

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİNE KARŞI HİBRİDOMA TEKNOLOJİSİNE
DAYALI POLİKLONAL ANTİKOR ÜRETİLMESİ

Atıfcan DEMİRCİOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA

Ağustos, 2020

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİNE KARŞI HİBRİDOMA TEKNOLOJİSİNE DAYALI
POLİKLONAL ANTİKOR ÜRETİLMESİ**

Atıfcan DEMİRCİOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 17. 08. 2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Emrah ŞEFİK ABAMOR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi. Sezen CANIM ATEŞ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün Nap,YTÜ- FBA-2018-3359 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Babamın Aziz Hatırasına, Ailem

ve

Tüm Öğretmenlerime

TEŞEKKÜR

Danışmanın ve Tez Juri üyesi, bana anne şevkatiyle yaklaşarak oluşan, oluşacak, oluşmuş sorunların çözümünde sürekli destek olan Yıldız Teknik Üniversitesi Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarının kurucularından danışmanım ve değerli hocam Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya, Tez juri üyesi, ekibimizin sessiz kahramanlarından, hocam gene bir sıkıntı var diye sürekli yanına gittiğim her seferde sabırla dinleyen ve işleri başından aşkın olmasına rağmen sürekli yol gösteren Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a, Juri üyesi Sezen CANIM ATEŞ hocama, Taktikleriyle ufkumu açan, Bilimsel Çalışmaların nasıl idare edilmesi gerektiği konusunda çokça deneyim ve bilgi kazanmamı sağlayan, tez çalışması, deneyleri, yazımı sırasındaki bitmeyen üstün sabrı ile sürekli yol gösteren ,tez çalışmamın gerçekleştirilebilmesi için gerekli kaynak ve hammaddeyi sağlayan projenin yönetici, Yıldız Teknik Üniversitesi Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarının kurucularından, Prof. Dr. Adil ALLAHVERDIEV'e, Çalışmam sırasında hem pratik hem teorik olarak yardımını esirgemeyen, sıkıştığımda imdada yetişen üst devrem Aslı Pınar ZORBA'ya, yolculuğum sırasında sürekli dertleştiğim, desteğini yardımını esirgemeyen laboratuvar arkadaşı ve devrem kavramının vücut bulmuş hali olan Sahar DINPARVAR'a, son dakikada bile sürekli destek olan tam bitti derken tekrar mücadeleye devam etmemi sağlayan laboratuvarın hırçın motivatörü Tural SAFAROV'a, minnetarlığımı ve saygılarımı sunarım.

Bir biyomühendisin nasıl olması gerektiği ve biyomühendisliğin ne olduğunun , enstrümental analizin ve laboratuvar cihazlarının çalışma prensiplerinin zihnimde tamda olması gerektiği gibi oturtmamı sağlayan her çalışmamda bilgisinin ve yol göstericiliğinin sonuçlarını sürekli gördüğüm Lisans Tez danışmanım Prof. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI'na Saygılarımı ve minnetarlığımı sunarım. Çalışmam sırasında rahmetli olan Yıldız Teknik Üniversitesi Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarının eski öğrencilerinden lisans eğitimim ve lisans tezim sırasında yardımları bulunan Hocam Serhat Elçiçek'e allahtan rahmet, ailesine sabır diliyorum.

Beni doğurup büyüten ilk kez kendimi bildiğim andan bu yana sürekli destekleriyle buraya kadar gelmemi sağlayan annem Ayşe seher DEMİRCİOĞLU'na ve bu tezin yapılabilmesi için gerekli şartları sağlayan ve tezde tam da bu yüzden en az benim kadar katkısı bulunan sağlayan kardeşim Abdurrahman DEMİRCİOĞLU'na teşekkür ederim. Bir ömürlük dostum, sırdaşım, Serhat DİKER'e, tezin yazılması sırasından sunulduğu hatta onayladığı güne kadar sürekli yardıma koşan değerli dostum Arş. Gör. Muhammet ÇELİK'e teşekkür ederim.



Atıfcan DEMİRCİOĞLU

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Hipotez	5
2 GENEL BİLGİLER	7
2.1 Mcf-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattının, Hücre Yüzey Molekülleri.....	7
2.2 Bağışıklık (İmmün) Sistemi.....	8
2.2.1Doğal İmmünite.....	8
2.2.2Adaptif İmmünite	8
2.3 Poliklonal Antikor Teknolojisi	11
2.4 Poliklonal Antikorların Monoklonal Antikorlar İle Kıyaslanması.....	12
2.5 Hibridoma Teknolojisi	13
2.6 İmmünizasyon İçin Seçilen Denek Hayvanlarının Özellikleri.....	13
2.7 Füzyon Çalışmalarında Kullanılacak Hücrelerin Özellikleri.....	13
2.8 Adjuvanlar.....	14
3 MATERYAL VE METOT	16
3.1 Materyal.....	16
3.1.1Ekipmanlar, Cihazlar Ve Kimyasallar	16
3.1.2Hücre Hatları.....	18
3.1.3 Üzerinde Çalışmaların Gerçekleştiği Ve B Lenfositleri İzole Edilmesi İçin Kullanılan Denek Hayvanı.....	19
3.1.4Kültür Besiyerleri.....	19
3.2 Metot.....	20

