bu dilüsyonlardan hem de analiz edilecek her bir örnekten 25 µL alınarak 96 gözlü pleyte eklendi. Daha sonrasında tüm gözlere BCA kiti içerisinde çıkan A ve B solüsyonlarından hacmen 50 A ve 1 B olacak şekilde hazırlanan reaksiyon karışımından 200 µL eklendi. Sonrasında pleyt karanlıkta 1 dakika boyunca orbital çalkalayıcı üzerinde bekletildikten sonra 37°C’ de yarım saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda pleyt okuyucuda 562 nm dalga boyunda pleyt okutularak absorbans değerleri kaydedildi. Sonrasında oluşturulan standart eğri denklemi kullanılarak analiz edilen örneklerin absorbans değerlerine karşılık gelen protein konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.5.9 Sterilite kontrolü

Farklı ortamlarda üretilen hücrelerin sterilite kontrolü, 29 g/L Tiyoglikolat brot (TGB) ve 30 g/L Triptik Soy brot (TSB) solüsyonlarında gerçekleştirildi. Bu amaçla hazırlanmış olan çözeltiler 121°C’de 20 dakika süre ile otoklavlandıktan sonra, laminar hava akışlı kabin içerisinde 3 tekrar olmak üzere her tüpe 9’ar ml dağıtıldı. Üzerlerine 1 haftalık kültürlerinin süpernatantlarından 1’er ml eklenerek ve bu tüpler 37 °C’deki etüvde ve oda sıcaklığında 14 gün boyunca inkübe edilerek her gün üreme olup olmadığı kontrol edildi.

3.2.6 İnfluenza virüsü enfeksiyon çalışmaları

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen ve bu bölümde anlatılan tüm işlemler Ege Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji ve Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi. Kullanılan influenza virüsü ise çalışmanın yapıldığı laboratuvardaki virüs stoklarından alındı.

3.2.6.1 Virüs büyütme ortamının ve viral enfektivite çalışmaları için viral yıkama solüsyonlarının hazırlanması

Virüs stoklarının oluşturulmasında virüs büyütme ortamını (VBO) hazırlamak için DMEM-HG bazal besin ortamı içerisine % 1 L-Glutamin, %1 penisilin/streptomisin, % 1 HEPES, % 0,4 Amfoterisin - B, % 0,2 Tripsin-EDTA ve % 0,1 gentamisin tamamlayıcı bileşenleri eklendi. Virüs yıkama solüsyonu ise DPBS içerisine % 1 penisilin/streptomisin, % 0,4 Amfoterisin-B ve % 0,1 gentamisin eklenmesi ile hazırladı. Bunların hazırlanması sırasında gerekli olan miktarlardaki tamamlayıcı bileşenlerin eklenmesi sterilitenin korunması adına laminar kabin içerisinde gerçekleştirildi.

3.2.6.2 Virüs çalışma stoklarının oluşturulması

Virüs enfektivite denemeleri için gerekli olan virüs stoklarını oluşturmak adına Ege Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji ve Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda bulunan virüs stoğundaki H1N1 alt tipi olduğu belirlenmiş influenza A virüsü kullanıldı. Çalışma stoğu oluşturmanın ilk aşaması olarak T25 ve devamında da T75 flaskta, flask yüzeyi % 70 - 80 kaplamış olan MDCK hücreleri kullanıldı. Bu işlemlerde öncelikle MDCK hücrelerinin bulunduğu flask virüs çalışmalarının yapıldığı laminar kabin içerisine alınarak içerisindeki DMEM-HG büyütme ortamı döküldü ve 3 - 5 mL virüs yıkama solüsyonu ile flask yıkandı. Bu işlem sonunda yıkama solüsyonunun tamamı flask içerisinden serolojik pipet yardımıyla çekildi. Sonrasında -86°C'den alınarak çözündürülen virüs stoğunun olduğu kriyotüp içinden 1-1,2 mL kadar virüs süspansiyonu alınarak yıkanan hücreler üzerine eklendi. Daha sonrasında içerisine virüs eklenen flask 37°C ve % 5 CO₂'li inkübatörde her 15 dakikada bir yavaşça

kariştırılarak 1,5 saat boyunca inkübe edildi. Sonrasında eklenen virüs süspansiyonu da serolojik pipet yardımıyla flask yüzeyinden çekildi ve flask üzerine 5 mL DMEM-HG VBO eklendi. Bu işlemler sonunda flask içerisindeki MDCK hücrelerinde sitopatik etki (CPE) olup olmadığı günlük gözlemler ile belirlendi. Yaklaşık olarak tüm hücrelerde CPE'nin gözlemlendiği 72-76 saat aralığında inkübasyon sonlandırıldı. İnkübatörden alınan flask 30 dakika boyunca -20°C'de bekletilerek donduruldu. Hemen ardından da 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda tekrardan çözündürülerek hücre içerisinde bulunabilecek enfektif virüslerin de elde edilmesi amacıyla tüm hücrelerin parçalanması sağlandı. Daha sonra flask virüs çalışmalarının yapıldığı kabin içerisine alınarak pastör pipeti yardımıyla flask içeriği homojenize edildi. Flask içeriği santrifüj tüpü içerisine alınarak 3000 rpm'de 30 dk boyunca 4°C'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası virüsü içeren kısım olan süpernatant oluşan pelleti almayacak şekilde dikkatlice kabin içerisinde toplandı ve kriyotüplere paylaştırılarak -86°C'de stoklandı (Karakus et al., 2018; Klimov et al., 2012; Szretter et al., 2006).

3.2.6.3 Virüs enfektivitesinin görüntülenmesi için immünfloresan boyama

Bu tez kapsamında kullanılan farklı hücrelerin oluşturulan influenza A virüs stokları ile enfektivitesinin gösterilmesi ve virüsün hücrede çoğaldığının teyit edilmesi için immünfloresan boyama işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem için 72 saat inkübasyon süresi tamamlanmış olan flask içerisinden 100 µl örnek alınarak uygun şekilde birleştirilen hunili ve sabitleyicili lam-filtre aparatı huni kısmına damlatıldı. Daha sonra bu aparat oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüjlendi. Aparattan dikkatlice çıkartılan lam üzerinden filtre kağıdı alınarak lam asetona daldırıldı. Bu şekilde -20°C' de 10 dakika boyunca aseton içerisinde bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığında 5 dakika boyunca PBS içerisinde bekletilen lam PBS'ten alındıktan sonra örneğin olduğu bölge üzerine floresan işaretli antikorun olduğu boyadan 1-2 damla damlatıldı. Lamaların üzerindeki boyanın akmaması için dikkatli bir şekilde 37°C'deki inkübatöre yerleştirilerek 30 dakika boyunca bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda lamlar tekrardan PBS içerisinde 5 dakika bekletildi ve bu işlem 2 kere uygulandı. Daha sonrasında PBS içerisinden alınan lamaların üstündeki fazla sıvı dikkatle silindi ve oda sıcaklığında karanlıkta kurutmaya bırakıldı. Daha sonra üstündeki sıvının büyük bir kısmı buharlaşmış olan

lam üzerine kapatma solüsyonu damlatıldı ve üzerine lamel kapatıldı (MERCK Millipore, 2019). Taşan solüsyon dikkatle silinerek elde edilen preparat floresan ataçmanlı mikroskopta 20x ve 40x büyütmelemlerde incelenerek fotoğraf çekildi.

3.2.6.4 Doku kültürü %50 enfektif doz (TCID₅₀) değerin belirlenmesi

Oluşturulan stoktaki ve farklı hücre hatları ile yapılan enfektivite çalışmalarında elde edilen virüs konsantrasyonlarının belirlenmesi için TCID₅₀ testi uygulandı. Bunun için 96 gözlü pleyte testin gerçekleştirileceği günün 1 gün öncesinde her bir gözdeki DMEM-HG büyütme ortamının total hacim 100 µl olacak şekilde göz başına 2×10^4 MDCK hücreleri ekildi. Hücrelerin ekildiği pleyt 37°C ve %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda MDCK hücrelerinin her bir pleyt gözünün %80-90' nını kapladığı teyit edildikten sonra TCID₅₀ testine başlandı. Bunun için öncelikle gözlerdeki büyütme ortamı mikropipetle çekildi. Sonrasında hücreler 150 µl virüs yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra pleytin sadece ilk kolonundaki her bir göze oluşturulan virüs stok süspansiyonundan doğrudan 146 µl eklendi. Pleytin 2. kolonundan son kolonundaki virüsün ekilmediği kontrol grubuna kadar da sadece 100 µl DMEM-HG VBO eklendi. Daha sonra sırasıyla seri dilüsyon yapmak için ilk kolondan 46 µl alınıp 2.kolona aktararak karıştırılıp tekrar 46 µl çekilerek 11.kolona kadar bu işlem devam ettirildi. Bu şekilde pleytin kolonlarında sırasıyla 10^0 , $10^{-0,5}$, 10^{-1} , $10^{-1,5}$... şeklinde seri virüs dilüsyonları elde edildi. En son 11. kolondan 46 µl çekilerek atıldı ve böylece her bir gözde 100 µl hacim olacak şekilde pleyt 37°C' deki %5 CO₂'li inkübatörde 15 dakikada bir karıştırılarak 1,5 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 11. kolona kadar olan tüm gözlerdeki virüs süspansiyonu içeren ortam çekilerek atıldı. Daha sonrasında kontrol grubunun olduğu 12. kolona sadece 100 µl ve geri kalan tüm kolonlara 200 µl DMEM-HG VBO eklendi ve pleyt 37°C'deki %5 CO₂'li inkübatörde 72 saat inkübe edildi. Günlük olarak her bir gözdeki CPE incelendi. 72 saatin sonunda tüm gözlerdeki DMEM-HG VBO' nun tamamı çekilerek atıldı ve her bir göz 200 µl virüs yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama solüsyonu da çekilerek her bir göze 100 µl %70' lik etil alkol çözeltisi eklendi ve 5 dakika inkübasyon sonunda tüm gözlerdeki etil alkol çekilerek atıldı (Charyasriwong et al., 2015). Bu işlemin ardından ters faz mikroskopta belirlenen CPE' lerin boyama ile teyit edilmesi adına her bir göze 50 µl % 0,5' lik kristal violet

solüsyonu eklendi ve pleyt 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu sürenin sonunda pleyt distile su dolu bir kapta yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Daha sonra, kurutulan pleytte yapılan gözlem ve kristal violet boyamaya göre CPE gözlenen gözler “pozitif/var” veya “negatif/yok” olarak değerlendirildi. Sonrasında bu değerler üzerinden Reed-Muench metodu kullanılarak TCID₅₀ değeri belirlendi (Lei et al., 2021). Bu metoda göre öncelikle kümülatif yüzde enfeksiyon oranları hesaplandı. Daha sonra bu oranlardan %50 oranını ilk geçen yüzde değer (%50 İGD) ve %50 oranının altında kalan ilk yüzde değerler (%50 AKİD) üzerinden aşağıda yer alan denklemler kullanılarak TCID₅₀ değeri hesaplandı (denklem 14-15) (Karakus et al., 2018; Klimov et al., 2012; Szretter et al., 2006).

$$\text{Orantısal uzaklık (PD)} = \frac{(\%50 \text{ İGD}) - 50}{(\%50 \text{ İGD}) - (\%50 \text{ AKİD})} \quad (\text{denklem 14})$$

$$\log(\text{TCID}_{50}) = \log(\%50 \text{ İGD'in dilüsyon değeri}) - \text{PD} \times (-\log(\text{Dilüsyon faktörü})) \quad (\text{denklem 15})$$

3.2.6.5 Virüs enfektivitesinin doğrulanması için RT-qPCR

Viral enfektivitenin doğrulanması ve kullanılan virüs stoğunda başka bir solunum yolu virüsünün olmadığına gösterilmesi adına RT-qPCR yapıldı. Bunun için öncelikle EZ1 & 2 Virüs Mini Kit v2.0 kullanılarak nükleik asit izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla enfektivite çalışması yapılan tüm örneklerden 400 µl toplanarak kit üreticisi firmanın yönergesi doğrultusunda kitteki kartuşun örnek yükleme kısmına eklendi. Cihazın çalışma süresi bittikten sonra kullanılan kit sayesinde yüklenen örnekler içindeki hücreler parçalanarak ortamdaki istenmeyen diğer bileşenler de ayrıldığından, son aşama olarak RT-qPCR için gerekli olan nükleik asit elüsyonu toplandı. Daha sonra toplanan bu elüsyonlara Solunum Yolu ID-2 RT-qPCR Kiti ile Rotor-Gene Q cihazı kullanılarak RT-qPCR yapıldı. Bunun için yine kit üreticisinin belirttiği şekilde işlem yapılacak her bir örnek için elde edilen nükleik asit elüsyonundan 2,5 µL alındı ve bunun üzerine 5 µl Buffer ile 2,5 µl Oligo mix eklendi. Pozitif kontrol için de yine kit içerisinde çıkan pozitif kontrol örnek tüpünden 2,5 µL alınarak 5 µl Buffer ve 2,5 µl Oligo mix eklendi. Tüm örnekler hazırlandıktan sonra RT-qPCR işlemi başlatıldı. İşlem sonunda

Rotor-Gene Q cihazının bağı olduğu Rotor-Gene Q Series Software programı ile çalışan sistemden sonuçlar “Döngü eşiği” (*Cycle threshold*, Ct) olarak görüntülendi.

3.2.6.6 Farklı hücre hatlarının enfektivite ve virüs üretiminin değerlendirilmesi

Bu çalışma kapsamında denemesi yapılan tüm hücre hatlarının ve bunların serumsuz ortama adapte edilmiş hallerinin enfektivite ve virüs üretimi açısından değerlendirilmesi gerçekleştirildi. Her bir örnekte eşit bir hücre-virüs etkileşimi gerçekleştirmek ve bunların daha doğru değerlendirilebilmesi adına “Enfeksiyon Çokluğu” (*Multiplicity of Infection*, MOI) değeri hesaplandı. Yapılan literatür araştırması sonucunda farklı MOI değerleri kullanılarak yapılan influenza virüsü enfeksiyon çalışmaları incelendiğinde bu çalışma için de kullanılacak olan MOI değeri 10^{-3} olarak belirlendi. Bu değer ise aşağıda yer alan formül (denklem 16) ile hesaplandı (ATCC, 2013; Corbishley et al., 2020).

$$\text{Enfeksiyon çokluğu (MOI)} = \frac{\text{Toplam viral partikül sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \quad (\text{denklem 16})$$

Bu değer in hesaplanması için bu çalışma kapsamında oluşturulan virüs stoğuna yapılan TCID₅₀ sonucu influenza virüsleri için hesaplanan Poisson dağılımına göre 0,7 ile çarpılarak teorik olarak plak testi sonucunda elde edilen Plak Oluşturma Birimi (*Plaque Forming Unit*, PFU)’ ne denk olan viral partikül değeri hesabı yapıldı. Bu hesaplama sonucunda TCID₅₀/mL değeri viral partikül/mL değerine dönüştürüldü (ATCC, 2013; Corbishley et al., 2020). Daha sonra literatürde influenza virüslerinin hücre kültüründe çoğaltılması için optimal bir MOI olarak gösterilen 10^{-3} değeri seçildi (Gränicier et al., 2019).

Virüs enfektivite çalışması yapılması için bu çalışmada kullanılan tüm hücrelerin orijinal halleri ile adapte edilmiş hallerine bu MOI değeri üzerinden virüs inokülasyonu yapıldı. Bunun için her bir hücre sayılarak hücre karakterine göre adherent veya süspanse T25 flasklara ekildi ve adherent karakterde olanların tutunması için 6-8 saat 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda adherent hücrelerin üzerindeki ortam dökülerek ardından virüs yıkama ortamıyla yıkama yapılırken süspanse hücrelere de aynı işlem 1000 rpm’ de 5

dakika santrifüjleme ile yapıldı. Daha sonra gerekli viral partikülü içeren virüs stoğundan hesaplanan miktarlar çekilerek hücrelerin üzerine eklendi. Süspanse hücreler için ise yıkama sonrası santrifüjleme ile oluşan pellet üzerine hesaplanan virüs stoğundan alınan hacim eklenerek bununla tekrardan süspanse edildikten sonra flaska alındı. Tüm flasklar 15 dakikada bir karıştırılarak 1,5 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda adherent hücrelerin üzerinden virüs süspansiyonu serolojik pipetle çekildi ve hepsinin üzerine 5 mL kendi spesifik VBO'su eklendi.

Süspanse olanlar için de virüs süspansiyonu yine santrifüjleme ile uzaklaştırıldı ve ardından oluşan pellet 5 mL kendi spesifik VBO'su ile tekrardan süspanse hale getirilerek flaska alındı. Burada kullanılan VBO' lar ise adherent karakterdeki CHO-K1, HEK-293 ve MDCK için DMEM-HG VBO, THP-1 için ise DMEM-HG VBO ile aynı tamamlayıcı bileşenleri içeren RPMI-1640 kullanılarak hazırlandı. Bunlarla birlikte serumsuz ortama adapte edilen tüm hücrelerin VBO' arı yukarıda bahsedilen şekilde her bir hücre hattı için kendi spesifik kimyasal olarak tanımlanmış serumsuz besin ortamları kullanılarak hazırlandı. Kimyasal olarak tanımlanmış serumsuz ortam VBO'ları hazırlanırken % 3 L-Glutamin, %1 penisilin/streptomisin, % 1 HEPES, % 0,4 Amfoterisin - B, % 0,2 recombinant tripsin-EDTA ve % 0,1 gentamisin oranlarında tamamlayıcı bileşenler kullanıldı. Özellikle serumsuz ortam VBO'ları hazırlanırken çalışma amacına uygun olarak hayvansal kökenli olan tripsin-EDTA yerine recombinant tripsin-EDTA kullanıldı. Bu şekilde tüm flasklar 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 72 saat inkübe edildikten sonra bütün örnekler yukarıda anlatıldığı şekilde sırasıyla immünfloresan boyama, RT-qPCR, her bir örnekten ayrı stok oluşturma ve sonrasında oluşturulan bu farklı hücre hatlarına ait stoklara TCID₅₀ değeri belirleme işlemleri yapıldı.

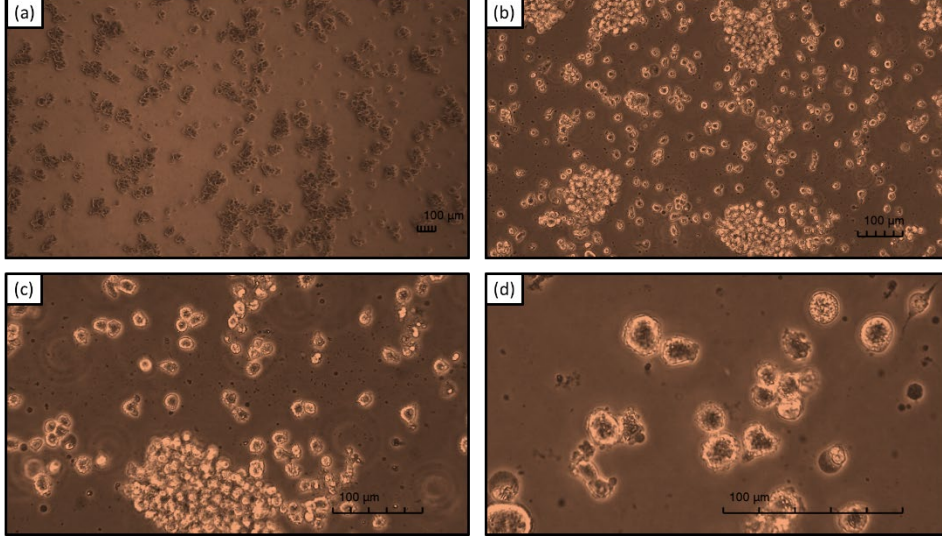
3.2.7 İstatistiksel analiz

Çalışmalar sonucunda elde edilen tüm veriler GraphPad Prism® 9 programı ile analiz edildi. Sonuçlar, tek yönlü varyans analizi (tek-yön ANOVA) ve çift yönlü varyans analizi (iki-yön ANOVA) ile $\pm$ % 95 güven aralığında değerlendirildi.

4. BULGULAR

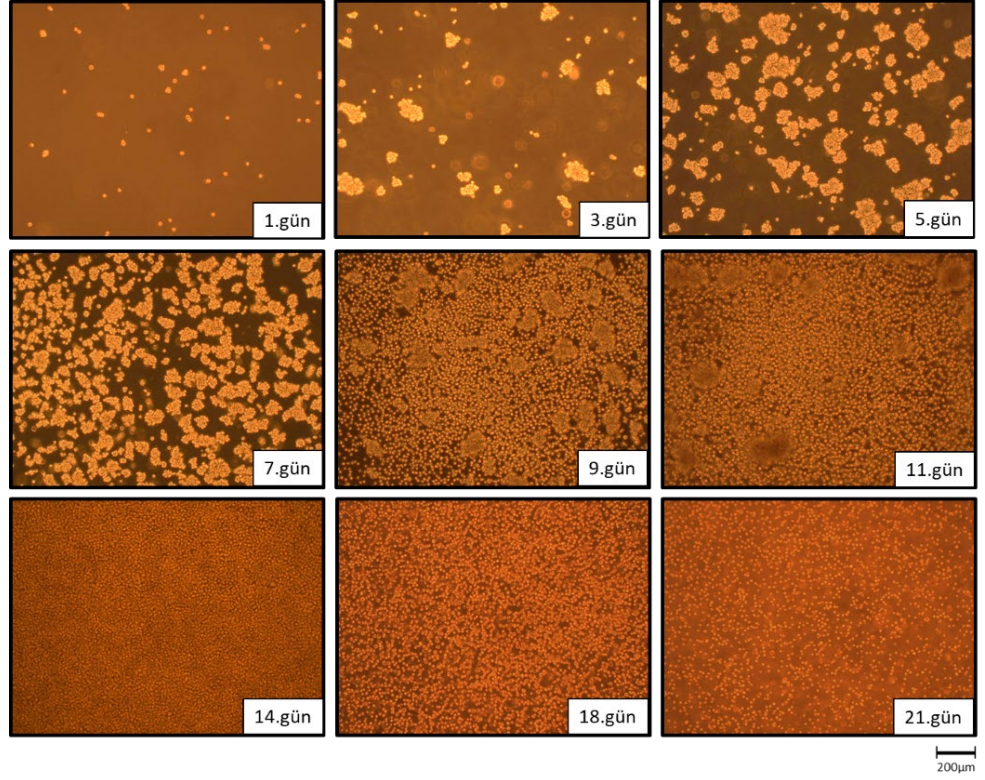
4.1 Hücre Hatlarının Kültür Karakterlerinin Belirlenmesi

4.1.1 THP-1 hücre hattı



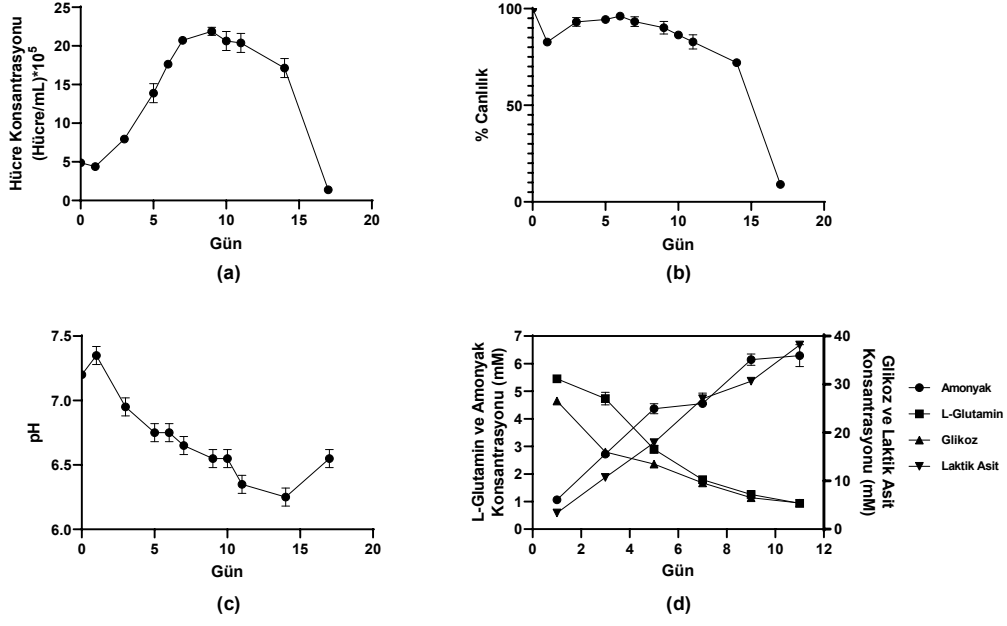
Şekil 4.1. THP-1 hücrelerinin ters faz mikroskopta çekilmiş olan farklı büyütmelerdeki görüntüleri 4x (a), 10x (b), 20x (c) ve 40x (d) (Ölçek barı uzunluğu: 100µm)

Çalışmada kullanılan tüm hücre hatlarının orijinal üreme karakterlerinin belirlenmesi adına büyüme kinetiği çıkartılmıştır. Bu çalışmalarda süspanse karakterde olan THP-1 hücrelerinin (Şekil 4.1) büyüme kinetiği 21 gün boyunca devam ettirildi. Bu süre boyunca kültürlen THP-1 hücrelerin 14. günde en yüksek konsantrasyona ulaştığı görüldü (Şekil 4.2). THP-1 hücrelerinin maksimum konsantrasyona ulaştığı bugünden sonra ise hücre canlılığının düştüğü ve bununla beraber kültürdeki hücre konsantrasyon artıkça da ortam pH sınırın düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.3c).



Şekil 4.2. Büyüme kinetiği sırasında günlük olarak sayımı yapılan THP-1 hücrelerinin gün bazındaki değişimlerini gösteren mikroskop görüntüleri (10x) (Ölçek barı uzunluğu: 200µm)

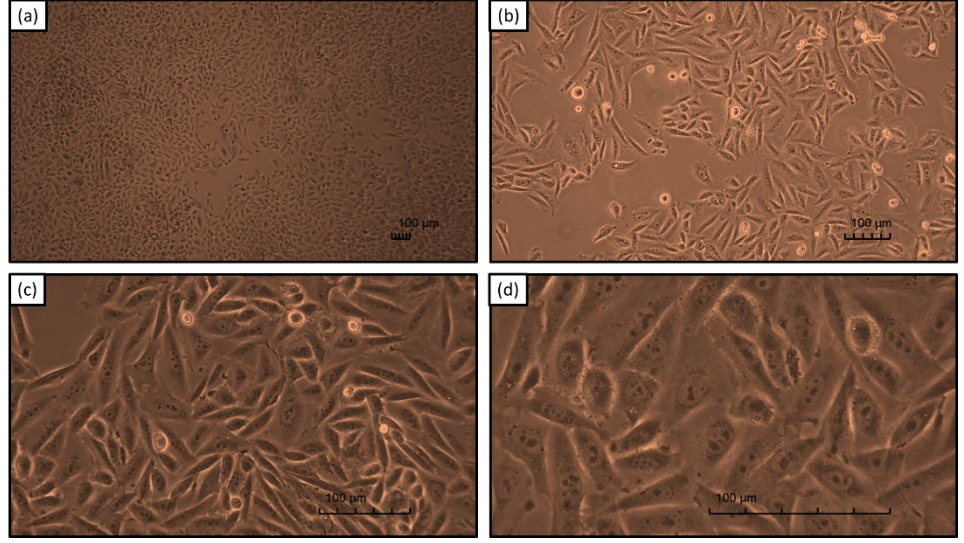
Sayımlar sonucunda THP-1 hücrelerinin 14. günde ulaştığı en yüksek konsantrasyonun $1,922 \pm 0,091 \times 10^6$ hücre/mL değeri belirlenerek (Şekil 4.3a) çıkartılan bu büyüme kinetiği üzerinden THP-1 hücrelerinin μ_{cell} ve bunun üzerinden t_d değeri hesaplandı. Bu hesaplamalar sonucunda da t_d değeri $48,95 \pm 0,42$ saat olarak hesaplandı. Ayrıca, THP-1 hücrelerinin uzun kültür süreleri boyunca canlılıklarının %70' in üzerinde kaldığı gözlemlendi (Şekil 4.3b).



Şekil 4.3. THP-1 hücrelerinin gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler

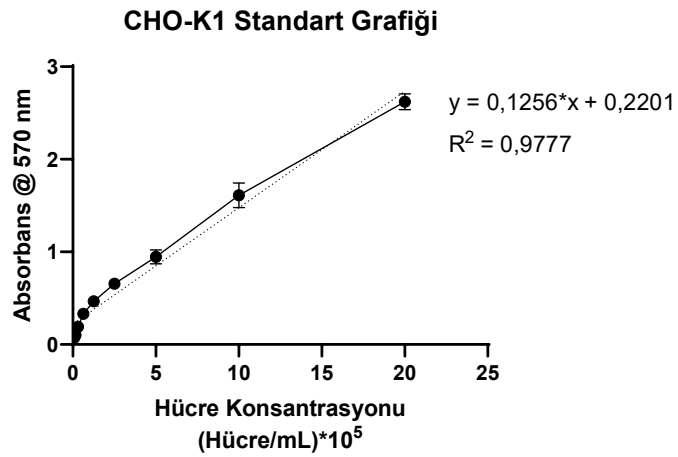
THP-1 hücrelerinin karakterizasyonu için gerçekleştirilen çalışmada hücre metabolik aktivitesinin de incelenmesi için toplanan örneklerden sırasıyla L-glutamin, amonyak, glüköz ve laktik asit metabolitlerinin değerleri ölçüldü. Yapılan ölçümlerde hücre konsantrasyonu ve pH değişimine bağlı olarak besin ortamı içeriğindeki hücre çoğalması için temel bileşenlerden olan glüköz ve L-glutamin bileşenlerinin konsantrasyonun azaldığı belirlendi. Bununla birlikte hücre metabolik aktivitesi ve çoğalmaya paralel olarak ortaya çıkan atık bileşenler olan laktik asit ve amonyak konsantrasyonlarının da arttığı gözlemlendi (Şekil 4.3d).

4.1.2 CHO-K1 hücre hattı



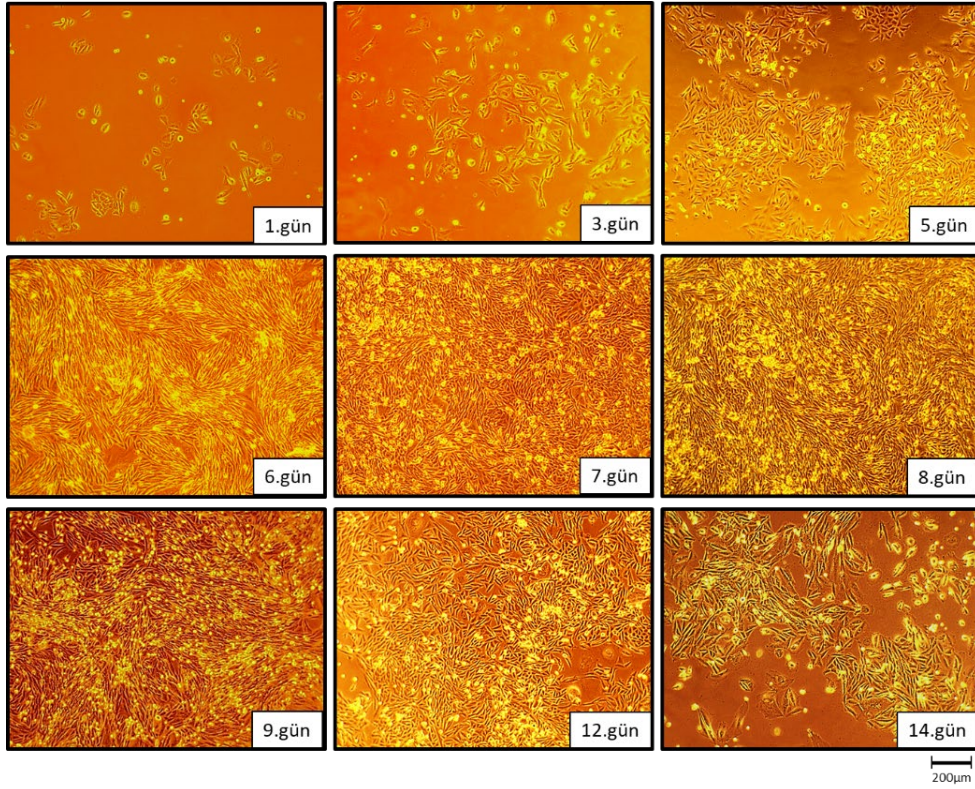
Şekil 4.4. CHO-K1 hücrelerinin ters faz mikroskopta çekilmiş olan farklı büyütmelerdeki görüntüleri 4x (a), 10x (b), 20x (c) ve 40x (d) (Ölçek barı uzunluğu: 100µm)

Adherent karaktere sahip olan CHO-K1 hücre hattının (Şekil 4.4) büyüme kinetiğinin çıkarılması için CHO-K1 hücreleri 24 gözlü pleytlere ekilerek gün bazında MTT testi yapılmıştır. Bunun için öncelikle hesaplanmak istenen hücre konsantrasyonuna karşı gelen absorbans değerinin belirlenmesi için bir standart grafiği oluşturuldu (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Adherent CHO-K1 hücrelerine ait bilinen hücre konsantrasyonlarına karşı gelen absorbans değerlerinin gösterildiği standart grafiği

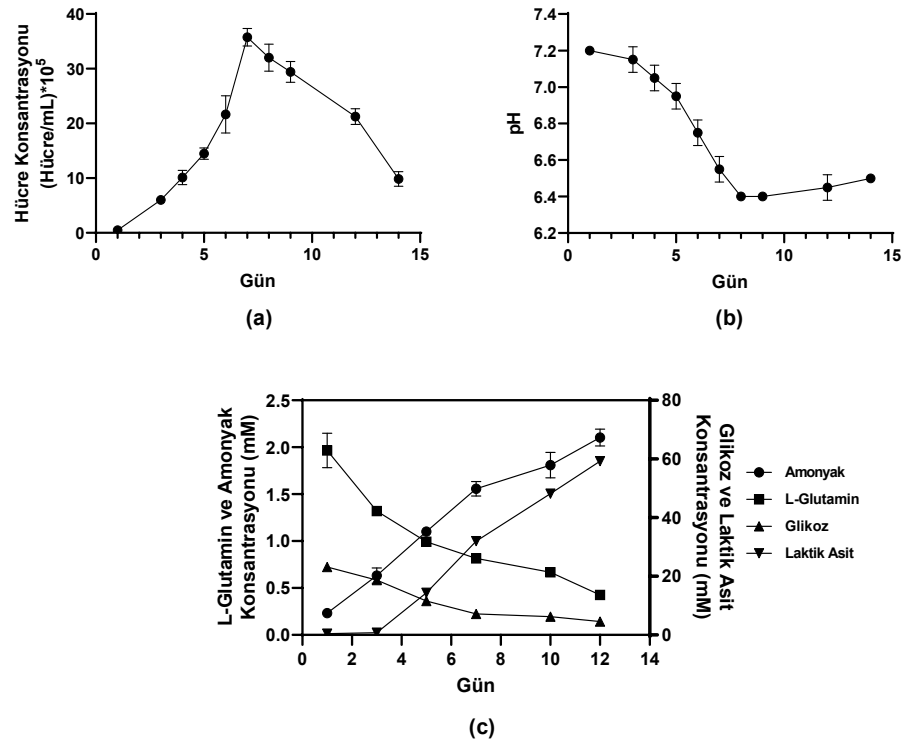
Bu grafikten elde edilen konsantrasyona karşı absorbansı ifade eden denklemi üzerinden gün bazında yapılan ölçümlerle adherent CHO-K1 hücrelerinin konsantrasyonları belirlendi. Ayrıca her bir gün için MTT testi öncesinde pH ölçümüyle birlikte mikroskopik gözlemler yapıldı. Bu gözlemlerde de CHO-K1 hücrelerinin adherent karakterlerine uygun olarak günden güne tüm yüzeyi kaplama oranlarının arttığı görüldü. En yüksek hücre konsantrasyon değerine ulaşılan 7. günden sonra ise hücreler tüm kültür kabı yüzeyini kapladığı için monolayer tabaka üzerinde yüksek miktarda hücre birikimi gözlemlendi (Şekil 4.6). Büyüme kinetiğinin ilerleyen günlerinde ise ortam pH'sının da düştüğü belirlendi. Bununla birlikte diğer adherent kültürler olan HEK-293 ve MDCK hücrelerine kıyasla CHO-K1 hücrelerinin ilerleyen kültür süresiyle beraber düşen pH'a rağmen adherent karakterini koruduğu ve kültür kabı yüzeyine tutunmaya devam ettiği gözlemlendi.



Şekil 4.6. Büyüme kinetiği için günlük olarak MTT testi yapılan CHO-K1 hücrelerinin gün bazındaki değişimlerini gösteren mikroskop görüntüleri (10x) (Ölçek barı uzunluğu: 200µm)

Her gün sonunda yapılan MTT testi ve pH ölçümleri sonucunda adherent CHO-K1 hücrelerinin büyüme kinetikleri çıkarıldı. Büyüme kinetiği eğrisine bakıldığında ise kültürün 7. günde maksimum konsantrasyona ulaştığı ve bu

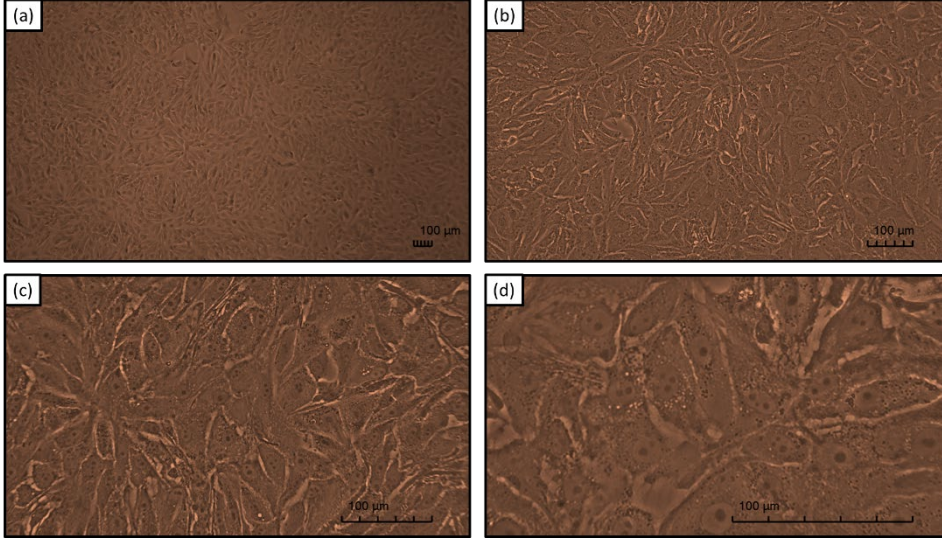
değerin ise $3,574 \pm 0,16 \times 10^6$ hücre/mL olduğu belirlendi. Artan hücre konsantrasyonuna bağlı olarak da pH değerlerinin ilerleyen günlerde devamlı olarak düştüğü, sadece 12. günden itibaren kültürdeki canlı hücre konsantrasyonunun düşmesine bağlı olarak artış gösterdiği gözlemlendi. Bu düşüşe paralel olarak da yapılan metabolit analizlerine bakıldığında laktik asit değerinin devamlı olarak yükseldiği ve bir diğer atık metabolit olan amonyağında benzer şekilde kültür süresince arttığı görüldü. Bunlarla beraber glikoz ve L-glutamin değerlerinde de azalma meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. CHO-K1 hücrelerinin büyüme kinetiğinde gün bazındaki hücre konsantrasyon (a), pH (b) ve metabolit (c) değerleri

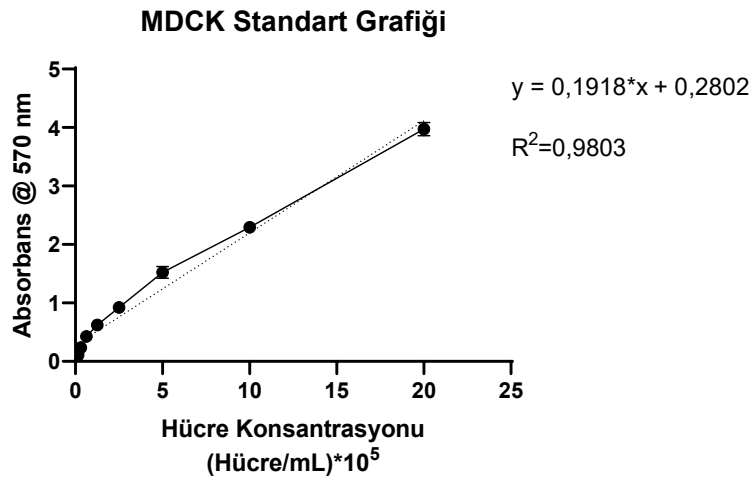
Oluşturulan büyüme kinetiğine bakıldığında logaritmik fazın ilk ve son günleri 1. ve 7. günler olarak belirlendi ve bu değerler kullanılarak adherent CHO-K1 hücreleri için $t_d = 23,22 \pm 0,64$ saat olarak hesaplandı.

