

ENDÜSTRİYEL BOYUTTA HÜCRE KÜLTÜRÜ İÇİN YENİ YAKLAŞIMLAR

Menemşe KİREMİTÇİ*

"Hayvansal hücre kültür teknolojisi", çok sayıda önemli biyolojik maddenin (tıp ve veteriner amaçlı aşular, insülin, interferon, plazminojen aktivatörleri vb.) üretimi amacıyla günümüzde yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Ancak, üretimin endüstriyel boyutta gerçekleştirilmesi konusunda önemli sorunlar mevcut olup, çözüm amacıyla yoğun çalışmalar sürdürülmektedir.

Hücre kültürünün temeli, çeşitli doku ya da organlardan izole edilen hücrelerin suni besi ortamlarında üretilmesi ve üretilen hücrelerin de in-vitro koşullarda farklı organizmalar olarak davranmasına dayanır. Hücre kültürü, doku ya da organdan enzimatik, kimyasal ya da mekaniksel yöntemlerle izole edilen hücrelerle hazırlanabileceği gibi, mevcut "hücre-soyları" kullanılarak da hazırlanabilir. Modern anlamdaki "hayvansal hücre teknolojisi" günümüzden 40 yıl kadar önce Earle ve grubu tarafından hücre üremesini destekleyecek suni besi ortamının geliştirilmesiyle başlamış olup, ilk olarak polio (çocuk felci) virüsünün üretiminde kullanılmış, bunu tıp ve veteriner amaçlı diğer aşular ve Tablo'dan verilen ürünler izlemiştir.

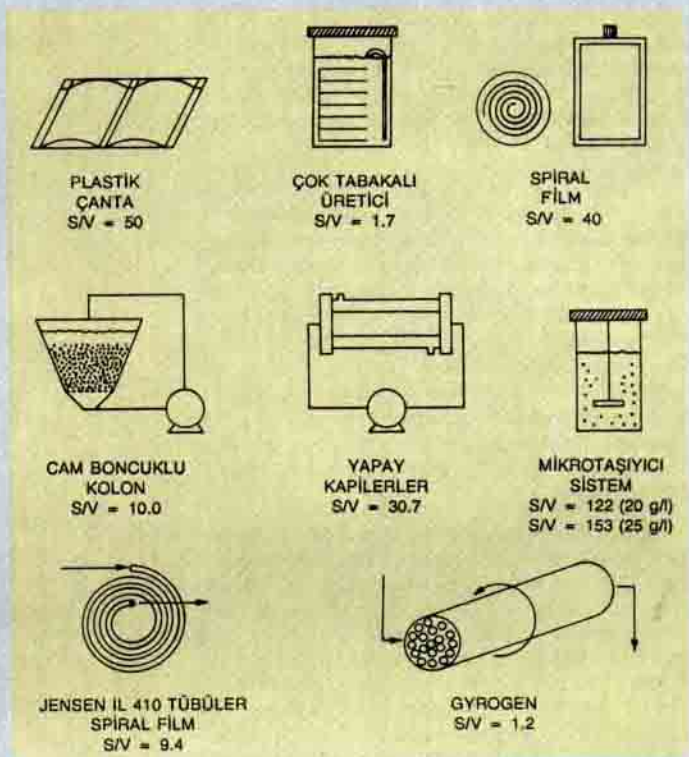
1980'li yıllarda Rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmelere bağlı olarak, insülin, interferon gibi pek çok proteinin bakteriyel sistemlerde üretilmesi karşısında, hayvansal hücrelerin protein üretimindeki kullanım potansiyeli önemini kaybetmeye başlar görünmüştü; ancak kompleks tersiyer ve kua-

terner yapılara sahip proteinlerle, transilyon sonrası modifikasyon gerektiren proteinlerin bakteriyel sistemlerde tanımlanamaması, bu tür yapıların "genetik olarak manipüle edilmiş hayvansal hücrelerle" üretimini gerekli kılmıştır. Söz konusu ürünler arasında Hepatit B virüs yüzey antijeni, plazminojen aktivatörleri ve monoklonal antiadiler sayılabilir.

Hücre teknolojisinde son 10 yıl içerisinde yapılan çalışmalar, üretim kapasitesinin endüstriyel boyutlara çıkarılması konusunda ağırlık kazanmıştır. Seçilen hedef, hayvansal hücreler için de mikrobiyal hücrelerdeki benzer endüstriyel fermentasyon proseslerinin geliştirilmesidir. Ancak, her iki hücre türü için de aynı temel kavramlar geçerli olmasına rağmen, aralarındaki yapısal farklılıklar (özellikle hayvansal hücrelerin üreme hızının yavaş oluşu ve kolaylıkla parçalanabilen plazma membranına sahip oluşları), hayvansal hücre kültürleri için daha değişik proseslerin geliştirilmesini gerekli kılmıştır.