3.2.1 Özel Kültür Besiyerlerinin Hazırlanması	20
3.2.2 Solüsyonların Hazırlanması	21
3.2.3Kriyobanktan MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Çıkarılması ..	23
3.2.5MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Biyokütle Üretim Optimizasyonu	24
3.2.6 MCF-7 İnsan Dişisi Meme Kanseri Hücrelerinin Biyokütle Üretiminde De-Novo Plato-ph Üretim Tekniği	24
3.2.7MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattının Pasajlanması.....	26
3.2.8MCF-7 İnsan Dişisi Meme Kanseri Hücrelerinin Kriyoprezervasyona Hazırlanması	26
3.2.9Fare Myeloma Ag8 Hücre Hattının Kültürü	27
3.2.10Fare Makrofaj Hücre Hattının (J774, Balb/C Dişi Retikulum Hücre Sarkoması) Kültürü	28
3.2.11J774 Hücre Hattı İle Şartlandırılmış Besiyeri Üretimi.....	28
3.2.12Hibridoma Hücrelerinin Kriyoprezervasyonu	28
3.2.13Antijen Amaçlı Lizat Hazırlama Metotları.....	28
3.2.14Lizatlardaki Protein (Antijen) Miktarının Tayini	32
3.2.15Formülasyonların Makrofaj Kültür Sisteminde Nitrik Oksit İmmünostimülasyonun İncelenmesi	32
3.2.16Antijen Stoklarının Hazırlanması	34
3.2.17İmmünizat Hazırlanması	35
3.2.18 Hayvanların Gruplandırılması Ve İşaretlenerek Birbirinden Ayırt Edilmesi	38
3.2.19Enjeksiyon Stresinin Engellenmesi	39
3.2.20İmmünizasyon Ve Serum Eldesi	39
3.2.21İmmünizasyon Kontrolü (MCF-7 Spesifik Elisa)	40
3.2.22Balb/C Sakrifikasyonu Ve Dokularının Eldesi	48
3.2.23Hücrel Füzyon.....	50
3.2.24Füzyon Sonrası Hibrit Bakımı Ve Hibridoma Seçimi	51
4 DENEYSEL SONUÇLAR	53
4.1 Mcf-7 İnsan Dişisi Meme Kanseri Hücrelerinin Biyokütle Üretiminde De-Novo Plato-Ph Üretim Tekniği Sonuçları	53
4.2 Mcf-7 İnsan Dişisi Meme Kanseri Hücrelerinin Biyokütle Üretim Optimizasyonu Sonuçları	53
4.3 Lizat Hazırlama Metotlarının Verimlerinin Elde Edilen Protein Miktarına Göre Karşılaştırılması.....	54

4.4	Antijen Miktarının Ve Adjuvanların Makrofaj Kültür Sistemindeki Nitrik Oksit Tepkisinin (İmmünojenitelerinin) Değerlendirilmesi	55
4.5	Lizatlardan Alınan Çökelti Hücre Artıklarının Giemza İle Boyanarak İçeriklerinin Mikroskopik Olarak Gözlemlenmesi	57
4.6	Balb/C Serumlarında Bulunan MCF-7 İnsan Dişi Meme Kanseri Hücre Antijenlerine Karşı Üretilmiş Antikor Miktarlarının Karşılaştırmalı İncelemeleri (Elisa Sonuçları)	59
4.7	Füzyon Sonucu Elde Edilen Hibridomaların Gelişimlerinin Mikroskopik Görüntüleri	62
4.8	Herceptin İle Tezde Üretilen Poliklonal Antikorlardan Aynı Miktarda Alınarak Yapılan Elisa Testinin Sonuçları.....	65
5	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	66
	KAYNAKÇA	69
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	72

SİMGELİSTESİ

A260	260 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri
A280	280 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri
Ag8	Ag8 fare kemik iliği kanseri, myeloma hücre hattı
bp	Baz çifti cc Santimetre küp
Da	Dalton
J774	Fare tümör monosit hücre hattı
kDa	kilo Dalton
μM	MikroMolar
°C	Santigrad Derece
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare



KISALTMA LİSTESİ

AP	Alkalin Fosfataz
APRT	Adenin Fosforibozil Transferaz
NO	Azot monoksit (Nitrik Oksit)
H zinciri	Antikor yapısında ağır “heavy” zincir
RPM	Bir dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
CD4+	CD4 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit
CD8+	CD8 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit
CFA	Complete Freund’s Adjuvan
NK	Doğal öldürücü hücreler (Natural Killer cells)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
Dk	Dakika
K ₂ HPO ₄	Di Potasyum bi fosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Test
Fab	Fragment antigen binding (antijen bağlayan bölge)
Fc	Fragment crystallizable (kristalize olabilen bölge)
Fab	Fragment antigen binding (antijen bağlayan bölge)
Fc	Fragment crystallizable (kristalize olabilen bölge)
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate buffered saline)
HAT	Hipoksantin, Aminopterin, Timidin
HCl	Hidroklorik asit
HGPRT	Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz
HT	Hipoksantin Timidin
pH	Hidrojen İyon Konsantrasyonun Negatif Logaritması
IgA	İmmünoglobulin A
IgD	İmmünoglobulin D
IgE	İmmünoglobulin E
IgG	İmmünoglobulin G
IgM	İmmünoglobulin M
CO ₂	Karbondioksit
MHC	Major Histocompatibility Complex
MW	Moleküler Ağırlık (Molecular Weight)
KCl	Potasyum klorür
KOH	Potasyum Hidroksit
PEG	Polietilen Glikol
PNPP	Para-Nitrofenilfosfat
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
NaCl	Sodyum klorür
FBS	Sığır Fetal Serum (Fetal Bovine Serum)
BSA	Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albümine)
Sn	Saniye
R0	Ticari RPMI
D0	Ticari DMEM

UV

Ultraviolett



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 2018 yılı kadınlar arasındaki kanser sonucu ölümlerin ülkelere göre gösterimi[5]	2
Şekil 3.1 Ag8 Balb/c fare myeloma hücrelerinin mikroskopi görüntüsü(10X,ikinci gün)	27
Şekil 3.2 Sonikatör spesifikasyonu[32]	30
Şekil 3.3 MCF-7 Hüclerinin fiziksel aralıkları[33]	30
Şekil 3.4 MCF-7 hücrelerinin harmonik frekansları[33]	31
Şekil 3.5 Nitrik oksit standartları kalibrasyon eğrisi	34
Şekil 3.6 Meme kanserine karşı oluşturulmuş antikorları tespit etmek amacı ile yapılan ELİSA testinin şematizasyonu	41
Şekil 3.7 Kalibrasyon eğrisi olarak kalibrasyon ölçümlerinin grafiği.....	48
Şekil 3.8 Balb/c Fare sakrafikasyonundan önce kalpten kan alınması.....	49
Şekil 3.9 Balb/c Fare sakrafikasyonundan sonra dalağın laminar kabinde çıkarılması.....	49
Şekil 3.10 RP0 besiyeri içerisindeki Balb/c fare dalağı	50
Şekil 3.11 Hibridomalar 14. günün ardından mikroskobik olarak oldukça küçük hücreler olarak gözlenebilmektedir.....	52
Şekil 3.12 HT besiyerinde apoptoza uğrayan myeloma hücreleri.....	52
Şekil 4.1 Lizat hazırlama metotlarının elde edilen protein miktarına göre karşılaştırma grafiği	55
Şekil 4.2 J774 hücre hattında MCF-7 hücre lizatına karşılık üretilen NO miktarını gösterir çubuk grafik.....	56
Şekil 4.3 J774 hücre hattında MCF-7 hücre lizatına karşılık üretilen NO miktarını gösterir çizgi grafik	56
Şekil 4.4 MCF-7 lizatı birlikte kullanılan Adjuvanların NO üretimine etkisi (nmol/ml).....	57
Şekil 4.5 Otoklavlama sonrası sonrası pelletten alınan sürüntünün giemza boyanarak alınmış mikroskopi görüntüsü (100x)	58
Şekil 4.6 Sonikasyon sonrası pelletten alınan sürüntünün giemza boyanarak alınmış mikroskopi görüntüsü (100x)	58
Şekil 4.7 Dondurma Çözdürme sonrası sonrası pelletten alınan sürüntünün giemza boyanarak alınmış mikroskopi görüntüsü (100x)	59