4.1.3 MDCK Hücre Hattı



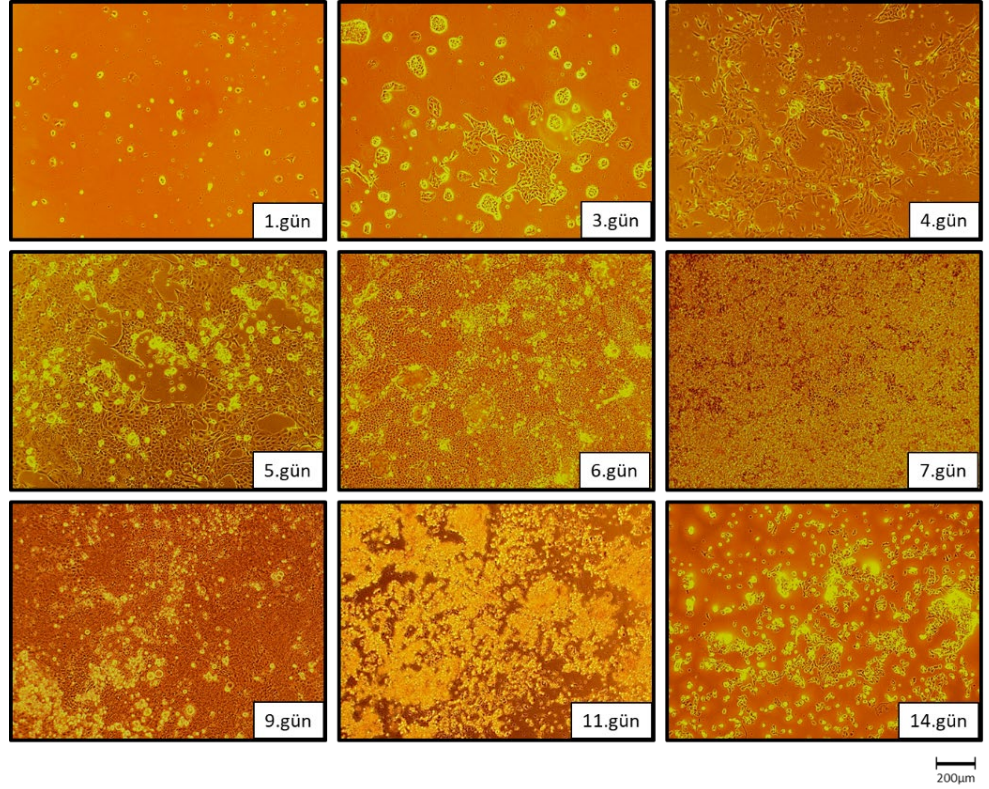
Şekil 4.8. MDCK hücrelerinin ters faz mikroskopta çekilmiş olan farklı büyütmelelerdeki görüntüleri 4x (a), 10x (b), 20x (c) ve 40x (d) (Ölçek barı uzunluğu: 100µm)

MDCK hücrelerinin (Şekil 4.8) de büyüme kinetiği 24 gözlü pleyt kullanılarak her gün için 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu hücre hattı da adherent karaktere sahip olduğu için MTT testi ile çıkartılan bu büyüme kinetiği öncesinde bilinen hücre konsantrasyonlarının ölçülen absorbans değerleri üzerinde bir standart eğri oluşturuldu (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Adherent MDCK hücrelerine ait bilinen hücre konsantrasyonlarına karşı gelen absorbans değerlerinin gösterildiği standart grafiği

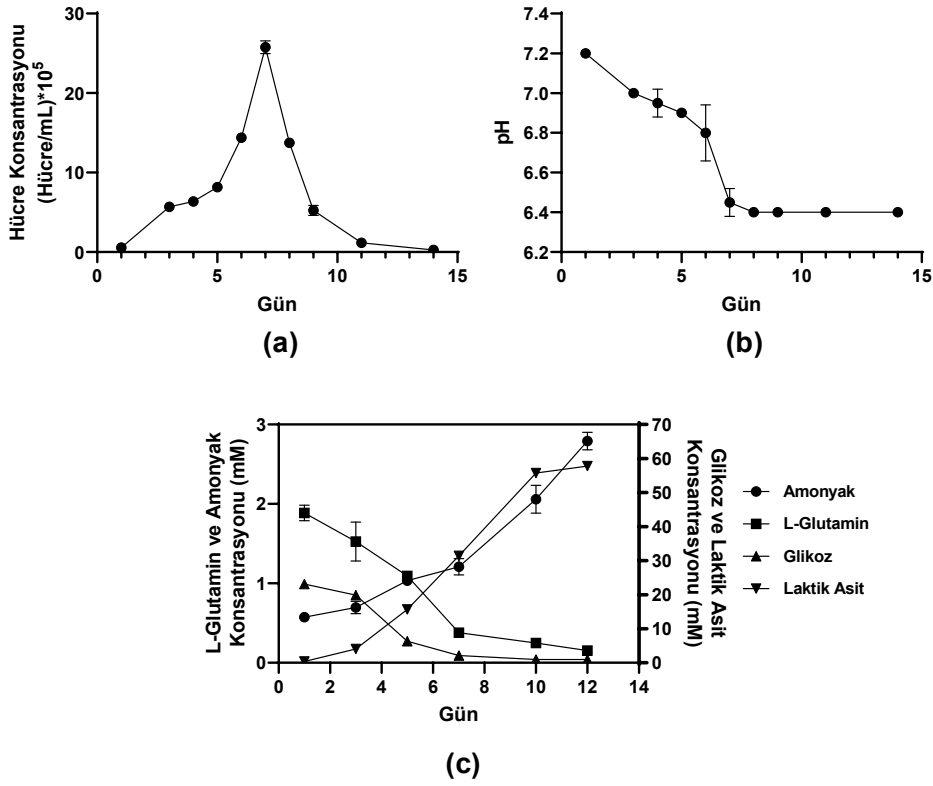
Elde edilen standart grafiği denklemi kullanılarak kültür süresi boyunca her gün yapılan MTT testi sonucunda elde edilen absorbans değerleri üzerinden MDCK hücrelerinin konsantrasyonları belirlendi. Ayrıca yine MTT testi öncesinde ters faz mikroskopla gözlem yapılarak kültürdeki büyüme gözlemlendi. Özellikle burada CHO-K1 hücrelerinde görüldüğü gibi 6. günden itibaren kültür kabı yüzeyinde yer bulamayan MDCK hücrelerinin monolayer tabaka üzerinde birikmeye başladığı görüldü. Yapılan pH ölçümlerine göre özellikle kültürün ilk günlerinden itibaren pH'da hızlı bir düşüş gözlemlendi ve kültür yoğunluğunun en yüksek olduğu 7. günden itibaren pH değeri 14 günlük kültür süresi sonuna kadar 6,4 olarak ölçüldü. Özellikle düşen pH değeriyle birlikte 11. günden itibaren MDCK hücrelerinin kültür kabı yüzeyinden tabakalar halinde kalkmaya başladığı görüldü (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Günlük olarak MTT testi yapılan MDCK hücrelerinin gün bazındaki değişimlerini gösteren mikroskop görüntüleri (10x) (Ölçek çubuğu uzunluğu: 200µm)

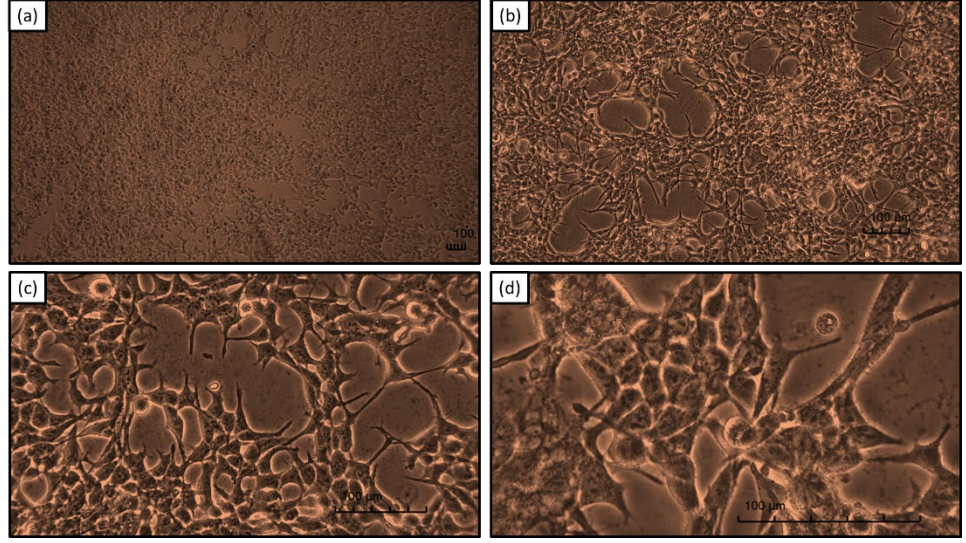
Kültür süresi boyunca yapılan MTT sonuçlarından elde edilen büyüme kinetiği grafiğine bakıldığında MDCK hücrelerinin en yüksek konsantrasyona 7. Günde ulaştığı görüldü. Bu hücre konsantrasyonu ise standart eğri üzerinden $2,575 \pm 0,0804 \times 10^6$ hücre/mL olarak hesaplandı. Daha sonra oluşturulan büyüme

kinetiği eğrisi üzerinden MDCK hücreleri için ikilenme süresi hesabı yapıldı. Bu hesaba göre adherent MDCK hücrelerinin t_d değeri $25,954 \pm 0,092$ saat olarak belirlendi. Bununla birlikte yapılan metabolit analizi sonucunda da MDCK hücrelerinin kültürün ilk günlerinden itibaren glikoz ve L-glutamini yüksek oranda kullandığı görüldü. Buna paralel olarak da laktik asit ve amonyak değerlerinin oldukça hızlı bir biçimde artış gösterdiği gözlemlendi. Buna paralel olarak da özellikle laktik asit artışının hızlandı 6. günden itibaren pH değerinin de hızlı bir şekilde düştüğü belirlendi (Şekil 4.11).



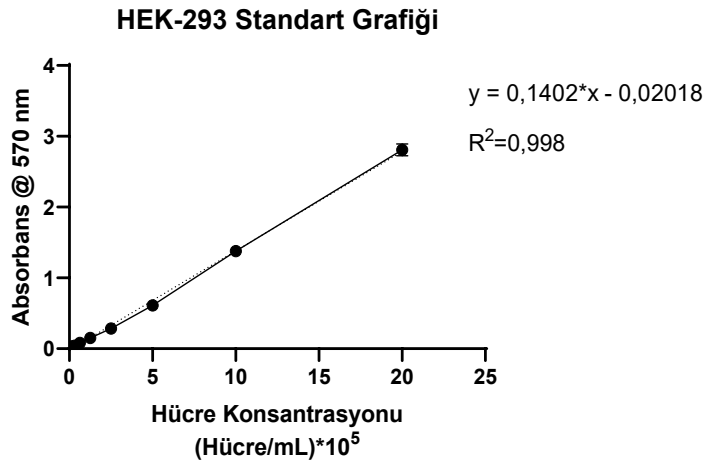
Şekil 4.11. MDCK hücrelerinin büyüme kinetiğinde gün bazındaki hücre konsantrasyon (a), pH (b) ve metabolit (c) değerleri

4.1.4 HEK-293 hücre hattı



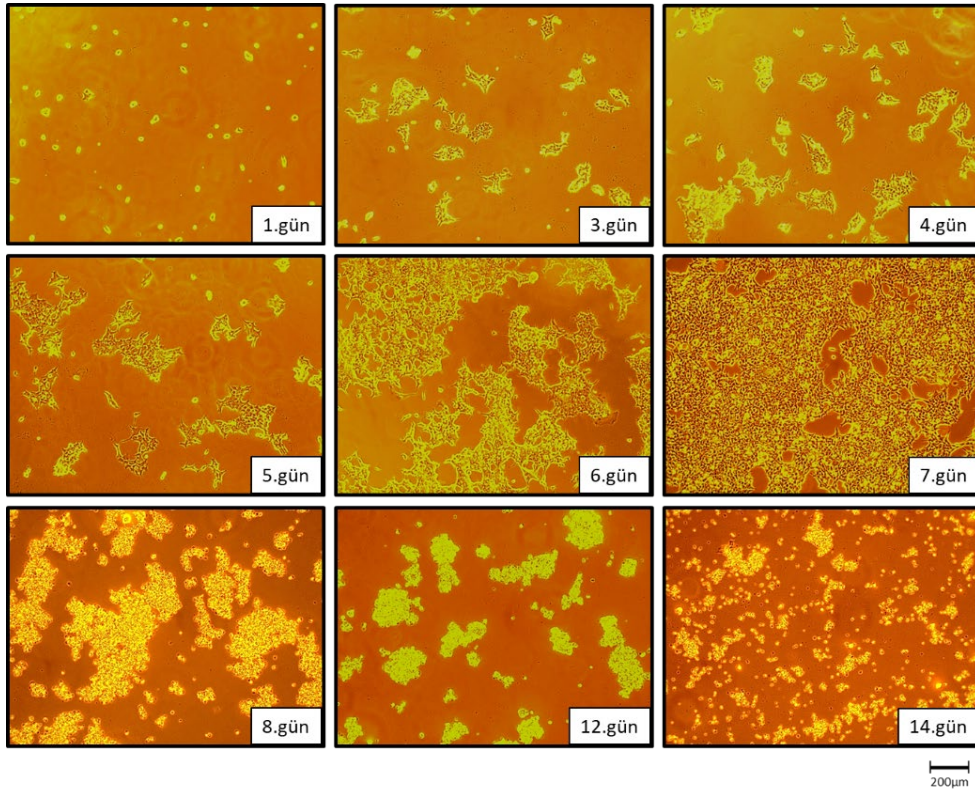
Şekil 4.12. HEK-293 hücrelerinin ters faz mikroskopta çekilmiş olan farklı büyütmelelerdeki görüntüleri 4x (a), 10x (b), 20x (c) ve 40x (d) (Ölçek barı uzunluğu: 100µm)

Diğer adherent karakterdeki hücelere benzer şekilde HEK-293 hücrelerinin (Şekil 4.12) de büyüme kinetiklerinin çıkarılması için öncelikle bir standart grafiği oluşturuldu. Daha sonrasında oluşturulan bu standart grafiğinden elde edilen denklem kullanılarak her bir gün için yapılan MTT analizi sonucunda elde edilen absorbans değerleri üzerinden HEK-293 hücrelerinin gün bazındaki konsantrasyonları hesaplandı (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Adherent HEK-293 hücrelerine ait bilinen hücre konsantrasyonlarına karşı gelen absorbans değerlerinin gösterildiği standart grafiği

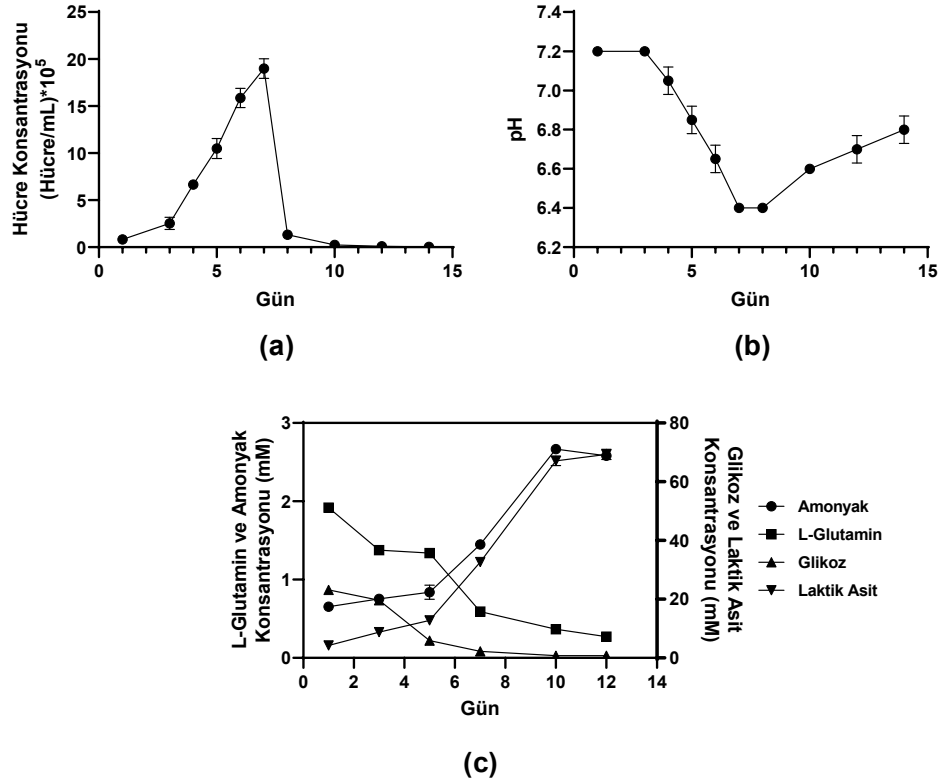
Kültür süresince hücre konsantrasyonlarının hesaplanması için MTT testi öncesinde kültür süpernantlarından pH ölçümü ve kültürdeki hücrelerin pleyt yüzeyini kaplama oranları ve büyümelerinin gözlenmesi için ters faz mikroskopta HEK-293 hücreleri incelendi. Bu incelemeler sonucunda HEK-293 hücrelerinin düşen pH değerine karşı oldukça dayanıksız olduğu görüldü. Özellikle maksimum hücre konsantrasyonuna ulaşılan 7. güne kadar kültürde sürekli bir pH düşüşü görüldü ve bu düşüşle birlikte 7. günden sonra hücre konsantrasyonunda ani bir azalma gözlemlendi. Bununla beraber yapılan gözlemlerle hücrelerin pleyt yüzeyinden kalktığı ve hücre bütünlüğünün bozulmaya başladığı belirlendi (Şekil 4.14). Kültürün ilerleyen günlerinde de düşen hücre konsantrasyonu ile beraber pH değerinde artış gözlemlendi. Bu açıdan da diğer hücre hatlarıyla yapılan büyüme kinetiği çalışmalarına kıyasla özellikle adherent HEK-293 hücrelerinin uzun kültür süreleri boyunca yüksek hücre konsantrasyonunu koruyamadığı görüldü.



Şekil 4.14. Kültür süresi boyunca MTT testi ile gün bazında HEK-293 hücrelerinin değişimlerini gösteren mikroskop görüntüleri (10x) (Ölçek çubuğu uzunluğu: 200µm)

Yapılan hesaplamalar sonucunda belirlenen hücre konsantrasyonlarından oluşturulan büyüme kinetiği grafiğinde en yüksek hücre konsantrasyonuna CHO-

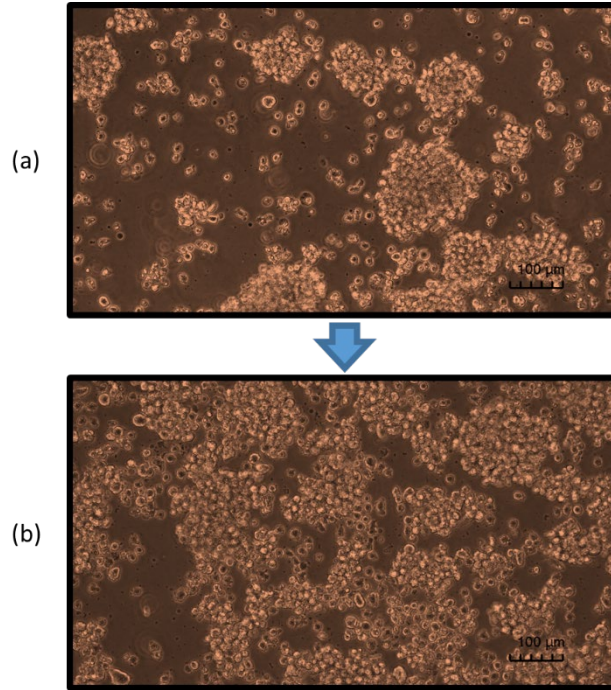
K1 ve MDCK hücrelerinde olduğu gibi 7. günde ulaşıldığı görüldü. Ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu ise $1,8987 \pm 0,1034 \times 10^6$ hücre/mL olarak hesaplandı. Kültür süresi boyunca hesaplanan tüm konsantrasyon değerlerine bakıldığında logaritmik fazın 3. ve 7. günlerde gerçekleştiği görüldü. Bu doğrultuda HEK-293 hücrelerinin ikilenme süresi hesaplandığında da hücrelerin t_d değeri $33,08 \pm 1,125$ saat olarak belirlendi. Yapılan metabolik analizlerde de hücre konsantrasyonuna bağlı olarak zamanla atık metabolitlerde artış gözlenirken kültür ortamında hücre büyümesi için gerekli olan bileşenlerin de konsantrasyonlarında azalma gözlemlendi. Özellikle kültür pH'ının düşmeye başladığı 4. günden itibaren de laktik asit miktarının çok hızlı bir şekilde arttığı görüldü (Şekil 4.15). Bununla beraber adherent kültürlerle bakıldığında HEK-293 ve CHO-K1 hücrelerinin laktik asit üretim miktarlarının daha yüksek olduğu, bununla beraber THP-1 hücreleri en yüksek miktarda amonyak üretimini gerçekleştirirken adherent hücreler özelinde de MDCK hücrelerinin amonyak üretiminin en fazla olduğu belirlendi.



Şekil 4.15. HEK-293 hücrelerinin büyüme kinetiğinde gün bazındaki hücre konsantrasyon (a), pH (b) ve metabolit (c) değerleri

4.2 Hücre Hatlarının Serumsuz Ortama ve Adherent Kültürlerin Süspanse Üreme Koşullarına Adaptasyonu

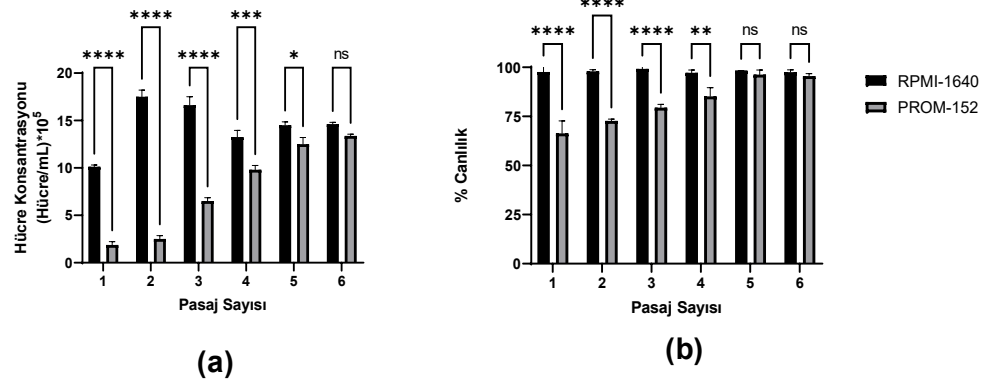
Bu çalışma kapsamında hücrelerin serumsuz ortama adapte edilmesi için iki farklı yöntem denendi. Özellikle adherent karakterde olanların hem serumsuz hem de süspanse koşullara paralel şekilde adapte edilmeye çalışıldığından adaptasyon çalışmalarına başlanılan günden itibaren günlük olarak mikroskop gözlemleri yapıldı. Bununla beraber orijinal hali süspanse karakterde olan THP-1 hücre hattı için sadece doğrudan adaptasyon yöntemi denendi. Bunun için THP-1 hücreleri kontrol grubu RPMI-1640 büyüme ortamı kontrol grubu olacak şekilde PROM-152 ortamında kültüre alınarak her 2-3 günde bir sayım yapıldı. Sayımlar sonucunda THP-1 hücrelerinin PROM-152 ortamı ve RPMI-1640 ortamındaki hücre konsantrasyonları değerlendirildi.



Şekil 4.16. THP-1 hücrelerinin adaptasyon sırasında ters faz mikroskopta çekilmiş olan kontrol grubu (a) ve adaptasyon demesi sırasında PROM-152 ortamında kültüre edilen hücrelerin (b) görüntüleri (10x) (Ölçek barı uzunluğu: 100µm)

Bununla beraber yapılan gözlemlerde THP-1 hücrelerinin hem kontrol grubunun hem de adaptasyon denemesi yapıldığı grubu hücrelerinin özellikle ilerleyen kültür süresine bağlı olarak büyük kümeler oluşturduğu gözlemlendi (Şekil

4.16). Bununla beraber PROM-152 ortamına adaptasyon için denemesi yapılan THP-1 hücrelerinin daha az küme oluşturduğu gözlemlendi. Bu kümelerin ise sayımlar sırasında yapılan pipetaj ile büyük oranda giderilebildiği görüldü.

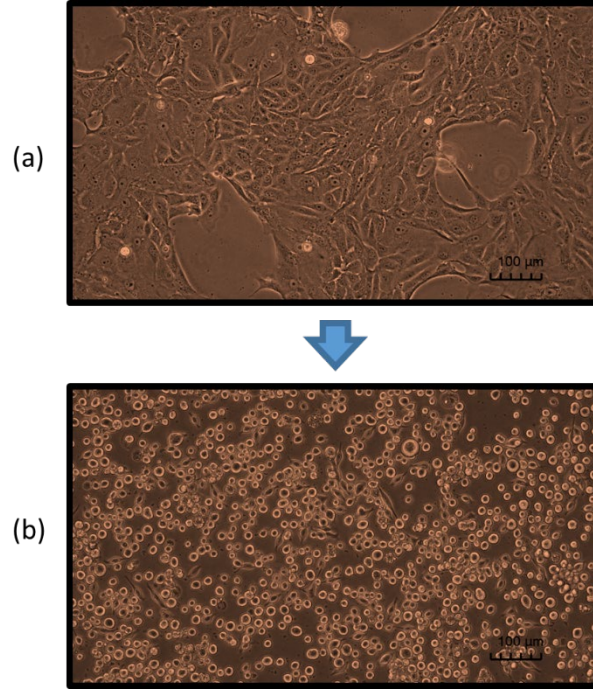


Şekil 4.17. THP-1 hücrelerinin PROM-152 ortamına doğrudan adaptasyonunda hücrelerin konsantrasyon (a) ve % canlılık (b) açısından kontrol grubuyla kıyaslanması

THP-1 hücrelerinin PROM-152 ortamına doğrudan adaptasyon denemesinde ilk 6 pasajda hücrelerin bu ortama adapte olduğu belirlendi. Bu süreçte özellikle ilk üç pasajda hücre üretim verimi açısından kontrol grubuyla PROM-152 ortamı arasında büyük bir farklılığın olduğu ($P < 0,0001$) görüldü. Daha sonrasında kültürün 4. pasajında ise daha düşük bir farkın olduğu ($P < 0,001$) ve 5. pasajda ise bu farkın giderek kapandığı ($P < 0,05$) gerçekleştirilen çift yönlü ANOVA testi sonucunda belirlendi. Kültürün 6. Pasajında da THP-1 hücrelerinin PROM-152 ortamına adapte olduğu ve kontrol grubuyla hücre üretim verimi açısından anlamlı bir fark olmadığı ($P > 0,05$) görüldü. Hücre canlılığı açısından da hücre konsantrasyonun değerlerinde olduğu gibi ilk pasajda oldukça yüksek bir fark gözlenirken ($P < 0,0001$), sonraki pasajda bu farkın azalmaya başladığı ($P < 0,01$) görüldü. Ancak son iki pasajda ise hücre canlılıkları arasında anlamlı bir farkın olmadığı ($P > 0,05$) belirlendi (Şekil 4.17).

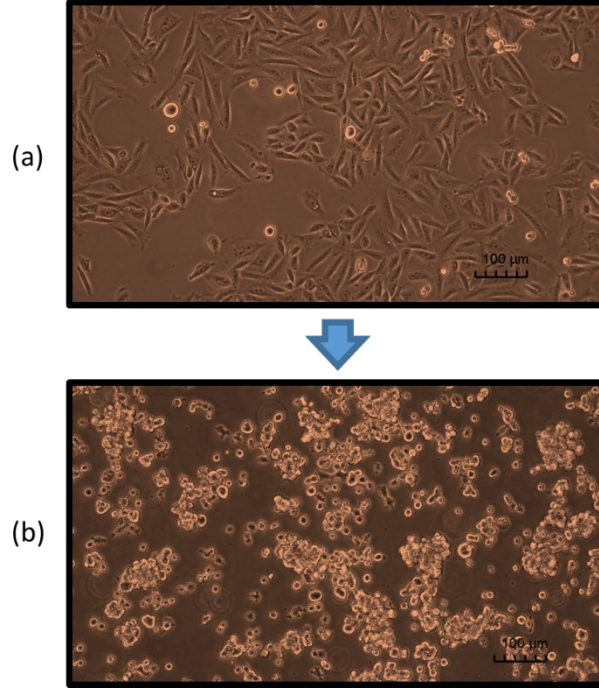
Adherent hücrelerin adaptasyon çalışmaları ise iki farklı yöntemin de denendiği paralel deney setleri kuruldu ve günlük gözlemler ile değerlendirildi. Doğrudan adaptasyon deney setinde tripsinizasyon sonrasında kaldırılan hücreler 5×10^5 hücre/mL konsantrasyonda olacak şekilde süspanse kültür flasklarına aktarıldı. Serumsuz ortama ve yüzeyleri hücre kültürü için işlem görmemiş

süspanse flasklara geçiş ile gerçekleştirilen doğrudan adaptasyon yaklaşımıyla hücrelerin büyük oranda da süspanse morfolojiye geçtiği belirlendi.



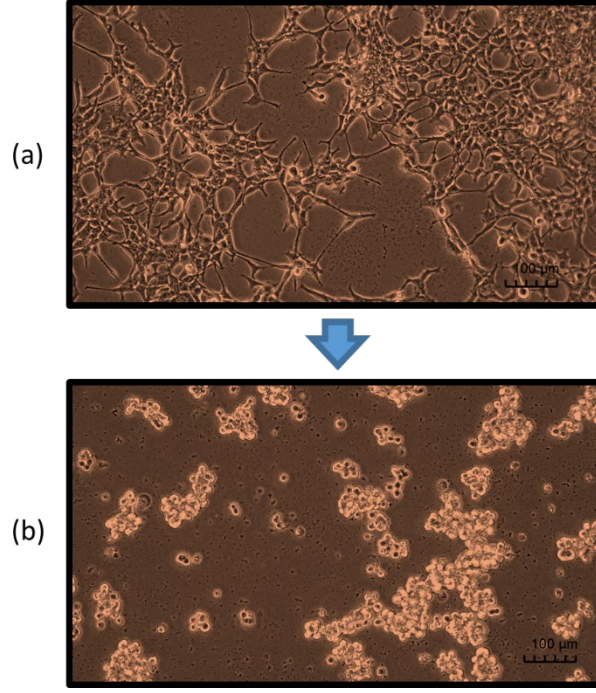
şekil 4.18. Doğrudan adaptasyon yöntemi sırasında serumlu bazal ortamda kültürlen (a) ve sonrasında tiripsinizasyon ile kaldırılıp sayıldıktan sonra süspanse flaska alınak kültürlen (b) MDCK hücrelerinin görüntüleri (10x) (Ölçek barı uzunluğu: 100µm)

Ancak bu adaptasyon yöntemiyle yapılan denemelerde kültür kapları süspanse olmasına rağmen hücrelerin 4-5 günden sonra kültür kabı yüzeyine orjinal adherent hallerindeki hücresel yayılmayı sergilemeyecek şekilde de olsa tutundukları gözlemlendi. Özellikle MDCK hücrelerinde (şekil 4.18) daha yoğun bir şekilde görülen bu tutunma CHO-K1 (şekil 4.19) ve HEK-293 (şekil 4.20) hücrelerinde de görüldü.



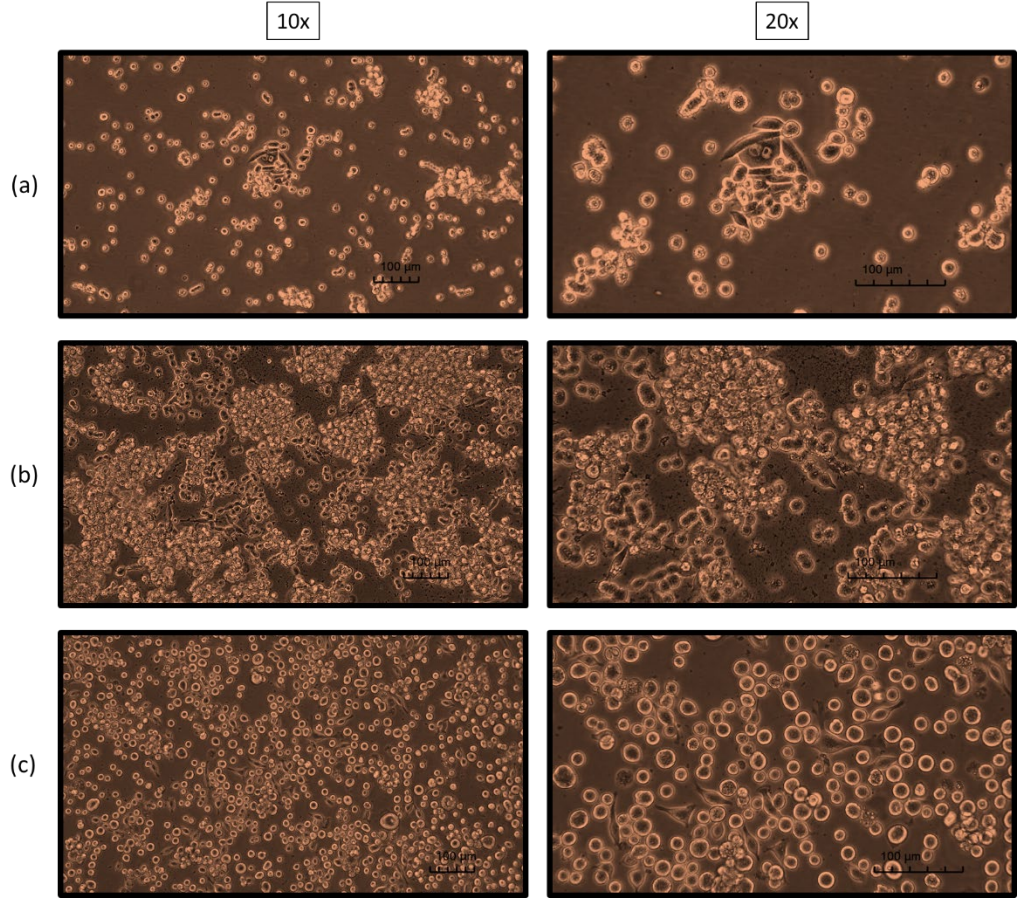
Şekil 4.19. Doğrudan adaptasyon yöntemi sırasında serumlu bazal ortamda kültürlen (a) ve sonrasında tripsinizasyon ile kaldırılıp sayıldıktan sonra süspanse flaska alınak kültürlen (b) CHO-K1 hücrelerinin görüntüleri (10x) (Ölçek çubuğu uzunluğu: 100µm)

Bununla birlikte bu tutunmanın en az gözlemlendiği hücre hattı ise HEK-293 olarak belirlendi. Özellikle kültür kabı yüzeyinin pipetaj ile yıkanması sonrasında da bu tutunan hücrelerin varlığı gözlemlendi. Bu anlamda da adaptasyon denemelerindeki pasajlamalar flaskta süspanse morfolojide kalarak kültürlen tutunmayan hücrelerin 2-4 günde bir sayılmasıyla gerçekleştirildi. Sayımlar sırasında ayrıca pH ölçümü de gerçekleştirildi ve hücre konsantrasyonunun pasajlama için yeterli olmadığı fakat pH'ın düşük olduğu gözlemlendiğinde tüm flask içeriği santrifüjlenerek taze ortam değişimi yapıldı. Pasajlamalarda özellikle adherent karakterini korumuş olan tutunan hücrelerin elimine edilmesi ve süspanse karakterde olanların tüm hücre popülasyonundan devamlı olarak seçilmesi ve bu hücre jenerasyonunun devamlılığı için her 2 pasaj sonrasında flask değişimi yapıldı.