HÜCRE KÜLTÜR SİSTEMLERİ

Hayvansal hücre kültürleri, hücrelerin üreyebilme koşullarına bağlı olarak, "tek-tabaka hücre kültürleri" ve "süspanse kültürleri" olmak üzere iki



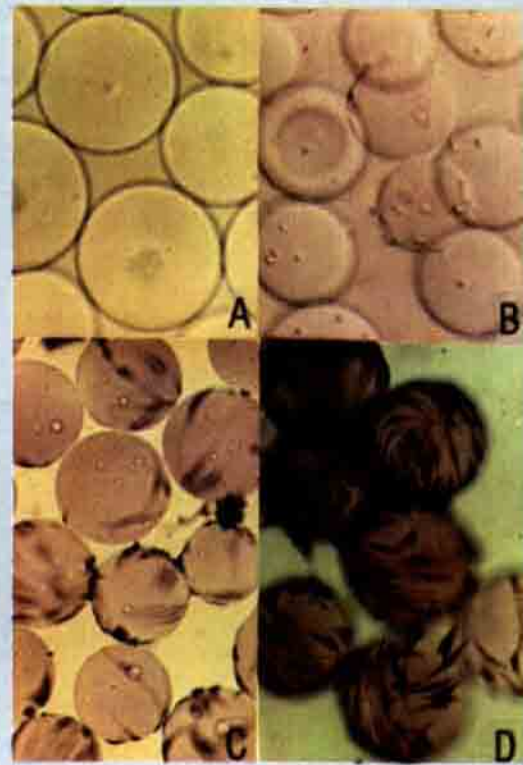
Şekil 1: Yüzeğe-bağımlı hücre kültür sistemleri (S/V: Yüzeğe/Hacim).

* Doç.Dr., Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Beştepe, Ankara.

şekilde yürütülebilirler. Üreyebilmesi için katı bir desteğe tutunmayı gerektiren hücreler, "yüzeğe-bağımlı hücreler" olarak adlandırılır ve tek-tabaka kültürlerde üretilirler. Süspansel hücreler ise, mikrobiyal hücrelere benzer olarak kültür ortamında serbest durumda üreyebilirler.

Tek-tabaka hücre kültüründe temel basamak, hücrelerin kültür kabının yüzeyine yapışmasıdır. Hücre yayılma ve üremesi, ancak uygun yüzeye yapışma gerçekleştiğinden sonra başlar. Hücreler tüm yüzeylere yapışmayacağı gibi, yapışmanın gerçekleştiği yüzeyler de üremeyi inhibe edebilir. Yüzeydeki makromoleküler organizasyon, yük türü ve yoğunluğu, iletilebilirlik ve fiziksel yapı hücre-yüzey etkileşimindeki önemli özellikler olarak sıralanabilir. Doğal yüzeyler (kollojen, glikoproteinler vb.) ve yapay yüzeyler (cam, polisitiren, teflon vb.), istenilen özellikleri taşıyan yapılar olarak hücre kültüründe kullanılmaktadır.

Yüzeğe-bağımlı hücrelerin üretiminde yaygın olarak kullanılan cihazlar, genel olarak cam veya polisitirenden imal edilmiş petri kapları ve döner şişelerdir. 1 litrelik döner şişe yaklaşık 500 cm² iç yüzey alanına sahiptir ve hücre yapışma ve üremesi, iç yüzey duvarında gerçekleşir. Şişeler inkübatöre yerleştirilip, yavaş hızda döndürülerek iç yüzeyin tamamının hücre tarafından kullanılması sağlanır. Şişe hacmi başına yüzey alanı son derece düşük olduğundan, ticarî boyuttaki çalışmalar için şişe sayısının artırılması gerekmektedir. Bu da, yüksek yatırım ve işletme maliyetine ve ortam koşullarının kontrolünün zorlaşmasına neden olmaktadır. Birim hacimdeki yüzey alanının artırılması için son yıllarda, yapay kapillerler, cam boncuklu kolon sistemleri, Gyrogen, plastik torbalar, spiral film, seramik matriks ve mikrotasıyıcı-destekli kültür sistemleri gibi çeşitli sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemler Şekil 1'de şematik olarak gösterilmiştir. Sistemler arasında en uygunu mikrotasıyıcı-destekli kültür reaktörleri olup, yüzeğe-bağımlı hücre kültürlerinin mikrotasıyıcı sistemlerde yürütülmesi fikri ilk olarak Van Wezel ta-