Şekil 4.8 İlk 6 İmmünizasyon döngüsünde elde edilen fare serumlarının MCF-7 insan meme kanseri hücre hattına karşı elisa sonuçlarının 3 boyutlu çubuk grafiği.....	60
Şekil 4.9 Sakrafikasyon öncesi tüm hayvanların antikor ölçümleri.....	60
Şekil 4.10 Gruplardaki anti-MCF-7 antikoru ELİSA sonuçlarının ortalamasın, grup içi ortalaması ile elde edilen immünizat formülasyonlarının sonuç grafiği (lizasyon metodunun göre gruplanmış).....	61
Şekil 4.11 Hibridomaların 14. günün ardından ilk mikroskobi görüntüsü.....	62
Şekil 4.12 Hibridomların füzyonun ardından 28.gündeki HAT besiyeriden HT Besiyerine geçiş sırasındaki görüntüsü.....	63
Şekil 4.13 Hibridoma bulunan kuyuların işaretlenmesi.....	63
Şekil 4.14 Hibridomların füzyonun ardından 48.günde invert mikroskobi görünütüsü(40X)	64
Şekil 4.15 Hibridomaların 96. günde hibridoma dondurma solüsyonunda dondurulmadan önceki mikroskobi görüntüleri (10X).....	64
Şekil 4.16 Herceptin ve tez kapsamında üretilen poliklonal antikorun karşılaştırmalı ELİSA Sonucu.....	65

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Aşı formülasyonları tablosu.....	35
Tablo 3.2 ELİSA kalibrasyon ölçümleri	47



Meme Kanserine Karşı Hibridoma Teknolojisine Dayalı Poliklonal Antikor Üretilmesi

Atıfcan DEMİRCİOĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA

Dünya'da kalp damar hastalıklarından sonra kanser ikinci sırada yer alır. Dünya sağlık örgütünün yayınladığı verilere göre sadece 2018 yılında 18 milyon insanda kanser tespit edilmiştir. Bu vakaların yaklaşık 2 milyonu meme kanseri oluşturur. Monoklonal antikorlar tanı ve tedavide yüksek spesiviteye sahip olmalarına rağmen bu spesivite tek epitop bölgesine bağlanabildikleri için poliklonal antikorlar ile karşılaştırıldıklarında düşük avidite sonuçlarıyla karşılaşmaktadır.

Literatürde hibridoma teknolojisine dayalı çalışmalarda meme kanseri hücrelerinden farklı yöntemlerle antijenin hazırlanmasına yönelik (sonikasyon, dondurma-çözme, otoklavlama) çalışmalar bulunsa da bunların farklı adjuvanlar ile formülasyonlarının immün yanıt oluşturmalarının karşılaştırılmasına yönelik çalışmaya rastlamadık. Tez çalışmasının amacı insan meme kanser hücresinden farklı yöntemlerle antijenin hazırlanması ve farklı adjuvanlar ile kombinasyonlarının geliştirilmesi tanı ve tedavide kullanılmak üzere hibridoma teknolojisine dayalı poliklonal antikorların üretilmesidir.

Poliklonal antikorların üretilmesi için, MCF-7 kültürü yapılarak bu hücrelerden sonikasyon, dondurma-çözdürme, otoklavlama yöntemleri lizatlar hazırlandı. Bu lizatlarda bulunan antijenler ile Polioksidonyum ve Freund komple adjuvanı karıştırılarak Balb/C tipi fareler immünize edildi. İmmünizasyonların ardından deneklerden elde edilen serumlardan ELİSA ile antikor titreleri tayin edildi. Tayinin ardından deneklerin dalaklarından izole edilen B hücreleri ile AG-8 hücreleri füzyona uğratarak hibridomalar elde edildi ve bu hibridomaların antikor üretimi gerçekleştirdikleri ELİSA testi ile tespit edilip Herceptin ile karşılaştırıldı.

Sonikasyon ile elde edilen antijen miktarının, dondurma çözme ile üretilen antijen miktarından %50 daha fazla, otoklavlama ile elde edilen antijen miktarından ise 8 kat daha fazla antijen sağladığı, Makrofaj Nitrik Oksit Kültür Sistemi testinde tek başına antijen kullanımının etkisiz olduğu, Freund komple adjuvanı veya Polioksidonyum adjuvanının kullanılması gerektiği gözlenmiştir. Formülasyonların immünizasyonu sırasında 6. immünizasyona kadar sonikasyon metoduyla hazırlanan antijenlerin dondurma çözme yöntemiyle hazırlanan antijenlere nazaran ortalamada 1.5 kat daha hızlı sonuç verdiği, otoklavla ile hazırlanan antijenlere nazaran ise 2 kata kadar daha hızlı sonuç verdiği tespit edilmiştir. Üretilen hibridomalardan elde edilen antikorların ise beklenildiği gibi monoklonal antikora nazaran 2 kata kadar daha yüksek aviditeye sahip olduğu ELİSA sonuçları ile gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: antikor üretimi, kanser antijeni üretimi, polioksidonyum, komple freund adjuvanı, elisa, antikanser antikor eliza'sı, poliklonal sera geliştirilmesi, kanser immünizasyonu.