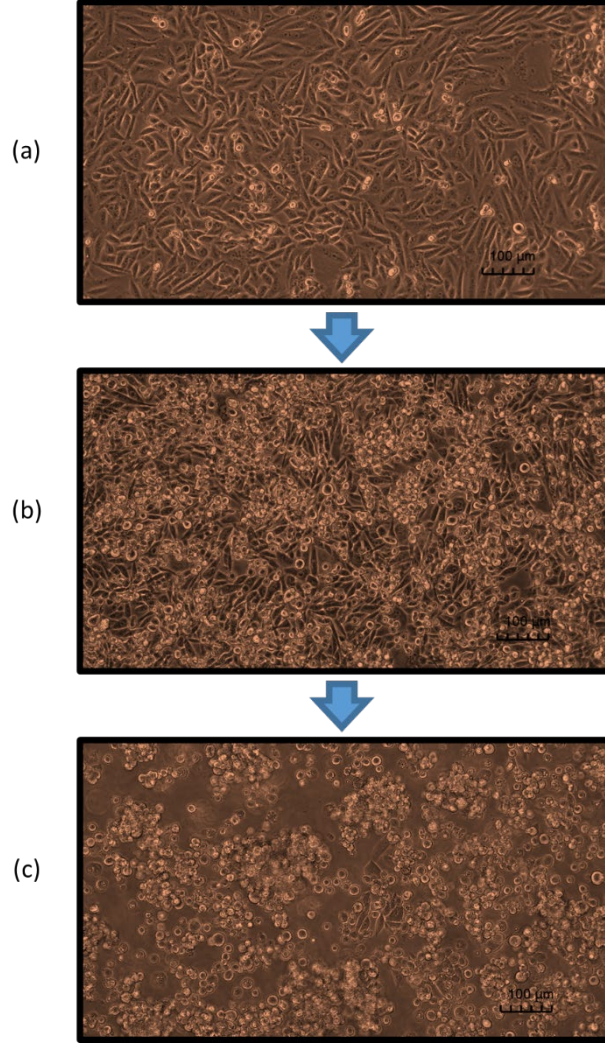
Şekil 4.20. Doğrudan adaptasyon yöntemi sırasında serumlu bazal ortamda kültürlen (a) ve sonrasında tripsinizasyon ile kaldırılıp sayıldıktan sonra süspanse flaska alınak kültürlen (b) HEK-293 hücrelerinin görüntüleri (10x) (Ölçek barı uzunluğu: 100µm)

Doğrudan adaptasyon yöntemi anlatıldığı şekilde tüm hücre hatlarının 5-8 kez pasajlanmaları boyunca devam ettirildi. Pasajlama sıklığı açısından hücre sayısının en hızlı arttığı kültürün ise HEK-293 olduğu görüldü. Özellikle 5. pasajdan itibaren tutunmayan hücrelerin sayıldığı her 2-3 günde bir hücre konsantrasyonunun pasajlama için gerekli olan konsantrasyona yakın olduğu görüldü. Bu anlamda CHO-K1 hücrelerinin de 7. pasajdan sonra HEK-293 hücrelerine benzer bir artış sergilediği belirlendi. Ancak MDCK hücrelerinin bu anlamda çok fazla tutunma eğiliminde olduğu ve bu nedenle de sadece süspanse karakterdeki hücreler sayılabildiğinden hücre konsantrasyonu diğer iki hücre hattına kıyasla oldukça düşük kaldı. Ayrıca kültürlerin günlük gözlemleri sırasında tüm hücre hatlarının yüksek oranda kümeleştiği gözlemlendi. Pasajlamalar sonunda büyük oranda adherent karakterini koruyarak tutunan hücreler elimine edilse de denemesi yapılan CHO-K1, HEK-293 ve MDCK hücrelerinin 7. pasajlamaları sonunda dahi kullanılan flask süspanse olasına rağmen tutunma eğiliminde olduğu görüldü (Şekil 4.21). Bu anlamda da kültürlenme şekli sebebiyle hücre hatlarının adapte edilmesinde daha uygun olacağı düşüncesiyle serumsuz ve süspanse karaktere adaptasyon süreci erlen çalışmalarıyla devam ettirildi.



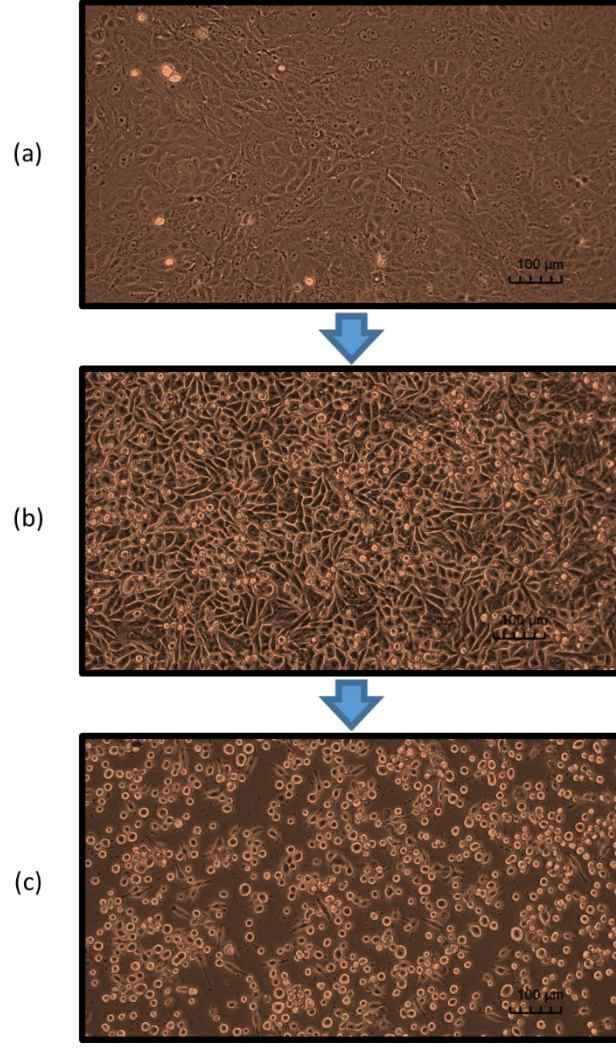
Şekil 4.21. Adaptasyon çalışmaları sırasında devamlı pasajlar sırasında adherent karakterini koruyan CHO-K1 (a), HEK-293 (b) ve MDCK (c) hücre hatlarının farklı büyütme ölçeklerindeki mikroskop görüntüleri (Sol sütun 10x, Sağ sütun 20x) (Ölçek çubuğu uzunluğu: 100µm)

Adherent karakterdeki hücrelerin adaptasyonu için denenen diğer bir yöntem ise kültür içinde adaptasyon yöntemi olup bu yöntemde tüm flask yüzeyini kaplamış hücrelerin serumlu büyütme ortamları uzaklaştırılarak bunların üzerine doğrudan serumsuz ortam eklendi. Günlük gözlemler sonucundan serumsuz ortamın eklendiği ertesi gün hücreler incelendiğinde hem CHO-K1 (Şekil 4.22) hem de MDCK (Şekil 4.23) hücrelerinin kültür kabı yüzeyinden kalkmadığı sadece hücre sınırlarının belirginleşerek hücre yayılımının azaldığı görüldü. Buna bağlı olarak da hücrelerin daha oval şekilli olduğu ve hücresel uzantıların da azaldığı gözlemlendi. Bunlarla beraber HEK-293 (Şekil 4.24) hücrelerinin ise yapılan gözlemlerinde büyük oranda tüm hücrelerin kültür kabı yüzeyinden kalktığı görüldü ancak hücrelerin tabakalar halinde flask yüzeyinden ayrıldığı gözlemlendi.



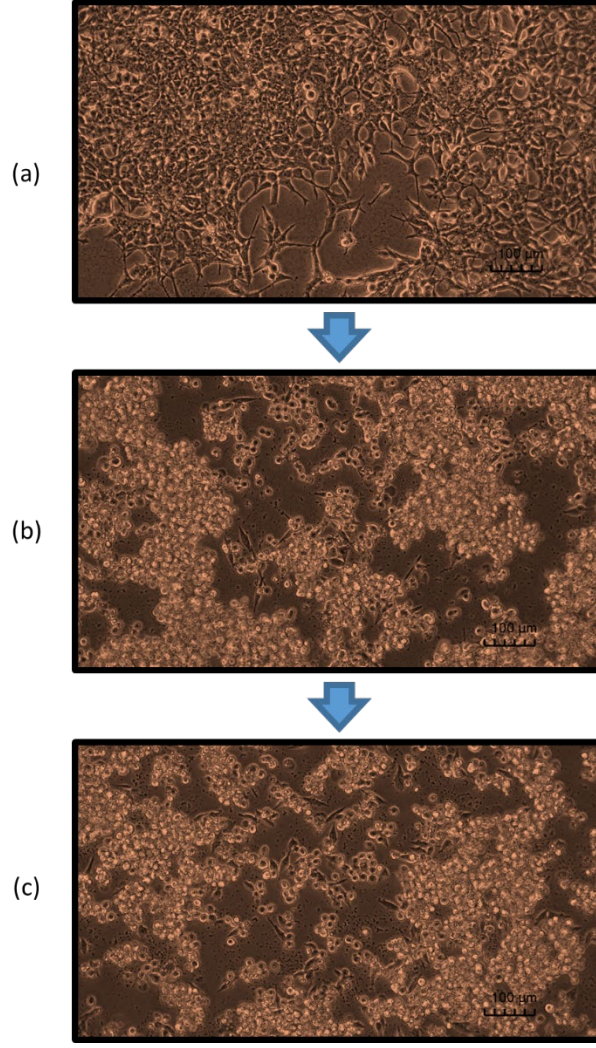
Şekil 4.22. Kültür içinde adaptasyon yöntemi sırasında serumlu bazal ortamda kültürlen (a), flask yüzeyini kaplamış olan hücrelerin üzerine IXORA ortamı eklenip 2 gün bekledikten sonraki (b) ve 2 gün sonunda tripsinizasyon ile kaldırılıp sayıldıktan sonra süspanse flaska alınak kültürlen (c) CHO-K1 hücrelerinin görüntüleri (10x) (Ölçek barı uzunluğu: 100µm)

Bu adaptasyon yönteminin gereğince hücreler serumsuz ortamda kültüre edildikten ve pH açısından ortam elverişsiz bir hale geldikten sonra tripsinizasyon ile kaldırılan hücreler alınıp sayıldı ve doğrudan adaptasyon başlangıcındaki gibi süspanse flaslara aktarıldı. Doğrudan adaptasyon kısmında anlatıldığı şekliyle günlük gözlem ve tutunmayan hücreler üzerinden sayımlar gerçekleştirildi. Burada yapılan gözlemler sonucunda ise ilerleyen pasaja rağmen hücrelerin doğrudan adaptasyon yöntemine göre daha fazla kültür kabı yüzeyine tutunma eğiliminde olduğu görüldü.



Şekil 4.23. Kültür içinde adaptasyon yöntemi sırasında serumlu bazal ortamda kültürlen (a), flask yüzeyini kaplamış olan hücrelerin üzerine CAMELLIA ortamı eklenip 2 gün bekleddikten sonraki (b) ve 2 gün sonunda tripsinizasyon ile kaldırılıp sayıldıktan sonra süspanse flaska almak kültürlen (c) MDCK hücrelerinin görüntüleri (10x) (Ölçek barı uzunluğu: 100µm)

Özellikle MDCK ve CHO-K1 hücre hatlarında bu durumun daha belirgin bir şekilde gerçekleştiği belirlendi. Bu yöntem ile yapılan adaptasyonda tüm hücre hatlarında hücre kümelerinin çok daha yoğun olduğu ve bunların kültür içerisinde pipetaj veya pasajlama işlemleri gibi kümelerin dağılmasını sağlayan işlemlerde bile devamlılığının sürdüğü gözlemlendi. HEK-293 hücreleri bu yöntemle de diğer iki hücre hattına kıyasla süspanse karaktere daha kolay geçiş gösterse de doğrudan adaptasyon yönteminde ilerleyen pasaj sayısı ile beraber hızlanan bu geçişin hücre sayımları, tutunma, kümeleşme ve kümelerin büyüklüğü sebebiyle burada daha yavaş gerçekleştiği görüldü.



Şekil 4.24. Kültür içinde adaptasyon yöntemi sırasında serumlu bazal ortamda kültürlen (a), flask yüzeyini kaplamış olan hücrelerin üzerine ORCHID-P ortamı eklenip 2 gün bekledikten sonraki (b) ve 2 gün sonunda tiripsinizasyon ile kaldırılıp sayıldıktan sonra süspanse flaska alınak kültürlen (c) HEK-293 hücrelerinin görüntüleri (10x) (Ölçek barı uzunluğu: 100µm)

Gerçekleştirilen iki adaptasyon yönteminin de hücrelerin serumsuz ve süspanse koşullara adapte edilmesinde başarılı olduğu görüldü. Ancak bahsedilen kriterler üzerinden bir değerlendirme yapıldığında, süspanse karaktere adaptasyonda hedefle yönelik daha iyi sonuçlar vermesi nedeniyle erlen çalışmalarına sadece doğrudan adaptasyon yöntemiyle adapte edilmeye başlanan kültürler ile devam edilmesine karar verildi.

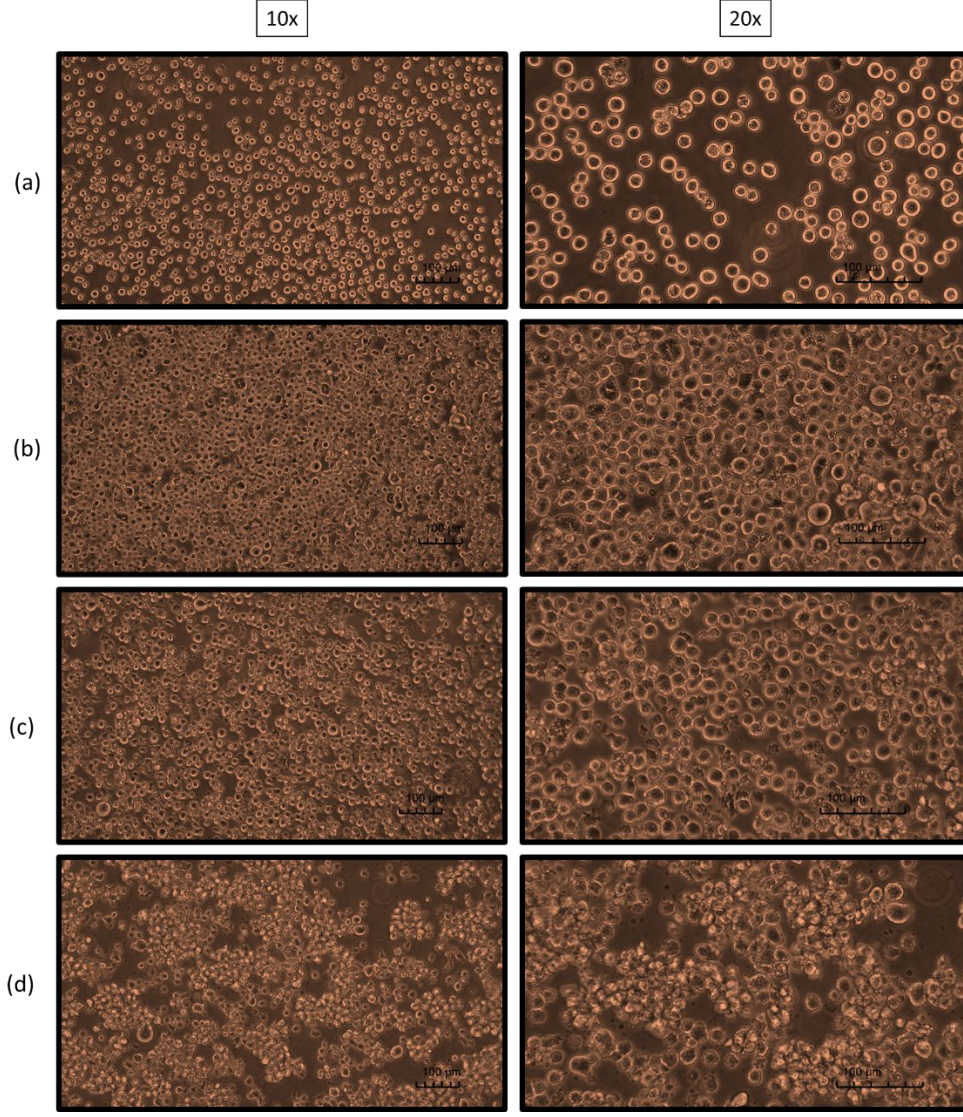
Büyük ölçek çalışmalarının öncesinde 4 farklı hücre hattının hem serumsuz hem de adherent karakterde olanlar için bunların süspanse koşullara adaptasyonu süspanse flask ve devamında erlen çalışmalarıyla gerçekleştirildi. Bu çalışmalarda

özellikle THP-1 hücreleri açısından hücrenin orijinal karakteri süspanse olduğu için adaptasyon süreci flask aşamasından itibaren rahatlıkla gerçekleştirilse de adherent karakterde olan hücre hatlarında bu süreç hücrenin üreme karakterinin değiştirilmesini de içerdiğinden daha uzun sürdüğü gözlemlendi. Bu çalışma kapsamında adaptasyondan itibaren büyük ölçekte üretime geçişte endüstride en önemli parametrelerden biri olan zamanı değerlendirmek adına belirli bir pasaj sayısına ulaşana kadar geçen süre temel alındı. Hücrelerin farklı kültür koşullarına adapte edilmesinde orijinal hücre karakterinin istenilen koşula adapte edikten sonra yeni karakterinin stabil hale gelmesi için gerekli olan 5-20 pasaj sayısı aralığı göz önüne alınarak tüm hücre hatlarının orijinal halinden itibaren flaskta ve devamında yapılan erlendeki adaptasyon çalışmalarında hücrelerin serumsuz ortamda süspanse olarak devam ettirildiği ilk 15 pasaj süresi boyunca geçen zaman belirlendi.

Tablo 4.1 Hücre hatlarının adapte edilmek istenen koşullarda 15 kez pasajlanmaları için geçen süre

	Hücre Hattı			
Hücrelerin Serumsuz Ortamda Süspanse Olarak 15 Kez Pasajlanmaları Sırasında Geçen Süre	MDCK	CHO-K1	HEK-293	THP-1
	114 gün	68 gün	76 gün	51 gün

Gerçekleştirilen adaptasyon çalışmaları sırasında tüm hücre hatlarının adapte edilmek istenilen koşullarda kültürlenmesinde ilk 15 pasaj sayısına kadar ulaşılan süreler bakıldığında tüm hücre hatları içerisinde THP-1 hücre hattının en kısa sürede 15 pasajlanma sayısına ulaştığı görüldü (Tablo 4.1). Bununla birlikte orijinalinde adherent karakterde olanlar kendi içinde değerlendirildiğinde ise bu açıdan en kısa sürede belirlenen pasaj sayısına ulaşan hücre hattının CHO-K1 olduğu belirlendi. Adherent karakterde olan hücreler arasından belirlenen pasaj sayısına en uzun sürede ulaşan hücre hattının ise MDCK olduğu görüldü. Bu süre sonunda ise tüm hücre hatlarının ve özellikle orijinalinde adherent karakterde olanların süspanse karakterlerinin stabil hale gelerek serumsuz ortamda çoğalabilme özelliği kazandığı gözlemlendi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Adaptasyon çalışmalarında 15 pasaj sayısına ulaşmış MDCK (a), CHO-K1 (b), HEK-293 (c) ve THP-1 (d) hücre hatlarının farklı büyütme ölçeklerindeki mikroskop görüntüleri (Sol sütun 10x, Sağ sütun 20x) (Ölçek çubuğu uzunluğu: 100μm)

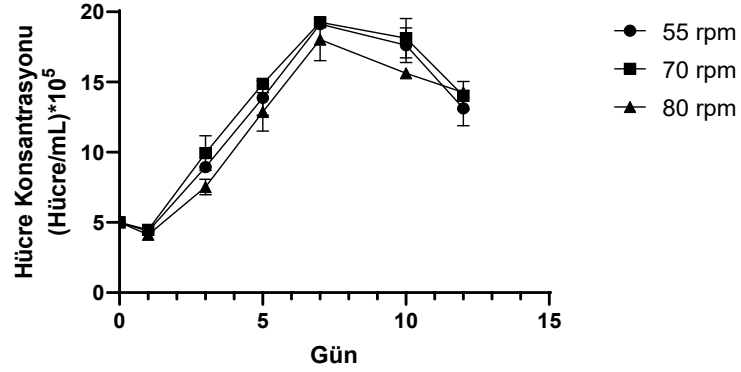
4.3 Ölçek Büyütme Çalışmaları

Bu tez kapsamında yapılan ölçek büyütme çalışmalarının ilk basamağı ve özellikle de süspanse karaktere adaptasyon çalışmalarının devamı olarak erlen ve spinner flask üretimleri gerçekleştirilmesinin ardından sırasıyla spinner flask ve karıştırmalı tank biyoreaktöründe üretimler gerçekleştirildi. Erlen ve spinner flask üretimlerinde her bir hücre hattı için literatürden bulunan değer aralıklarında denemeler yapıldı. Bu denemeler ise alınan günlük örneklerin sayımı ve mikroskop gözlemleri üzerinden değerlendirilerek en iyi karıştırma hızları seçildi. Daha sonra spinner flask

çalışmalarında seçilen karıştırma hızları üzerinden spesifik güç girişi hesabı yapılarak biyoreaktör ölçeğindeki üretimler, hesaplanan karıştırma hızı değerleri kullanılarak gerçekleştirildi.

4.3.1 THP-1 hücre hattının ölçek büyütme çalışmaları

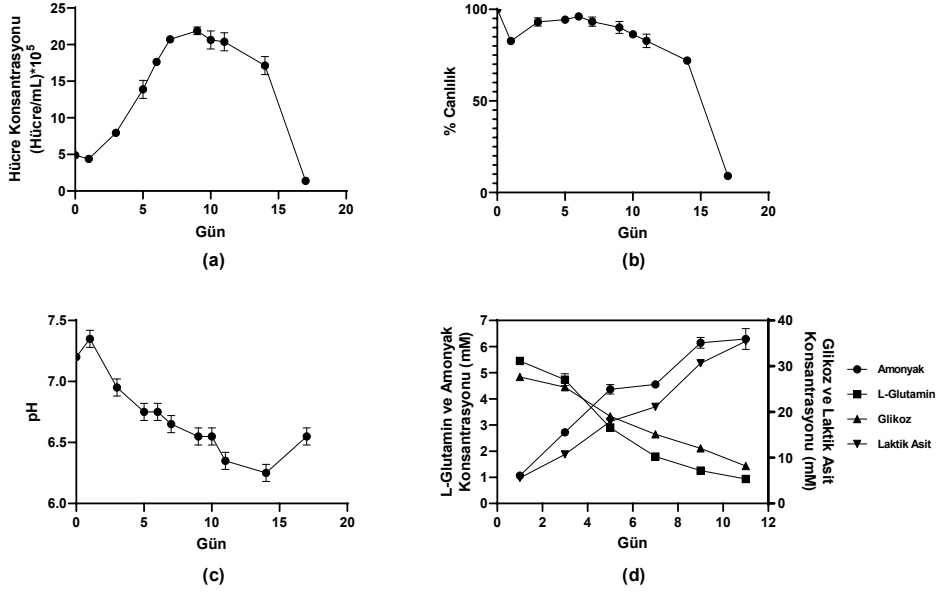
Halihazırda süspanse karakterde ve serumsuz PROM-152 ortamına adapte edilmiş olan THP-1 hücreleriyle denemeler yapıldı. THP-1 hücrelerinin kültürlenmesi için PROM-152 ortamı kullanılarak 55, 70 ve 80 rpm değerleri denendi. Bu denemelerde 5×10^5 hücre/mL ile başlatılan erlen üretimlerinden günlük olarak alınan örneklerdeki hücre konsantrasyonu üzerinden değerlendirildi.



Şekil 4.26. Erlen üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenen THP-1 hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler

Gerçekleştirilen denemeler sonucunda THP-1 hücrelerinin 55, 70 ve 80 rpm karıştırma hızlarının gün bazında hücre konsantrasyonları Tukey testiyle değerlendirildiğinde anlamlı bir fark olmadığı ($P>0,05$) görüldü. Ancak yapılan mikroskop gözlemleri sonucunda 70 rpm karıştırma hızında hücre kümelerinin daha az olduğu ve hücrelerin daha homojen bir morfolojiye sahip olduğu görüldü. Bu nedenle THP-1 hücreleriyle yapılan erlen üretimlerinde 70 rpm karıştırma hızının kullanılmasına karar verildi (Şekil 4.26). THP-1 hücrelerinin birkaç kez bu karıştırma hızında pasajları yapılarak hücrelerin dinamik kültür koşullarına alışması sağlandı. Daha sonrasında ise THP-1 hücrelerinin erlendeki üreme karakterlerinin belirlenmesi adına farklı başlangıç hücre konsantrasyonlarıyla denemeler yapıldı ve bunlar arasından en iyi sonucun 5×10^5 hücre/mL ile başlatılan kültürün verdiği görüldü. Bunun altındaki başlangıç değerlerinde hücre büyümesinin çok yavaş

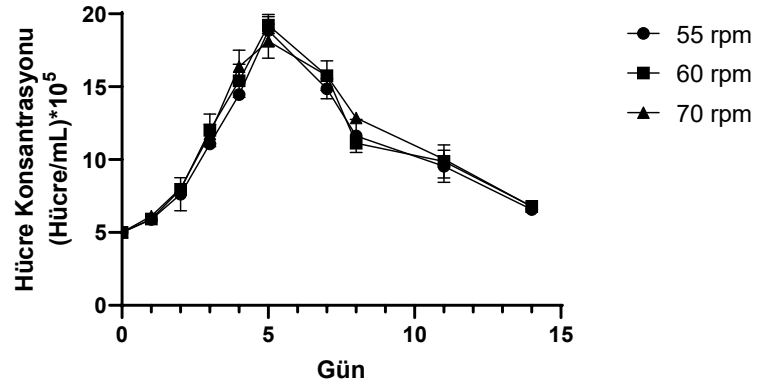
gerçekleştiği ve erlen denemelerinde ulaşılan maksimum konsantrasyonu değerlerinin çok altında kalan hücre konsantrasyonlarına ancak ulaşabildiği görüldü. Bu nedenle erlende üreme kinetiği belirlenmesi için bu konsantrasyonda başlatılan büyüme kinetiği başlatıldı. Büyüme kinetiği süresince pH ve % canlılık değerleri de takip edildi.



Şekil 4.27. THP-1 hücrelerinin erlen üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler

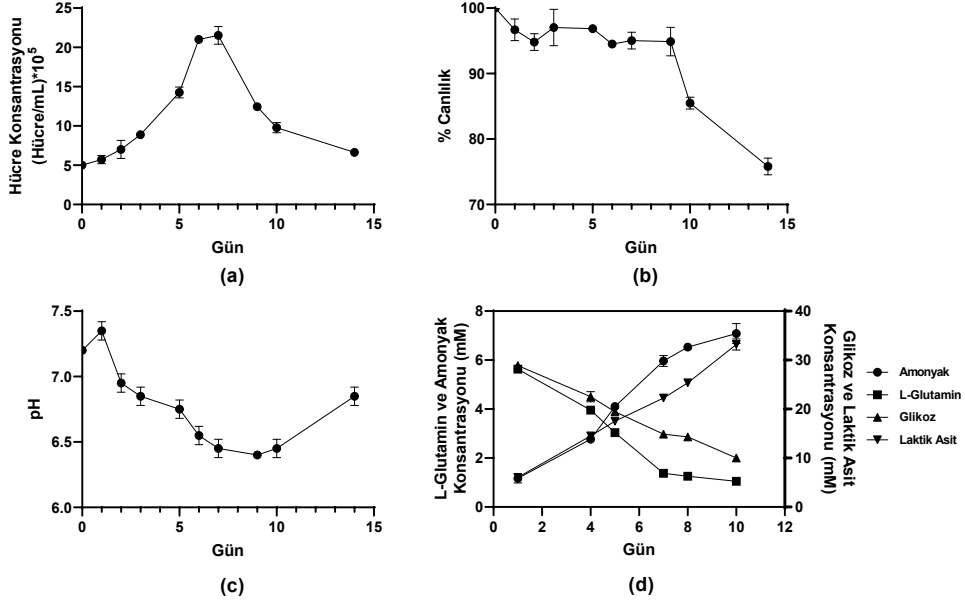
Gerçekleştirilen büyüme kinetiği çalışmasında THP-1 hücrelerinin en yüksek hücre konsantrasyonuna 9. günde ulaştığı ve bu değerin $2,187 \pm 0,053 \times 10^6$ hücre/mL olduğu görüldü. Ayrıca yapılan büyüme kinetiği üzerinden de serumsuz ortama adapte edilmiş THP-1 hücrelerinin erlendeki t_d değeri $64,17 \pm 0,118$ saat olarak hesaplandı. Erlende yapılan büyüme kinetiği sırasında toplanan örneklerden gerçekleştirilen metabolit ölçümlerinde de artan hücre konsantrasyonuna ters olarak glukoz ve L-glutamin bileşenlerinin azaldığı, laktik asit birikimiyle de pH değerinin düştüğü görüldü. Ayrıca, THP-1 hücrelerinin RPMI-1640 bazal ortamında üretildiği büyüme kinetiğine kıyasla THP-1 hücrelerinin glukoz ve L-glutamini çok daha hızlı bir şekilde kullandığı ve bunun paralelinde özellikle atık metabolit konsantrasyonların da daha fazla arttığı gözlemlendi (Şekil 4.27).

Daha sonra spinner flask çalışmalarına geçildi ve erlen çalışmasına benzer şekilde farklı karıştırma hızlarında denemeler yapıldı. Bu denemeler sonucunda denenen 55, 60 ve 70 rpm karıştırma hızlarında hücre konsantrasyonu açısından Tukey testine göre oldukça benzer sonuçlar elde edildi. Ancak, hem ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu hem de mikroskop ile yapılan günlük gözlemler sonucunda hücrelerin daha homojen dağılım gösterdiği belirlendiğinden spinner çalışmalarına 60 rpm karıştırma hızı ile devam edildi (Şekil 4.28).



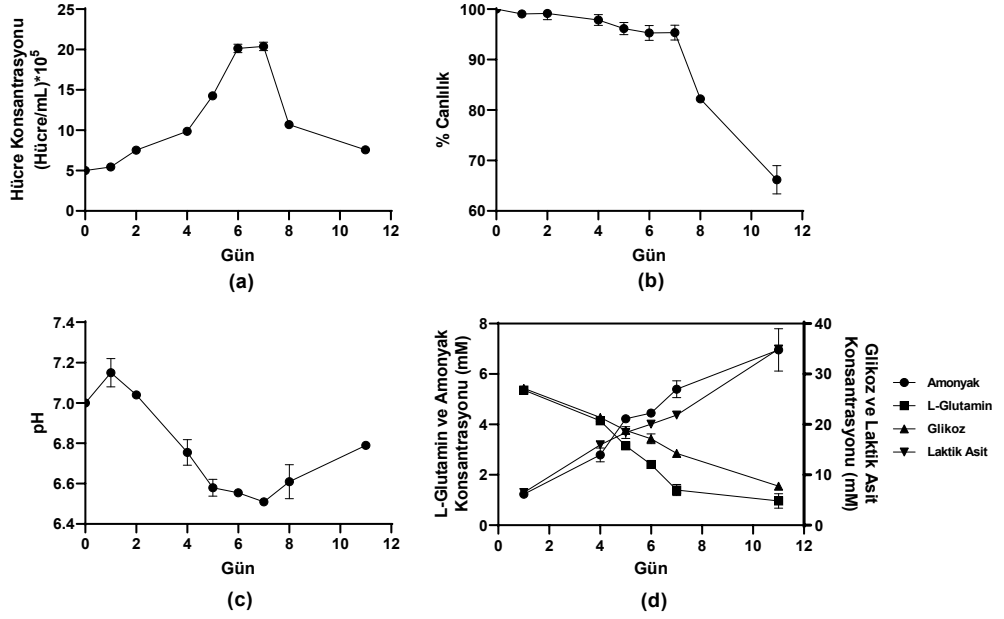
Şekil 4.28. Spinner flask üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenen THP-1 hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler

THP-1 hücreleri için karıştırma hızının belirlenmesinin ardından hücreler bu hızda 3-4 kez pasajlandıktan sonra spinner flask için büyüme kinetiği kuruldu. Yapılan büyüme kinetiğinde 7. günde $2,152 \pm 0,112 \times 10^6$ hücre/mL olan maksimum hücre konsantrasyonuna ulaşılmış olup t_d değeri ise $63,96 \pm 0,045$ saat olarak hesaplandı. Bununla beraber yapılan metabolit ölçümlerinin de erlen üretimine benzer şekilde zamanla artan hücre konsantrasyonuna bağlı olarak tüm metabolitlerin benzer bir eğilim gösterdiği görüldü (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. THP-1 hücrelerinin spinner flask üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler

Ölçek büyütme işlemlerinin devamında spinner flaskta 60 rpm karıştırma hızında büyüme kinetiği çıkartılan THP-1 hücrelerinin biyoreaktör üretimleri gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle 60 rpm karıştırma hızı temel alınarak biyoreaktördeki karıştırma hızı 90 rpm olarak hesaplandı. Sonrasında spinner ve erlen çalışmalarında belirlenen başlangıç hücre konsantrasyonu temel alınarak biyoreaktörde büyüme kinetiği başlatıldı.



Şekil 4.30. THP-1 hücrelerinin karıştırılmalı tank biyoreaktöründeki üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler

Biyoreaktörde gerçekleştirilen büyüme kinetiği sonucuna göre THP-1 hücreleri 7. günde $2,037 \pm 0,053 \times 10^6$ hücre/mL olarak maksimum hücre konsantrasyonuna ulaştı. Ayrıca, büyüme kinetiğinin logaritmik fazı üzerinden hesaplanan t_d ise $63,56 \pm 0,49$ saat olarak bulundu. Bunlarla beraber kültürün % canlılığının maksimum hücre konsantrasyonuna ulaşılan 7. günden itibaren düşmeye başladığı ve pH' ın da özellikle artan hücre konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı fakat 6,5 değerinin altına düşmediği gözlemlendi. Kültürün canlılığının düştüğü günlerde de bu düşüşe paralel şekilde pH' taki düşmenin yavaşladığı ve kültür sonuna doğru da pH değerinde yükselişin gerçekleştiği görüldü (Şekil 4.30). Ayrıca gerçekleştirilen metabolit analizlerine bakıldığında da erlen, spinner flask ve biyoreaktör sistemlerinin gün bazında gerçekleşen metabolit değişimlerinin benzerlik gösterdiği görüldü.

Yapılan çalışmalar kapsamında ise hem THP-1 hücresinin orijinal hali hem de büyüme kinetiği çalışmalarının yapıldığı bütün dinamik sistemlerde ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu ve ikilenme süresi üzerinden değerlendirildiğinde ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonları arasında hiçbir anlamlı farkın olmadığı ($P > 0,05$) görüldü. Bununla birlikte ikilenme süreleri

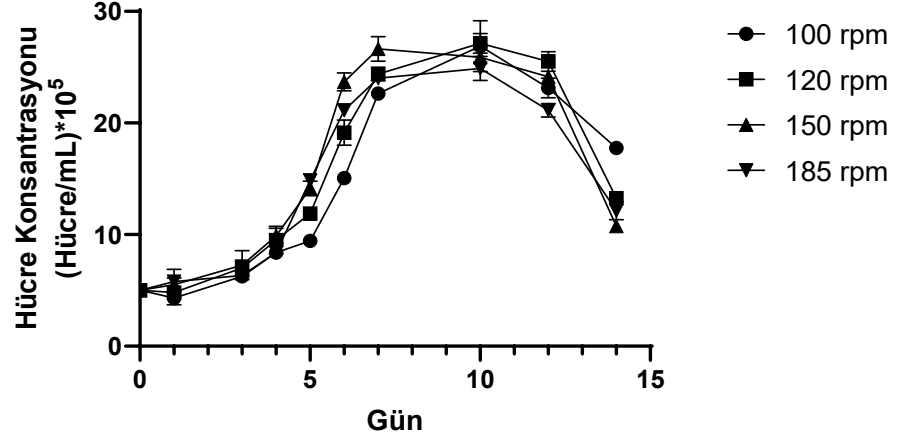
kıyaslandığında ise erlen, spinner ve biyoreaktör sonuçları arasında yine hiçbir anlamlı fark bulunmazken THP-hücrelerinin orijinal haliyle adapte edilmiş haliyle yapılan üretimlerde oldukça anlamlı ($P<0,0001$) bir fark görüldü (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. THP-1 hücre hattıyla yapılan çalışmalarda hücrenin hem orijinal hem de adapte edilmiş haliyle farklı üretim sistemlerinde yapılmış olan üreme kinetiklerinden elde edilen maksimum hücre konsantrasyonu ve ikilenme süresi değerleri

Kültür şekli	Karıştırma hızı (rpm)	Ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu x 10 ⁶ (hücre/mL)	İkilenme süresi (t _d) (saat)
Orjinal	Statik	1,922 ± 0,091	48,95 ± 0,42
Erlen	70 rpm	2,187 ± 0,053	64,17 ± 0,118
Spinner	60 rpm	2,152 ± 0,112	63,96 ± 0,045
Biyoreaktör	90 rpm	2,037 ± 0,053	63,56 ± 0,49

4.3.2 CHO-K1 hücre hattının ölçek büyütme çalışmaları

Flasklarda hem serumsuz hem de süspanse karaktere adapte edilmeye çalışılan CHO-K1 hücreleriyle yapılan adaptasyon çalışmalarının devamı olarak CHO-K1 hücreleri 120 rpm’ de 5-7 pasaj boyunca devam ettirildi. Hücrelerin süspanse karaktere adapte olması için gerçekleştirilen bu üretimlerden sonra hücrelerin kültürlenmesi için en uygun karıştırma hızının belirlenmesi için deney setleri kuruldu. Bunun için bir süre erlende pasajlanarak süspanse üreme karakteri kazandırılan CHO-K1 hücre hattıyla başlangıç hücre konsantrasyonu 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 100, 120, 150 ve 185 rpm karıştırma hızlarında erlen üretimleri gerçekleştirildi.

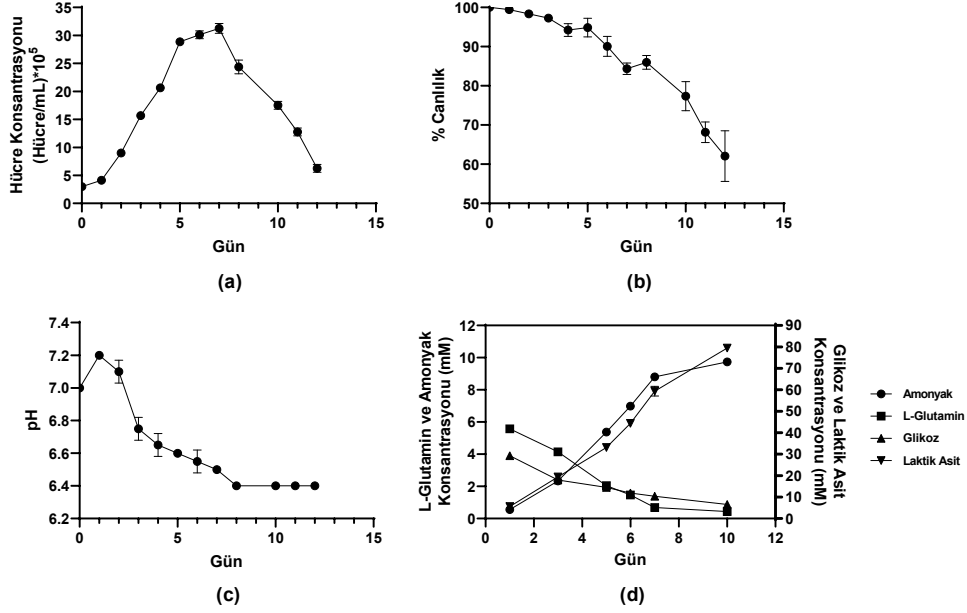


Şekil 4.31. Erlen üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenen CHO-K1 hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler

Yapılan kıyaslama sonucunda tüm karıştırma hızları yine Tukey testi üzerinden karşılaştırıldı. Bu teste göre özellikle hücre konsantrasyonunun maksimum sayılara ulaştığı 6. ve 7. günlerde 150 rpm karıştırma hızının tüm deney seti gruplarına göre daha iyi olduğu görüldü. Bu nedenle CHO-K1 hücreleriyle yapılan erlen çalışmalarına bu karıştırma hızıyla devam edildi (Şekil 4.31). Birkaç pasaj boyunca bu karıştırma hızlarında pasajlanan CHO-K1 hücreleriyle daha sonra farklı hücre konsantrasyonlarında büyüme kinetiği kuruldu. Bu konsantrasyonlar arasından CHO-K1 hücreleri için bütün hücresel büyüme fazlarının en iyi şekilde belirlenebildiği ve erlen karıştırma hızı denemelerindeki maksimum hücre konsantrasyonuna yakın bir değere ulaşıldığı için başlangıç hücre konsantrasyonu 3×10^5 hücre/mL olarak seçildi.