Şekil 2: Mikrotasıyıcı-destekli sistemlere ait optik fotoğraflar. a) mikrotasıyıcılar; b) mikrotasıyıcı yüzeyine hücre yapışması; c) yüzeyde hücre yayılması; d) hücre üremesi.

rafından ortaya atılmış ve DEAE (dietilaminoetil)-Sephadex A-50 (Pharmacia), ticarî iyon-değiştirici reçine, mikrotasıyıcı olarak kullanılmıştır. Bu yeni yaklaşımda hücreler, kültür ortamında hafif karıştırılmaya (yaklaşık 60 devir/dakika) süspansel halde tutulabilir ve "mikrotasıyıcı" olarak adlandırılan, polimerik yapıdaki katı kürelerin yüzeyinde üretilirler. Dekstran, jelatin, polisitiren, cam ve selüloz temelli çok sayıda mikrotasıyıcı ticarî olarak mevcuttur. Mikrotasıyıcılar, uygun yüzey özelliklerine sahip olmaları yanında, yoğunlukları 1,03-1,04 g/ml, çapları 100-230 mikron aralığında ve şeffaf olmalıdır. Ayrıca, toksik, kanserojenik ve rijit özellikler göstermemeleri istenir. Mikrotasıyıcı-destekli sistemler, yüksek alan/hacim oranı nedeniyle üretim kapasitesinin artması, hücre üretiminin birçok küçük üretim ünitesi yerine, tek bir yüksek üretim kapasitesindeki reaktörde gerçekleştirilmesiyle, kültür ortamının ekonomik bir şekilde kullanımının mümkün oluşu, kontaminasyon riskinin azalması, ortam koşullarının mükemmel bir şekilde kontrol edilebilmesi, mikroskobik inceleme ve kimyasal testler için ortamdan kolaylıkla örnek alınabilmesi gibi avantajlara sahiptirler.

Şekil 2'de dekstran yapısındaki Cytodex-1 mikrotasıyıcılar (Pharmacia) ile yapışma, yayılma ve üreme evrelerinde mikrotasıyıcı yüzeyindeki Baby Hamster Kidney (Yavru Hamster Böbrek Hücresi,

Hayvansal Hücre Kültürleri ile Üretilen Biyolojik Maddeler	
Aşılar	Hüresel Kimyasallar
Şap (Foot and Mouth)	α -interferon
Çocuk Felci (Polio)	β -interferon
Kuduz	interleukin-2
Kızamıkçık	Plazminojen Aktivatörü
Kızamık	Thymosin
Kabakulak	
Hormonlar	İmmünobiyolojik Maddeler
Büyüme Hormonu	Monoklonal Antiadiler
Prolaktin	Teşhis Amaçlı
ACTH	Pasif Aşılı Olarak
	Laboratuvar Amaçlı

BHK) hücrelerini gösteren optik mikrofotograflar verilmiştir. Fotograflar Ankara Şap Enstitüsü'nde yaptığımız çalışmalardan alınmıştır (Kiremitçi, Gürhan, 1990).

Günümüzde, mikrotasıyıcı-destekli sistemler, pek çok firma tarafından endüstriyel boyutta üretim amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin Fransa'da Merieux Enstitüsü tarafından çocuk felci ve kuduz aşılarının üretimi 1000 litre kapasiteli mikrotasıyıcı-destekli reaktörlerde gerçekleştirilmektedir. Ayrıca, ticari olmayan pek çok mikrotasıyıcı sistemle de çalışmalar sürdürülmektedir.

Son yıllarda, yüzeye bağımlı hücrelerin üretilmesi için, KC Biological ve Corning araştırmacıları tarafından tanımlanan diğer bir sistem, kare kesitli kanallar içeren seramik matriksden oluşmaktadır. Silindirik yapıdaki bu sistem ile yüksek alan/hacim oranına ulaşılmaktadır. Kültür ortamı, kanallar boyunca sisteme pompalanmakta ve ortamın sürekli sirkülasyonu sağlanmaktadır. Seramik matrikslerle ulaşılan en geniş yüzey alanı 18.5 m² olarak kaydedilmiştir. Bu değer yüzey alanı olarak, 5 g/litre derişiminde mikrotasıyıcı içeren 6 litrelik mikrotasıyıcı kültür reaktörüne karşı gelmektedir. Mikrotasıyıcı sistemlerle 1000 litrelik reaktörlerde çalışıldığı göz önüne alınırsa, seramik matrikslerde bu değere ulaşılabilmesi için reaktörün çok fazla büyütülmesi gerektiği söylenebilir. Seramik matriks, hibridoma hücrelerinin üretiminde kullanılmaktadır.