Production Of Polyclonal Antibodies Against Breast Cancer Based On Hybridoma Technology

Atıfcan DEMİRCİOĞLU

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Melahat BAĞIROVA

Cancer second important disease after cardiovascular diseases in the world. According to the data published by the World Health Organization, cancer was detected in 18 million people in 2018 alone. Approximately 2 million of these cases was breast cancer cases. Monoclonal antibodies have high specificity in diagnosis and treatment, low avidity results are encountered when compared with polyclonal antibodies, since they can bind to a single epitope region to compared multiple epitope.

Although there are studies in the literature on the preparation of antigens from breast cancer cells by different methods (sonication, freezing-thawing, autoclaving) in studies based on hybridoma technology, we did not find any study to compare the immune response of their formulations with different adjuvants. The aim of this thesis is to prepare the antigen from human breast cancer cells with different methods and to use their combinations with different adjuvants to produce polyclonal antibodies based on hybridoma technology for use in diagnosis and treatment.

In order to produce polyclonal antibodies, MCF-7 cells cultured and lysates were prepared from these cells by sonication, freezing-thawing, autoclaving methods. Balb / C type mice were immunized by mixing the antigens contained in these lysates with Polyoxidonium and Freund's complete adjuvant. Antibody titers were determined by ELISA from the sera obtained from Balb/c mice after the immunizations. After the determination of anti-MCF-7 sera antibodies, hybridomas were obtained by fusing AG-8 cells and B cells isolated from the spleens of Balb/c mice, and these hybridomas (antiMCF-7 polyclonal antibody producing hibridomas) were controlled by ELISA tests that produced antibodies and compared with Herceptin.

As result the amount of antigen obtained by sonication provides 50% more antigen than the amount of antigen obtained by freezing and thawing and 8 times more than the amount obtained by autoclaving, At the Macrophage Nitric Oxide Culture System test shown, the use of antigen alone is ineffective, Freund's complete adjuvant or Polyoxidonium adjuvant should be used in formulations. During the immunization of the formulations, it was determined that the antigens prepared by sonication method until the 6th immunization gave results 1.5 times faster than the antigens prepared by freezing and thawing method, and up to 2 times faster than the antigens prepared by autoclave. It was observed with ELISA results that polyclonal antibodies obtained from the produced hybridomas have up to 2 times higher avidity compared to monoclonal antibodies as expected.

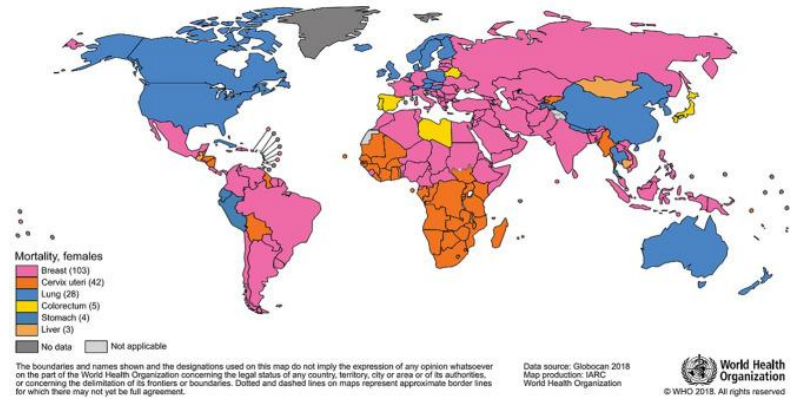
Keywords: Antibody production, cancer antigen production, polyoxidonium, complete freund adjuvant, elisa, anticancer antibody elisa, development of polyclonal anti-sera, cancer immunization.

1.1 Literatür Özeti

Meme kanseri kadınlar arasında en yaygın olan kanser tipidir. Bu patalojinin erken tespiti edilmesi hayatta kalma olasılığını yükseltir. Patolojinin erken tespiti ile birlikte ayrıca bu patoloji için gerekli tedavi yöntemlerinin daha ulaşılabilir hale getirilmesi ve ücretlerinin idame ettirilebilir değerlere düşürülmesi de hayatta kalma olasılığını yükseltir.

Yirmi birinci yüzyılda kanserin batı ülkelerinde en sık ölüm nedeni olacağı tahmin edilmektedir: 2015 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) açıklamasına göre, ülkelerin büyük kısmında 70 yaş altı ölüm vakalarının önemli bir kısmı teşkil edeceği açıklanmıştır[1]. Kanser ile gerçekleşen ölümlerin % 18'ini temsil etmektedir. Kadınlarda ise ölüm nedenlerinden en sık tespit edilendir. 2018 de 2 milyon meme kanseri vakasına tanı koyulmuş ve bu kanser vakalarının yaklaşık % 25'ini temsil etmektedir[2].

Türkiye'de 2017 yılında ölüm oranlarının %19,56 sı Neoplazmalar sonucu gerçekleşmiş ve erkeklerde ölümlerin 23,28 i kanserden kadınlarda ölümlerin % 15.14 ü neoplazmalardan gerçekleşmiştir[3]. Erkeklerde kanser tipleri içerisinde en sık görülen kanser tipi % 21 ile trakea,bronş,akciğer iken kadınlarda ise kanserler içerisinde %24,7 si meme kanseridir[4].



Şekil 1.1 2018 yılı kadınlar arasındaki kanser sonucu ölümlerin ülkelere göre gösterimi[5]

Halihazırda mamografi meme kanseri teşhisinde en önemli tanı yöntemidir. Bununla beraber bazı kadınlarda meme dokusunun dansitesinin (yoğunluğundan) yükselmiş olması, meme kanserini tespit etmeyi zorlaştırmaktadır. Sonuçta dolaşımdaki tümör biomarkerları kanserin erken fazda tespit edilmesi veya tanımlanması tedavi edilmesi ve metastazın engellenmesi için büyük ilgi çekmektedirler.

Bu amaçla meme kanserinde HER2(insan epidermal büyüme faktörü) ve CA15-3 (Cancer antigen) gibi birçok biomarker kullanılmaktadır. Reel olarak HER2 nin aşırı ekspresyonu meme kanserlerinde % 20-25 arasındaki olmakla birlikte , gen amplifikasyonu yüzde 30 oranında metastatik meme kanserinde tespit edilmiş olup zayıf prognozla ve kemoteropatik ajanlara karşı dirençle ilişkilendirilmiştir.