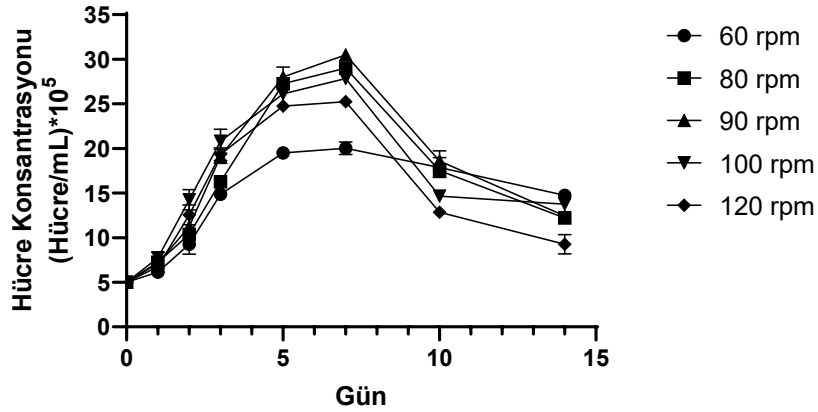
Buna göre kurulan erlen büyüme kinetiği sonuçlarına göre kültür 7. günde $3,125 \pm 0,088 \times 10^6$ hücre/mL konsantrasyonuna ulaştı. Bu açıdan adherent CHO-K1 kültürünün de aynı günde maksimum hücre konsantrasyonuna ulaşması açısından iki kültürün benzediği görüldü. Bununla birlikte büyüme kinetiğinin logaritmik fazının başlangıcı ve bitişi olarak belirlenen 1. ve 5. günler üzerinden t_d $34,21 \pm 0,427$ saat olarak belirlendi. Özellikle kültürün 3. gününe gelindiğinde pH değerinin çok hızlı bir şekilde düştüğü ve bu pH düşüşüne paralel şekilde % canlılığında düşmeye başladığı gözlemlendi. Metabolit analizlerine de bakıldığında laktik asit birikimiyle pH' ın düştüğü, hücre konsantrasyonu artışıyla da glikoz ve L-glutamin değerlerinin düştüğü görüldü (Şekil 4.32). Ayrıca CHO-

K1 hücrelerinin adherent halleri ile adapte edilmiş hallerinin hem ilerleyen kültür süresine göre canlılıkları hem de laktik asit üretimi açısından benzerlik gösterdiği belirlendi.



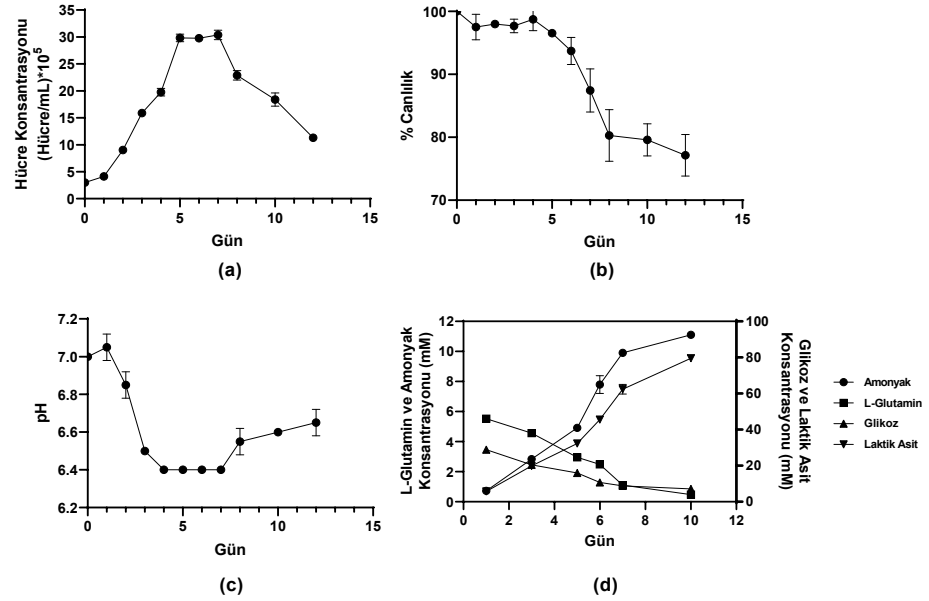
Şekil 4.32. CHO-K1 hücrelerinin erlen üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler

Daha sonrasında CHO-K1 hücreleriyle spinner flask denemelerini gerçekleştirmek üzere farklı karıştırma hızlarında CHO-K1 hücreleri spinner flasklarda kültürlendi. Bunun için 5x10⁵ hücre/mL başlangıç konsantrasyonu ile 60, 80, 90, 100 ve 120 rpm hızlarında üretimler gerçekleştirilerek bunlar kıyaslandı.



Şekil 4.33. Spinner flask üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenen CHO-K1 hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler

Gerçekleştirilen denemelerde 5 farklı karıştırma hızı denenmiş olup tüm bunlar Tukey testi ile kıyaslandığında özellikle anlamlı olarak 80 ve 90 rpm karıştırma hızlarının kültürlerin maksimuma ulaştığı 5. ve 7. günlerde diğer karıştırma hızlarına kıyasla çok daha yüksek konsantrasyon değerlerine çıkabildikleri görüldü (Şekil 4.33). Aynı zamanda yapılan testte 80 ve 90 rpm karıştırma hızları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı ($P>0,05$) belirlendi. İki karıştırma hızının da yapılan mikroskop gözlemlerinde özellikle 90 rpm karıştırma hızındaki örneklerin çok daha homojen morfolojide olduğu ve yoğun bir kümeleşme eğilimine sahip olan CHO-K1 hücre hattının oluşturduğu bu kümeleri daha iyi dağıttığı gözlemlendi. Bu sebeple de CHO-K1 ile gerçekleştirilen spinner flask çalışmalarında 90 rpm karıştırma hızı tercih edildi. Bu doğrultuda bu karıştırma hızında birkaç kez pasajlanan süspanse ve serumsuz ortama adapte edilmiş CHO-K1 hücrelerinin erlen denemelerinde belirlenen başlangıç konsantrasyonu büyüme kinetiği çalışmasına başlandı.

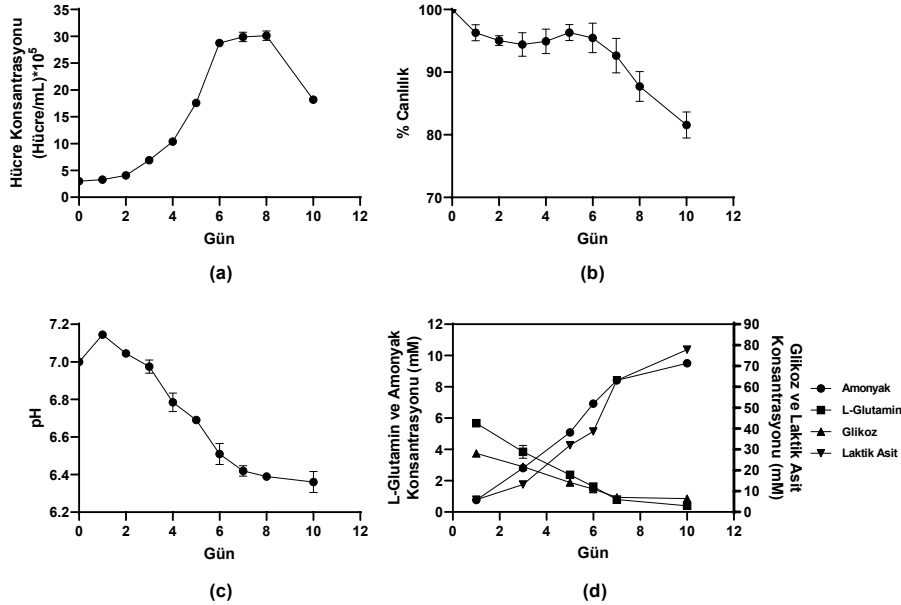


Şekil 4.34. CHO-K1 hücrelerinin spinner flask üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler

Gerçekleştirilen spinner büyüme kinetiği sonucunda erlen üretimine benzer şekilde bir büyüme eğrisi görüldü. Erlen üretimlerinde olduğu gibi kültürün 7. günde $3,037 \pm 0,048 \times 10^6$ hücre/mL değerinde maksimum hücre konsantrasyonuna

ulaştığı gözlemlendi. Spinner flaskta çıkartılan büyüme kinetiği sonucunda hesaplanan t_d değeri ise $33,64 \pm 1,06$ saat olarak belirlendi. Aynı zamanda kültürün % canlılık ve pH değerlerine bakıldığında da pH değerinin çok hızlı bir şekilde azaldığı ve 4. günden itibaren 6,4'e düştüğü gözlemlendi. Kültürün % canlılığı ise azalan hücre konsantrasyonuna paralel bir şekilde düşme eğilimi gösterdiği görüldü. Yapılan metabolit ölçümlerinde erlen üretimine benzer şekilde de hızla artan hücre konsantrasyonuna paralel olarak laktik asit ve amonyak miktarlarının artış gösterdiği, glikoz ve L-glutamin miktarlarında da azalmanın meydana geldiği görüldü (Şekil 4.34). Bununla birlikte erlen üretimindeki metabolit profiliyle kıyaslandığında spinner flask daha yüksek amonyak değerlerine ulaşsa da diğer tüm metabolitlerin değişimi yönünden iki sistemin oldukça benzer olduğu belirlendi.

Spinner flaskta gerçekleştirilen denemelerin ardından en iyi karıştırma hızı olarak belirlenen 90 rpm değeri üzerinden de spesifik güç girişi hesabı yapıldı ve bu hesaba göre CHO-K1 hücreleri için karıştırılmalı tank biyoreaktörde üretimde uygulanacak karıştırma hızı 130 rpm olarak belirlendi. Buna uygun olarak da başlangıç hücre konsantrasyonu erlen ve spinner flask çalışmalarıyla aynı olacak şekilde CHO-K1 hücrelerinin biyoreaktörde büyüme kinetiği çıkartıldı.



Şekil 4.35. CHO-K1 hücrelerinin karıştırılmalı tank biyoreaktöründeki üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler

CHO-K1 hücreleriyle gerçekleştirilen biyoreaktör üretimleri sonucunda günlük olarak hücre konsantrasyonlarına bakıldığında hücrelerin erlen ve spinner flastaki gibi ilk andan itibaren hızlı bir artış içerisinde olmadığı, bu artışın 2. günden itibaren gerçekleştiği gözlemlendi. Maksimum hücre konsantrasyonunun $3,012 \pm 0,088 \times 10^6$ hücre/mL olarak 8. günde erişildiği görülen biyoreaktör sisteminin t_d değeri de $34,06 \pm 0,865$ saat olduğu hesaplandı. Özellikle logaritmik fazın başlangıcından itibaren pH değerinde hızlı bir düşüş görülmeye başladığı ve 6. günden sonra da pH değerlerinin sürekli 6,4 değerlerinde kaldığı görüldü. Ancak, pH değerindeki bu yüksek düşüş eğilimine rağmen CHO-K1 hücrelerinin % canlılıklarının yüksek olduğu gözlemlendi. Gerçekleştirilen metabolit analizlerinden de kültürde zamanla artan laktik asit miktarına paralel şekilde pH değerinin zamanla azaldığı, buna rağmen ilerleyen kültür sürelerinde de hücrelerin canlılık açısından aktif oldukları ve besin ortamındaki ana bileşenlerden olan glikoz ile L-glutamini kullandığı belirlendi (Şekil 4.35). Özellikle biyoreaktör üretiminde diğer iki dinamik sisteme kıyasla daha az laktik asit üretiminin meydana geldiği görüldü. Ayrıca amonyak üretimi açısından da erlen ve biyoreaktör değerlerinin çok daha fazla benzerlik gösterdiği saptandı. Bununla birlikte erlen, spinner ve biyoreaktörde yapılan her bir üretime bakıldığında hepsinin tüm kültür parametreleri açısından benzerlik gösterdiği görülmektedir.

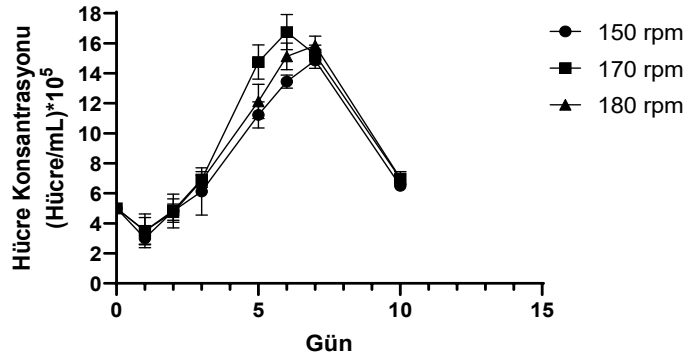
CHO-K1 hücre hattıyla yapılan üretimlerde büyüme kinetiğinin yapıldığı bütün sistemler, ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu ve ikilenme süresi üzerinden Tukey testi ile değerlendirildi. Buradan elde edilen sonuçlarda erlen, spinner ve biyoreaktörde ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonları arasında hiçbir anlamlı farkın olmadığı ($P>0,05$) görüldü. Bununla birlikte orijinal kültür ile tüm dinamik kültür sistemleri arasında maksimum hücre konsantrasyonu açısından küçük de olsa anlamlı ($P<0,05$) bir farkın olduğu gözlemlendi. İkilenme süresi açısından bakıldığında da tüm dinamik üretim sistemleri arasında da hiçbir anlamlı farkın olmadığı gözlemlendi. Ancak adapte edilerek dinamik kültür sistemlerinde büyüme kinetiği çıkartılan CHO-K1 hücreleriyle orijinal halinin ikilenme süresi üzerinden kıyaslaması yapıldığında aralarında istatistiksel açıdan büyük ($P<0,001$) bir fark olduğu görüldü (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. CHO-K1 hücre hattıyla yapılan çalışmalarda hücrenin hem orijinal hem de adapte edilmiş haliyle farklı üretim sistemlerinde yapılmış olan üreme kinetiklerinden elde edilen maksimum hücre konsantrasyonu ve ikilenme süresi değerleri

Kültür şekli	Karıştırma hızı (rpm)	Ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu $\times 10^6$ (hücre/mL)	İkilenme süresi (t_d) (saat)
Orjinal	Statik	$3,574 \pm 0,16$	$23,22 \pm 0,64$
Erlen	150 rpm	$3,125 \pm 0,088$	$34,21 \pm 0,427$
Spinner	90 rpm	$3,037 \pm 0,048$	$33,64 \pm 1,06$
Biyoreaktör	130 rpm	$3,012 \pm 0,084$	$34,06 \pm 0,865$

4.3.3 MDCK hücre hattının ölçek büyütme çalışmaları

Flasklar içerisinde gerçekleştirilen adaptasyon çalışmalarında yüksek oranda adherent karakterini koruyan MDCK hücrelerinin erlen çalışmaları başlangıcında hücreler 150 rpm karıştırma hızında birkaç kez pasajlandıktan sonra karıştırma hızı denemelerine başlandı. Bunun için 5×10^5 hücre/mL başlangıç konsantrasyonunda 150, 170 ve 180 rpm karıştırma hızlarında erlen denemeleri gerçekleştirildi.

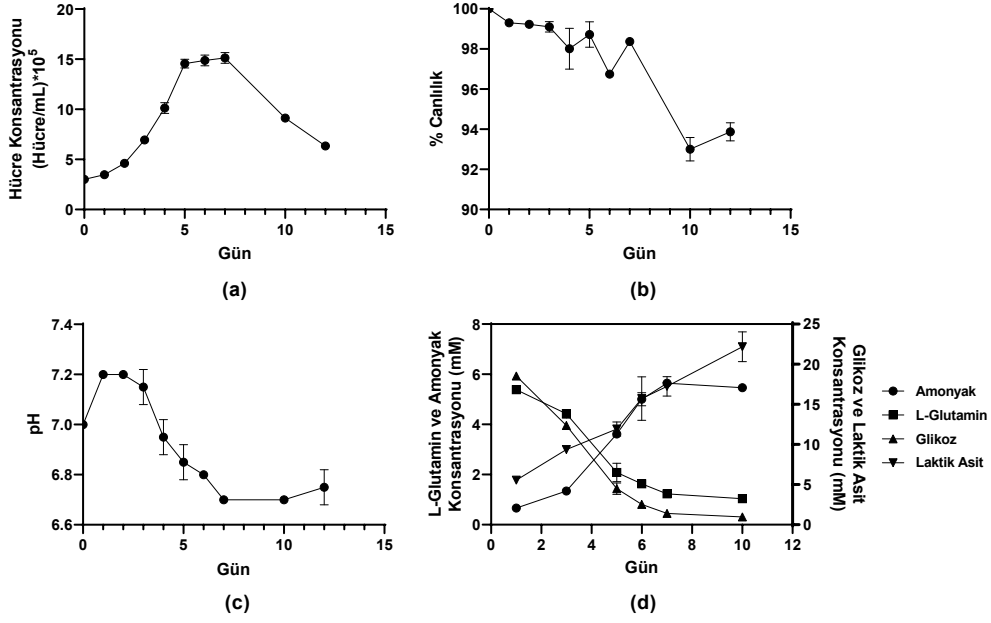


Şekil 4.36. Erlen üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenen MDCK hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler

Gerçekleştirilen denemeler sonunda her bir karıştırma hızının yapılan sayımlar sonucunda ilgili gündeki hücre konsantrasyonları üzerinden analiz edildiğinde 5. günde 170 rpm karıştırma hızının ulaştığı hücre konsantrasyonu

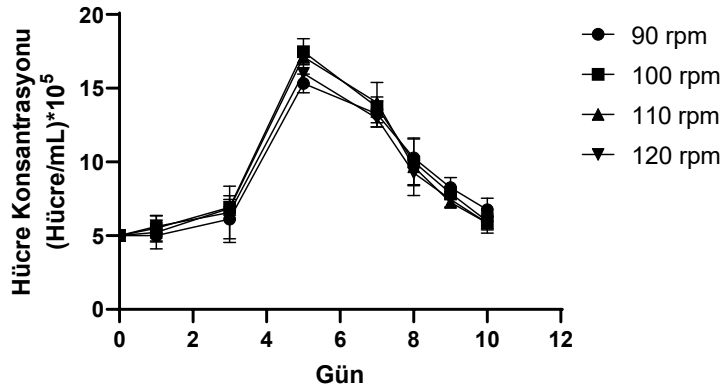
değerinin 150 rpm ($P < 0,001$) ve 180 rpm' e ($P < 0,01$) kıyasla istatistiksel açıdan farklı olduğu görüldü. Bu nedenle de daha kısa bir sürede daha yüksek konsantrasyonuna ulaşabildiği görüldüğünden MDCK hücrelerinin erlen çalışmalarında 170 rpm karıştırma hızının uygulanmasına karar verildi (Şekil 4.36). Bununla beraber sayımlar sırasında da yapılan incelemelerde 150 rpm karıştırma hızında hücrelerin yüksek oranda kümeleştiği görülürken 170 ve 180 rpm hazırlarında bu kümelerin boyutlarının küçüldüğü gözlemlendi. Bu açıdan belirlenen 170 rpm karıştırma hızında bir süre pasajlanan serumsuz ve süspanse koşullara adapte edilmiş olan MDCK hücreleri daha sonra büyüme kinetiğinin çıkarılması için farklı başlangıç hücre konsantrasyonlarında denendi. Bu denemelerde daha iyi bir faz ayrımı ve erlende ulaşılan maksimum konsantrasyona ulaşılabilirdiği görüldüğünden MDCK hücreleri için de başlangıç hücre konsantrasyonunun 3×10^5 hücre/mL olmasına karar verildi.

Erlende gerçekleştirilen büyüme kinetiği çalışmasında MDCK hücrelerinin 7.günde en yüksek konsantrasyona ulaştığı görüldü. Tüm kültür süresi boyunca % canlılık değerinin oldukça yüksek devam ettiği gözlemlendi. Ayrıca pH değerinin MDCK hücrelerinin adherent kültüründe gözlenene kıyasla burada daha yavaş bir şekilde düşme eğiliminde olduğu görüldü. Metabolit analizlerinde belirlenen laktik asit değerinin de kültür süresi boyunca adherent kültüre göre çok daha düşük seviyelerde üretildiği gözlemlendi (Şekil 4.37). Bununla birlikte amonyak üretiminin adherent kültüre kıyasla daha yüksek olduğu görüldü. Büyüme kinetiği üretimi sonucunda en yüksek $1,512 \pm 0,053 \times 10^6$ hücre/mL değerine ulaşan MDCK hücrelerinin erlen üretimleri sırasında logaritmik fazın başlangıç ve bitişi üzerinden hesaplanan t_d değeri ise $46,48 \pm 1,97$ saat olarak belirlendi.



Şekil 4.37. MDCK hücrelerinin erlen üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler

Spinner flask çalışmalarında da farklı karıştırma hızlarının MDCK hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi adına 90, 100, 110 ve 120 rpm karıştırma hızları denendi.

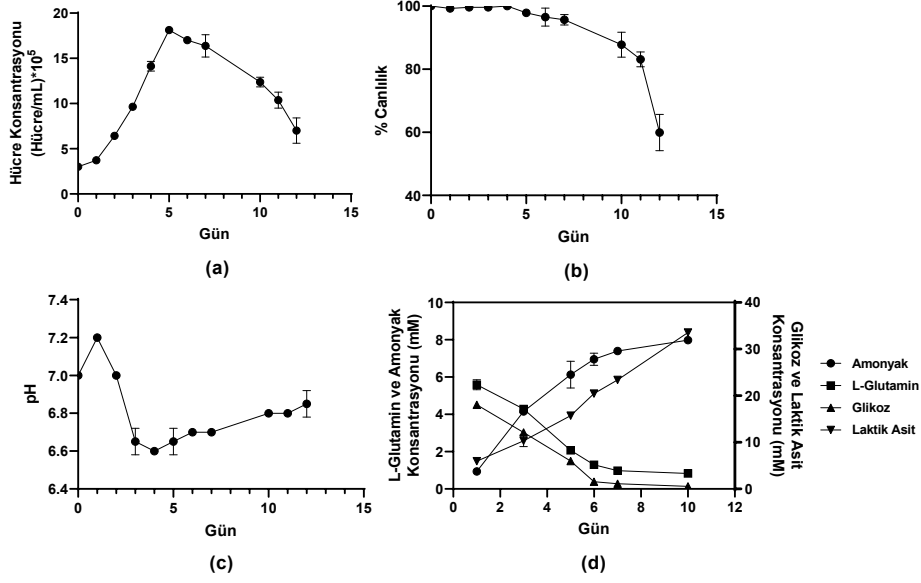


Şekil 4.38. Spinner flask üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenen MDCK hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler

Gerçekleştirilen üretimler sonucunda elde edilen hücre konsantrasyon değerleri üzerinden karıştırma hızları kıyaslandığında denenen tüm karıştırma hızlarının gün bazındaki konsantrasyonlarına bakıldığında aralarında anlamlı bir farklılığın olmadığı ($P > 0,05$) görüldü. Bununla birlikte 90 ve 120 rpm değerlerinde

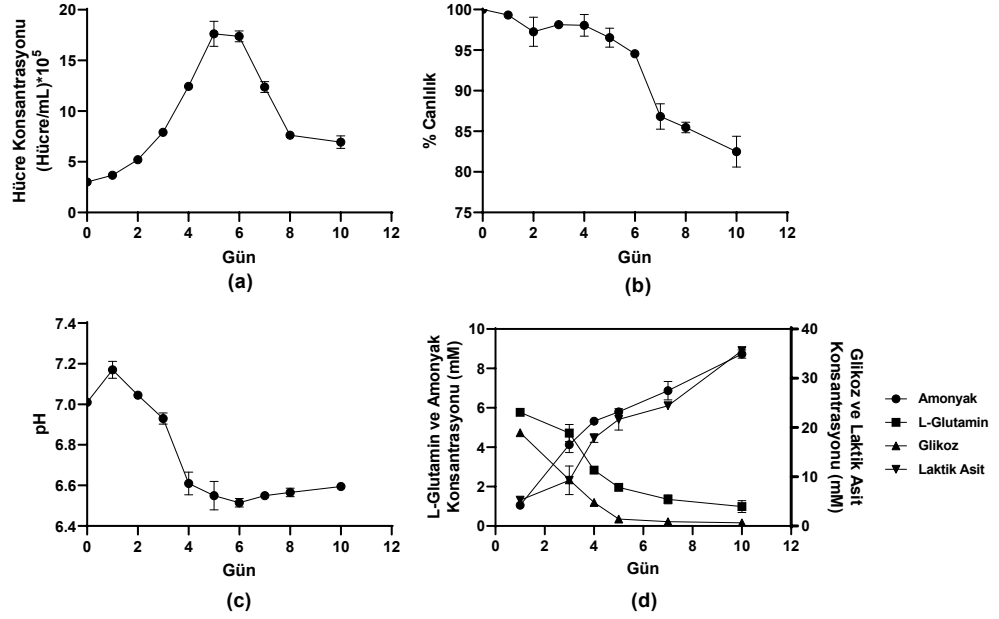
ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonunun 100 ve 110 rpm hızlarına kıyasla daha düşük olduğu görüldü (şekil 4.38). Mikroskop gözlemlerinde 90 rpm karıştırma hızında hücrelerin yüksek oranda kümeleştiği, diğer karıştırma hızlarında ise bu kümelerin oldukça az olduğu ve kültür homojenitesi açısından da hücre morfolojilerinin benzer olduğu gözlemlendi. Bunlarla beraber sayımlar sırasında 120 rpm karıştırma hızının % canlılığının da diğer karıştırma hızlarındaki kültürlerle göre düşük olduğu belirlendi. Bu nedenle spinner flask çalışmalarının devamı için belirlenmesi gereken karıştırma hızı seçiminde mikroskop gözlemleri sonucunda oluşan kümelerin durumu, hücre morfolojisinin homojenitesi, canlılık ve üretim sistemine sağlanması gereken güç miktarı göz önüne alındığında 100 rpm karıştırma hızı tercih edildi. MDCK hücrelerinin 100 rpm karıştırma hızında tekrarlı pasajlarının ardından erlende yapılan büyüme kinetiğinde belirlenen başlangıç hücre konsantrasyonu temel alınarak spinner flaskta büyüme kinetiği başlatıldı.

Spinner flaskta gerçekleştirilen büyüme kinetiğinde erlendeki büyüme kinetiğinden farklı olarak maksimum hücre konsantrasyonuna 5. günde ulaşıldı. Aynı zamanda ulaşılan $1,812 \pm 0,035 \times 10^6$ hücre/mL değerinin erlende yapılan denemelerde ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu değerlerinden yüksek olduğu görüldü. Ayrıca spinner flask üretimlerinde % canlılığın çok daha hızlı bir şekilde düştüğu belirlendi. Bunlarla beraber, süspanse ve serumsuz ortama adapte edilmiş olan MDCK hücrelerinin kültür süresi boyunca pH değerinin erlen üretimiyle karşılaştırıldığında yine çok daha düşük değerlere ulaştığı gözlemlendi (şekil 4.39). Gerçekleştirilen metabolit analizlerine de bakıldığında spinner flask üretiminde erlen üretimine kıyasla çok daha yüksek miktarda laktik asit ve amonyak üretildiği gözlemlendi. MDCK hücrelerinin spinner flasktaki t_d değerı $42,078 \pm 1,283$ saat olarak belirlendi. Bu aından erlen üretimine kıyasla ikilenme süresinde bir azalma meydana geldiği görüldü.



Şekil 4.39. MDCK hücrelerinin spinner flask üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler

Spinner flask üretiminin ardından karıştırılmalı tank biyoreaktöründe üretime geçiş yapıldı. Biyoreaktörde gerçekleştirilecek üretim için MDCK hücrelerinin spinner flaskta üretilmesi için seçilen 100 rpm değeri üzerinden spesifik güç girişi hesabı yapılarak biyoreaktörde gerçekleştirilecek olan üretimde gerekli olan karıştırma hızı 144 rpm olarak hesaplandı. Buna göre biyoreaktörde başlangıç konsantrasyonu 3×10^5 hücre/mL olacak şekilde büyüme kinetiği çalışmaları gerçekleştirildi.



Şekil 4.40. MDCK hücrelerinin karıştırılmalı tank biyoreaktöründeki üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler

Biyoreaktörde gerçekleştirilen büyüme kinetiği çalışmasında hücrelerin maksimum konsantrasyona ulaştıkları gün 5. gün olarak belirlendi. Bugünde $1,762 \pm 0,124 \times 10^6$ hücre/mL değerine ulaşan MDCK hücrelerinin t_d değeri ise $42,53 \pm 2,17$ saat olarak hesaplandı. Biyoreaktör üretimlerinde de kültür süresince % canlılık değerinin yüksek olduğu görüldü. Kültür süresince gerçekleşen pH değerinin değişimi değerlendirildiğinde CHO-K1 hücrelerinin biyoreaktör üretimlerine kıyasla bu düşüşün daha yavaş gerçekleştiği görüldü. Bununla beraber MDCK hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen tüm dinamik üretim sistemlerindeki büyüme kinetiklerine bakılarak pH değeri en fazla 6,51 değerine kadar düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.40). Metabolit analizlerine bakıldığında da adapte edilmiş MDCK hücreleriyle yapılan tüm büyüme kinetikleri içerisinde biyoreaktörde yapılan üretimde belirlenen laktik asit miktarının en yüksek olduğu belirlendi. Bununla beraber bu sistemler kıyaslandığında tüm kültür parametreleri değerlendirildiğinde erlen üretimine kıyasla spinner flask ve biyoreaktör üretimlerinde elde edilen üretim profillerinin daha benzer olduğu gözlemlendi.

Yapılan büyüme kinetiklerinde MDCK hücrelerinin ulaştığı maksimum hücre konsantrasyonu ve ikilenme süresi üzerinden Tukey testi ile değerlendirme yapıldı.

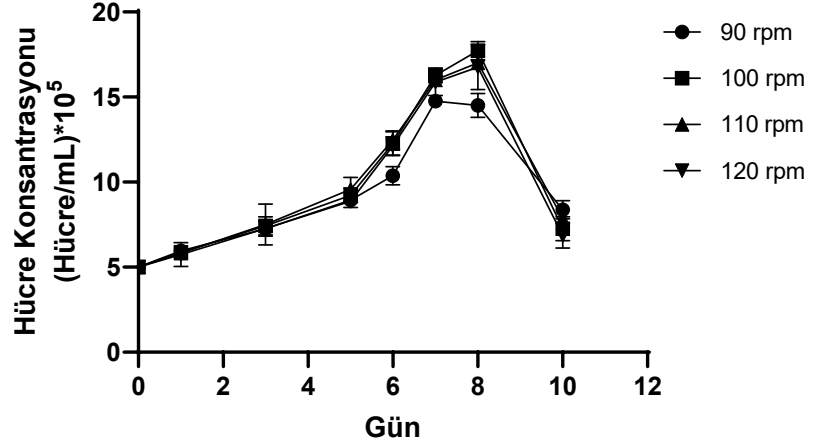
Bu değerlendirmeye göre erlen, spinner ve biyoreaktörde ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonları arasında hiçbir anlamlı farkın olmadığı ($P>0,05$) görüldü. Bununla birlikte MDCK' nın orijinal hali ile erlen sistemi arasında daha büyük ($P<0,001$), spinner ve biyoreaktör üretimleri açısından da daha küçük ($P<0,01$) anlamlı bir farkın olduğu belirlendi. Bununla birlikte ikilenme süresi açısından da tüm dinamik üretim sistemleri arasında da hiçbir anlamlı farkın olmadığı gözlenmezken orijinal kültüre kıyaslanlandığında yine erlen sisteminde daha büyük ($P<0,001$), spinner ve biyoreaktör üretimleri açısından da daha küçük ($P<0,01$) anlamlı bir farklılığın olduğu görüldü (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. MDCK hücre hattıyla yapılan alışamlarda hücrenin hem orijinal hem de adapte edilmiş haliyle farklı üretim sistemlerinde yapılmış olan üreme kinetiklerinden elde edilen maksimum hücre konsantrasyonu ve ikilenme süresi değerleri

Kültür şekli	Karıştırma hızı (rpm)	Ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu $\times 10^6$ (hücre/mL)	İkilenme süresi (td) (saat)
Orjinal	Statik	$2,575 \pm 0,0804$	$25,954 \pm 0,092$
Erlen	170 rpm	$1,512 \pm 0,053$	$46,48 \pm 1,97$
Spinner	100 rpm	$1,812 \pm 0,035$	$42,078 \pm 1,283$
Biyoreaktör	144 rpm	$1,762 \pm 0,124$	$42,53 \pm 2,17$

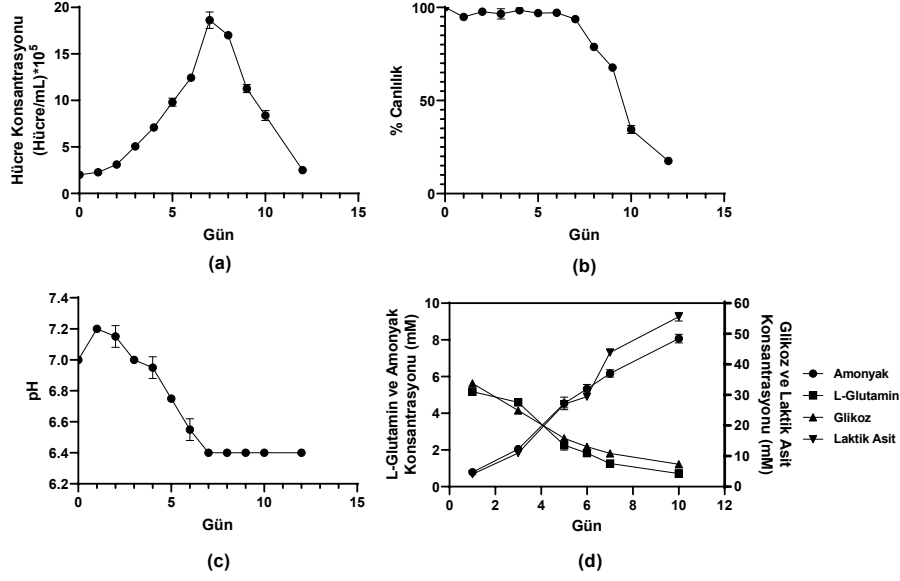
4.3.4 HEK-293 hücre hattının ölçek büyütme alışmaları

Adherent reme karakterinden serumsuz ortamda süspanse olarak üretime adapte edilmeye çalışılan diğer bir hücre hattı olan HEK-293'n adaptasyon çalışmalarının devamında erlen çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için HEK-293 hücre hattı 110 rpm karıştırma hızında bir süre pasajlandıktan sonra farklı karıştırma hızlarının hücre üretimi üzerindeki etkilerinin incelenmesi için 5×10^5 hücre/mL başlangıç konsantrasyonunda erlen denemeleri gerçekleştirildi. Bu denemelerde 90, 100, 110 ve 120 rpm karıştırma hızları denendi. Her bir karıştırma hızında denemesi yapılan erlenlerden alınan günlük örneklerden kültür durumu değerlendirildi.



Şekil 4.41. Erlen üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenen HEK-293 hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler

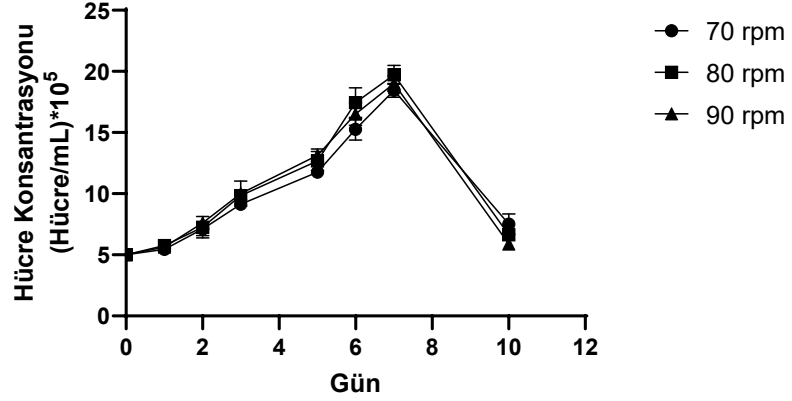
Yapılan karıştırma hızı deneme çalışmalarında hücre konsantrasyonu değerleri üzerinden Tukey testi gerçekleştirildiğinde özellikle hücre konsantrasyonunun maksimuma doğru ulaştığı 6-8 günlerde 90 rpm karıştırma hızının diğer değerlerden daha iyi olduğu görüldü. Diğer karıştırma hızlarının ise birbirine benzediği ve aralarından istatistiksel açıdan bir fark olmadığı ($P>0,05$) belirlendi (Şekil 4.41). Bununla birlikte diğer hücre hatlarında yapılan değerlendirmeye benzer şekilde tüm karıştırma hızlarındaki hesaplanan hücre konsantrasyonu dışında % canlılık, kümeleşme oluşumu, hücre morfolojisi değerlendirildi. Bununla birlikte gerekli olan güç miktarı da düşünüldüğünde en uygun karıştırma hızı 100 rpm olarak belirlendi. Bunun ardından HEK-293 hücreleri 100 rpm karıştırma hızında tekrarlı olarak pasajlandı ve büyüme kinetiği çıkarılması için HEK-293 hücreleriyle farklı konsantrasyonlarda başlangıç hücre sayısı denemeleri yapılarak en iyi başlangıç hücre konsantrasyonu değerinin 2×10^5 hücre/mL olduğu görüldü. Bu başlangıç konsantrasyonunda büyüme kinetiği kuruldu.