Tümör hücreleri, örneğin HeLa hücreleri ve limfoblastoidler üremeleri için bir yüzey gerektirmeyen süspanse hücreler olup, bakteriyel fermentasyondakine benzer ekipmanlarda üretilirler. Elde edilen ürünler düşük maliyette ve miktarda çöktür. Son 20 yıl içerisinde yapılan çalışmalarda, özellikle aşı üretimi amacıyla reaktör kapasitesi 8000 litreye kadar çıkartılmıştır. Ancak, bu hücrelerin normal olmayan kromozomal değişimler ve tümörjenik özellikler göstermesi, Dünya Sağlık Örgütü tarafından, süspanse hücrelerden elde edilen biyolojik ürünlerin insan uygulamalarında kullanımının yasaklanmasına neden olmuştur.

Süspanse hücre kültürlerindeki diğer önemli husus, hücrelerin kültür ortamındaki karıştırmadan kaynaklanan kayma kuvvetlerine karşı olan aşırı duyarlılığıdır. Kayma kuvvetleri etkisinin minimuma indirilmesi amacıyla çeşitli türde karıştırıcı dizaynları yapılmıştır. Diğer bir sistem ise, "airlift fermentörler" (hava-kaldırılmalı)dır. Bu tür fermentörlerde, ortam reaktör tabanından beslenen hava kabarcıklarıyla karıştırılır. Günümüzde, 1000 litrelik airlift fermentörlerde monoklonal antibadi üretimi yapılmaktadır.

Süspanse hücre üretiminde diğer bir yaklaşım olan mikrokapsülasyon ilk olarak 1980'de Lim ve Sun tarafından pankreatik β -islet hücrelerinin in-vitro ve in-vivo koşullardaki yaşam süresini artırmak amacıyla kullanılmıştır. Bu yöntemde hücreler Ca-Aljinat jel

içerisinde hapsedilmiştir. Elde edilen yarı geçirgen aljinat/poliamin membran besin maddelerinin kapsül içerisine girişine ve atık maddelerin kapsülden uzaklaştırılmasına izin vermektedir. Sistemin dezavantajları olarak, maliyeti, çoklu manipülasyon işlemleri sırasındaki kontaminasyon riski, bazı hücre türlerinin matriks bileşenleriyle uyusamamaları ve kapsül içerisine oksijen aktarımının kısıtlanmış oluşu sayılabilir. Mikrokapsülasyon, "Damon Biotech" firması tarafından monoklonal antibadi üretiminde kullanılmaktadır. Bu amaçla, hibridoma hücreleri yaklaşık 500 mikron çapındaki aljinat küreler içerisinde kapsüle edilmiştir.

Diğer bir sistem olan "hollow-fiber" reaktörlerin hücre kültüründe kullanımı, 1970'lerin başında gerçekleşmiş olup, sistem ile ilgili çalışmalar günümüzde de sürdürülmektedir. Reaktör silindirik geometriye sahip olup, selüloz, selüloz asetat, polisülfon ya da polipropilen yapısındaki hollow-fiber kapillerleri iç kısma monte edilmiş ve silindirin her iki ucu da kapatılmıştır. Hücreler kabuk tarafında inoküle edilmiştir. Kültür ortamı ise, silindirin bir ucundan diğerine beslenmektedir. Hollow-fiber sistemlerin son uygulaması monoklonal antibadi üretimidir. Böyle bir sistemin üretim verimliliği süspanse kültürlerinkinden çok daha yüksektir.

Biyoteknolojik açıdan son derece önemli birçok maddenin endüstriyel boyutta üretimine olanak sağlayacak bu yöntemlerin bir kısmı endüstriyel üretimde yerini alırken, bir yandan da bilim adamlarının mükemmeli arayış çabaları doğrultusunda yöntemler üzerindeki çalışmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Earle, W.R., Schilling, E.L., Shannon, J.E., J. Nat. Cancer Inst., 12, 179, 1951.
- 2- Van Wezel, A.L., Develop. Biol. Stand., 37, 143, 1977.
- 3- Lim, F., Sun, A.M., Science, 210, 908, 1980.
- 4- Kiremitçi, M., Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 1988.
- 5- Kiremitçi, M., Gürhan, I., Biotechnology and Applied Biochemistry, 14, 170, 1991.