Kanserin tanı ve tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen poliklonal ve monoklonal antikorlar tanısız, teropatik ve analitik değere sahip yapılardır. Yirminci yüzyılın sonlarına doğru in vitro koşullar altında kültürde koşullarında antikor üreten hücrelerin yaşam sürelerini uzatmak için birçok araştırma grubu çeşitli yöntemler geliştirmek için çalışmışlardır. Kohler ve Milstein 1975 yılında canlılığını sürdürebilen melez hücre hatları için antikor üretme yeteneği gösteren (B-lenfositleri) lenfositlerle sürekli bölünme özelliği bulunan kemik iliği kanser hücrelerini (myeloma) sendai virüsü ile füzyona uğratmışlardır. Bu sayede in vitro şartlarda antikor üreten ve sürekli çoğalan hibrit hücre hattını elde ettiler. [6], [7], [8]. Affiniteleri ve özgüllükleri ile önemli antikorları üretme yeteneğine sahip bu

hibrit hücrelerin üretilmelerini sağlayan hibridoma teknolojisi kanser tanı ve tedavisinde büyük öneme sahiptir [9].

Antikor teknolojilerine ve dolayısıyla hibridoma teknolojisine dayalı olarak geliştirilen tanı kitlerinin ve terapotik ajanların en büyük avantajı doğal süreçler içerisinde klonal seçilim ile seçilen hücrelerden köken alan başarılı antikorların diğer moleküler yöntemlerle elde edilenlere nazaran özgüllüğünün ve uyumlarının köken aldığı biyolojik sistemle uyum içerisinde çalışmasıdır.

Hibridoma teknolojisi için gerekli olan immünizatların üretilmesi sırasında moleküllerin immünojenitesinin artırılması amacıyla çeşitli moleküller kullanılmakta ve bu moleküllere adjuvanlar denmektedir. Adjuvan kullanımı zayıf immünojen moleküllerin, immünojenitelerini yükselterek doğal immünojen moleküllerden bile daha immünojenik hale gelmesine neden olmaktadır. Kanser çalışmalarında kanserin moleküllerini immünojen hale getirmek için çeşitli adjuvanlar kullanılmaktadır. Bununla Freund's adjuvanı karşılaştırma yapabilmek için neredeyse standart adjuvan haline gelmiş ve birçok çalışmada kullanılmaktadır. Freund's adjuvanının diğer adjuvanlardan daha toksik olduğu bilinmektedir. Bundan dolayı , hibridoma teknolojisine çalışmalarında FDA(Food and Drug Administration, USA) onaylı ve etkin bir adjuvanın seçilmesi yüksek öneme sahiptir. Laboratuvarımızda tamamlanan yüksek lisans ve doktora tez çalışmalarında ilk kez olarak PO'nun , dondurulmuş-çözülmüş ve otoklavlanmış antijenler ile etkili kombinasyonlarının yüksek immünojen etki gösterdiği saptanmıştır [10],[11],[12],[13]. Ancak laboratuvarımızdaki çalışmalar haricinde literatürde hibridoma teknolojisinde PO'nun kullanımına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Hibridoma teknolojisinde toksik olmayan adjuvanların kullanımı büyük öneme sahiptir.

Kanser antikoru üretilmesi, immünizatlarının ve aşılarının geliştirilmesi ile ilgili literatürde yapılan çalışmalar yoğun şekilde olarak bulunmasına rağmen bu çalışmalara konu olan teknolojinin alt yapısıyla ilgili çalışmalar 80'li yıllara aittir. Bununla beraber antikor üretilmesi için gerekli olan antijenlerin lizasyon metotlarına göre değerlendirildiği ve etkinliklerinin ortaya konduğu çalışmalar birbirleriyle çoğunlukla çelişmektedir. Gelişen teknoloji eğitimi uzun zaman alan

teknolojilerin hızlıca gelişmesini sağlasa da teknik alt yapı çalışmaları hala bazı alanlarda yeterli düzeyde değildir. Hibridoma teknolojisi ile ilgili çalışmalar uygulanması zor, zaman alan, uğraştırıcı bir çalışma olmasına rağmen uygun alt yapı ve bilginin elde edilmesi gerekli deneyimin kazanılmasında sonra oldukça hızlı ilerlemektedir.

Ülkemizde 2012 yılına ait laboratuvarımızda tamamlanan yüksek lisans tez çalışması kapsamında visseral leishmaniasis etmeni *L.infantum*'a karşı monoklonal antikor üretilmiştir [10]. 2015 yılında leishmania tropica parazitlerinden elde edilen immünojen moleküllere karşı tanıda kullanılmak üzere hibridoma teknolojisine dayalı antikor üretilmesi gerçekleştirilmiştir[13]. Bununla beraber MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine karşı poliklonal antikor üretilmesine literatürde rastlamadık.

1.2 Tezin Amacı

Çeşitli yöntemlerle (Sonikasyon, Dordurma-çözme, Otoklavlama) insan meme kanser hücrelerinden(MCF-7) elde edilen lizatın farklı adjuvanlarla formülasyonlarının (CFU-Comple Freund's Adjuvant, POX-polioksidonyum) geliştirilmesiyle hibridoma teknolojisine dayalı poliklonal antikorların üretilmesi ve ilk kez olarak daha uygun ve etkin formülasyonun tespit edilmesidir.