Şekil 4.42. HEK-293 hücrelerinin erlen üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler

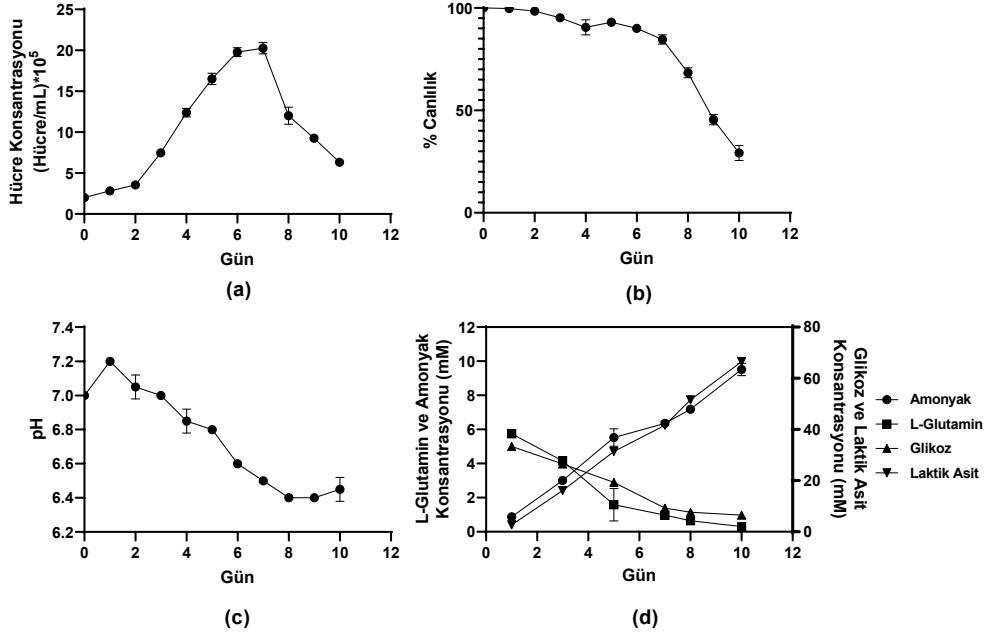
Erlende gerçekleştirilen büyüme kinetiğine çalışmalarında HEK-293 hücrelerinin 7. günde maksimum hücre konsantrasyonuna ulaştığı görüldü. Bu günde $1,862 \pm 0,088 \times 10^6$ hücre/mL konsantrasyona ulaşan HEK-293 hücrelerinin logaritmik büyüme fazı üzerinden hesaplanan t_d değerinin ise $46,375 \pm 0,543$ saat olduğu belirlendi. % canlılık değerlerine bakıldığında ise kültürün maksimum değere ulaştığı günü takiben hızla düşmeye başladığı gözlemlendi. Bu durumun özellikle 4. günden itibaren hızla düşmeye başlayan pH değerine paralel bir şekilde gerçekleştiği belirlendi. Metabolit analizlerinde belirlenen değerlere bakıldığında da 4. günden itibaren laktik asit miktarının da oldukça hızlı bir şekilde arttığı görüldü (Şekil 4.42). Bu açıdan da erlen de yapılan büyüme kinetiğindeki ulaşılan maksimum hücre sayısı, bunun ulaşıldığı gün ve pH düşüşünün adherent HEK-293 büyüme kinetiğine benzerlik gösterdiği görüldü. Ancak adherent kültüre kıyasla burada laktik asit miktarı çok daha düşük seviyelerde kalırken amonyak miktarının çok daha yüksek seviyelere ulaştığı gözlemlendi.

Erlen çalışmalarının ardından spinner flask denemeleri gerçekleştirildi. Bunun için erlen çalışmalarına benzer şekilde 70, 80 ve 90 rpm şeklindeki farklı karıştırma hızlarında HEK-293 hücrelerinin gün bazındaki hücre konsantrasyonları üzerinden kıyaslama yapıldı. Kıyaslamalar için gerçekleştirilen kültürlere ise başlangıç konsantrasyonu 5×10^5 hücre/mL olarak başlandı.



Şekil 4.43. Spinner flask üretimlerinde farklı karıştırma hızlarında denenene HEK-293 hücrelerinin gün bazında hücre konsantrasyonundaki değişimler

Spinner flaskta gerçekleştirilen denemelerde farklı karıştırma hızlarının HEK-293 hücreleri üzerindeki etkileri Tukey testine göre belirlendi. Kültürün ilk 5 gününde hücre konsantrasyonları açısından tüm karıştırma hızları arasında istatistiksel açıdan herhangi bir farklılık ($P>0,05$) görülmedi. Ancak kültürün 6. gününden itibaren 70 ve 80 rpm arasında anlamlı bir farklılık ($P<0,01$) gözlemlendi (Şekil 4.43). Bununla birlikte bu gün için diğer tüm kıyaslamalarda oluşan farkın anlamsız ($P>0,05$) olduğu görüldü. Tüm bu verilerin yanında kültürlerin sayımı sırasında yapılan mikroskop gözlemi ile beraber kültür durumunun da izlenmesi sırasında elde edilen bulgularla beraber sisteme sağlanması gereken güç de göz önüne alındığında karıştırma hızının 80 rpm olmasına karar verildi. Daha sonrasında adapte edilen HEK-293 hücreleri bu karıştırma hızında 5-7 kez pasajlandıktan sonra erlende büyüme kinetiği çalışmalarında belirlenen başlangıç konsantrasyonunda spinner flaskta büyüme kinetiği başlatıldı.

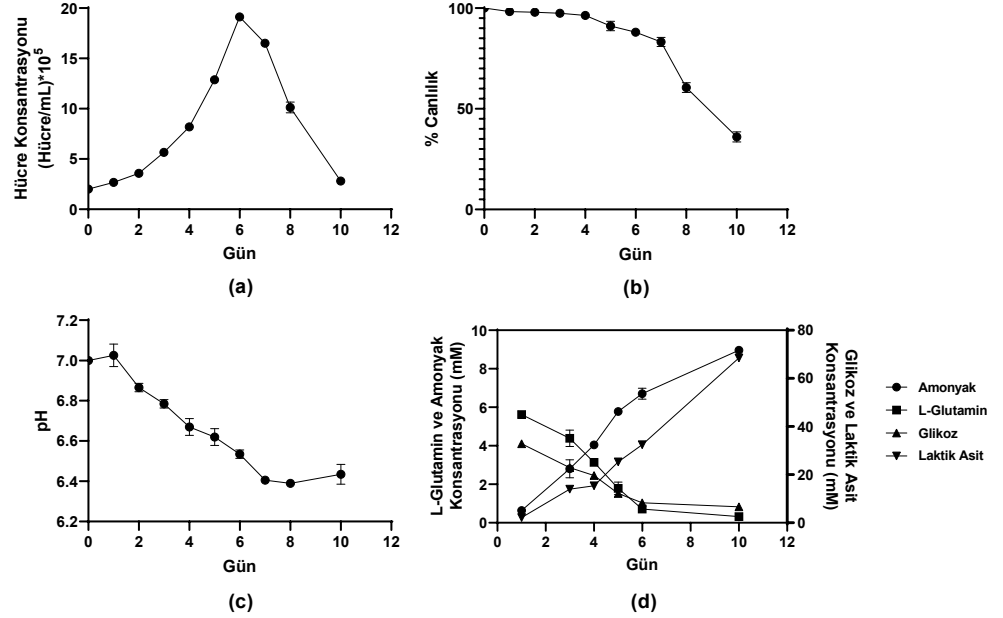


Şekil 4.44. HEK-293 hücrelerinin spinner flask üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler

Gerçekleştirilen büyüme kinetiği çalışmasında erlene ve HEK-293 hücrelerinin adherent kültürünün büyüme kinetiğine benzer şekilde maksimum hücre konsantrasyonuna 7. günde $2,025 \pm 0,0707 \times 10^6$ hücre/mL olarak ulaştığı görüldü. Bununla birlikte erlen çalışmasına kıyasla spinner flaskta ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonunun daha yüksek olduğu gözlemlendi. Çıkarılan büyüme kinetiğinde 2. ve 6. günler logaritmik fazın başlangıç ve bitiş günleri olarak belirlenmiş olup bu günlerdeki hücre konsantrasyonları üzerinden t_d değeri $38,795 \pm 0,293$ saat olarak hesaplandı. Erlen çalışmasına kıyasla spinner flask için hesaplanan hücresel ikilenme süresinin çok daha düşük olduğu görüldü. Bunlarla birlikte kültürün % canlılık değerlerinin hücre konsantrasyonunun azalmaya başladığı 7. günden sonra düşüş eğilimi gösterdiği ve pH değerinin de özellikle artan hücre konsantrasyonuna paralel şekilde düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.44). Özellikle diğer hücre tüm hatlarına kıyasla HEK-293 hücreleriyle kurulan büyüme kinetiklerinde % canlılık ile birlikte pH' ın oldukça hızlı bir şekilde düşük seviyelere gerilediği belirlendi. Bununla beraber metabolit analizlerine bakıldığında erlen üretimine kıyasla spinner flask üretiminin adherent kültürde üretilen laktik asit miktarına benzerlik gösterdiği belirlendi. Buna paralel olarak

kültürün son gününde glikozun daha çok tüketildiği ve pH değerinin de artan laktik asit miktarıyla beraber düştüğü gözlemlendi. Ayrıca, erlen üretimine kıyasla spinner flaskta yapılan büyüme kinetiğinde kültürdeki amonyak miktarının da arttığı gözlemlendi.

Ölçek büyütme adımlarının sonuncusu olan biyoreaktörde üretime geçişte ise spinner flask üretimi için belirlenen 80 rpm değeri üzerinden spesifik güç girişi hesabı yapıldığında HEK-293 hücrelerinin biyoreaktördeki büyüme kinetiği için karıştırma hızı 117 rpm olarak belirlendi. Karıştırma hızının hesaplanmasıyla beraber erlen ve spinner büyüme kinetiklerindeki başlangıç hücre konsantrasyonunda biyoreaktörde büyüme kinetiği çalışması başlatıldı.



Şekil 4.45. HEK-293 hücrelerinin karıştırmalı tank biyoreaktöründeki üretimine ait gün bazındaki hücre konsantrasyonu (a), % canlılık (b), pH (c) ve metabolit (d) değerlerinde meydana gelen değişimler

Biyoreaktörde gerçekleştirilen büyüme kinetiği çalışmasında HEK-293 hücrelerinin 6. Günde maksimum hücre konsantrasyonuna ulaştığı görüldü. Biyoreaktörde ulaşılan $1,912 \pm 0,017 \times 10^6$ hücre/mL maksimum hücre konsantrasyonu ile beraber üretimin logaritmik fazı üzerinden hesaplanan t_d değeri de $39,678 \pm 0,452$ saat olarak belirlendi. Gerçekleştirilen üretim süresince de pH değerinin çok hızlı bir şekilde 2. günden itibaren düşmeye başladığı gözlemlendi. Bu

pH düşüşüne paralel olarak da özellikle diğer hücre hatlarıyla yapılan büyüme kintliği çalışmalarında ilerleyen kültür süresine rağmen yüksek kalan % canlılık değeri HEK-293 hücreleri ile yapılan erlen ve spinner üretimlerine benzer şekilde biyoreaktörde gerçekleştirilen büyüme kinetiğinde de oldukça gerilediği görüldü (Şekil 4.45). Tüm bunlarla beraber HEK-293 hücrelerinin dinamik sistemler için yapılan metabolit analizlerine bakıldığında da spinner ve biyoreaktörün birbirine oldukça yakın olduğu ve bu sistemlerde hücre metabolik davranışlarının benzer olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte özellikle spinner flaskta çok daha yüksek seviyelerde amonyak üretilirken biyoreaktörde ise laktik asit miktarı kültür sonlarına göre çok daha yüksek miktarlarda belirlendi.

Yapılan çalışmalarda HEK-293 hücresinin orijinal hali ve adapte halinin dinamik sistemlerdeki büyüme kintliği sonuçlarında ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu üzerinden bir değerlendirme yapıldığında ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonları arasında hiçbir anlamlı farkın olmadığı ($P>0,05$) görüldü. Bununla birlikte ikilenme süreleri kıyaslandığında ise erlen ve HEK-293 hücrelerin orijinal halleri arasında ($P<0,001$) diğer tüm dinamik sistemlere kıyasla ($P < 0,01$) daha yüksek anlamlı bir farkın olduğu gözlemlendi. Ayrıca, ikilenme süresi açısından erlen sisteminin hem spinner flask hem de biyoreaktör sistemi ile arasında eşit derecede anlamlı bir farkın olduğu ($P<0,01$) görüldü. Tüm bunlarla birlikte ise spinner ile biyoreaktör arasında ikilenme süresi açısından da hiçbir anlamlı farkın olmadığı ($P>0,05$) belirlendi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. HEK-293 hücre hattıyla yapılan çalışmalarda hücrenin hem orijinal hem de adapte edilmiş haliyle farklı üretim sistemlerinde yapılmış olan üreme kinetiklerinden elde edilen maksimum hücre konsantrasyonu ve ikilenme süresi değerleri

Kültür şekli	Karıştırma hızı (rpm)	Ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu x 10^6 (hücre/mL)	İkilenme süresi (t_d) (saat)
Orjinal	Statik	$1,8987 \pm 0,103$	$33,08 \pm 1,125$
Erlen	100 rpm	$1,862 \pm 0,088$	$46,375 \pm 0,543$
Spinner	80 rpm	$2,025 \pm 0,0707$	$38,795 \pm 0,293$
Biyoreaktör	117 rpm	$1,912 \pm 0,017$	$39,678 \pm 0,452$

4.3.5 Tüm hücre hatlarının biyoreaktör üretimleri üzerinden kıyaslanması

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan tüm hücre hatlarının endüstriyel açıdan biyoproses verimliliklerinin ortaya konması açısından hem zaman hem de ürün miktarı üzerinden dolaylı olarak bir kıyaslama yapılması için hücrelerin ikilenme süresi ve üretimde ulaşabildikleri maksimum hücre konsantrasyonları değerlendirildi. Ayrıca biyoreaktörde gerçekleştirilen karıştırma sonucunda oluşan eddy burgaçları ve hücre boyutları da kültürdeki hücrelere etkisinin ortaya konması açısından belirlendi.

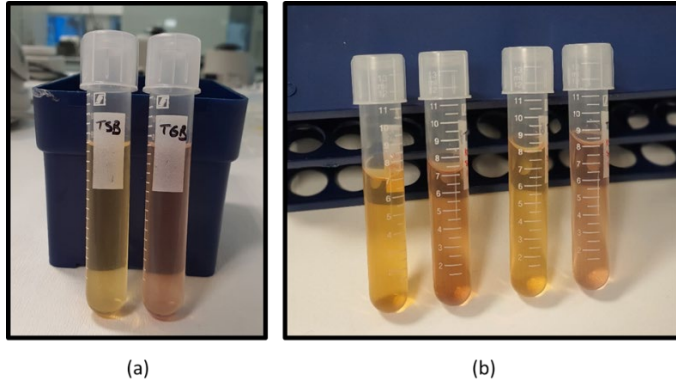
Tablo 4.6. Çalışmada kullanılan tüm hücre hatlarının adapte edildikten sonra gerçekleştirilen biyoreaktör üretimlerine ait veriler

Hücre Hattı	Ulaşılan Maksimum hücre konsantrasyonu $\times 10^6$ (hücre/mL)	İkilenme süresi (t_d) (Saat)	Kolmogorov Eddy Burgaçlarının Boyutu (σ) (μm)	Hücre Boyutu (μm)
MDCK	$1,762 \pm 0,124$	$42,53 \pm 2,17$	83,518	$18,64 \pm 3,07$
HEK-293	$1,912 \pm 0,017$	$39,68 \pm 0,45$	97,224	$19,07 \pm 2,29$
THP-1	$2,037 \pm 0,053$	$63,56 \pm 0,49$	118,387	$18,86 \pm 2,84$
CHO-K1	$3,012 \pm 0,084$	$34,06 \pm 0,86$	89,721	$16,12 \pm 2,04$

Bu değerlendirmeler sonucunda tüm hücre hatlarının ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonları açısından CHO-K1 ile anlamlı şekilde ($P>0,001$) farklı olduğu görüldü. Bununla birlikte THP-1, HEK-293 ve MDCK' nın biyoreaktör üretimleri sonucunda ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonları arasında hiçbir anlamlı farkın olmadığı ($P>0,05$) belirlendi. İkilenme süresi açısından hücre hatlarına yapılan Tukey testi sonucundaki kıyaslamasında sadece HEK-293 ve MDCK hücrelerinin arasında anlamlı bir farkın olmadığı ($P>0,05$), THP-1 ve CHO-K1 arasında ise oldukça yüksek düzeyde ($P<0,0001$) bir farkın olduğu görüldü. Diğer taraftan THP-1 hücre hattının MDCK ve HEK-293 ile de arasında yüksek derece ($P<0,001$) bir farkın olduğu belirlendi. CHO-K1 hücreleriyle MDCK hücreleri kıyaslandığında aralarında anlamlı derecede bir farklılığın bulunduğu

($P<0,01$) görüldü. Bununla beraber CHO-K1 ve HEK-293 hücrelerinin de aralarında istatistiksel açıdan bir fark belirlenirken bunun diğer hücrelerle olan farka göre çok daha düşük düzeyde ($P<0,05$) olduğu belirlendi (Tablo 4.6).

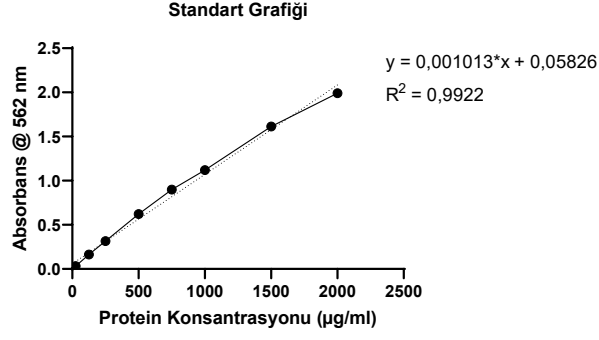
Bununla birlikte tüm adapte edilen hücre hatlarının hücre boyutları ImageJ programı kullanılarak ölçüldü. Yapılan ölçümlerde en büyük hücrenin HEK-293, en küçük hücrenin ise CHO-K1 olduğu görüldü. Karıştırmanın hücre üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi için de her bir hücre hattı için belirlenen karıştırma hızında oluşan eddy burgaçlarının boyutu hesaplandı. Ölçülen hücre boyutları ile her bir hücre hattının belirlenen karıştırma hızı için hesaplanan eddy burgaçlarının boyutu karşılaştırıldığında hücre boyutlarının eddy burgaçlarınınkinden oldukça küçük olduğu belirlendi (Tablo 4.6). Ayrıca her bir ölçek büyütme işleminden sonra üretilen kültürün herhangi bir kontaminant içermediğinin belirlenmesi için her bir hücre hattına yapılan sterilité testlerinin temiz olduğu görüldü (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. Sterilité testi için önceden hazırlanmış TSB (solda) ve TGB (sağda) test tüpleri (a), her bir hücre hattı için ölçek büyütme işlemleri sırasında yapılan sterilité testinin 14 gün sonundaki görüntüsü (b)

4.4 Büyük Ölçek Üretiminde Hücre Hatlarının Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Her bir hücre hattıyla gerçekleştirilen büyük ölçekteki biyoreaktör üretimlerinden toplanan örnekler hücre hatlarının ekspresyonel kapasiteleri ve üretim sırasında ortamda biriken protein miktarını belirlemek için toplam protein konsantrasyonları BCA analizi ile belirlendi. Bunun için öncelikle bilinen protein konsantrasyonlarına karşı absorban değerlerinin olduğu bir standart grafiği oluşturuldu (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. Bilinen protein konsantrasyonlarına karşı gelen absorbans değerlerinin gösterildiği standart grafiği

Daha sonra oluşturulan bu standart grafiği üzerinden ölçülen absorbans değerlerinin karşılık geldiği protein konsantrasyonları her bir hücre hattı için hesaplandı (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Hücre hatlarının biyoreaktör üretimleri sırasında toplanan örnekler üzerinden hesaplanan toplam protein konsantrasyonları

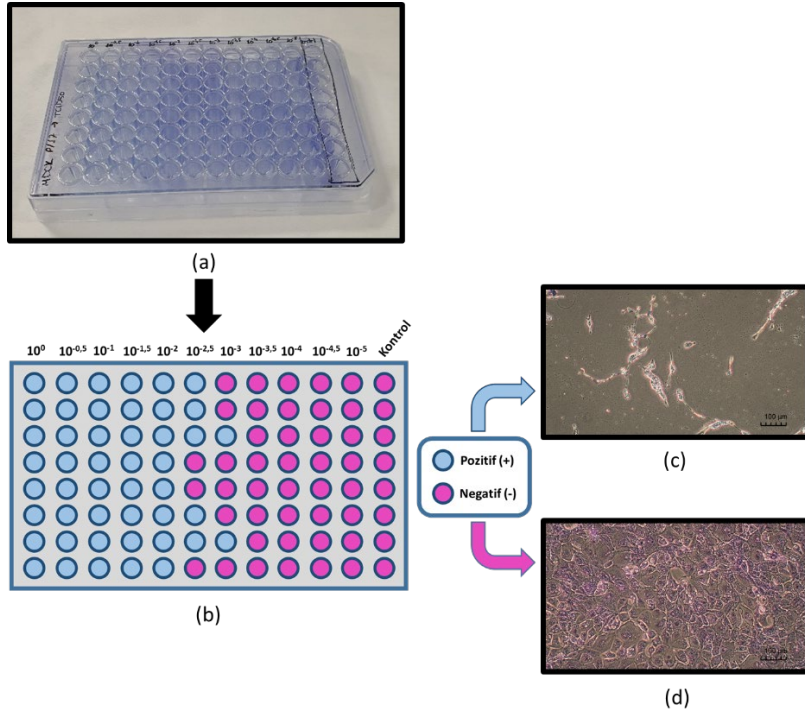
Hücre Hattı							
MDCK		CHO-K1		HEK-293		THP-1	
Gün	Protein Konsantrasyonu (g/L)	Gün	Protein Konsantrasyonu (g/L)	Gün	Protein Konsantrasyonu (g/L)	Gün	Protein Konsantrasyonu (g/L)
1	0,787 ± 0,045	1	0,758 ± 0,037	1	0,672 ± 0,061	1	0,608 ± 0,077
3	0,804 ± 0,030	3	0,876 ± 0,021	3	0,903 ± 0,028	4	0,647 ± 0,086
4	0,824 ± 0,056	5	0,946 ± 0,005	4	1,057 ± 0,015	5	0,663 ± 0,094
5	0,868 ± 0,087	6	1,007 ± 0,007	5	1,120 ± 0,011	6	0,706 ± 0,060
7	1,071 ± 0,024	7	1,065 ± 0,018	6	1,207 ± 0,006	7	0,762 ± 0,029
10	1,087 ± 0,013	10	1,112 ± 0,043	10	1,290 ± 0,019	10	0,807 ± 0,006

Hesaplanan protein konsantrasyonları gün bazında Tukey testi ile kıyaslandığında özellikle THP-1 hücre hattının ilk günden sonra diğer tüm hücre hatlarından farklı olduğu ($P < 0,01$) ilerleyen günlerde ise bu farkın giderek arttığı ($P < 0,0001$) görüldü. Bununla birlikte MDCK hücre hattının da HEK-293 hücre hattına kıyasla özellikle ilk 3 günde anlamlı bir fark yokken 4. gün ($P < 0,001$) ve 5. günden itibaren anlamlı bir farkın olduğu ($P < 0,0001$) belirlendi. HEK-293 hücre hattıyla CHO-K1 hücre hattı kıyaslandığında kültürlerin 5. gününe kadar aralarında

anlamlı bir fark yokken ($P>0,05$) 7. günden itibaren anlamlı bir farkın olduğu ($P<0,05$) ilerleyen günde de bu farkın arttığı ($P<0,01$) gözlemlendi.

4.5 Hücre Hatlarının İnfluenza Virüsü ile Enfekte Edilmesi ve Virüs Üretimi

H1N1 alt tipindeki İnfluenza A virüsüyle gerçekleştirilen enfeksiyon çalışmaları öncesinde çalışmalar için yeterli stoğun oluşturulması adına adherent MDCK hücreleri kullanılarak virüs stoğu oluşturuldu. Burada virüslerin MDCK hücrelerine adapte olmaması için sadece 3-5 kez pasaj yapıldı. Daha sonra aynı üretimden yeterli miktarda virüs stoğu elde edilince hücre hatlarının influenza virüsüyle enfeksiyon denemeleri öncesinde 10^{-3} olarak belirlenen MOI değerinde işlem yapılması için oluşturulan stoktaki viral partikül sayısının belirlenmesi adına 96 gözlü pleytte TCID₅₀ testi yapıldı. Yapılan test sonucunda CPE ve kristal violet boyanma durumuna göre kuyular pozitif veya negatif olarak belirlendi. Bunun ardından yapılan hesap sonucunda virüs enfeksiyon çalışmalarında kullanılması planlanan virüs stoğunun $4,932 \times 10^3$ TCID₅₀/mL değerinde viral yüke sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.48).



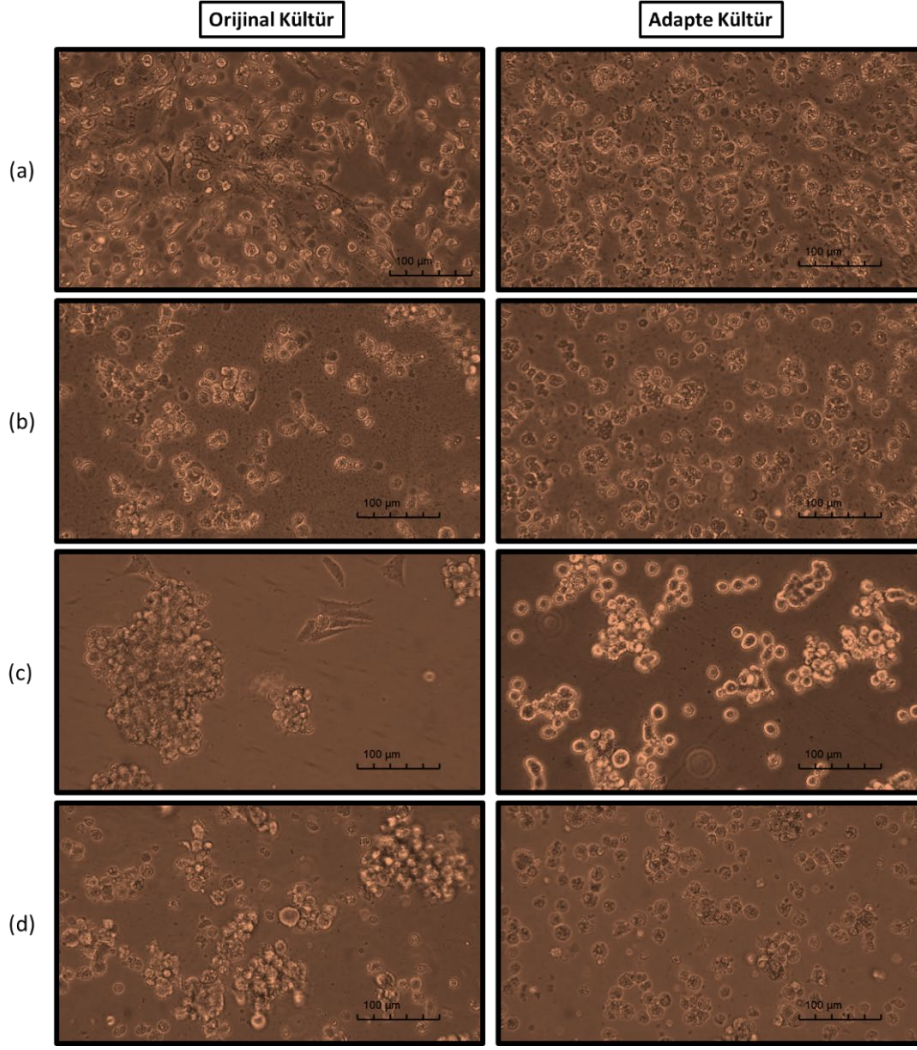
Şekil 4.48. Viral enfeksiyon çalışmalarında kullanılacak olan stoğun viral yükünün belirlendiği TCID₅₀ testi (a), test sonucunda elde edilen pleytin şematize edilmiş görüntüsü (b) ve testte belirlenen pozitif ve negatif pleyt gözlerinin mikroskop görüntüsü (10x) (Ölçek barı uzunluğu: 100µm)

Daha sonrasında elde edilen bu virüs stoğunun sadece influenza A virüsü içerdiğinin doğrulanması ve oluşturulan stoktaki viral yükün Ct olarak değerinin belirlenmesi için RT-qPCR yapıldı. Yapılan bu RT-qPCR sonucunda MDCK hücreleri kullanılarak oluşturulan virüs stoğunun sadece influenza A virüsü içerdiği ve viral yükünün de Ct cinsinden 17,74 değerine sahip olduğu belirlendi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Viral enfeksiyon çalışmalarında kullanılacak olan stoğun virüs doğrulanması ve viral yükünün Ct olarak belirlendiği RT-qPCR sonucu

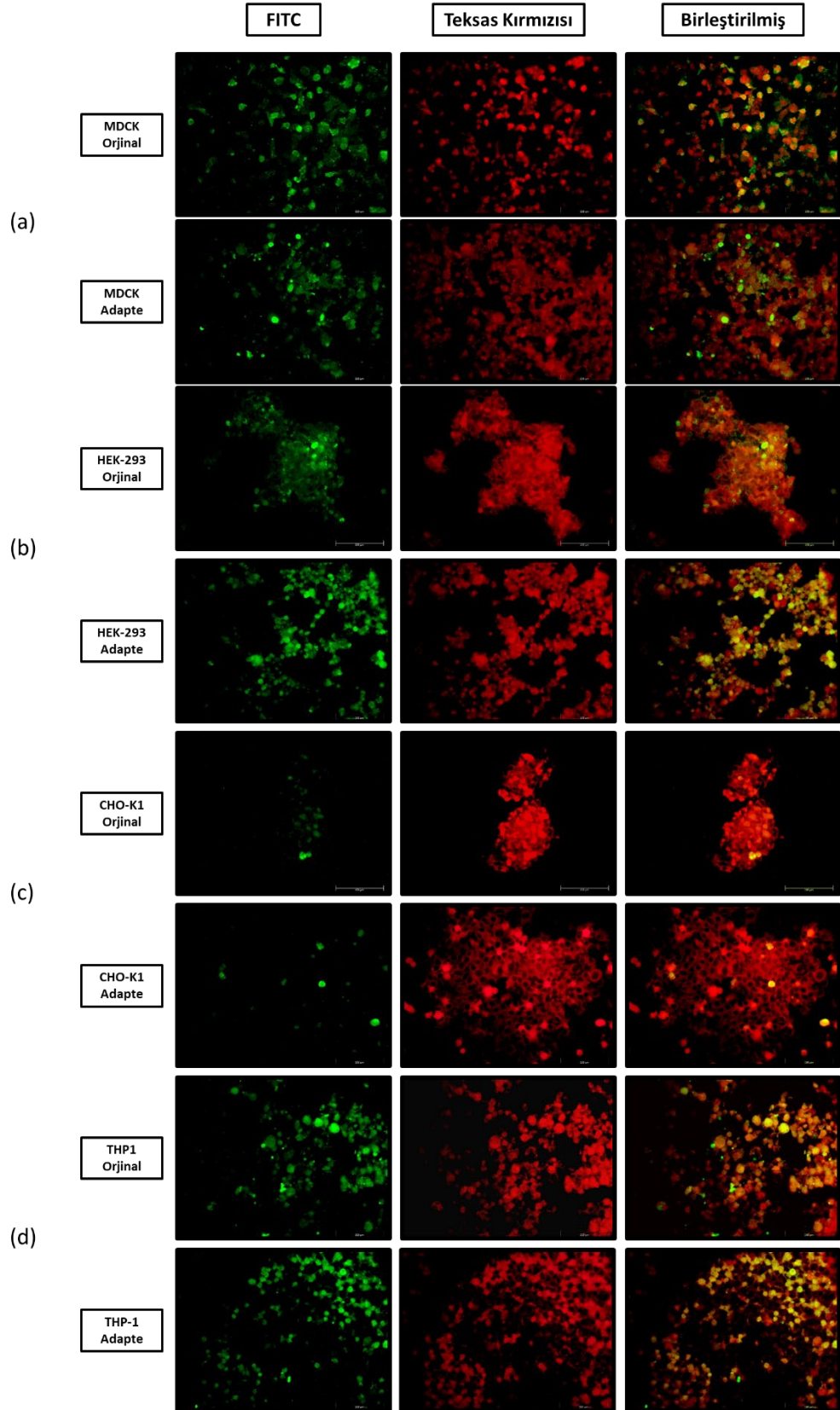
MDCK STOK	RSV A/B	N/A	Negatif
MDCK STOK	Influenza B	N/A	Negatif
MDCK STOK	Influenza A	17.74	Pozitif
MDCK STOK	SARS-CoV-2	N/A	Negatif
MDCK STOK	Adenovirüs	N/A	Negatif
MDCK STOK	Rhinovirüs	N/A	Negatif

Tüm bu testlerin ardından oluşturulan viral stok ile bu çalışma kapsamında kullanılan her bir hücre hattının hem orjinal hem de büyük ölçekte üretim için adapte edilmiş halleriyle birlikte T25 flasklarda enfeksiyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle belirlenen MOI değerinde çalışmanın başlatılması adına hesaplanan TCID₅₀/mL değeri üzerinden gerekli hücre sayısı hesaplandı. Yapılan hesaplar sonucunda gerekli hücre sayısı $4,143 \times 10^6$ olarak belirlendi. Daha sonrasında virüs stoğu oluşturmaya benzer şekilde flasklar 72 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda öncelikle flasklarda meydana gelebilecek CPE değişimlerinin görüntülenmesi için ters faz ışık mikroskopunda gözlem yapıldı (Şekil 4.49).



Şekil 4.49. MDCK (a), HEK-293 (b), CHO-K1 (c) ve THP-1 (d) hücre hatlarının hem orijinal (sol sütun) hem de adapte hallerinin (sağ sütun) çalışmada kullanılan H1N1 alt tipindeki influenza A virüsü ile enfekte edildikten 72 saat sonraki CPE görüntüleri (20x) (Ölçek çubuğu: 100µm)

Bu gözlem sonucunda tüm hücre hatlarının morfolojilerinin değiştiği ve özellikle adherent karakterde olanların neredeyse tamamının yüzeyden kalktığı gözlemlendi. Bununla birlikte tüm hücre hatlarında hücresel morfoloji ve bütünlüğün büyük oranda bozulduğu gözlemlendi. Meydana gelen bu morfolojik değişimlerin viral enfeksiyon kaynaklı olarak gerçekleştiğinin gösterilmesi için immünfloresan boyama yapıldı. Yapılan boyama sonucunda tüm hücreler kırmızı olarak boyanırken bunlar arasından sadece enfekte hücreler yeşil olarak boyandı. Böylelikle, yapılan boyama sonucunda denemesi yapılan tüm hücre hatlarının çalışmada kullanılan influenza A virüsü ile enfekte olduğu gözlemlendi (Şekil 4.50).



Şekil 4.50. MDCK (a), HEK-293 (b), CHO-K1 (c) ve THP-1 (d) hücre hatlarının hem orijinal (üst satır) hem de adapte hallerinin (alt satır) kullanılan influenza A virüsü ile enfekte edildikten 72 saat sonraki immünfloresan görüntüleri (40x) (Ölçek barı uzunluğu: 100µm)

Gerçekleştirilen immün floresan boyama sonrasında her bir hücre hattının virüs üretim veriminin ortaya konması adına her bir hücre hattının kendisiyle birlikte adapte edilmiş haline sırasıyla RT-qPCR ve TCID₅₀ testi yapıldı. Yapılan testler sonucunda elde edilen Ct değerleri ile TCID₅₀/mL değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görüldü. Özellikle örnekteki viral yük miktarı arttıkça Ct değerinin düştüğü göz önüne alındığında, daha düşük Ct değerlerinde çok daha yüksek TCID₅₀ değerlerinin hesaplandığı görüldü. Tüm hücre hatları içerisinde influenza A virüsünü en fazla üreten hücrenin adherent HEK-293 olduğu belirlendi. Aynı zamanda, tüm adapte hücreler açısından bakıldığında da yine en fazla virüs üretimini süspanse ve serumsuz ortam adapte edilmiş olan HEK-293 hücrelerinin gerçekleştirdiği görüldü. En az virüs üretimini CHO-K1'in adapte edilmiş hali olduğu gözlemlendi (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. RT-qPCR ve TCID₅₀ testi sonucunda her bir hücre hattı için belirlenen değerler

Hücre Hattı		RT-qPCR Sonucu (Ct)	TCID ₅₀ Sonucu (TCID ₅₀ /mL)
MDCK	Orjinal	12,56	4,606 x 10 ⁴
	Adapte	13,75	3,628 x 10 ⁴
HEK-293	Orjinal	11,81	5,222 x 10 ⁴
	Adapte	13,31	3,988 x 10 ⁴
THP-1	Orjinal	15,78	1,960 x 10 ⁴
	Adapte	14,94	2,651 x 10 ⁴
CHO-K1	Orjinal	16,47	1,392 x 10 ⁴
	Adapte	17,48	5,624 x 10 ³

5. TARTIŞMA

Çalışmalarda kullanılan hücre hatları aynı olmasına rağmen farklı stokların kullanılması veya tedarikçilerin tercih edilmesi halinde hücre karakterinin değişiklik gösterebileceği belirtilmektedir. Bu anlamda yapılan bir çalışmada EACC ve ATCC' den alınan MDCK hücrelerinin karakter ve morfoloji açısından oldukça farklı olduğu gösterilmiştir (Rodrigues et al., 2020). Bu nedenle bu tez kapsamında kullanılan hücrelerin orijinal hallerinin büyüme kinetiği çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen büyüme kinetiklerinin değerleri literatür verileriyle kıyaslandığında tüm hücre hatlarının orijinal karakterlerindeki şekilde üreyebildiği morfolojik gözlemler ve hesaplanan ikilenme sürelerine göre belirlenmiştir. Bu durumun teyit edilmesi aynı zamanda tez çalışmasının devamında gerçekleştirilecek olan adaptasyon çalışmaları için de oldukça önemlidir. Bunun nedeni adaptasyon sürecinde hücre karakterinde meydana gelen değişikliklerin orijinal haline kıyasla nasıl gerçekleştiğinin doğru bir şekilde gösterilebilmesidir (Sinacore et al., 2000; S. Wu et al., 2021). Böylelikle kullanılan hücre stoklarının bilimsel açıdan tekrarlanabilirlik ilkesiyle örtüşecek şekilde uygunluğu ortaya konmaktadır.

Hayvan hücre kültürlerinin serumsuz ortama adaptasyonunda birden çok yöntem bulunmasına rağmen burada hücrelerin doğrudan serumsuz ortamlara adapte edilmesi yaklaşımına odaklanılmıştır. Bunun nedeni; ticari olarak geliştirilmiş serumsuz besin ortamlarının hücreye spesifik olarak geliştirilmesi ve geliştirici firmanın da belirttiği şekilde hücrelerin doğrudan bu besin ortamları kullanılarak kültürlenebileceği yönündeki yönergeleridir. Bu nedenle seçilen her bir hücre hattı özelinde geliştirilmiş olan serumsuz besin ortamları tercih edilmiştir. Bununla birlikte özellikle doğrudan adaptasyon yöntemine kıyasla kademeli olarak gerçekleştirilen adaptasyon yönteminin hücre üremesi ve canlılığı açısından çok daha yüksek başarı sağladığı ancak daha zaman alıcı olduğu gösterilmektedir (Jang et al., 2022; Kimiz-Gebologlu et al., 2022; van der Valk et al., 2010).