Amaca ulaşmak için aşağıdaki işlemlerin uygulandı:

- MCF-7'nin kültürünün yapılması,
- Kültürü yapılan MCF-7 hücrelerinin lizatlarının çeşitli yöntemlerle (sonikasyon, dondurma-çözdürme, otoklavlama) elde edilmesi,
- Her iki hücre hattından elde edilen lizatlar ve adjuvanlar (Freund adjuvan, polioksidonyum) ile immünizat oluşturulması ve oluşturulan immünizatlarla Balb/c tipi deney farelerine immünizasyon işleminin gerçekleştirilmesi
- İmmünizasyonların ardından farelerin mandibular veninden alınan kan serumları kullanılarak yapılan ELISA tesleri ile antikor titresinin belirlenmesi ve füzyon için gerekli antikor miktarı tespit edilene kadar immünizasyonun devam ettirilmesi,

-ELISA testlerine dayandırılarak, füzyon için gerekli yüksek antikor yanıtı gösteren Balb/c tipi deney farelerinin sakrafikasyonun gerçekleştirilmesi, dalaklarının izole edilip, dalaktan yüksek miktarda B lenfosit içeren splenosit hücre karışımının elde edilmesi,

-İkincil sentez yolağı baskılanmış ve sınırsız bölünme özelliğine sahip Balb/c tipi fare kanser hücre hattı olan Ag/8 myeloma hücrelerinin kültür ortamında üretilmesi,

-İmmünizata karşı poliklonal antikor üreten B lenfosit hücreleri ile sınırsız bölünme yeteneğine sahip myeloma hücrelerinin PEG ile füzyonunun gerçekleştirilmesi,

-Füzyon sonrası hücrelerin HAT ve HT seçici besiyeri içeren ortamda kültürünün gerçekleştirilmesi,

-Füzyon ile oluşturulan hibridomalardan poliklonal antikorların eldesi ve meme kanseri antijenleriyle ELISA yöntemiyle immünoreaktivitesinin ölçülmesi

1.3 Hipotez

Poliklonal antikor teknolojisi yeni bir teknoloji olmamakla birlikte kanser lizatları ile poliklonal antikor elde etme amaçlı çalışmalar oldukça ihmal edilmiştir. Bu ihmalin temel sebebi monoklonal antikor teknolojisine duyulan ihtiyaçtan kaynaklanmaktadır. Bununla beraber ilerleyen kişiselleştirilmiş immünoterapiler, antikor terapileri gibi kanser tedavi metotları için kanser poliklonal hibridomalarının üretilmesi ve incelenmesi gerekmektedir. Bu amaçla MCF-7 meme kanser hücre hattından poliklonal antikorların üretimi gerçekleştirilmelidir. Bu amaçla laboratuvarımızda geçmişte gerçekleştirilmiş çalışmalardan ilham alınarak gelecekte ihtiyaç duyulacak kanser poliklonal antikorlarının üretim metodunun belirlenmesi bu tezin ana hipotezini oluşturmaktadır. Bununla birlikte ana hipotezden ayrıca hibridoma teknolojisine uygun olarak yan hipotezler de kurulmuş ve tezin ana hipotezi bunlarla desteklenmiştir. Yan hipotezler aşağıdaki özetlenmiştir.

Balb/c tipi deney farelerin meme kanseri hattı mcf-7 hücrelerinin lizatlarına karşı immün yanıt oluşturulabilirliği, kanser hücrelerinden antijen üretimi amaçlı

lizasyon işlemleri için etkili lizat hazırlama metodun belirlenmebilirliği, lizat immünizasyonunda etkin konstrasyonun belirlenebilirliği, kanser lizatlari için makrofaj kültür sisteminde nitrik oksit testlerinin yapılabilirliği ve immünizasyon sonucuna yol göstericiliği, kanser lizatları için makrofaj kültür sisteminde etkin immünizat antijen konsantrasyonlarının tespit edilebilirliği, insan meme kanserine karşı hibridoma üretilebilirliğinin incelenmesidir.



2.1 MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattının, Hücre Yüzey

Molekülleri

MCF-7 hücre hattının yüzey proteinleri LC-MS (liquid chromatography mass spectrometry) analizi ile 313 adet tespit edilmiştir[14]. Bu sayı çeşitli nedenlerle farklılık gösterebilir ki bunlardan en önemlisi pasajlanma sayısıdır[15]. Çeşitli hücre lizasyon işlemleri proteinlerin yapılarında deformasyona yada kırılmaya neden olabildiği için elde edilecek protein çeşitlerinin identifikasyonu paralel çalışmalar yürüten çalışmacılarla yapılmak zorundadır. Ayrıca MCF-7 hücre hattı özellikle yüksek oranda tirozin kinaz bağlı reseptör(Her2) proteini ve östrojen reseptörü içermesinden dolayı da önemlidir[14]. Bununla beraber BRCA-1 (Breast cancer type 1 susceptibility protein) ve BRCA-2 (Breast cancer type 2 susceptibility protein) proteinlerinin de MCF-7 hücre hattında tespit edilmiştir[16].

Bununla beraber CK19(Keratin, type I cytoskeletal 19), GATA3(Trans-acting T-cell-specific transcription factor), MET(Hepatocyte growth factor receptor), CAV1(Caveolin-1), MOESIN, CD44, ETS1(Protein C-ets-1), EGFR(Epidermal growth factor receptor), CK5/6 proteinlerini de üretmektedir[14]. Buna göre de tanıda daha etkin multiklonal moleküllerin araştırılması ve antijenlerinin tanımlanarak kullanılması daha uygun olabilir. Bu açıdan literatürde çeşitli enfeksiyonların tanısında ve tedavisinde çeşitli yöntemlerle elde edilmiş poliklonal karışım antijenlerin kullanılmasına yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Ayrıca meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücresinin lizatları ticari olarak da bulunmaktadır. Ancak bu lizatların immünopresipitasyon metotlarında Her2 molekülünü yüksek miktarda içermesinden dolayı kullanılmasına rağmen hali hazırda bu lizatların hibridoma teknolojisine dayalı antikor üretiminde kullanılmasına yönelik literatürde herhangi bir yayına rastlamadık. Bu yöntemin dezavantajı bazı meme kanseri hastalarında oluşan antikorum miktarının az olmasından dolayı mevcut lizatların her zaman yalancı pozitif sonuç vermesidir. Hastalardaki oto-antijen düzeyi çok düşük olduğundan geleneksel ELİSA testleriyle ölçülebilmesi zor

olmaktadır. Buna göre de oto-antikorlar üzerinden direk tanı konması tam desteklenmemektedir.

2.2 Bağışıklık (İmmün) Sistemi

İmmün sistem, vücudun doku, organ ve sistemleri ile bir bütün halinde çalışarak patojen mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyon hastalıklarına ve bunların enfeksiyöz ajanlarına karşı canlıyı korur. İmmün sistemin temel yapıtaşı olan lenfositler hemotopoetik hücrelerden köken alarak çeşitli dokuların birbiri ile etkileşimi ile gelişirler. Kan dolaşımında, lenf sisteminde ve lenfoid dokularda bulunan lenfositler patojenik özellik gösteren hücrelerle, virüslerle veya bunların parça ya da ürünleri ile karşılaşır ve aktifleşirler. Çeşitli patojenlere karşı canlı sistemini biyolojik işgale karşı savunan İmmün sistemin 2 temel mekanizması vardır. Bu mekanizmalar Doğal İmmünite ve Adaptif İmmünite olarak adlandırılır [17][18].

2.2.1 Doğal İmmünite

İlk savunma mevzisini temsil eder ve spesifik olmayan yanıtlar oluşturur. Akut faz proteinleri, sitokinler, kompleman sistemi, dokularda ve kanda bulunan fagositik ve sitotoksik hücreler (Makrofajlar, Nötrofiller, Doğal öldürücü hücreler(Natural Killer NK hücreler), Eozinofiller), Deri ve Müköz membranların fiziksel bariyerleri bu savunma mevzisinin temel elemanlarıdır.

Enfeksiyonlarla mücadelede doğal bağışıklığın yanıtları derinlemesine savunma sağlarken, adaptif immün yanıtların oluşmasında da görev alarak patojenler için spesifik ve çeşitli açılardan daha etkili karşı savunma tedbirlerinin devreye sokulmasını sağlar. [19].

2.2.2 Adaptif İmmünite

Karşılaşılan enfeksiyon ajanlarının antijenlerine karşı spesifik oluşu ve hafıza oluşturarak bu antijen komponentler ile tekrar karşılaşılması durumunda daha etkili, daha hızlı yanıt oluşturulması bakımından karakteristik iki belirgin özelliğe sahiptir.

Adaptif İmmün sistem değişik tipteki işgalciler ile muharebe etmek için farklı mekanizmalarını devreye sokar. Adaptif immün yanıt; ateş hattı savunması için B ve T lenfositlerini, ateş gücünün etkili yönlendirilebilmesi için gerekli olan seçici ve özgül yanıtların başlatılıp sürdürülmesini sağlayacak antijen sunucu hücreleri (makrofajlar,B hücreleri,Dendritik hücreler) ,aynı türdeki yeni işgal girişimlerine hızlı cevap vermek amacıyla Plazma Hücrelerini (farklılaşmış B lenfositleri) içerir.

Adaptif immün yanıtın değişik tiplerdeki mikroorganizmalarla savaşmak üzere özel mekanizmaları mevcuttur. Adaptif immüitenin bileşenleri lenfositler (B ve T hücreleri), antijen sunan hücreler (makrofajlar, B hücreleri, dendritik hücreler) ve plazma hücreleri (farklılaşmış B hücreleri) gibi hücrelerdir [19].

İmmün sistemin yabancı bir antijen ile karşılaşması ile uyarılıp spesifik yanıt vererek, aynı ajanla tekrar karşılaşılması durumunda moleküler hafızası olduğundan dolayı bu yapıları tanıyıp daha kuvvetli yanıt veren bir sistemdir. Adaptif immün cevapta iki ana alt gruba ayrılır. Bu iki alt grup adaptif immün cevapta iki ana hücre grubu tarafından yönlendirilir. Antikora bağımlı hümmoral yanıt B hücrelerinden üretilen antikorlar yoluyla hücre dışı (sıvı yapıda hümmoral vb.) patojenlerle, hücre bağımlı immün yanıt ise T lenfositleri yoluyla hücre içinde yaşayan patojenleri hedef alır. Hümmoral yanıt aşamasında Adaptif immünite dolaşıma ve diğer vücut sıvılarına antikorlar salgılar. Vücut sıvılarında bulunan antikorlar spesifik olarak üretildikleri patojen, virüs, mikroorganizma komponenti toksin gibi yapılara bağlanıp bu patojenlerin işlevsiz hale getirilmesini veya diğer immün sistem hücreleri tarafından fagosite edilerek ortamdan uzaklaştırılmasını sağlarlar[20].

B Hücrelerinin aktivasyonu ile antijne özgül hücrelerin çoğalması ve bu antijen özgül hücrelerin antikor üreten efektör hücrelere dönüşmesi ile antikorlar üretilirler. Birincil cevapta periferdeki lenfoid organlarda bulunan naif B hücreleri, antikor salgılayan hücrelere dönüşür, ardından ise bu hücreler bellek hücrelerine farklılaşarak çoğalırlar. İkincil cevapta ise, geçmişte oluşan bellek hücreleri hızlı aktifleşir ve antikor salgırlar. Kemik iliğine göç eden bazı antikor üreten B hücreleri kemik iliğinde uzun süre yaşayabilirler. Daha sonra ise protein

yapısındaki antijenlerle tekrarlayan etkileşimler oluşur ise antijene afiniteliteli antikorları üretmeye gelişirler.[21]

2.2.2.1 Antikorlar (İmmünoglobulinler)

Serumda ve plazmada bulunan, globular protein grupları immünoglobulinler olarak adlandırılır. Literatürde antikor ile immünoglobulin aynı yapıyı ifade etmektedir. Fakat bazı durumlarda immünoglobulin kelimesi yapının antikor olup olmadığına bakılmadan antijen bağlama özgülüğü olan yapılar için de kullanılabilir. Antikorlar Y şekilli B lenfositleri yada B hücreleri olarak adlandırılan kan hücreleri tarafından üretilen moleküllerdir. İmmünoglobülinlerin protein bölgeleri %90-95'i benzerlik göstermekte iken; farklılık gösteren kısım aminoasit uç bölgelerinin olduğu %5-10'luk kısmıdır. [22]

2.2.2.2 Antikorların Yapısı

İmmunoglobulinler benzer yapılı olmalarına rağmen tiplerine göre farklı spesivitede yapılardır. Oligosakkarit gruplardaki kovalent bağ ile bağlanmış, ikisi özdeş yapıdaki ağır zincir (H) ve iki özdeş olup glikozitlenmiş (L) hafif zincirden oluşur. Disülfid bağı ağır zincir ve hafif zinciri bir arada tutan yapıdır. Disülfid bağlarının konumlandığı bölgeye hinge bölgesi adı verilir. Küre yapısındaki bölge polipeptidlerin katlanmasıyla oluşur. Dört polipeptid zinciri sabit "C" ve değişken "V" aminoasit bölümleri içerir. Ağır ve hafif zincirler bir adet değişken "V" bölge içerirler. Hafif zincirde bir C bölümü olmasına rağmen. ağır zincir ise üç C bölgesi bulunur. Ağır ve hafif zincirlerdeki değişken bölüm özdeş antijen bağlama bölgesi bulundurur. Antijen bağlanma bölgeleri antijenleri tanıyarak onları antikorum bu bölgelerinden bağlar. Antikorum plasenta üzerinden embriyoya geçtikleri ve antijene bağlandıktan sonra diğer immün sistem yapılarıyla etkileştikleri bölgeye Fc bölgesi yada kuyruk bölgesi adı verilir[21].