Sadece THP-1 hücrelerin kültürlenmesi için seçilen kimyasal olarak tanımlanmış serumsuz besin ortamı süspanse hücrelere yönelik geliştirilmiş olup THP-1'e ait bir spesifitesi bulunmamaktadır. Denemelerde hücre hatları için

zorlayıcı bir yaklaşım olan doğrudan adaptasyon yöntemi uygulanmasına rağmen THP-1 hücrelerinin 6. pasajdan itibaren bu ortama uyum sağladığı kontrol grubu olarak %10 FBS içeren RPMI-1640 THP-1 hücreleri ile yapılan hücre konsantrasyonu kıyaslamalarıyla belirlenmiştir. THP-1 hücrelerinin kademeli adaptasyon çalışmalarında ise özellikle % 5 gibi düşük FBS konsantrasyonlarında kontrol grubuyla kıyaslandığında erken pasaj sayılarında çok daha hızlı bir şekilde ortama uyum sağlayabildiği gösterilmektedir (Kimiz-Gebologlu et al., 2022).

Orjinalinde adherent karakterde olan diğer hücre hatları için ise temelde hücrelerin doğrudan istenilen ortamda kültürlenmesine odaklanan iki farklı adaptasyon yöntemi denenmiştir. Bunlar doğrudan adaptasyon yöntemi ve kültür içinde adaptasyon yöntemidir. Kültür içinde adaptasyon yöntemi, yöntemin kendisi gereğince sadece adherent hücrelere uygulanabildiği için THP-1 hücrelerinin adapte edilmesinde doğrudan adaptasyon yöntemi kullanılmıştır. HEK-293, MDCK ve CHO-K1 adherent karakterdeki hücre hatlarında ise her iki yöntem de denenmiştir. İki yöntemin kıyaslanmasında ise başta mikroskopik gözlem olmakla beraber pasajlama durumlarının belirlenmesi adına yapılan sayımlar da göz önüne alındığında hücrelerin belirli başlangıç konsantrasyonlarında sayılarak hücrelerin doğrudan istenilen besin ortamlarına alındığı doğrudan adaptasyon yönteminin daha başarılı olduğu söylenebilmektedir.

Kültür içinde adaptasyon yönteminde ise istenmeyen şekilde hücrelerin adherent karakterlerini daha fazla koruduğu ve süspanse koşullara geçişte zorlandığı belirlenmiştir. Bu durum yapılan gözlemlerdeki bozulan hücre morfolojilerinden ve uzun kültür sürelerine rağmen artmayan veya çok az bir artış sergileyen hücre konsantrasyonu değerlerine bakılarak anlaşılmıştır. Bunun nedeninin de hücrelerin ilk başta kültür kabı yüzeyini tam kaplamış halleri üzerine serumsuz ortam konduktan sonra bu şekilde besin ortamı serumsuz olsa da bir yüzeye tutunarak kültürlenmeye alışmalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Özellikle bu açıdan da yöntemin diğer bir aşaması olan hücrelerin tripsinizasyon uygulanarak pasajlanması sırasında süspanse hale getirilen hücrelerin yeni süspanse flaska aktarılmasındaki sonrasında tutunacak bir yüzey bulamaması sebebiyle strese girdikleri tahmin edilmektedir.

Her iki yöntemde de hücrelerin kültürlenmesinde kullanılan flasklar süspanse olsa bile kültür kabı yüzeyine tutunabildikleri görülmüştür. Özellikle bu durumunda ilerleyen kültür sürelerine paralel şekilde hücrelerin kültür ortamına salgıladıkları ekstraselüler matriks bileşenleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Yonemura, 2014). Bu tutunma özellikle HEK-293 ve CHO-K1 için az bir oranda gerçekleşse de MDCK hücrelerinin adherent karakterlerini uzun süreler boyunca koruduğu görülmüştür. Bu nedenle özellikle adaptasyon sürecinin devamı olarak hücrelerin kültür kabı yüzeyiyle en az etkileşimde olabildiği dinamik kültür sistemleri kullanılması gerekmektedir. Adherent karakterde olan hücre hatlarının hem süspanse karaktere adapte edilmesi hem de ölçek büyütme basamakları. gereğince hücrelerin yüksek hacimlerde kültürlenmelerinin ilk aşaması olarak erlen üretimleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin serumsuz ve süspanse koşullara adapte edilmesinde süspanse flask ve devamında erlen üretimlerini içeren tüm süreçte hücrelerin karakterlerinin stabil hale gelmesi için en az 15 kez adapte edilmek istenen koşullarda pasajlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Literatürde de hücrelerin orijinalinden farklı üretim koşullarına adapte edilmesinde yeni hücre karakterinin stabil hale gelmesi için 5-20 kez pasajlanması gerektiği gösterilmektedir (Jang et al., 2022; Lohr et al., 2010; Rourou et al., 2019; Singh et al., 2010; Tamm et al., 2013). Kullanılan 4 hücre hattının adapte edilmek istenilen kültür koşullarında gerçekleştirilen 15 defa pasajlanması için geçen süre (Tablo 4.1) göz önüne bulundurulduğunda en avantajlı hücre hattının THP-1 ve sonrasında CHO-K1 olduğu gösterilmiştir. MDCK ise süre açısından en çok zaman alan hücre hattıdır. Özellikle pandemi gibi bir koşul düşünüldüğünde hem insan kökenli olması hem de çok daha hızlı bir şekilde endüstriyel üretim için adapte edilebilmesi açısından HEK-293 ve THP-1 hücre hattı öne çıkmaktadır. Terapötik bir protein üretimi söz konusu olduğunda endüstride en fazla tercih edilen hücre hattı olan CHO-K1'e kıyasla da THP-1 ve HEK-293 hücre hatlarının başta insan kökenli olmalarının sağladığı avantajla birlikte hızlı bir şekilde adapte olabilmeleri nedeniyle tercih edilebilirlikleri ortaya konmuştur.

Dinamik kültür çalışmalarının başlangıcı olan erlen üretimlerinde farklı karıştırma hızları denenmiş ve en iyi karıştırma hızı ulaşılan hücre konsantrasyonu, morfolojik gözlem ve kültüre sağlanması gereken güç girişi üzerinden kıyaslanması sonucunda belirlenmiştir. Karıştırma hızı seçiminde özellikle hücrelerin

morfolojileri ve küme oluşturup oluşturmadıkları incelenmiştir. Biyoteknolojik üretimlerin birçoğunda kullanılan ekspresyonel platformların kümeleşmeden kültür ortamında tek hücre halinde üremesi istenmektedir. Her ne kadar virüs üretiminin hedeflendiği biyoproseslerde oluşan kümelerin virüs enfeksiyonunu arttırıcı etki gösterdiği gösterilse de (Göbel et al., 2022) virüslerin etkili bir enfeksiyon gerçekleştirebilmesi adına tüm hücre yüzeyine daha kolay ulaşabileceği tek hücre halindeki süspansiyon kültürler tercih edilmektedir (Merten et al., 2014).

Özellikle terapötik protein üretimi açısından bu kümeler ürün kaybı ve hücre ölümünü tetiklediğinden dolayı üretim esnasında bunların oluşumunu engellemek adına ortama kümeleşme önleyici bileşenler eklenmesi, enzim muamelesi, karıştırıcı tipi değişikliği, besin ortamı içeriğindeki belirli bileşenlerin konsantrasyonlarının azaltılması ve karıştırma hızının arttırılması gibi uygulamalar yapılabilmektedir (Gallo–Ramírez et al., 2015; Jang et al., 2022; Rourou et al., 2019; Singh et al., 2010). Ancak, yüksek karıştırma hızlarında oluşan kayma gerilimi (*shear stress*) nedeniyle kümeleşme eğilimi düşerken aynı zamanda bu kuvvetler hücrelerin yapısal bütünlüğüne de zarar verdiği için hem % canlılık hem de buna bağlı olarak hücre konsantrasyonunda düşüşe neden olduğu ve bu durumun literatürde yapılan çalışmalarla da benzerlik gösterdiği görülmektedir (Gallo–Ramírez et al., 2015; Hunt et al., 2014; Singh et al., 2010; Wu et al., 2022). Bu nedenle her bir hücre hattı için hem hücreleri kayma gerilmesinden koruyan hem de kümeleşme oluşumu azaltan Pluronic® F68 kullanımıştır.

Aynı zamanda erlen ve spinner flask çalışmalarında her bir hücre hattına özel karıştırma hızları denenmiştir. Optimum olarak belirlenen (erlen için 70 rpm, spinner için 60 rpm ve biyoreaktör için 90 rpm) olan karıştırma hızı değerlerine bakılarak özellikle THP-1 hücrelerinin daha hassas olduğu ve yüksek karıştırma hızlarında kültür başarısının düştüğü gözlenmiştir. Aynı zamanda THP-1 hücrelerinin düşük karıştırma hızlarında bile kümeleşme olmadan yüksek hücre konsantrasyonlarına çıkabildiği görülmektedir. Özellikle güç tasarrufu açısından bu hücre hattı öne çıkmaktadır. HEK-293 hücreleri için uygulanan karıştırma hızları THP-1'e kıyasla daha yüksek olmasına rağmen seçilen karıştırma hızlarında (erlen için 100 rpm, spinner için 80 rpm ve biyoreaktör için 117 rpm) HEK-293 hücrelerinin de neredeyse hiç kümeleşmeden çoğaldığı gözlemlenmiştir. CHO-K1

ve MDCK ise en fazla küme oluşturan hücre hatlarıdır. Bu açıdan da bu hücrelerin kültürlenmelerinde MDCK için daha yüksek (erlen için 170 rpm, spinner için 100 rpm ve biyoreaktör için 144 rpm) olmakla birlikte CHO-K1 için de (erlen için 150 rpm, spinner 90 rpm ve biyoreaktör için 130 rpm) daha yüksek karıştırma hızları tercih edilmiştir.

Erlenden büyük ölçeğe geçişte ise diğer bir basamak spinner flasklarda üretimdir. Özellikle karıştırmalı tank biyoreaktörlerine geometrik açıdan benzerlikleri sebebiyle birçok hesaplamalı akış mekaniği simülasyonu için kullanılan sistemlerdir (Berry et al., 2016; Ponnuru et al., 2014; Shafa et al., 2019; Zhang et al., 2022). Erlenle kıyaslandığında buradaki karıştırmanın dahili olarak gerçekleştirilmesi özellikle kültür içerisinde yer alan hücrelerin karıştırıcı bıçaklarının ucunda oluşan yüksek kayma gerilmesi bölgesine girdiklerinde daha fazla hasar almalarına neden olabilmektedir. Bu nedenle de karıştırma hızları oldukça iyi optimize edilmelidir. Burada bir diğer önemli faktör ise karıştırmayla beraber oluşan *Kolmogorov eddy* burgaçlarıdır. Bu burgaçların boyutu hücrelerden küçük olduğu zaman yüksek oranda onlara zarar verir ve bu durum sonucunda özellikle oldukça hassas olan hayvan hücre kültürleri için hücrenin parçalanmasıyla sonuçlanır. Bu nedenle bir üretim sisteminde karıştırma hızının belirlenmesi için bu burgaçların boyutu da oldukça önemlidir (Bellani et al., 2020; Ladd et al., 2022; Zhang et al., 2022).

Bu tez çalışması kapsamında biyoreaktör üretimlerine geçilmeden önce spinner flasklarda optimize edilen karıştırma hızları üzerinden spesifik güç girişi hesabıyla ölçek büyüme işlemleri uygulanmıştır. Bu yöntemin tercih edilme nedeni bu ölçek büyütme yaklaşımının literatürde ve endüstride en çok tercih edilen yöntem olmasıdır. Bu yöntemin temelinde karıştırmayla oluşan kolmogorov burgaçlarının boyutunu sabit tutularak hedeflenen üretim sistemindeki karıştırıcı bıçak boyutu ve çalışma hacimleri üzerinden hesaplamalar yapılmaktadır. (Shafa et al., 2019; Zhang et al., 2022). Bu tez kapsamında da spinner flaskta belirlenen karıştırma hızı üzerinden bu yaklaşım tercih edilmiştir. Ayrıca son yıllarda özellikle de hücre kültürü temelli biyoteknolojik üretimlerde hem konvansiyonel hem de tek kullanımlık biyoreaktörlerde segmentli tip veya filkulağı tipi karıştırıcı bıçak kullanılmaktadır. Bu karıştırıcı tiplerinin hücrelere en az zarar vererek kültür

sistemi içerisinde oldukça etkili bir karıştırma sağladığı gösterilmektedir (Kaiser et al., 2017; Rotondi et al., 2021; Zhang et al., 2022). Özellikle segmentli bıçak tipi ile yapılan laboratuvar ölçekli üretimler sınırlıdır ve literatürde bu bıçak tipin için hesaplamalara yönelik kısıtlı bilgi bulunmaktadır.

Yapılan detaylı araştırma sonucunda bıçak açısı 30° 'ye ayarlanmış olan 3 bıçaklı segmentli tip karıştırıcıya ait Np sayısı belirlenmesinde literatürde yer alan Re sayısına karışıklık gelen Np sayıları üzerinden bir değerlendirme yapılmıştır. Özellikle bu bıçak açısında ve bu karıştırıcı tipine sahip olan UniVessel® 2L SU Bioreactor ile yapılan çalışmalarda oluşturulan grafiklerden faydalanılmıştır (Kaiser et al., 2017). Ayrıca bu karıştırıcı tipinde olan fakat bıçak açısı 45° 'ye ayarlı olarak denemeleri yapılan biyoreaktörlerin geometrileri, grafikleri ve analizleri de incelenmiştir (van Eikenhorst et al., 2014; Wyrobnik et al., 2022). Wu ve diğerleri (2001) tarafından yapılan çalışmada bıçak açısının azaldıkça Np sayısının da azaldığı ve bıçak açısı 45° 'den 30° 'ye değiştirildiğinde Np'nin yaklaşık olarak yarı yarıya azaldığını göstermişlerdir (Wu et al., 2001). Böylelikle tüm literatür verileri değerlendirildiğinde biyoreaktörler için kullanılan 30° 'ye ayarlanmış 3 bıçaklı segmentli tip karıştırıcının tahmin edilen karıştırma hızları arasındaki Re sayısı aralığı için Np değeri 0,8375 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, bu değer belirlenirken incelenen çalışmalarda kullanılan biyoreaktörlerin geometrisi de göz önüne alınarak karıştırıcının biyoreaktördeki yerleşimi buna göre yapılmıştır. Biyoreaktör için karıştırma hızı hesabında ise serum içermeyen DMEM-HG ortamının viskozite ve yoğunluk değerleri kullanılmıştır. Özellikle tüm dinamik kültür çalışmalarında ortama % 0,1 oranında eklenen Pluronic® F68'in ise besin ortamı viskozitesini anlamlı olarak etkilemediği gösterildiğinden (Tharmalingam et al., 2008) eklenen Pluronic® F68'in kültür ortamı viskozitesi üzerindeki etkisi ihmal edilerek tüm hesaplamalar gerçekleştirilmiştir.

Tüm sistemlerin dinamik kültürlerinin kendi içinde kıyaslamasında özellikle tüm hücre hatlarının spinner flask üretimiyle biyoreaktör üretimleri arasında hem ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu hem de ikilenme süresi açısından hiçbir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Bu durum gerçekleştirilen ölçek büyütme işlemleri için belirlenen değerlerin ve yapılan hesapların doğru olduğunu gösterir niteliktedir. Ayrıca her bir hücre hattı için belirlenen karıştırma hızı için hesaplanan *eddy*

burgacı boyutlarının, ölçülen hücre boyutlarından oldukça büyük olması hücrelerinin belirlenen bu karıştırma hızlarında bioreaktör içerisinde zarar görmeden kültürlenebildiğini ortaya koymaktadır (Merten, 2015).

Çalışma kapsamında kullanılan tüm hücre hatlarının bioreaktör üretimleri sonucunda belirlenen ikilenme süreleri ve ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu verileri literatür ile kıyaslanmıştır. Literatürde genellikle süspanse ve serumsuz koşullara adapte edilmiş olan MDCK hücrelerinin 20-30 saat aralığında değiştiği ve ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonun da $2-12 \times 10^6$ hücre/mL olduğu görülmüştür (Bissinger et al., 2019; Rodrigues et al., 2020; van Wielink et al., 2011; Wu et al., 2020). Bununla birlikte benzer çalışmalarda adapte edilen MDCK hücrelerinin yaklaşık olarak 30-50 saatlik ikilenme süresine sahip olduğu ve düşük maksimum hücre konsantrasyonlarına ulaştığı da gösterilmektedir (Culture and Collection, 2006; Lohr et al., 2010). Bu çalışma kapsamında ise MDCK hücrelerinin ulaştığı maksimum hücre konsantrasyonu $1,762 \times 10^6$ hücre/mL ve ikilenme süresi de 42,53 saat olarak hesaplanmıştır. Literatürdeki bazı çalışmalarla benzerlik gösterse de diğer çalışmalarla oluşan farklılıkların üretim modu, adaptasyon yöntemi ve kullanılan besin ortamı içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca bioreaktörlerde yapılan üretimlerdeki metabolitlerin değişimlerinin literatürdeki çalışmalara oldukça benzediği görülmektedir. HEK-293 hücreleriyle yapılan bioreaktör üretimi sonucunda elde edilen 39,678 saatlik ikilenme süresi ve $1,912 \times 10^6$ olarak ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu değerlerinin, Jang ve diğerleri (2022) tarafından HEK-293 hücrelerinin süspanse koşullara doğrudan adaptasyonu sonucunda hesaplanan 44 saatlik ikilenme süresine ve 1×10^6 olarak ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonuna kıyasla daha iyi olduğu görülmüştür. Ayrıca HEK-293 hücrelerinin metabolik değişimleri için çizilen metabolit grafiklerindeki değişimlere de oldukça benzediği görülmektedir (Jang et al., 2022). Bir başka çalışmada ise HEK-293T hücreleri için ikilenme süresi ortalama olarak 24 saat civarında hesaplanırken, yapılan erlen üretimlerinde $1,1 \times 10^7$ hücre/mL konsantrasyona ulaşıldığı gösterilmiştir (Lomba et al., 2021). Ayrıca HEK-293SF hücreleriyle bioreaktörde kesikli beslemeli üretim modunda yapılan başka bir çalışmada ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu 6×10^6 hücre/mL olarak belirtilmiştir (Dash et al., 2023). CHO-K1 hücreleriyle yapılan bioreaktör üretimi sonucunda da ikilenme süresi 34,06 saat olarak bulunmuş ve ulaşılan

maksimum hücre konsantrasyonu da $3,012 \times 10^6$ hücre/mL olarak hesaplanmıştır. Serumsuz koşullarda süspanse olarak üremeye adapte edilen CHO-K1 ile yapılan literatür çalışmalarına bakıldığında ise ikilenme sürelerinin çok daha düşük olduğu (18 - 20 saat civarında) ve ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonlarının da $1 - 3 \times 10^7$ aralığında olduğu görülmektedir (Schmitz et al., 2021; Tossolini et al., 2018). Literatürle farklılıklar gösterse de CHO-K1 hücrelerine yapılan metabolik analizlerinin büyük oranda bu çalışmalara benzediği görülmüştür. Adapte edilmiş CHO-K1 hücreleri kullanılarak biyoreaktörde mAb üretiminin yapıldığı başka bir çalışmada ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonunun yaklaşık olarak 2×10^6 hücre/mL olduğu gösterilmiştir (Romand et al., 2016). Adaptasyon yöntemi, kullanılan besin ortamı içeriği ve üretim modu bu değerlerin değişmesindeki en büyük etkenlerdir. THP-1 hücreleriyle yapılan biyoreaktör üretimi sonucunda bulunan $2,037 \times 10^6$ hücre/mL maksimum hücre konsantrasyonu ve 63,56 saatlik ikilenme süresinin, literatürdeki THP-1 hücreleriyle yapılan büyük ölçek çalışmasında $2,02 \times 10^6$ hücre/mL maksimum hücre konsantrasyonuna ulaşılarak ikilenme süresinin de 64,8 saat olarak bulunduğu çalışmaya oldukça benzediği görülmüştür (Kimiz-Gebologlu et al., 2022).

Tüm hücre hatlarıyla yapılan biyoreaktör üretimleri sonucunda elde edilen veriler üzerinden hücre hatlarının değerlendirilmesinin iki şekilde yapılmasının daha doğru olacağı düşünülmektedir. Endüstride terapötik protein üretimi için uzun yıllardır tercih edilen CHO-K1 hücre hattı, insan kökenli olan THP-1 ve HEK-293 hücreleriyle biyoproses verimliliği açısından kıyaslandığında CHO-K1'in bu hücrelerden ikilenme süresi ve ulaşılan maksimum hücre konsantrasyonu açısından üstün olduğu görülmektedir. Bununla birlikte kökenleri açısından THP-1 ve HEK-293 hücreleri sentezledikleri protein glikozilasyon motifi yapılarının insana daha uygun olduğu ve bu anlamda da daha kaliteli terapötik protein ürünleri üretebilecekleri düşünüldüğünde CHO-K1'e göre avantajlıdırlar. Bu iki insan kökenli hücre hattı da kendi içinde kıyaslandığında HEK-293 ikilenme süresi ve üretim için gerekli olan başlangıç hücre konsantrasyonunun daha düşük olması gibi avantajlarıyla öne çıkmaktadır. Bununla beraber THP-1 hücreleri de daha düşük karıştırma hızlarında kültürlenebilme, adaptasyon süresinin daha kısa olması ve orijinalinde süspanse karakterde olma gibi avantajlara sahiptir.

Hücre hatlarının biyoproses verimliliklerinin değerlendirilmesinde diğer bir alan ise hayvan hücrelerinin kullanılmasının bir gereklilik olduğu viral aşı üretimidir. Bu açıdan da iki insan kökenli hücre hattı influenza aşılarının üretiminde tercih edilen bir platform olan MDCK hücreleriyle temel biyoproses verileri üzerinden kıyaslandığında, HEK-293 hücre hattı daha kısa ikilenme süresi ve adaptasyon süresiyle birlikte daha yüksek hücre konsantrasyonuna ulaşabilme açısından daha avantajlıdır. THP-1 hücre hattı ile MDCK kıyaslandığında ise MDCK daha kısa bir ikilenme süresine sahip olsa da THP-1'in insan kökenli olması, daha yüksek maksimum hücre konsantrasyonuna ulaşabilmesi ve daha kısa adaptasyon gibi üstünlükleri bulunmaktadır. Bu açıdan da özellikle influenza virüsü kaynaklı bir pandemi düşünüldüğünde en kısa zamanda ve en fazla miktarda ürün ortaya konmak istendiğinde bu durum önem kazanmaktadır. Tüm bunlara ek olarak otorite kuruluşlar endüstriyel üretimlerde yer alan besin ortamlarında antibiyotik olmamasını veya kullanılıyor ise bunun sınırlandırılmasını istediğinden gerçekleştirilen tüm adaptasyon ve ölçek büyütme çalışmalarında buna uygun olarak sadece yine bu kuruluşların üretimlerde kullanılmak üzere izin verdiği bir antibiyotik çeşidi olan gentamisin kullanılmıştır (Food and Drug Administration, 1977). Kullanılan bu gentamisinin besin ortamındaki konsantrasyonu ise güvenli aralıkta yer alan ve hücre kültürlerinde standart olarak kabul edilen 50 µg/mL konsantrasyonuna ayarlanarak çalışmada kullanılmıştır (Hassan and Ahmad, 2020).

Hücre hatlarının verimlerinin kıyaslanması için ayrıca BCA analizi ile toplam protein konsantrasyonları hesaplanmıştır. BCA analizine göre tüm hücre hatları gün bazında değerlendirildiğinde, HEK-293'ün en yüksek protein konsantrasyonuna sahip olduğu, sonra sırasıyla CHO-K1, MDCK ve THP-1 hücre hattı olduğu belirlenmiştir. Burada BCA analizi yapılmasındaki amaç dolaylı olarak herhangi bir terapötik protein üretimi planlandığından hücre hatlarının ekspresyonel kapasitelerinin ortaya konmasıdır (Geraghty et al., 2014). Ancak, bu analiz ile bir yandan hücrelerin ekspresyonel kapasiteleri ortaya konarken diğer bir yandan da bunların daha sonra ürünün yüksek saflıkta elde edilmesi için üründen ayrılması gerektiğinden alt akım işlemlerinde oluşturacağı zorluk da düşünülmelidir. Normalde endüstriyel terapötik üretiminde kullanılmayan MDCK hücrelerine de bu analizin gerçekleştirilmesindeki amaç, sadece bu hücre hattıyla yapılacak bir viral üretimde ortamdan uzaklaştırılması gereken hücresel atık olarak değerlendirilecek

protein miktarının belirlenmesidir. Diğer bir yandan da CHO-K1 ile diğer insan kökenli hücre hatları ekspresyonel kapasite açısından kıyaslandığında HEK-293'ün özellikle CHO-K1 gibi endüstriyel kullanıma oldukça uygun olduğu düşünülmektedir. THP-1'in en düşük toplam protein konsantrasyonu değerlerine sahip olmasının yanında özellikle biyoreaktör üretimlerinde hücre metabolizması açısından HEK-293 ve CHO-K1 hücrelerine kıyasla ortamda çok daha az laktik asit salgıladığından dolayı terapötik ürünlerin üretiminde ilerleyen kültür sürelerinde bile ürün yapısını olumsuz anlamda en az düzeyde etkileceği söylenebilmektedir (Buchsteiner et al., 2018; Torres et al., 2018).

Hücre hatlarının biyoproses verimliliklerinin kıyaslanması için yapılan diğer bir çalışma ise tüm hücre hatlarının ve bunların adapte hallerinin H1N1 alt tipi olduğu belirlenen influenza A virüsü ile enfekte edilmesidir. Burada kullanılan tüm hücre hatlarının kullanılan influenza virüsü ile enfekte olduğu görülmüştür. Ayrıca, hücrelerin virüs üretim verimleri TCID₅₀ ve Ct değerleri üzerinden kıyaslanmıştır. Gerçekleştirilen virüs enfeksiyon çalışmasında en fazla virüsü monolayer HEK-293 hücrelerinin ürettiği hem Ct hem de TCID₅₀ sonucuna bakılarak görülmektedir. Literatürde yer alan çalışmalara bakıldığında ise MDCK hücrelerini adherent hallerinin HEK-293 hücrelerine kıyasla çok daha fazla düzeyde influenza virüsü üretebildiğini göstermektedir (Le Ru et al., 2010; Vlecken et al., 2013). Burada HEK-293 hücrelerinin MDCK hücrelerinden daha fazla virüs üretmesinin sebebinin çalışmada kullanılan virüsün doğrudan insandan izole edilen bir virüs olması ve belirli bir hücre tipine adapte olmaması için de 5 kereden fazla MDCK hücrelerinde pasajlanmadığından dolayı insan hücrelerinde daha iyi üremesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca yapılan literatür çalışmalarının neredeyse hepsinde H1N1 alt tipindeki PR8 adlı influenza virüsü kullanılmaktadır. Ancak bu virüs fare hücrelerinde yüksek oranda pasajlanarak hücre kültürüne adapte edilmiş atenüe bir virüstür. Bu nedenle insan hücrelerinde üremesi çok daha düşük seviyelerde olabilmektedir (Rodriguez et al., 2009; Rutigliano et al., 2014). Bununla birlikte THP-1 hücrelerinin de oldukça yüksek düzeyde enfekte olduğu görülmektedir. Özellikle diğer hücre hatlarından farklı olarak THP-1 hücrelerinin adapte edilmiş halinin virüs üretim miktarının orijinal haline kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. Literatürde bazı kaynaklarda THP-1 hücrelerinin PR8 virüsüne karşı duyarlı olmadığı gösterilse de (Ana-Sosa-Batiz et al., 2016) yapılan

diğer farklı çalışmalarda da PR8 ile enfekte olduğu (Lamichhane and Puthavathana, 2018; Liu et al., 2019) belirtilmektedir. Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen enfeksiyon denemelerinde ve virüs üretiminde THP-1 hücrelerinin kullanılan influenza A virüsü ile enfekte olduğu ve virüsü üretebildiği görülmektedir. Hücre hatlarının adapte edilmiş halleri kıyaslandığında ise en fazla virüsü adapte edilmiş HEK-293 hücrelerinin ürettiği görülmüştür. Bunun hemen ardından da adapte edilmiş olan MDCK ve THP-1 hücreleri gelmektedir. Tüm bunlar değerlendirildiğinde, bu çalışma kapsamında HEK-293 hücreleri hem daha fazla virüs üretebildiği hem de insan kökenli olmasından dolayı daha uygun yapıda enfektif viral partikül sentezi yapacağı düşünüldüğünden en uygun platform olarak belirlenmiştir.

Literatürde influenza virüsleriyle gerçekleştirilen enfeksiyon sonucunda kullanılan hücre hattının metabolik profilinin de değiştiği gösterilmektedir (Correia Ramos et al., 2022; Keshavarz et al., 2020; Ritter et al., 2010). İnfluenza virüsü enfeksiyonunda büyük ölçüde glikoz ve laktik asit metabolizmasının arttığı görülmektedir. Yapılan bir çalışmada özellikle laktik asidin kültür ortamındaki konsantrasyonunun artmasıyla hücrelerdeki tip-I interferon ekspresyonunu azalttığından dolayı influenza virüs enfeksiyonunu artırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir (Thyrsted et al., 2021). Bu anlamda da çalışmada en fazla virüsü üreten hücre hattı olan HEK-293 hücrelerinin de hem adherent hem de adapte hallerinin sırasıyla 69,28 mM ve 68,53 mM olarak ölçülen laktik asit konsantrasyonlarının diğer tüm hücre hatlarından elde edilen verilere kıyasla bu değerlerin en yüksek değerler olduğu görülmektedir. Özellikle literatürde HEK-293 hücrelerine kıyasla daha yüksek viral titrelerin elde edildiği MDCK hücre hattında ise bu değerler orijinal ve adherent halleri için sırasıyla 57,75 mM ile 35,61 mM şeklindedir. Gerçekleştirilen çalışma kapsamında MDCK'ya kıyasla HEK-293 hücrelerinin daha yüksek titrede virüs üretmesinin bu durumla da ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir. Bu hücre hatlarına kıyasla, THP-1 hücrelerinin düşük olan laktik asit miktarıyla beraber bu hücrenin bağışıklık sistemi hücresi olduğu düşünüldüğünde, hücre içi virüs savunma mekanizmasıyla influenza enfeksiyonunun sınırlandırılmış olabileceği söylenebilmektedir. Ölçülen diğer bir metabolit olan amonyağın ise influenza virüsü enfeksiyonunu inhibe edebileceği gösterilmektedir (Decrey et al., 2016). Adapte edilmiş HEK-293 ve MDCK hücre

hatlarının biyoreaktör üretimleri sonucunda ölçülen amonyak değerleri birbirine yakın olmasına rağmen THP-1’de ise bu değer çok daha düşük kalmaktadır. Bununla birlikte her bir hücre hattından elde edilen viral titreler göz önüne alındığında laktik asidin virüs enfeksiyonu üzerinde daha etkili olduğu söylenebilmektedir. Ancak bu çalışma kapsamında viral enfeksiyon denemeleri sadece flask ölçeğinde gerçekleştirilmiştir. Bu anlamda da hem dinamik kültürün etkisini hem de influenza A virüsü enfeksiyonunun hücre hatları metabolizması üzerindeki etkilerini değerlendirmek adına biyoreaktörlerde de büyük ölçek çalışmaları gerçekleştirilmelidir. Ayrıca, MDCK hücrelerinin virüs üretimine kıyasla daha düşük olsa da THP-1 hücrelerinin de oldukça iyi düzeyde influenza A virüsü replikasyonuna izin verdiği ve enfektif virüs partiküllerini üretebildiği görülmüştür. Bu anlamda da özellikle hem insan kökenli hem de orijinal halinin süspanse olmasından dolayı da influenza virüsü üretimlerinde kullanılması açısından yüksek potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Tüm bunlarla beraber influenza virüsü enfeksiyon çalışmalarında CHO-K1 negatif kontrol gibi kullanılmıştır. CHO-K1 hücrelerinin influenza A virüsü ile enfekte olduğu fakat yeterli düzeyde viral replikasyonu desteklemediği bilinmektedir (Le Ru et al., 2010; Vlecken et al., 2013). Bu açıdan da gerçekleştirilen enfeksiyon çalışmasında en az sayıda virüs üreten hücre hattı olmuştur.

Tüm bunlar değerlendirildiğinde özellikle hem influenza virüsü hem de terapötik protein üretimi açısından HEK-293 ve THP-1 hücre hattının biyoproseslerde kullanılma potansiyellerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Terapötik protein üretimi özelinde CHO-K1 biyoproses verimi açısından üstün özellikler sergilese de üretimde tercih edilen hücre hattının insan kökenli olması ürün kalitesi açısından avantaj sağlamaktadır. İnfluenza virüsü üretimi açısından değerlendirildiğinde ise özellikle bu çalışma kapsamında HEK-293 hücre hattı öne çıkmaktadır. Bu anlamda tüm virüs üretimine dayalı bir influenza A virüsü üretim sürecinde HEK-293 hücrelerinin aşı üretim biyoproseslerinde kullanılma potansiyellerinin çok yüksek olduğu bu çalışmayla gösterilmektedir. Bununla birlikte özellikle üretim başlangıcı için hız söz konusu olduğunda da bu çalışma kapsamında değerlendirilen diğer bir insan kökenli hücre hattı THP-1’ in de oldukça yüksek bir potansiyel sahip olduğu ortaya konmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Gerçekleştirilen tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarından CHO-K1 ve MDCK hücre hattı literatürde üretim sistemleri için sıklıkla kullanılan hücre hatları olmasına rağmen biyoreaktör ölçeğinde HEK-293 ve özellikle de THP-1 ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Özellikle bu tez kapsamında ilk kez doğrudan adaptasyonla serumsuz ortama adapte edilen THP-1 hücrelerinin endüstriyel ölçeğe uyarlanabilirliği ortaya konmaktadır. HEK-293 hücreleriyle üretim denemeleri gerçekleştirilse ve literatürde özellikle son yıllarda buna yönelik yayın sayısı artsa da özellikle endüstriyel sistemlerin en iyi simülasyonu olan karıştırmalı tank biyoreaktöründe yapılan üretilere ait biyoproses verileri kısıtlıdır. HEK-293 hücrelerinin süspanse üremeye adapte edilerek tüm üretim sistemlerinde bu hücrelerin üretimine yönelik karıştırma hızı belirlenmesi ve yöntem kıyaslamasında elde edilen sonuçlarla beraber bu hücre hattının endüstriyel uygunluğunu ortaya koymaktadır. Özellikle insan kökenli oldukları ve biyofarmasötik ürün üretimi açısından daha uygun ekspresyonel platformlar olmaları nedeniyle de bunların endüstriye uyarlanabilirliğinin gösterilmesi hem akademik hem de sanayi açısından önemlidir. Ayrıca gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan biyoreaktördeki karıştırıcı tipine ait verilerin azlığı nedeniyle de gerçekleştirilen tez çalışmasında bu bıçak tipinin kullanılması çalışmanın yenilikçi yönleri arasında yer almaktadır. Bu çalışmada gerçekleştirilen influenza virüsü enfeksiyon denemeleriyle birlikte de halihazırda endüstride influenza aşısı üretiminde kullanılan MDCK ile beraber özellikle HEK-293 ve THP-1 hücre hatlarının influenza aşısı üretiminde ekspresyonel platformlar olarak kullanılabilirlikleri ortaya konmuştur. Tüm bunlara ek olarak üretimler için tercih edilen serumsuz besin ortamlarının yerli üretim yapan bir firmadan tedarik edilmesi de bu çalışmanın yerli kaynakların kullanımı ve milli kazanım ilkesinin önemini vurgulması açısından da önemlidir.

Bunlarla birlikte özellikle bu çalışmada insan kökenli hücre hatlarına odaklanılmıştır. Bu açıdan burada yer alan HEK-293 ve THP-1 hücre hatlarıyla birlikte endüstriyel kullanım açısından diğer insan kökenli hücre hatlarının da uygunluğu değerlendirilebilir. Ayrıca daha farklı adaptasyon yöntemlerinin de denenmesiyle bu yöntemler arasındaki farklılıkların potansiyel bir üretim söz konusu olduğunda üretim verimine olan etkileri daha detaylı olarak gösterilebilir.

Özellikle biyoreaktör üretimleri için karıştırma hızının hesaplanmasında teorik bir yaklaşım uygulanmıştır. Bu yaklaşımın gerçekleştirilen üretimler sonucunda başarılı olduğu görülse de özellikle sırasıyla erlen ve spinner üretimleri için torkmetreyle ölçüme dayanan uygulamalı hesaplamalar ile ölçek büyütme için gerçekleştirilecek hesaplamaların daha doğru olabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber bu çalışma kapsamında yapılan virüs üretim çalışmalarının da endüstriyel üretimlerin daha gerçekçi bir simülasyonunun yapılması adına dinamik kültür sistemleri kullanılarak yapılması da üretim sistemlerinin ve bunlarda kullanılan ekspresyonel platformlar olan hücre hatlarının üretim başarısının gösterilmesinde daha uygun olacağı söylenebilmektedir.

Ayrıca bu çalışmada hücre hatlarının biyoproslerdeki üretim verimlerinin kıyaslanması adına temel olarak hayvan hücre kültürleri kullanılarak yapılan terapötik protein üretimi ve viral aşı üretimindeki başarıları değerlendirilmeye çalışılmıştır. Terapötik protein üretimi açısından dolaylı olarak sadece BCA analiziyle hücre hatlarının ekspresyonel kapasiteleri değerlendirilmiştir. Burada özellikle tüm hücre hatlarının bir mAb, büyüme faktörü veya hormon üretecek şekilde transfekte edilip daha sonra bunların üretim verimi açısından bunların kıyaslanması daha uygun bir yaklaşım olacaktır. Ayrıca insan kökenli olan hücre hatlarının ürettiği terapötik proteinlerin kalite açısından değerlendirilmesi için de glikozilasyon profili ile beraber proteinin farmakodinamik ve farmakokinetik etkinliğinin değerlendirilmesi bu kıyaslamanın daha detaylı şekilde yapılmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Daha detaylı olarak viral aşı üretimi açısından hücre hatlarını değerlendirmek adına influenza A virüsüyle enfeksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sadece flask düzeyinde yapılabilmiş olup asıl hedef endüstriyel üretim olduğu için de bunların biyoreaktör ölçeğinde gerçekleştirilmesinin daha uygun olacağı söylenebilmektedir. Böylelikle büyük ölçekte influenza A virüsü enfeksiyonunun hücre metabolizmasını nasıl değiştirdiğiyle beraber dinamik koşulların virüs-hücre etkileşimi üzerindeki etkileri ve virüs üretimi açısından nasıl bir farklılık oluşturacağı daha etkin bir şekilde gösterilebilir. Bunlarla birlikte influenza aşılarında influenza A ile beraber influenza B ve H3N2 gibi diğer influenza A virüsü alttiplerinin de kullanıldığı göz önüne alınırsa bu çalışmada

kullanılan H1N1 alttipindeki influenza A virüsü dışında influenza B virüsü ve influenza A virüsünün diğer alttipleriyle de üretim denemelerinin yapılması, çalışmada kullanılan hücre hatlarının influenza aşısı üretimi için verimlerinin ortaya konması açısından çok daha etkili olacağı düşünülmektedir.

Ayrıca bu çalışmanın nihai hedefi endüstriyel üretim açısından hücre hatlarının kıyaslanması olduğundan çalışmadan 1 L çalışma hacmiyle gerçekleştirilen biyoreaktör üretiminin 5 L veya 10 L gibi daha büyük hacimlere çıkılarak üretim yapmanın endüstriyel simülasyon açısından daha uygun olacağı söylenebilmektedir. Bununla birlikte özellikle hayvan hücre kültürü üretimlerinde ve diğer biyoteknolojik üretimlerde en çok tercih edilen biyoreaktör tipi karıştırmalı tabk olmasına rağmen farklı tipte biyoreaktör sistemleri de kullanılmaktadır. Özellikle dalgalı veya orbital çalkalamalı biyoreaktörler sıklıkla endüstride tercih edilmektedir. Bu açıdan hücre hatlarının farklı biyoreaktör sistemlerinde üretilerek bunlardaki üretim başarılarının gösterilmesi diğer bir öneri olarak düşünülebilmektedir. Tüm bunlarla birlikte hayvan hücre kültürü temelli olarak üretilecek endüstriyel bir ürün belirlenerek bu ürünün denenene farklı hücre hatlarında üretimi için sanayi-üniversite işbirlikli olarak genişletilmesinin çalışmanın asıl hedefine ulaşması açısından oldukça önemli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abaandou, L., Quan, D., Shiloach, J.**, 2021, Affecting hek293 cell growth and production performance by modifying the expression of specific genes, *Cells*, 10(7): 1667.
- Acevedo-Whitehouse, K., Bruno, R.**, 2023, Potential health risks of mRNA-based vaccine therapy: A hypothesis, *Medical Hypotheses*, 171: 111015.
- Al-Jighefee, H.T., Najjar, H., Ahmed, M.N., Qush, A., Awwad, S., Kamareddine, L.**, 2021, Covid-19 vaccine platforms: Challenges and safety contemplations, *Vaccines*, 9(10): 1196.
- Alagheband Bahrami, A., Azargoonjahromi, A., Sadraei, S., Aarabi, A., Payandeh, Z., Rajabibazl, M.**, 2022, An overview of current drugs and prophylactic vaccines for coronavirus disease 2019 (COVID-19), *Cellular and Molecular Biology Letters*, 27(1): 38.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.**, 2008, Molecular Biology of The Cell, Taylor & Francis, New York, 1601 p.
- Aldo, P.B., Craveiro, V., Guller, S., Mor, G.**, 2013, Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line, *American Journal of Reproductive Immunology*, 70(1): 80-86 pp.
- Ana-Sosa-Batiz, F., Vandervan, H., Jegaskanda, S., Johnston, A., Rockman, S., Laurie, K., Barr, I., Reading, P., Lichtfuss, M., Kent, S.J.**, 2016, Influenza-Specific Antibody-Dependent Phagocytosis, *PLoS One*, 11(4): e0154461.
- Anitha, T., Kuduvalli, S.S., Ramalakshmi, O., Precilla, S.D.**, 2020, Evaluation of Cell Doubling Time in C6 and Y79 Cell Lines Based on Seeding Density, *SBV Journal of Basic, Clinical and Applied Health Science*, 2(4):146–149 pp.
- Anleitung, Thermo-Fisher...**, 2019, "Transferring CHO Cells From Monolayer to Suspension Culture", *Culture*, <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/protocols/cell-culture/chinese-hamster-ovary-cell-culture-protocol/transferring-cho-cells-from-monolayer-to-suspension-culture.html>, (Erişim Tarihi : 02.02.2020)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- ATCC.**, 2013, Virology guide, *ATCC Guide*, <http://www.lgcstandards-atcc.org/Home/Form Confirmations/Thank You Guides>, 1–35 pp.
- ATCC.**, 2023a, 293 [HEK-293] (CRL-1573), <https://www.atcc.org/products/crl-1573>, (Erişim Tarihi : 12.01.2023)
- ATCC.**, 2023b, CHO-K1 (CCL-61), <https://www.atcc.org/products/ccl-61>, (Erişim Tarihi : 14.01.2023)
- ATCC.**, 2023c, MDCK (CCL-34), <https://www.atcc.org/products/ccl-34>, (Erişim Tarihi : 14.01.2023)
- ATCC.**, 2023d, THP-1 (TIB-202), <https://www.atcc.org/products/tib-202>, (Erişim Tarihi : 25.04.2023)
- Aubrit, F., Perugi, F., Léon, A., Guéhenneux, F., Champion-Arnaud, P., Lahmar, M., Schwamborn, K.**, 2015, Cell substrates for the production of viral vaccines, *Vaccine*, 33(44): 5905–5912 pp.
- Ayati, N., Saiyarsarai, P., Nikfar, S.**, 2020, Short and long term impacts of COVID-19 on the pharmaceutical sector, *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28: 799–805 pp.
- Barberis, I., Myles, P., Ault, S.K., Bragazzi, N.L., Martini, M.**, 2016, History and evolution of influenza control through vaccination: From the first monovalent vaccine to universal vaccines, *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 57(3): E115-E120 pp.
- Barrett, P.N., Mundt, W., Kistner, O., Howard, MK.**, 2009, Vero cell platform in vaccine production: Moving towards cell culture-based viral vaccines, *Expert Review of Vaccines*, 8(5): 607-618 pp.
- Bellani, C.F., Ajeian, J., Duffy, L., Miotto, M., Groenewegen, L., Connon, C.J.**, 2020, Scale-Up Technologies for the Manufacture of Adherent Cells, *Frontiers in Nutrition*, 7: 575146.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Benton, T., Chen, T., McEntee, M., Fox, B., King, D., Crombie, R., Thomas, T.C., Bebbington, C.,** 2002, The use of UCOE vectors in combination with a preadapted serum free, suspension cell line allows for rapid production of large quantities of protein, *Cytotechnology*, 38: 43–46 pp.
- Berg, S., Kircher, M., Preschitschek, N., Bröring, S.,** 2020, Bioeconomy as a circular and integrated system, *Bioeconomy for Beginners*, 139-157 pp.
- Berry, J.D., Liovic, P., Šutalo, I.D., Stewart, R.L., Glattauer, V., Meagher, L.,** 2016, Characterisation of stresses on microcarriers in a stirred bioreactor, *Applied Mathematical Modelling* 40(15-16): 6787–6804 pp.
- Berting, A., Farcet, M.R., Kreil, T.R.,** 2010, Virus susceptibility of Chinese hamster ovary (CHO) cells and detection of viral contaminations by adventitious agent testing, *Biotechnology and Bioengineering*, 106(4): 598–607 pp.
- Bissinger, T., Fritsch, J., Mihut, A., Wu, Y., Liu, X., Genzel, Y., Tan, W.S., Reichl, U.,** 2019, Semi-perfusion cultures of suspension MDCK cells enable high cell concentrations and efficient influenza A virus production, *Vaccine*, 37(47): 7003–7010 pp.
- Böhm, L., Hohl, L., Bliatsiou, C., Kraume, M.,** 2022, Multiphase stirred-tank bioreactors – New geometrical concepts and scale-up approaches, *Chemie Ingenieur Technik*, 94(9): 1341–1341 pp.
- Borys, B.S., Roberts, E.L., Le, A., Kallos, M.S.,** 2018, Scale-up of embryonic stem cell aggregate stirred suspension bioreactor culture enabled by computational fluid dynamics modeling, *Biochemical Engineering Journal*, 133: 157–167 pp.
- Bosshart, H., Heinzelmann, M.,** 2016, THP-1 cells as a model for human monocytes, *Annals of Translational Medicine*, 4(21).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Böttcher-Friebertshäuser, E., Freuer, C., Sielaff, F., Schmidt, S., Eickmann, M., Uhlenborff, J., Steinmetzer, T., Klenk, H-D., Garten, W.,** 2010, Cleavage of Influenza Virus Hemagglutinin by Airway Proteases TMPRSS2 and HAT Differs in Subcellular Localization and Susceptibility to Protease Inhibitors, *Journal of Virology*, 84(11): 5605–5614 pp.
- Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., Gstraunthaler, G.,** 2010, Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database, *ALTEX*, 27(1): 53-62 pp.
- Buchsteiner, M., Quek, L.E., Gray, P., Nielsen, L.K.,** 2018, Improving culture performance and antibody production in CHO cell culture processes by reducing the Warburg effect, *Biotechnology and Bioengineering*, 115(9): 2315–2327 pp.
- Butler, M.,** 2004, Animal Cell Culture and Technology, Taylor & Francis, New York, 287p.
- Butler, M., Meneses-Acosta, A.,** 2012, Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96: 885–894 pp.
- Butler, M.,** 2015, Serum and Protein Free Media, Animal Cell Culture, Springer, Switzerland, Chapter 8: 223–236 pp.
- Cadwell, J.J.S.,** 2011, Production of recombinant proteins and monoclonal antibodies in hollow-fiber bioreactors, *American Laboratory*, 43(5): 30 p.
- Campbell, S.A., Lin, J., Dobrikova, E.Y., Gromeier, M.,** 2005, Genetic Determinants of Cell Type-Specific Poliovirus Propagation in HEK 293 Cells, *Journal of Virology*, 79(10): 6281–6290 pp.
- Caron, A.L., Biaggio, R.T., Swiech, K.,** 2018, Strategies to suspension serum-free adaptation of mammalian cell lines for recombinant glycoprotein production, *Methods in Molecular Biology*, 75-85 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chanput, W., Mes, J.J., Wichers, H.J.**, 2014, THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach, *International Immunopharmacology*, 23(1): 37-45 pp.
- Chanput, W., Peters, V., Wichers, H.**, 2015, THP-1 and U937 cells, The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models, Springer, Switzerland, Chapter 14: 147 p.
- Charyasriwong, S., Watanabe, K., Rahmasari, R., Matsunaga, A., Haruyama, T., Kobayashi N.**, 2015, In Vitro Evaluation of Synergistic Inhibitory Effects of Neuraminidase Inhibitors and Methylglyoxal Against Influenza Virus Infection, *Archives of Medical Research*, 46(1): 8–16 pp.
- Chaturvedi, K., Sun, S.Y., O'Brien, T., Liu, Y.J., Brooks, J.W.**, 2014, Comparison of the behavior of CHO cells during cultivation in 24-square deep well microplates and conventional shake flask systems, *Biotechnology Reports*, 1: 22–26 pp.
- Chen, J.R., Liu, Y.M., Tseng, Y.C., Ma, C.**, 2020, Better influenza vaccines: An industry perspective, *Journal of Biomedical Science*, 27(1): 1-11 pp.
- Chiang, A.W.T., Li, S., Kellman, B.P., Chattopadhyay, G., Zhang, Y., Kuo, C.C., Gutierrez, J.M., Ghazi, F., Schmeisser, H., Ménard, P., Bjørn, S.P., Voldborg, B.G., Rosenberg, A.S., Puig, M., Lewis, N.E.**, 2019, Combating viral contaminants in CHO cells by engineering innate immunity, *Scientific Reports*, 9(1): 8827.
- Cho, M.J., Thompson, D.P., Cramer, C.T., Vidmar, T.J., Scieszka, J.F.**, 1989, The Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Epithelial Cell Monolayer as a Model Cellular Transport Barrier, *Pharmaceutical Research: An Official Journal of American Association of Pharmaceutical Scientists*, 6: 71-77 pp.
- Chu, C., Lugovtsev, V., Golding, H., Betenbaugh, M., Shiloach, J.**, 2009, Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human siat7e gene and its application for influenza virus production, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35): 14802–14807 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Corbishley, A., Gally, D., Tidswell, A.S.M.**, 2020, Tracking SARS-CoV-2 via Municipal Wastewater, University of Edinburgh, United Kingdom, Edinburgh, 58 p.
- Correia Ramos, J.R., Bissinger, T., Genzel, Y., Reichl, U.**, 2022, Impact of Influenza A Virus Infection on Growth and Metabolism of Suspension MDCK Cells Using a Dynamic Model, *Metabolites*, 12(3): 239 p.
- Cortês, M., Schütze, T., Marx, R., Moeller, R., Meyer, V.**, 2020, Fungal Biotechnology in Space: Why and How?, *Grand Challenges in Biology and Biotechnology*, 501–535 pp.
- Cox, R.J., Brokstad, K.A., Ogra, P.**, 2004, Influenza Virus: Immunity and Vaccination Strategies. Comparison of the Immune Response to Inactivated and Live, Attenuated Influenza Vaccines, *Scandinavian Journal of Immunology*, 59(1): 1-15 pp.
- Cruat, V., Rogero, M.M., Keane, K.N., Curi, R., Newsholme, P.**, 2018, Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation, *Nutrients*, 10(11): 1564 p.
- Culture Collection, ATCC.**, 2006, Suspension MDCK Cell Culture, *SAFC Biosciences*, 61: 1–4 pp.
- Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K.B., Dockrell, D.H.**, 2010, The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages, *PLoS One*, 5(1): e8668 p.
- Dash, S., Farnós, O., Yang, Z., Sudalaiyadum Perumal, A., Chaves Fulber, J.P., Venereo-Sánchez, A., Leclerc, D., Kamen, A.A.**, 2023, A rapid procedure to generate stably transfected HEK293 suspension cells for recombinant protein manufacturing: Yield improvements, bioreactor production and downstream processing, *Protein Expression and Purification*, 210: 106295.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Davis, J.M.**, 2011, *Animal Cell Culture: Essential Methods*, Wiley & Sons, United Kingdom, 346 p.
- Dawn, M., Ecker, P.S.**, 2020, CPhI Annual Report 2020: Postulating the post-COVID pharma paradigm, 43–49 pp.
- Decrey, L., Kazama, S., Kohna, T.**, 2016, Ammonia as an in situ sanitizer: Influence of virus genome type on inactivation, *Applied and Environmental Microbiology*, 82(16): 4909–4920 pp.
- Demain, A.L., Vaishnav, P.**, 2009, Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, *Biotechnology Advances*, 27(3): 297-306 pp.
- Demirden, S.F., Alptekin, K., Kimiz-Gebologlu, I., Oncel, S.S.**, 2022, Influenza Vaccine: An Engineering Vision from Virological Importance to Production, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 27(5): 740–764 pp.
- Diaz-Mitoma, F., Popovic, V., Spaans, J.N.**, 2021, Assessment of immunogenicity and safety across two manufacturing lots of a 3-antigen hepatitis B vaccine, Sci-B-Vac®, compared with Engerix-B® in healthy Asian adults: A phase 3 randomized clinical trial, *Vaccine*, 39(29): 3892–3899 pp.
- DSMZ**, 2023, THP-1 (ACC-16), <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-16>, (Erişim Tarihi : 14.05.2023)
- Du, R., Cui, Q., Rong, L.**, 2019, Competitive cooperation of hemagglutinin and neuraminidase during influenza A virus entry, *Viruses*, 11(5): 458 p.
- Dukes, J.D., Whitley, P., Chalmers, A.D.**, 2011, The MDCK variety pack: Choosing the right strain, *BMC Cell Biology*, 12(1): 1-4 pp.
- Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., Kshirsagar, R.**, 2016, Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives, *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6): 1110-1122 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ebrahimi, M., Tamer, M., Villegas, R.M., Chiappetta, A., Ein-Mozaffari, F.,** 2019, Application of CFD to analyze the hydrodynamic behaviour of a bioreactor with a double impeller, *Processes*, 7(10): 694 p.
- Eibl, R., Kaiser, S., Lombriser, R., Eibl, D.,** 2010, Disposable bioreactors: The current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 41-49 pp.
- van Eikenhorst, G., Thomassen, Y.E., van der Pol, L.A., Bakker, W.A.M.,** 2014, Assessment of mass transfer and mixing in rigid lab-scale disposable bioreactors at low power input levels, *Biotechnology progress*, 30(6): 1269–1276 pp.
- Ergen, N., Tüfekçi, H.,** 2022, Mammalian cell lines used in bioprocessing. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 39(3): 884-892 pp.
- Esparza, J., Lederman, S., Nitsche, A., Damaso, C.R.,** 2020, Early smallpox vaccine manufacturing in the United States: Introduction of the “animal vaccine” in 1870, establishment of “vaccine farms”, and the beginnings of the vaccine industry, *Vaccine*, 38(30): 4773–4779 pp.
- European Medicines Agency (EMA),** 2013, Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products, EMA/CHMP/B: 1–8 pp.
- Fanelli, A.,** 2016, HEK293 Cell Line: human embryonic kidney cells 3–4 p. <http://www.hek293.com/>. (Erişim Tarihi : 10.07.2021)
- Fang, Z., Lyu, J., Li, J., Li, C., Zhang, Y., Guo, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Chen, K.,** 2022, Application of bioreactor technology for cell culture-based viral vaccine production: Present status and future prospects, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10: 921755.
- Farzaneh, M., Hassani, S.N., Mozdziak, P., Baharvand, H.,** 2017, Avian embryos and related cell lines: A convenient platform for recombinant proteins and vaccine production, *Biotechnology Journal*, 12(5): 1600598.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Feng, L., Tang, Y., Wu, P., Chu, X., Wang, W., Hou, J.,** 2016, H9 subtype influenza vaccine in MDCK single-cell suspension culture with stable expression of Tmprss2: Generation and efficacy evaluation. *Engineering in Life Sciences* 16(8): 795–807 pp.
- Fernandes, P., Silva, A.C., Coroadinha, A.S., Alves, P.M.,** 2016, Upstream Bioprocess for Adenovirus Vectors, *Adenoviral Vectors for Gene Therapy: Second Edition*, 139–161 pp.
- Flickinger, M.C., Birch, J.R.,** 2010, Suspension Culture, animal cells, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, eib557.
- Fliedl, L., Grillari, J., Grillari-Voglauer, R.,** 2015, Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon, *New Biotechnology*, 32(6): 673–679 pp.
- Food and Drug Administration (FDA),** 1977, Code of Federal Regulations, Title 21.182.1320, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=610.15>. (Erişim Tarihi : 24.06.2023)
- Francis, M.E., King, M.L., Kelvin, A.A.,** 2019, Back to the future for influenza preimmunity—Looking back at influenza virus history to infer the outcome of future infections, *Viruses*, 11(2): 122.
- Freshney, R.I.,** 2005, Culture of Animal Cells, Wiley-Blackwell, New Jersey, United States of America, 676p.
- Freshney, R.I.,** 2011, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition, Wiley-Blackwell, United States of America, 796p.
- Freshney, R.I., Stacey, G.N., Auerbach, J.M.,** 2007, Culture of Human Stem Cells, Wiley-Blackwell, New Jersey, United States of America, 343p.
- Fröhling, M., Hiete, M.,** 2020, Sustainability and life cycle assessment in industrial biotechnology: a review of current approaches and future needs, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 143-203 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gallo-Ramírez, L.E., Nikolay, A., Genzel, Y., Reichl, U.,** 2015, Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production, *Expert Review of Vaccines*, 14(9): 1181–1195 pp.
- Genzel, Y.,** 2015, Designing cell lines for viral vaccine production: Where do we stand?, *Biotechnology Journal*, 10(5): 728-740 pp.
- Genzel, Y., Rödiger, J., Rapp, E., Reichl, U.,** 2014a, Vaccine production: Upstream processing with adherent or suspension cell lines, *Methods in Molecular Biology*, 1104: 371–393 pp.
- Genzel, Y., Vogel, T., Buck, J., Behrendt, I., Ramirez, D.V., Schiedner, G., Jordan, I., Reichl, U.,** 2014b, High cell density cultivations by alternating tangential flow (ATF) perfusion for influenza A virus production using suspension cells, *Vaccine*, 32(24): 2770 - 2781 pp.
- Geraghty, R.J., Capes-Davis, A., Davis, J.M., Downward, J., Freshney, R.I., Knezevic, I., Lovell-Badge, R., Masters, J.R.W., Meredith, J., Stacey, G.N., Thraves, P., Vias, M.,** 2014, Guidelines for the use of cell lines in biomedical research, *British Journal of Cancer*, 111(6): 1021-1046 pp.
- Ghattas, M., Dwivedi, G., Lavertu, M., Alameh, M.G.,** 2021, Vaccine technologies and platforms for infectious diseases: Current progress, challenges, and opportunities, *Vaccines*, 9(12): 1490.
- Giri, S., Bader, A.,** 2014, immortalization of Human Fetal Hepatocyte by Ectopic Expression of Human Telomerase Reverse Transcriptase, Human Papilloma Virus (E7) and Simian Virus 40 Large T (SV40 T) Antigen Towards Bioartificial Liver Support, *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 4(3): 191-201 pp.
- Göbel, S., Kortum, F., Chavez, K.J., Jordan, I., Sandig, V., Reichl, U., Altomonte, J., Genzel, Y.,** 2022, Cell-line screening and process development for a fusogenic oncolytic virus in small-scale suspension cultures, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106 (13-16): 4945–4961 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gobin, J., Muradia, G., Mehic, J., Westwood, C., Couvrette, L., Stalker, A., Bigelow, S., Luebbert, C.C., Bissonnette, F.S.D., Johnston, M.J.W., Sauvé, S., Tam, R.Y., Wang, L., Rosu-Myles, M., Lavoie, J.R., 2021,** Hollow-fiber bioreactor production of extracellular vesicles from human bone marrow mesenchymal stromal cells yields nanovesicles that mirrors the immuno-modulatory antigenic signature of the producer cell, *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1): 1-20 pp.
- Gomez-Lechon, M., Donato, M., Lahoz, A., Castell, J., 2008,** Cell Lines: A Tool for In Vitro Drug Metabolism Studies, *Current Drug Metabolism*, 9(1): 1-11 pp.
- Gomez, P.L., Robinson, J.M., 2017,** Vaccine Manufacturing, *Plotkin's Vaccines*, Chapter 6, 51-60 pp.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977,** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *Journal of General Virology*, 36(1): 59–72 pp.
- Granados, R.R., Li, G., Blissard, G.W., 2007,** Insect cell culture and biotechnology, *Virologica Sinica*, 22: 83–93 pp.
- Gränicher, G., Coronel, J., Pralow, A., Marichal-Gallardo, P., Wolff, M., Rapp, E., Karlas, A., Sandig, V., Genzel, Y., Reichl, U., 2019,** Efficient influenza A virus production in high cell density using the novel porcine suspension cell line PBG.PK2.1, *Vaccine*, 37(47): 7019-7028 pp.
- Greenblatt, D.J., 2017,** Mechanisms and Consequences of Drug-Drug Interactions, *Clinical Pharmacology in Drug Development*, 6(2):118–124 pp.
- Gregersen, J.P., Schmitt, H.J., Trusheim, H., Bröker, M., 2011,** Safety of MDCK cell culture-based influenza vaccines, *Future Microbiology*, 6(2): 143–152 pp.
- Grodzki, A.C.G., Giulivi, C., Lein, P.J., 2013,** Oxygen Tension Modulates Differentiation and Primary Macrophage Functions in the Human Monocytic THP-1 Cell Line, *PLoS One*, 8(1): e54926.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gstraunthaler, G., Schöffl, H., Appl, H., Pfaller, W.,** 2008, Alternatives to the use of fetal bovine serum (FBS): A survey of recent strategies to reduce or replace FBS in cell and tissue culture, *ALTEX*, 25: 24p.
- Gupta, S.K., Dangi, A.K., Smita, M., Dwivedi, S., Shukla, P.,** 2019, Effectual Bioprocess Development for Protein Production, *Applied Microbiology and Bioengineering*, 40: 203–227 pp.
- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., Tripathy, B.C.,** 2016, Basic and applied aspects of biotechnology, *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, 503-520 pp.
- Haeussler, D.J., Evangelista, A.M., Burgoyne, J.R., Cohen, R.A., Bachschmid, M.M., Pimental, D.R.,** 2011, Checkpoints in adenoviral production: Cross-contamination and E1A, *PLoS One*, 6(8): e23160.
- Hahn, W.C.,** 2002, immortalization and transformation of human cells, *Molecules and Cells*, 13(3): 351-361 pp.
- Harada, Y., Takahashi, H., Trusheim, H., Roth, B., Mizuta, K., Hirata-Saito, A., Ogane, T., Odagiri, T., Tashiro, M., Yamamoto, N.,** 2020, Comparison of suspension MDCK cells, adherent MDCK cells, and LLC-MK2 cells for selective isolation of influenza viruses to be used as vaccine seeds, *Influenza and other Respiratory Viruses*, 14(2): 204–209 pp.
- Harrington, W.N., Kackos, C.M., Webby, R.J.,** 2021, The evolution and future of influenza pandemic preparedness, *Experimental and Molecular Medicine*, 53(5), 737-749 pp.
- Harris, J.W., MacDonald, H.R., Engers, H.D., Fitch, F.W., Cerottini, J.,** 1976, Increased cytolytic T lymphocyte activity induced by 2 mercaptoethanol in mixed leukocyte cultures: kinetics and possible mechanisms of action. *The Journal of Immunology*. 116(4): 1071–1077 pp.
- Hassan, S.N., Ahmad, F.,** 2020, The relevance of antibiotic supplements in mammalian cell cultures: Towards a paradigm shift, *Gulhane Medical Journal*, 62(4): 224–230 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hayden, F.G., Palese, P.**, 2016, Influenza virus, *Clinical Virology*, 1009-1058 pp.
- Herman, P., Pauwels, K.**, 2015, Biosafety Recommendations on the Handling of Animal Cell Cultures, *Animal cell culture*, 689–716 pp.
- Herold, S., Becker, C., Ridge, K.M., Budinger, G.R.S.**, 2015, Influenza virus-induced lung injury: Pathogenesis and implications for treatment, *European Respiratory Journal*, 45(5): 1463-1478 pp.
- Hess, R.D., Weber, F., Watson, K., Schmitt, S.**, 2012, Regulatory, biosafety and safety challenges for novel cells as substrates for human vaccines, *Vaccine*, 30(17): 2715-2727 pp.
- Horowitz, B., Minor, P., Morgenthaler, J.J., Burnouf, T., McIntosh, R., Padilla, A., Thorpe, R., van Aken, W.G.**, 2004, WHO Expert Committee on Biological Standardization, *World Health Organization technical report series*, 924: 1-232 pp.
- Hu, J., Han, J., Li, H., Zhang, X., Liu, L.L., Chen, F., Zeng, B.**, 2018, Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology, *Cells Tissues Organs*, 205(1): 1-8 pp.
- Hu, W., Rathman, J.J., Chalmers, J.J.**, 2008, An investigation of small-molecule surfactants to potentially replace pluronic F-68 for reducing bubble-associated cell damage, *Biotechnology and Bioengineering*, 101(1): 119-127 pp.
- Hunt, M.M., Meng, G., Rancourt, D.E., Gates, I.D., Kallos, M.S.**, 2014, Factorial Experimental Design for the Culture of Human Embryonic Stem Cells as Aggregates in Stirred Suspension Bioreactors Reveals the Potential for Interaction Effects Between Bioprocess Parameters, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 20(1): 76–89 pp.
- Hunter, M., Yuan, P., Vavilala, D., Fox, M.**, 2019, Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells, *Current Protocols in Protein Science*, 95(1): e77.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jagschies, G.**, 2018a, Brief Review of the Biopharmaceutical and Vaccine Industry, *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*, 33–58 pp.
- Jagschies, G.**, 2018b, Disease and Healthcare Priorities, *Biopharmaceutical Processing Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*, 3–31 pp.
- Jagschies, G., Łacki, K.M.**, 2018, Process Capability Requirements, *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*, 73–94 pp.
- Jagschies, G., Lindskog, E., Łacki, K., Galliher, P.**, 2018, Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes, Elsevier, Unites States of America, 1308p.
- Jang, M., Pete, E.S., Bruheim, P.**, 2022, The impact of serum-free culture on HEK293 cells: From the establishment of suspension and adherent serum-free adaptation cultures to the investigation of growth and metabolic profiles, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10: 964397.
- Javanian, M., Barary, M., Ghebrehewet, S., Koppolu, V., Vasigala, V.K.R., Ebrahimpour, S.**, 2021, A brief review of influenza virus infection, *Journal of Medical Virology*, 93(8): 4638-4646 pp.
- Jayapal, K.P., Wlaschin, K.F., Hu, W.S., Yap, M.G.S.**, 2007, Recombinant protein therapeutics from CHO Cells - 20 years and counting, *Chemical Engineering Progress*, 103(10): 40–47 pp.
- JCRB Cell Bank**, 2023, JCRB9029 MDCK (NBL-2), https://cellbank.nibiohn.go.jp/~cellbank/en/search_res_det.cgi?ID=568. (Erişim Tarihi : 28.03.2023).
- Jedrzejczak-Silicka, M.**, 2017, History of Cell Culture, *New Insights into Cell Culture Technology*, 1: 13 p.
- Jordan, I., Sandig V.**, 2014, Matrix and backstage: Cellular substrates for viral vaccines, *Viruses*, 6(4): 1672–1700 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Josefsberg, J.O., Buckland, B.**, 2012, Vaccine process technology, *Biotechnology and Bioengineering*, 109(6): 1443-1460 pp.
- Jossen, V., Eibl, R., Eibl, D.**, 2019, Single-use bioreactors-an overview, *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, 37–52 pp.
- Junker, B.H.**, 2009, Good Manufacturing Practice (GMP) and Good Industrial Large Scale Practice (GLSP), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 1-19 pp.
- Kaiser, S.C., Kraume, M., Eibl, D., Eibl, R.**, 2015, Single-Use Bioreactors for Animal and Human Cells, *Animal Cell Culture*, 445–500 pp.
- Kaiser, S.C., Werner, S., Jossen, V., Kraume, M., Eibl, D.**, 2017, Development of a method for reliable power input measurements in conventional and single-use stirred bioreactors at laboratory scale, *Engineering in Life Sciences*, 17(5): 500–511 pp.
- Karakus, U., Cramer, M., Lanz, C., Yángüez, E.**, 2018, Propagation and Titration of Influenza Viruses, *Methods in Molecular Biology*, 1836: 59–88 pp.
- Karimi Alavijeh, M., Baker, I., Lee, Y.Y., Gras, S.L.**, 2022, Digitally enabled approaches for the scale up of mammalian cell bioreactors, *Digital Chemical Engineering*, 4: 100040.
- Karlsson, E.A., Mook, P.A.N., Vandemaele, K., Fitzner, J., Hammond, A., Cozza, V., Zhang, W., Moen, A.**, 2021, Review of global influenza circulation, late 2019 to 2020, and the impact of the COVID-19 pandemic on influenza circulation, *Weekly Epidemiological Record*, 96: 241-64 pp.
- Karnieli, O., Friedner, O.M., Allickson, J.G., Zhang, N., Jung, S., Fiorentini, D., Abraham, E., Eaker, S.S., Yong, T.K., Chan, A., Griffiths, S., When, A.k., Oh, S., Karnieli, O.**, 2017, A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies, *Cytotherapy*, 19(2): 155-169 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Karp, G.**, 2009, Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. Wiley & sons; 6th edition, United States of America, 832p.
- Keshavarz, M., Solaymani-Mohammadi, F., Namdari, H., Arjeini, Y., Mousavi, M.J., Rezaei, F.**, 2020, Metabolic host response and therapeutic approaches to influenza infection, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 25: 1-19 pp.
- Kesik-Brodacka, M.**, 2018, Progress in biopharmaceutical development, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(3): 306-322 pp.
- Khan, K.H.**, 2013, DNA vaccines: Roles against diseases, *Germs*, 3(1): 26–35 pp.
- Khanna, M., Saxena, L., Gupta, A., Kumar, B., Rajput, R.**, 2013, Influenza pandemics of 1918 and 2009: A comparative account, *Future Virology*, 8(4): 335-342 pp.
- Kiesslich, S., Kamen, A.A.**, 2020, Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines, *Biotechnology Advances*, 44: 107608p.
- Kiesslich, S., Kim, G.N., Shen, C.F., Kang, C.Y., Kamen, A.A.**, 2021, Bioreactor production of rVSV-based vectors in Vero cell suspension cultures, *Biotechnology and Bioengineering*, 118(7): 2649–2659 pp.
- Kim, P., Jang, Y.H., Kwon, S. B., Lee, C.M., Han, G., Seong, B.L.**, 2018, Glycosylation of hemagglutinin and neuraminidase of influenza a virus as signature for ecological spillover and adaptation among influenza reservoirs, *Viruses*, 10(4): 183 p.
- Kim, S.H., Lee, G.M.**, 2009, Development of serum-free medium supplemented with hydrolysates for the production of therapeutic antibodies in CHO cell cultures using design of experiments, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83: 639-648 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kimiz-Gebologlu, I., Demirden, S.F., Oncel, S.S., 2022,** A study of the THP-1 cell line as the potential biologics production platform with the emphasis on serum-free media substitution for economic expediency, *Biotechnology Journal*, 17(9): 2200154.
- Klimov, A., Balish, A., Veguilla, V., Sun, H., Schiffer, J., Lu, X., Katz, J.M., Hancock, K., 2012,** Influenza Virus Titration, Antigenic Characterization, and Serological Methods for Antibody Detection, *Methods in Molecular Biology*, 865: 25–51 pp.
- Kodati, B., Darbha, S., 2016,** Mammalian Expression System and Improvisation for High Production, *International Journal of Science and Research*, 5(6): 743–749 pp.
- Komives, C., Parker, R.S., 2003,** Bioreactor state estimation and control, *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5): 468-474 pp.
- Kosik, I., Yewdell, J.W., 2019,** Influenza hemagglutinin and neuraminidase: Yin–yang proteins coevolving to thwart immunity, *Viruses*, 11(4): 346 p.
- Krammer, F., 2019,** The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination, *Nature Reviews Immunology*, 19(6): 383-397 pp.
- Kumar, A., Meldgaard, T.S., Bertholet, S., 2018,** Novel platforms for the development of a universal influenza vaccine, *Frontiers in Immunology*, 9: 600.
- Kumar, S., Sarma, P., Kaur, H., Prajapat, M., Bhattacharyya, A., Avti, P., Sehkhari, N., Kaur, H., Bansal, S., Mahendiratta, S., Mahalmani, V.M., Singh, H., Prakash, A., Kuhad, A., Medhi, B., 2021,** Clinically relevant cell culture models and their significance in isolation, pathogenesis, vaccine development, repurposing and screening of new drugs for SARS-CoV-2: a systematic review, *Tissue and Cell*, 70: 101497.
- Kuystermans, D., Al-Rubeai, M., 2015,** Biopharmaceutical Products from Animal Cell Culture, *Animal cell culture*, 717-757 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ladd, B., Bowes, K., Lundgren, M., Gräslund, T., Chotteau, V.,** 2022, Proof-of-Concept of Continuous Transfection for Adeno-Associated Virus Production in Microcarrier-Based Culture, *Processes*, 10(3): 515.
- Lakshmanan, M., Kok, Y.J., Lee, A.P., Kyriakopoulos, S., Lim, H.L., Teo, G., Poh, S.L., Tang, W.Q., Hong, J., Tan, A.H.M., Bi, X., Ho, Y.S., Zhang, P., Ng, S.K., Lee, D.Y.,** 2019, Multi-omics profiling of CHO parental hosts reveals cell line-specific variations in bioprocessing traits, *Biotechnology and Bioengineering*, 116(9): 2117–2129 pp.
- Lamichhane, P.P., Puthavathana, P.,** 2018, PR8 virus harbouring H5N1 NS gene contributed for THP-1 cell tropism, *Virus Disease*, 29: 548–552 pp.
- Langer, E.S.,** 2022, Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture and Beyond, *Chemie-Ingenieur-Technik*, 94(12): 1892–1901 pp.
- Lee, D.K., Park, J., Seo, D.W.,** 2020, Suspension culture of vero cells for the production of adenovirus type 5, *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 9(1): 48–55 pp.
- Lei, C., Yang, J., Hu, J., Sun, X.,** 2021, On the Calculation of TCID₅₀ for Quantitation of Virus Infectivity, *Virologica Sinica*, 36: 141-144 pp.
- Li, S.W., Wright, M., Healey, J.F., Hutchinson, J.M., O'Rourke, S., Mesa, K.A., Lollar, P., Berman, P.W.,** 2020, Gene editing in CHO cells to prevent proteolysis and enhance glycosylation: Production of HIV envelope proteins as vaccine immunogens, *PLoS One*, 15(5): e0233866.
- Li, Y., Tenchov, R., Smoot, J., Liu, C., Watkins, S., Zhou, Q.,** 2021, A Comprehensive Review of the Global Efforts on COVID-19 Vaccine Development, *ACS Central Science*, 7(4): 512-533 pp.
- Lindskog, E.K., Fischer, S., Wenger, T., Schulz, P.,** 2018, Host Cells, *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*, Elsevier, 111–130 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, G., Chen, S., Hu, A., Zhang, L., Sun, W., Chen, J., Tang, W., Zhang, H., Liu, C., Ke, C., Chen, X.,** 2019, The Establishment and Validation of the Human U937 Cell Line as a Cellular Model to Screen Immunomodulatory Agents Regulating Cytokine Release Induced by Influenza Virus Infection, *Virologica Sinica*, 34: 648–661 pp.
- Lohr, V., Genzel, Y., Behrendt, I., Scharfenberg, K., Reichl, U.,** 2010, A new MDCK suspension line cultivated in a fully defined medium in stirred-tank and wave bioreactor, *Vaccine*, 28(38): 6256–6264 pp.
- Loignon, M., Perret, S., Kelly, J., Boulais, D., Cass, B., Bisson, L., Afkhamizarreh, F., Durocher, Y.,** 2008, Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells, *BMC Biotechnology*, 8(1): 1-16 pp.
- Lokko, Y., Heijde, M., Schebesta, K., Scholtès, P., Van Montagu, M., Giacca, M.,** 2018, Biotechnology and the bioeconomy—Towards inclusive and sustainable industrial development, *New Biotechnology*, 40: 5-10 pp.
- Lomba, A.L.O., Tirapelle, M.C., Biaggio, R.T., Abreu-Neto, M.S., Covas, D.T., Picanço-Castro, V., Swiech, K., Mizukami, A.,** 2021, Serum-Free Suspension Adaptation of HEK-293T Cells: Basis for Large-Scale Biopharmaceutical Production, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64.
- Luckert, C., Schulz, C., Lehmann, N., Thomas, M., Hofmann, U., Hammad, S., Hengstler, J.G., Braeuning, A., Lampen, A., Hessel, S.,** 2017, Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells, *Archives of Toxicology*, 91: 393-406 pp.
- Ma, B., He, L.F., Zhang, Y.L., Chen, M., Wang, L.L., Yang, H.W., Yan, T., Sun, M.X., Zheng, C.Y.,** 2015, Characteristics and viral propagation properties of a new human diploid cell line, walvax-2, and its suitability as a candidate cell substrate for vaccine production, *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 11(4): 998–1009 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Madhusudana, S.N., Sundaramoorthy, S., Ullas, P.T.**, 2010, Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: Comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines, *International Journal of Infectious Diseases*, 14(12): e1067-e1071 pp.
- Malm, M., Saghaleyni, R., Lundqvist, M., Giudici, M., Chotteau, V., Field, R., Varley, P.G., Hatton, D., Grassi, L., Svensson, T., Nielsen, J., Rockberg, J.**, 2020, Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development, *Scientific Reports*, 10(1): 18996.
- Marigliani, B., Balottin, L.B.L., Augusto, E. de F.P.**, 2019, Adaptation of Mammalian Cells to Chemically Defined Media, *Current Protocols in Toxicology*, 82(1): e88.
- Marusak, R.A., Doan, K., Cummings, S.D.**, 2007, Setting up an Maintaining CHO Cell Culture, *Integrated Approach to Coordination Chemistry*, 244–248 pp.
- MERCK Millipore**, 2019, Diagnostics TM Collection Illuminating your way in FIND WHAT YOU ' VE BEEN MISSING, Germany, Darmstadt, 24p.
- Merten, O.W.**, 2006, Introduction to animal cell culture technology—past, present and future, *Cytotechnology*, 50(1-3): 1-7 pp.
- Merten, O.W.**, 2015, Advances in cell culture: Anchorage dependence, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1661): 20140040.
- Merten, O.W., Bakker, W.A.M., Vorlop, J., Reiter, M., Visnovsky, G., Jäger, V., Merabishvili, M., Reichl, U.**, 2014, Virus Production Under Suspension Conditions, *Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells*, 503-554 pp.
- MilliporeSigma SAFC.**, 2021, Vaccine Bioprocessing Handbook, 3–25 pp. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/165/693/vaccine-handbook-process-br5237en-mk.pdf>. (Erişim Tarihi : 20.04.2022)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mimura, A., Kaoru, Y., Fusao, I., Katsumi, Y., Tsuneo, S., Mitsuharu, O., Mitsuru, S.,** 1986, Growth characterizations of a human monocytic leukemia cell line in a serum-free medium, *Journal of Fermentation Technology*, 64(2): 145–153 pp.
- Minonzio, G.M., Linetsky, E.,** 2014, The Use of Fetal Bovine Serum in Cellular Products For Clinical Applications: CommentaryTitle, *CellR4*, 2(6): e1307.
- Mirasol, F.,** 2018, Maintaining Cell Line Integrity, *BioPharm International*, 31(8): 10-15 pp.
- Modrof, J., Kerschbaum, A., Farcet, M.R., Niemeyer, D., Corman, V.M., Kreil, T.R.,** 2020, SARS-CoV-2 and the safety margins of cell-based biological medicinal products, *Biologicals*, 68: 122–124 pp.
- Moghadami, M.,** 2017, A narrative review of influenza: A seasonal and pandemic disease, *Iranian Journal of Medical Sciences*, 42(1): 2.
- Moreira, A.S., Silva, A.C., Sousa, M.F.Q., Hagner-McWhirterc, Å., Ahlenc, G., Lundgren, M., Coroadinha, A.S., Alves, P.M., Peixoto, C., Carrondo, M.J.T.,** 2020, Establishing Suspension Cell Cultures for Improved Manufacturing of Oncolytic Adenovirus, *Biotechnology Journal*, 15(4): 1900411.
- Morrow, K. joh.,** 2016, Biosimilars of Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, Canada, 667p.
- Mostafa, A., Abdelwhab, E.M., Mettenleiter, T.C., Pleschka, S.,** 2018, Zoonotic potential of influenza A viruses: A comprehensive overview, *Viruses*, 10(9): 497.
- Müller, M., Meusel, W., Husemann, U., Greller, G., Kraume, M.,** 2017, Measurement of heat transfer coefficients in stirred single-use bioreactors by the decay of hydrogen peroxide, *Engineering in Life Sciences*, 17(12): 1234–1243 pp.
- Nachbagauer, R., Palese, P.,** 2020, Is a Universal Influenza Virus Vaccine Possible?, *Annual Review of Medicine*, 71: 315-327 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Negrete, A., Ling, T.C., Lyddiatt, A.**, 2008, Production of Adenoviral Vectors in 293 Cells: A Case Study of the Adaptation of Attached Cells to Grow in Suspension, *The Open Biotechnology Journal*, 2(1): 29–35 pp.
- Nema, R., Khare, S.**, 2012, An animal cell culture: Advance technology for modern research, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3(3): 219.
- Nichols, W.W., Lardenoije, R., Ledwith, B.J., Brouwer, K., Manam, S., Vogels, R., Kaslow, D., Zuidgeest, D., Bett, A.J., Chen, L., Van der Kaaden, M., Galloway, S.M., Hill, R.B., Machotka, S.V., Anderson, C.A., Lewis, J., Martinez, D., Lebron, J., Russo, C., Valerio, D., Bout, A.**, 2016, Propagation of Adenoviral Vectors: Use of PER.C6TM Cells, *Adenoviral Vectors for Gene Therapy: Second Edition*, 164–196 pp.
- Noh, S.M., Shin, S., Lee, G.M.**, 2019, Cell Line Development for Therapeutic Protein Production, *Cell Culture Engineering*, 23–47 pp.
- Nyirenda, M., Omori, R., Tessmer, H.L., Arimura, H., Ito, K.**, 2016, Estimating the lineage dynamics of human influenza B viruses, *PLoS One*, 11(11): e0166107.
- O’Flaherty, R., Bergin, A., Flampouri, E., Mota, L.M., Obaidi, I., Quigley, A., Xie, Y., Butler, M.**, 2020, Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing, *Biotechnology Advances*, 43: 107552.
- Ögmundarson, Ó., Sukumara, S., Herrgård, M.J., Fantke, P.**, 2020, Combining Environmental and Economic Performance for Bioprocess Optimization, *Trends in Biotechnology*, 38(11): 1203-1214 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Olsen, S.J., Winn, A.K., Budd, A.P., Prill, M.M., Steel, J., Midgley, C.M., Kniss, K., Burns, E., Rowe, T., Foust, A., Jasso, G., Merced-Morales, A., Davis, C.T., Jang, Y., Jones, J., Daly, P., Gubareva, L., Barnes, J., Kondor, R., Sessions, W., Smith, C., Wentworth, D.E., Garg, S., Havers, F.P., Fry, A.M., Hall, A.J., Brammer, L., Silk, B.J., 2021, Changes in Influenza and Other Respiratory Virus Activity During the COVID-19 Pandemic - United States, 2020–2021, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 70(29): 1013–1019 pp.**
- Ozturk, S., Kaseko, G., Mahaworasilpa, T., Coster, H.G.L., 2003, Adaptation of cell lines to serum-free culture medium, *Hybridoma and Hybridomics*, 22(4): 267-272 pp.**
- Paules, C., Subbarao, K., 2017, Influenza, *The Lancet*, 390: 697-708 pp.**
- Pauwels, K., Herman, P., Van sVaerenbergh, B., Dai Do Thi, C., Berghmans, L., Waeterloos, G., Van Bockstaele, D., Dorsch-Häsler, K., Sneyers, M., 2007, Animal Cell Cultures: Risk Assessment and Biosafety Recommendations, *Applied Biosafety*, 12(1): 26–38 pp.**
- Pawitan, J.A., 2014, Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine, *BioMed Research International*, 965849.**
- Pilgrim, C.R., McCahill, K.A., Rops, J.G., Dufour, J.M., Russell, K.A., Koch, T.G., 2022, A Review of Fetal Bovine Serum in the Culture of Mesenchymal Stromal Cells and Potential Alternatives for Veterinary Medicine, *Frontiers in Veterinary Science*, 9: 859025.**
- Plotkin, S. A., Orenstein, W., Offit, P. A., & Edwards, K. M., 2017, Vaccines, Elsevier, China, 2331p.**
- Plotkin, S.L., Plotkin, S.A., 2017, A Short History of Vaccination, Plotkin's Vaccines, Elsevier, 1-15.e8 pp.**
- van der Pol, L.A., Bakker, W.A., 2014, How to choose the correct cell line for producing your viral vaccine: what is important?, *Pharmaceutical Bioprocessing*, 2(3): 207-210 pp.**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ponnuru, K., Wu, J., Ashok, P., Tzanakakis, E.S., Furlani, E.P.**, 2014, Analysis of stem cell culture performance in a microcarrier bioreactor system, *Technical Proceedings of the 2014 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2014*, 2: 132–135 pp.
- Poon, C.**, 2022, Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of in vitro devices, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 126: 105024.
- Pramod, K., Tahir, M., Charoo, N., Ansari, S., Ali, J.**, 2016, Pharmaceutical product development: A quality by design approach, *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 6(3):129.
- Price, P.J.**, 2017, Best practices for media selection for mammalian cells, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 53(8): 673-681 pp.
- Puente-Massaguer, E., Badiella, L., Gutiérrez-Granados, S., Cervera, L., Gòdia, F.**, 2019, A statistical approach to improve compound screening in cell culture media, *Engineering in Life Sciences*, 19(4): 315–327 pp.
- Pulix, M., Lukashchuk, V., Smith, D.C., Dickson, A.J.**, 2021, Molecular characterization of HEK293 cells as emerging versatile cell factories, *Current Opinion in Biotechnology*, 71: 18-24 pp.
- Rathore, A.S., Kanwar Shekhawat, L., Loomba, V.**, 2016, Computational Fluid Dynamics for Bioreactor Design, *Bioreactors: Design, Operation and Novel Applications*, 295-322.
- Reinhart, D., Damjanovic, L., Kaisermayer, C., Sommeregger, W., Gili, A., Gasselhuber, B., Castan, A., Mayrhofer, P., Grünwald-Gruber, C., Kunert, R.**, 2019, Bioprocessing of Recombinant CHO-K1, CHO-DG44, and CHO-S: CHO Expression Hosts Favor Either mAb Production or Biomass Synthesis, *Biotechnology Journal*, 14(3): 1700686.
- Rioux, M., McNeil, M., Francis, M.E., Dawe, N., Foley, M., Langley, J.M., Kelvin A.A.**, 2020, The power of first impressions: Can influenza imprinting during infancy inform vaccine design?, *Vaccines*, 8(3): 546.

- Ritter, J.B., Wahl, A.S., Freund, S., Genzel, Y., Reichl, U., 2010,** Metabolic effects of influenza virus infection in cultured animal cells: Intra- and extracellular metabolite profiling, *BMC Systems Biology*, 4(1): 1-22 pp.
- Rodrigues, A.F., Soares, H.R., Guerreiro, M.R., Alves, P.M., Coroadinha, A.S., 2015,** Viral vaccines and their manufacturing cell substrates: New trends and designs in modern vaccinology, *Biotechnology Journal*, 10(9): 1329–1344 pp.
- Rodrigues, A.F., Fernandes, P., Laske, T., Castro, R., Alves, P.M., Genzel, Y., Coroadinha, A.S., 2020,** Cell bank origin of mdck parental cells shapes adaptation to serum-free suspension culture and canine adenoviral vector production, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17): 1–27 pp.
- Rodríguez-Hernández, C.O., Torres-García, S.E., Olvera-Sandoval, C., Ramírez-Castillo, F.Y., Loera Muro, A., Avelar-Gonzalez, F.J., Guerrero-Barrera, A.L., 2014,** Cell Culture: History, Development and Prospects, *International Journal of Current Research and Academic Review*, 2(12): 188-200 pp.
- Rodriguez, A., Pérez-González, A., Hossain, M.J., Chen, L-M., Rolling, T., Pérez-Breña, P., Donis, R., Kochs, G., Nieto, A., 2009,** Attenuated Strains of Influenza A Viruses Do Not Induce Degradation of RNA Polymerase II, *Journal of Virology*, 83(21): 11166–11174 pp.
- Romand, S., Jostock, T., Fornaro, M., Schmidt, J., Ritter, A., Wilms, B., Laux, H., 2016,** Improving expression of recombinant human IGF-1 using IGF-1R knockout CHO cell lines, *Biotechnology and Bioengineering*, 113(5): 1094–1101 pp.
- Rotondi, M., Grace, N., Betts, J., Bargh, N., Costariol, E., Zoro, B., Hewitt, C.J., Nienow, A.W., Rafiq, Q.A., 2021,** Design and development of a new ambr250® bioreactor vessel for improved cell and gene therapy applications, *Biotechnology Letters*, 43: 1103–1116 pp.
- Rourou, S., Ben Zakkour, M., Kallel, H., 2019,** Adaptation of Vero cells to suspension growth for rabies virus production in different serum free media, *Vaccine*, 37(47): 6987–6995 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Le Ru, A., Jacob, D., Transfiguracion, J., Ansorge, S., Henry, O., Kamen, A.A.,** 2010, Scalable production of influenza virus in HEK-293 cells for efficient vaccine manufacturing, *Vaccine*, 28(21): 3661–3671 pp.
- Rutigliano, J.A., Sharma, S., Morris, M.Y., Oguin, T.H., McClaren, J.L., Doherty, P.C., Thomas, P.G.,** 2014, Highly Pathological Influenza A Virus Infection Is Associated with Augmented Expression of PD-1 by Functionally Compromised Virus-Specific CD8 + T Cells, *Journal of Virology*, 88(3): 1636–1651 pp.
- Saha, G., Barua, A., Sinha, S.,** 2016, Bioreactors: Animal cell culture control for bioprocess engineering, Taylor&Francis, CRC Group, United States of America, Florida, 150p.
- Salomon, R., Webster, R.G.,** 2009, The Influenza Virus Enigma, *Cell*, 136(3): 402-410 pp.
- van der Sandt, C.E., Kreijtz, J.H.C.M., Rimmelzwaan, G.F.,** 2012, Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses, *Viruses*, 4(9): 1438-1476 pp.
- Sartorius,** 2020, Adaptation of mammalian cell lines to serum-free suspension culture, 1–4 pp.
- Sattley, W.M., Madigan, M.T.,** 2015, Microbiology, *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–10 pp.
- Saxena, S., Shrivastava, S., Arora, R., Hussain, S., Jena, S.C., Kumar, M., Vasu, R.K., Srivastava, S., Sharma, P., Kumar, N., Dhama, K.,** 2016, Development of real-time PCR assays for detecting matrix metalloproteinases-2 & 9 over-expression in canine mammary tumours, *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4(7): 346–356 pp.
- Schmitz, J., Hertel, O., Yermakov, B., Noll, T., Grünberger, A.,** 2021, Growth and eGFP Production of CHO-K1 Suspension Cells Cultivated From Single Cell to Laboratory Scale, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9: 716343.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schnellbaecher, A., Binder, D., Bellmaine, S., Zimmer, A.,** 2019, Vitamins in cell culture media: Stability and stabilization strategies, *Biotechnology and Bioengineering*, 116(6): 1537-1555 pp.
- Seddon, A.M., Casey, D., Law, R.V., Gee, A., Templer, R.H., Ces, O.,** 2009, Drug interactions with lipid membranes, *Chemical Society Reviews*, 38(9): 2509–2519 pp.
- Seidel, S., Maschke, R.W., Mozaffari, F., Eibl-Schindler, R., Eibl, D.,** 2023, Improvement of HEK293 Cell Growth by Adapting Hydrodynamic Stress and Predicting Cell Aggregate Size Distribution, *Bioengineering*, 10(4): 478.
- Seitz, C., Isken, B., Heynisch, B., Rettkowski, M., Frensing, T., Reichl, U.,** 2012, Trypsin promotes efficient influenza vaccine production in MDCK cells by interfering with the antiviral host response, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93: 601–611 pp.
- Shafa, M., Panchalingam, K.M., Walsh, T., Richardson, T., Baghbaderani, B.A.,** 2019, Computational fluid dynamics modeling, a novel, and effective approach for developing scalable cell therapy manufacturing processes, *Biotechnology and Bioengineering*, 116(12): 3228–3241 pp.
- Shanmugaraj, B., Phoolcharoen, W.,** 2021, Addressing demand for recombinant biopharmaceuticals in the COVID-19 era, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 14(2): 49-51 pp.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., Graham, F.L.,** 2002, Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells, *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(8): 869–871 pp.
- Sheets, R., Petricciani, J.,** 2004, Vaccine Cell Substrates 2004: 29th June - 1st July, Rockville, MD, USA, *Expert Review of Vaccines*, 3(6): 633–638 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shekhawat, L.K., Sarkar, J., Gupta, R., Hadpe, S., Rathore, A.S.,** 2018, Application of CFD in Bioprocessing: Separation of mammalian cells using disc stack centrifuge during production of biotherapeutics, *Journal of Biotechnology*, 267: 1-11 pp.
- Shen, C., Gu, M., Song, C., Miao, L., Hu, L., Liang, D., Zheng, C.,** 2008, The tumorigenicity diversification in human embryonic kidney 293 cell line cultured in vitro, *Biologicals*, 36(4): 263–268 pp.
- Shen, C.F., Guilbault, C., Li, X., Elahi, S.M., Ansorge, S., Kamen, A., Gilbert, R.,** 2019, Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines, *Vaccine*, 37(47): 6996–7002 pp.
- Sheng-Fowler, L., Lewis, A.M., Peden, K.,** 2009, Issues associated with residual cell-substrate DNA in viral vaccines, *Biologicals*, 37(3): 190–195 pp.
- Shukla, A.A., Gottschalk, U.,** 2013, Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing, *Trends in Biotechnology*, 31(3): 147-154 pp.
- Sinacore, M.S., Drapeau, D., Adamson, S.R.,** 2000, Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media, *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 15: 249-257 pp.
- Singh, H., Mok, P., Balakrishnan, T., Rahmat, S.N.B., Zweigerdt, R.,** 2010, Up-scaling single cell-inoculated suspension culture of human embryonic stem cells, *Stem Cell Research*, 4(3): 165–179 pp.
- Stacey, G.N., Hawkins, J.R.,** 2016, Cell lines: Applications and biosafety, *Biological Safety: Principles and Practices*, 299–325 pp.
- Stepanenko, A.A., Dmitrenko, V.V.,** 2015, HEK293 in cell biology and cancer research: Phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution, *Gene*, 569(2): 182–190 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Subbiahanadar Chelladurai, K., Selvan Christyraj, J.D., Rajagopalan, K., Yesudhasan, B.V., Venkatachalam, S., Mohan, M., Chellathurai Vasantha, N., Selvan Christyraj, J.R.S.,** 2021, Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective, *Heliyon*, 7(8): e07686.
- Suderman, M., Moniwa, M., Alkie, T.N., Ojkic, D., Broes, A., Pople, N., Berhane, Y.,** 2021, Comparative susceptibility of madin–darby canine kidney (Mdck) derived cell lines for isolation of swine origin influenza a viruses from different clinical specimens, *Viruses*, 13(12): 2346.
- Sun, T., Kwok, W.C., Chua, K.J., Lo, T.M., Potter, J., Yew, W.S., Chesnut, J.D., Hwang, I.Y., Chang, M.W.,** 2020a, Development of a Proline-Based Selection System for Reliable Genetic Engineering in Chinese Hamster Ovary Cells, *ACS Synthetic Biology*, 9(7): 1864–1872 pp.
- Sun, W., Luo, T., Liu, W., Li, J.,** 2020b, Progress in the development of universal influenza vaccines, *Viruses*, 12(9): 1033.
- Szretter, K.J., Balish, A.L., Katz, J.M.,** 2006, Influenza: Propagation, Quantification, and Storage, *Current Protocols in Microbiology*, 29(1): 15G-1.
- Takada, K., Kawakami, C., Fan, S., Chiba, S., Zhong, G., Gu, C., Shimizu, K., Takasaki, S., Sakai-Tagawa, Y., Lopes, T.J.S., Dutta, J., Khan, Z., Kriti, D., van Bakel, H., Yamada, S., Watanabe, T., Imai, M., Kawaoka, Y.,** 2019, A humanized MDCK cell line for the efficient isolation and propagation of human influenza viruses, *Nature Microbiology*, 4(8): 1268-1273 pp.
- Tamm, C., Galitó, S.P., Annerén, C.,** 2013, A comparative study of protocols for mouse embryonic stem cell culturing, *PLoS One*, 8(12): e81156.
- Tan, E., Chin, C.S.H., Lim, Z.F.S., Ng, S.K.,** 2021, HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9: 796991.
- Tekkatte, C., Gunasingh, G.P., Cherian, K.M., Sankaranarayanan, K.,** 2011, “Humanized” stem cell culture techniques: The animal serum controversy, *Stem Cells International*, 504723: 1-14 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tharmalingam, T., Ghebeh, H., Wuerz, T., Butler, M.,** 2008, Pluronic enhances the robustness and reduces the cell attachment of mammalian cells, *Molecular Biotechnology*, 39: 167–177 pp.
- Thyrsted, J., Storgaard, J., Blay-Cadanet, J., Heinz, A., Thielke, A.L., Crotta, S., de Paoli, F., Olgner, D., Wack, A., Hiller, K., Hansen, A.L., Holm, C.K.,** 2021, Influenza A induces lactate formation to inhibit type I IFN in primary human airway epithelium, *iScience*, 24(11): 1-16 pp.
- Tihanyi, B., Nyitray, L.,** 2020, Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production, *Drug Discovery Today: Technologies*, 38: 25-34 pp.
- Tjio, J.H., Puck, T.T.,** 1958, Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture, *The Journal of experimental medicine*, 108(2): 259–268 pp.
- Torres, M., Altamirano, C., Dickson, A.J.,** 2018, Process and metabolic engineering perspectives of lactate production in mammalian cell cultures, *Current Opinion in Chemical Engineering*, 22: 184–190 pp.
- Tossolini, I., López-Díaz, F.J., Kratje, R., Prieto, C.C.,** 2018, Characterization of cellular states of CHO-K1 suspension cell culture through cell cycle and RNA-sequencing profiling, *Journal of Biotechnology*, 286: 56–67 pp.
- Tripathi, N.K., Shrivastava, A.,** 2019, Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7: 420.
- Tsao, Y.S., Condon, R., Schaefer, E., Lio, P., Liu, Z.,** 2001, Development and improvement of a serum-free suspension process for the production of recombinant adenoviral vectors using HEK293 cells, *Cytotechnology*, 37: 189–198 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K.,**1980,Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *International Journal of Cancer*, 26(2): 171-176 pp.
- Tüfek, H., Özkan, Ö.,** 2018, 4R Rule in Laboratory Animal Science, *Commagene Journal of Biology*, 21(1): 55–60 pp.
- Usmani, Z., Sharma, M., Awasthi, A.K., Sivakumar, N., Lukk, T., Pecoraro, L., Thakur, V.K., Roberts, D., Newbold, J., Gupta, V.K.,** 2021, Bioprocessing of waste biomass for sustainable product development and minimizing environmental impact, *Bioresource Technology*, 322: 124548.
- van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, Å., Honegger, P., Knudsen, L.E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M.L., Gstraunthaler, G.,** 2010, Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods, *Toxicology in Vitro*, 24(4): 1053-1063 pp.
- Van Der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W.G., Fu, J., Hickman, J.J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., Winkler, S., Gstraunthaler, G.,** 2017, Consensus Report Fetal Bovine Serum (FBS): Past – Present – Future, *ALTEX Online first published August*, 3: 1-21 pp.
- Vemula, S.V., Zhao, J., Liu, J., Xue, X.W., Biswas, S., Hewlett, I.,** 2016, Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans, *Viruses*, 8(4): 96.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H.,** 2015, The impact of food bioactives on health: In vitro and Ex Vivo models, Springer, New York, 341p.
- Verma, A., Verma, M., Singh, A.,** 2020, Animal tissue culture principles and applications, *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*, 269–293 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vesikari, T., Finn, A., Van Damme, P., Leroux-Roels, I., Leroux-Roels, G., Segall, N., Toma, A., Vallieres, G., Aronson, R., Reich, D., Arora, S., Ruane, P.J., Cone, C.L., Manns, M., Cosgrove, C., Faust, S.N., Ramasamy, M.N., Machluf, N., Spaans, J.N., Yassin-Rajkumar, B., Anderson, D., Popovic, V., Diaz-Mitoma, F., 2021,** Immunogenicity and Safety of a 3-Antigen Hepatitis B Vaccine vs a Single-Antigen Hepatitis B Vaccine: A Phase 3 Randomized Clinical Trial, *JAMA Network Open*, 4: e2128652.
- Vlecken, D.H.W., Pelgrim, R.P.M., Ruminski, S., Bakker, W.A.M., van der Pol, L.A., 2013,** Comparison of initial feasibility of host cell lines for viral vaccine production, *Journal of Virological Methods*, 193(1): 28–41 pp.
- Warnock, J.N., Al-Rubeai, M., 2006,** Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 45(1): 1-12 pp.
- Wei, C.J., Crank, M.C., Shiver, J., Graham, B.S., Mascola, J.R., Nabel, G.J., 2020,** Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges, *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(4): 239-252 pp.
- van Wielink, R., Kant-Eenbergen, H.C.M., Harmsen, M.M., Martens, D.E., Wijffels, R.H., Coco-Martin, J.M., 2011,** Adaptation of a Madin-Darby canine kidney cell line to suspension growth in serum-free media and comparison of its ability to produce avian influenza virus to Vero and BHK21 cell lines, *Journal of Virological Methods*, 171(1): 53-60 pp.
- Wisnuwardhani, P.H., Septisetyani, E.P., Santoso, A., 2017,** Sequential Adaptation in Mammalian CHO-K1 Cells Producing Human Erythropoietin, *Annales Bogorienses*, 21(1): 15.
- Wu, J., Zhu, Y., Pullum, L., 2001,** Impeller geometry effect on velocity and solids suspension, *Chemical Engineering Research and Design*, 79(8): 989-997 pp.
- Wu, Y., Jia, H., Lai, H., Liu, X., Tan, W.S., 2020,** Highly efficient production of an influenza H9N2 vaccine using MDCK suspension cells, *Bioresources and Bioprocessing*, 7: 1-12 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wu, H., Tang, X., Wang, Y., Wang, N., Chen, Q., Xie, J., Liu, S., Zhong, Z., Qiu, Y., Situ, P., Zern, M.A., Wang, J., Chen, H., Duan, Y., 2022,** Dextran sulfate prevents excess aggregation of human pluripotent stem cells in 3D culture by inhibiting ICAM1 expression coupled with down-regulating E-cadherin through activating the Wnt signaling pathway, *Stem Cell Research and Therapy*, 13(1): 218.
- Wu, S., Rish, A.J., Skomo, A., Zhao, Y., Drennen, J.K., Anderson, C.A., 2021a,** Rapid serum-free/suspension adaptation: Medium development using a definitive screening design for Chinese hamster ovary cells, *Biotechnology Progress*, 37(4): e3154.
- Wu, Y., Bissinger, T., Genzel, Y., Liu, X., Reichl, U., Tan, W.S., 2021b,** High cell density perfusion process for high yield of influenza A virus production using MDCK suspension cells, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105: 1421-1434 pp.
- Wurm, F.M., Hacker, D., 2011,** First CHO genome, *Nature Biotechnology*, 29(8): 718–720 pp.
- Wyrobnik, T.A., Oh, S., Ducci, A., Micheletti, M., 2022,** Engineering characterization of the novel Bach impeller for bioprocessing applications requiring low power inputs, *Chemical Engineering Science*, 252: 117263.
- Xu, X., Nagarajan, H., Lewis, N.E., Pan, S., Cai, Z., Liu, X., Chen, W., Xie, M., Wang, W., Hammond, S., Andersen, M.R., Neff, N., Passarelli, B., Koh, W., Fan, H.C., Wang, J., Gui, Y., Lee, K.H., Betenbaugh, M.J., Quake, S.R., Famili, I., Palsson, B.O., Wang, J., 2011,** The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line, *Nature Biotechnology*, 29(8): 735–741 pp.
- Yang, J., Guertin, P., Jia, G., Lv, Z., Yang, H., Ju, D., 2019,** Large-scale microcarrier culture of HEK293T cells and Vero cells in single-use bioreactors, *AMB Express*, 9(1): 1-14 pp.
- Yang, Z., Xiong, H-R., 2012,** Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells, *Biomedical Tissue Culture*, 1: 3-18 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yao, T., Asayama, Y.**, 2017, Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues, *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2): 99-117 pp.
- Yonemura, S.**, 2014, Differential sensitivity of epithelial cells to extracellular matrix in polarity establishment, *PLoS One*, 9(11): e112922.
- Zahoor, M.A., Khurshid, M., Qureshi, R., Naz, A., Shahid, M.**, 2016, Cell culture-based viral vaccines: Current status and future prospects, *Future Virology*, 11(7): 549–562 pp.
- Zainul Abidin, S.N., Anuar, A.N.**, 2011, Comparison of the Production of Recombinant Protein in Suspension Culture of CHO Cells in Spinner Flask and Shake Flask System, *IIUM Engineering Journal*, 12(4): 43-49 pp.
- Zhang, J., Peng, Y., Guo, M., Li, C.**, 2022, Large-Scale Expansion of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Stirred Suspension Bioreactor Enabled by Computational Fluid Dynamics Modeling, *Bioengineering*, 9(7): 274.
- Zhang, X., Stettler, M., de Sanctis, D., Perrone, M., Parolini, N., Discacciati, M., de Jesus, M., Hacker, D., Quarteroni, A., Wurm, F.**, 2010, Use of orbital shaken disposable bioreactors for mammalian cell cultures from the milliliter-scale to the 1,000-liter scale, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 33-53 pp.
- Zhou, T.C., Zhou, W.W., Hu, W., Zhong, J.J.**, 2010, Bioreactors, Cell Culture, Commercial Production, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 1-18 pp.
- Zhu, M.M., Mollet, M., Hubert, R.S., Kyung, Y.S., Zhang, G.G.**, 2017, Industrial Production of Therapeutic Proteins: Cell Lines, Cell Culture, and Purification, *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*, 1639–1669 pp.
- Qin, Z.**, 2012, The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature, *Atherosclerosis*, 221(1): 2-11 pp.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve lisans sürecimin tamamında bana her zaman yardımcı olan, bilgisiyle yönlendiren ve tüm imkanları sağlayarak sonsuz destek olup her açıdan bana kattığı tüm değerler için tez hocam değerli Doç. Dr. Suphi Şurişvan ÖNCEL' e, ayrıca bu çalışmanın özellikle de virüs denemeleri kısmında değerli bilgi ve deneyimlerini paylaşılarak verdiği destek için saygıdeğer hocam Prof. Dr. Saime İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN' a ve bu süreçte bize sağladığı destek ile birlikte bizi kendi ekibinden hiçbir zaman ayırmayarak yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ' a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu tez kapsamında yapılan virüs çalışmalarını kendi bünyelerinde gerçekleştirmemiz için sağladıkları tüm olanaklar ve verdikleri desteklerden dolayı başta Prof. Dr. Candan ÇİÇEK ve Sinan ERCAN olmak üzere tüm Ege Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji ve Hücre Kültürü Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca başta bilgisi, deneyimi, yol göstericiliği ve sabrıyla bir hoca olarak, diğer bir yandan da güleryüzü, desteği ve samimiyetiyle bir abla olarak çalışmalarımın her basamağında bana her türlü desteği vererek yardımını asla esirgemeyen canım ablam Ilgın KIMIZ GEBOLOĞLU' na sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarımı beraber yürüttüğüm ve tüm bu süreçte eğlenerek birbirimize sürekli destek verip çalışmalarımıza devam ettiğimiz arkadaşım Kadir ALPTEKİN' e ve ilk öğrencilerimiz olan ve tüm bu süreçte kendi çalışmaları gibi bize destek vererek birlikte eğlendiğimiz Ali Murat SAĞLAM ve Egemen UYKIZ' a çok teşekkür ederim.

Aynı zamanda verdikleri desteklerle ve laboratuvarlarının tüm olanaklarını hiç sakınmadan bize kullanarak bizi kendilerinden hiçbir zaman ayırmayan başta Pelin SAĞLAM METİNER olmak üzere Yağmur FİLİZ, Yağmur ARSLAN, Reyhan ÇOBAN, Başar DOĞAN ve diğer tüm Biyomimetik Mikrosistemler Laboratuvarı ekibine, biyoproses ekibi olarak her zaman yardımcı oldukları ve verdikleri tüm desteklerden dolayı Ceren GÜRLEK, Yaprak ŞAHİN ve Çağla YARKENT başta olmak üzere tüm Mikroalgal Biyoproses Laboratuvarı ekibine ve

laboratuvar olanaklarından faydalanmamıza izin vererek sağladıkları desteklerden dolayı Doku Mühendisliği ve Rejenaratif Tıp Laboratuvarı Grubu çalışanlarına teşekkür ederim.

Son ve en önemli olarak da, tüm bunların mimarları olarak beni bu günlere getiren, tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyerek hep arkamda olan rol modellerim annem Leman DEMİRDEN ve babam İsmail DEMİRDEN' e, tüm hayatım boyunca da bana her zaman destek olarak yanımda duran sevgili ablam Hatice Ecem DEMİRDEN EROL' a, gerçek anlamda her zaman yanımda olup günümü güzelleştiren Lucy' ye ve desteğini her zaman yanımda hissedeceğim Hikmet DEMİRDEN' e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

SÜLEYMAN FURKAN DEMİRDEN

Biyomühendis

Eğitim Bilgileri

- 2020 - ... : Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı, İzmir
- 2015 – 2020 : Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, Lisans Programı, İzmir.
- 2011 – 2015 : Atakent Anadolu Lisesi, İzmir.

Akademik ve Mesleki Deneyim

- 24 Haziran – 22 Temmuz 2019 : Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Seroloji Laboratuvarı (Zorunlu Staj)
- 2021 – 2023: Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Mühendislik Laboratuvarı dersi “Plakalı Isı Değiştiriciler” deneyi laboratuvar ders asistanı

Tezler

- 2021 – 2023 : Hücre kültürü temelli biyoteknolojik üretimlerde kullanılmak üzere farklı hücre hatlarının biyoproses verimliliklerinin kıyaslanması (Yüksek Lisans Tezi)
- 2019 – 2020 : Tıbbi Kullanım Amaçlı THP-1 Hücre Hattının Yerli Üretim Serumsuz Ortama Adaptasyonu ve Bu Ortamın Yabancı Menşeli Besin Ortamlarıyla Karşılaştırılması (Lisans Tezi)

Araştırma Alanları

- Hayvan hücre kültürleri
- Hayvan hücre kültürü temelli biyoproses uygulamaları
- İmmünoloji
- Aşı üretimi ve üretim süreci geliştirilmesi
- Hayvan hücre kültürleri için serumsuz ortam çalışmaları

Projeler ve Burslar

- 2021 – 2023 : Ülkemizde ve Dünyada Halk Sağlığını En Fazla Tehdit Eden HPV ve Influenza Kaynaklı Enfeksiyonlara Karşı Tanı Kitleri, İlaç Formülasyonları ve Aşı Geliştirilmesi, 1004 - Mükemmeliyet Merkezi Destek Programı, Yürürlükte, ARDEB, KAMAG - Kamu Araştırmaları Destek Grubu (Proje Kodu: 20AG005, Bursiyer)
- 2019 – 2020 : Tıbbi Kullanım Amaçlı THP-1 Hücre Hattının Yerli Üretim Serumsuz Ortama Adaptasyonu ve Bu Ortamın Yabancı Menşeli Besin Ortamlarıyla Karşılaştırılması (TÜBİTAK-BİDEB 2209-B Sanayi Odaklı Lisans Bitirme Tezi Destekleme Programı, Proje yürütücüsü)

Yayınlar

- Celik, Y., Alptekin, K., Demirden, S. F., & Oncel, S. S. (2023). A novel low shear horizontal bioreactor design for the production of animal cells: Effect of bioreactor dynamics on the 3D spheroid formation of HepG2. Biochemical Engineering Journal, 196, 108952. DOI: 10.1016/j.bej.2023.108952
- Demirden, S.F, Kimiz-Gebologlu I, Alptekin, K., Senyay-Oncel D. (2023) Importance of Intellectual Property Rights for Building a Sustainable Future, Ch. 4, 69-94 pp., In: Oncel, S.S. (eds). A Sustainable Green Future: Perspectives on Energy, Economy, Industry, Cities and Environment, Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-031-24942-6_4. ISBN: 978-3-031-24941-9

- Demirden, S.F, Alptekin, K., Kımız Geboloğlu I, Öncel S.Ş. (2022) Düünden Bugüne Türkiye’de Aşılama ve Aşı Üretiminin Tarihçesi, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 52(4): 247-264. DOI: 10.54453/TMCD.2022.52244
- Demirden, S.F, Alptekin, K., Kimiz-Gebologlu I, Oncel S.S. (2022) Influenza Vaccine: An Engineering Vision from Virological Importance to Production, Biotechnology and Bioprocess Engineering Journal, 27: 740–764. DOI: 10.1007/s12257-022-0115-8.
- Kimiz-Gebologlu I, Demirden, S.F, Oncel S.S (2022) A study of the THP-1 cell line as the potential biologics production platform with the emphasis on serum-free media substitution for economic expediency, Biotechnology Journal, 17, e202200154. DOI: 10.1002/biot.202200154.

Kurs / Sertifika Bilgisi

- 4-5 Mayıs 2023 – 5th Novel Fluidic Technologies Workshop with an Emphasis on Tissue Engineering, Ege Üniversitesi, İzmir-Türkiye.
- 14-25 Kasım 2022 : Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Ege Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADMEK), İzmir-Türkiye
- 3-5 Kasım 2022 – 4th International Vaccine Congress, Ankara Üniversitesi, Ankara-Türkiye.
- 20 – 22 Ekim 2021: Çevrimiçi HPLC Eğitimi, Ege MATAL.
- 11 Şubat – 15 Nisan 2021: Çevrimiçi İleri Eğitim Kursu “HÜCRE KÜLTÜRÜNE DAYALI ÜRETİM TEKNİKLERİ” . Sabancı Üniversitesi, SUNUM.
- 29 Şubat 2020: Doku Mühendisliği ve Uygulamaları Kursu. Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü.
- 08 – 09 Aralık 2018: GMP-İyi Üretim Uygulamaları, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü İzmir-Türkiye.
- 08 – 09 Aralık 2018: GLP- İyi Laboratuvar Uygulamaları, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü İzmir-Türkiye. Sertifika
- 08 – 09 Aralık 2018: ISO/IEC 17025:2017, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü İzmir-Türkiye.

- 08 – 09 Aralık 2018: ISO 9001:2015, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü İzmir-Türkiye.
- 22 Mart 2018: Malzeme Güvenlik Bilgi Formu Bilgilendirme Semineri, TMMOB Kimya Mühendisleri Odası Ege Bölge Şubesi, İzmir-Türkiye
- 23 Mart 2018: TS EN ISO 9001-2015 Kalite Yönetim Sistemi Bilgilendirme Eğitimi, TMMOB Kimya Mühendisleri Odası Ege Bölge Şubesi, İzmir-Türkiye
- 2017: Biyomühendislik Günleri, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü İzmir-Türkiye.
- 2016: American House Language Schools, İzmir-Türkiye. Certificate of Achievement (C1 level)

Yabancı Dil Bilgisi

- İngilizce (ileri derecede)
- Almanca (başlangıç seviyesi)

Bilgisayar Bilgisi

- Microsoft Office (iyi derece)
- Matlab (orta seviyede)
- GraphPAD Prism (iyi derece)
- Design Expert (iyi derece)

Referanslar

Doç. Dr. Suphi Şurişvan ÖNCEL – Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, İzmir-Türkiye

Prof. Dr. Sait SARGIN – Bursa Teknik Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, Bursa-Türkiye

Biyolog Dr. Aylin BABAOĞLU – Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Birimleri Bölümü Parazitoloji Anabilim Dalı Seroloji Laboratuvarı İzmir, Türkiye