2.2.2.3 Antikor İzotipleri Ve Fonksiyonlar

IgD, IgG, IgE, IgM, ve IgA olmak üzere memelilerde antikor sınıfları 5 bölüme ayrılır.[23] Antikordaki ağır (H) zincirlerler o immünoglobülinin tipini belirlemektedir.

IgG: İkincil bağışıklık immün yanıtında en baskın olarak görülen, plasenta üzerinden fetusa geçerek fetusun da pasif olarak bağışıklanmasını sağlayan tek immünoglobülin tipidir. Serumdaki antikor fraksiyonunun yaklaşık %75'ini teşkil ederler. Gama sabit zincirinin izotiplerine göre; IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 olmak üzere 4 alt gruba ayrılır. Lökositlerde bulunan Fc reseptörlerine bağlanarak opsonizasyon, kompleman bağlanma ve fagosit hücrelerin aktive edilmesi gibi işlerde görev yapar. [23], [24], [25]

IgA: Mukozadaki immün sistem antikor tipleri olarak karşımıza çıkar. Genellikle virüslerin sisteme karışmadan nötralizasyonunda görev alır. Dimer yapılarından dolayı çok sayıda H ve L zinciri barındırır.

IgM: Erken immün yanıt oluşmasında görevlidir. Beşgenimsi yapısıyla B lenfositlerinin yüzeyinde reseptör molekülü olarak bulunur. Aktifleşmiş B hücrelerinde erken dönem bağışıklık yanıtında salgılanan ilk antikordur.

IgE: Alerjilerden sorumlu antikor tipi olarak genellikle sınıflandırılır. IgE mast hücrelerindeki kendine özgül reseptörlere bağlanıp antijen ile bağlantı kurduğu mast hücresinin degranülasyon yapmasını sağlar. Genelde hücre dışı paraziter enfeksiyonlarda etkilidir. IgE'nin Fc kuyruğu çeşitli dokularda bulunan mast hücrelerinin ve dolaşımdaki bazofil hücrelerinin Fc reseptörüne yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Antijen bağlanan bu hücreler çok çeşitli sitokinler salgılamayarak aktive olmayı sağlar. [26] [27].

IgD: Monomer yapıda olup serumda düşük konsantrasyonda bulunan bir antikordur.

IgM ile birlikte B lenfositlerinin yüzeyini işgal etmektedir. IgD nin fonksiyonu tam anlaşılamamakla beraber B lenfositlerinin gelişmesi ve farklılaşmasında görev aldığı düşünülmektedir.

2.3 Poliklonal Antikor Teknolojisi

Poliklonal antikorlar terapötik(tedavisel), diagnostik(tanısal) ve analitik(ölçümsel) uygulamalar için kullanılmaktadırlar. Yüksek affiniteleri ve çok sayıda bölgeyi bağlayabilme özellikleri nedeniyle oldukça değerlidirler. Poliklonal antikor üretiminin en önemli dezavantajı hayvana ihtiyaç duyulmasıdır. Büyük miktarda antiserum için çok sayıda hayvan kullanmak gerektirmektedir. En yaygın

kullanılan denek canlılar tavuklar, fareler, sıçanlar, atlar, keçiler ve tavşanlardır. Kullanım kolaylığı bakımından sıçan ve fare tercih edilmesine rağmen bu canlılarda sürekli olarak antijenik uyarana ihtiyaç duymaktadır. Gelişen tekniklerle beraber adjuvanlarında bağışıklamada kullanılması bu sorunu bir nebze olsun azaltmıştır. Adjuvanlar ve nanoteknolojik yapılar antijenlerin uzun zamanda ve kontrollü salımını sağlayarak bu sürekli uyaran ihtiyacını karşılayabilmektedirler.

Poliklonal antikorların özellikleri:

- 1)Antiserum olarak bilinmektedirler.
- 2)B-lenfosit ürünleridir.
- 3)Hayvan kaynaklı olup sadece in vivo üretilirler.
- 4)Doğaldır ancak; başka antijenlere karşı çapraz reaksiyon gösterebilirler.
- 5)Üretimi güçlendirici tekrarlanan enjeksiyon gerektirirler.
- 6)Poliklonal antikor teknolojisi in vivo da güçlü bir teknoloji olarak kabul gördüğünden sınırlı insan gücü gerektirir ve sofistike aletler olmaksızında üretilir.
- 7)Homojenizasyon açısından karışık olduklarından karakterizasyon işlemleri uzun süreçler gerektirebilir.
- 8)Polimorfizm ve glikozilasyon gibi epitop değişikliklerinden etkilenebilir.
- 9)Bozunmuş ya da denatüre antijenlerin tespitinde kullanılabilir.
- 10)Çeşitli hastalıklara özgü immünolojik testlerde hassasiyeti açısından iyi bir seçimdir.
- 11)Pasif bağışıklığı sağlamak için kullanılabilir [28]

2.4 Poliklonal Antikorların Monoklonal Antikorlar İle Kıyaslanması

Canlı hayvanda poliklonal antikor toplanmadan önce hayvanlara her seferinde indükleyiciler vermek gerekebilmektedir. Bununla beraber Kohler ve Milstein tarafından bulunan monoklonal antikorlar, antikorların daimi kaynakları olmakla birlikte; tutarlılık, özgüllük ve afinite özellikleri sergilerler.

Monoklonal antikorların keşfi sadece bağışıklık aracılı tanı için değil sağlık bilimleri açısından da bir devrime neden olmuştur. Fakat monoklonal antikorlar epitop etkileşimine sahip olmadıkları için moleküler şeklin değişmesi durumunda bu önemli yeteneklerini kaybetmektedirler . Bununla Beraber poliklonal antikorlar hedeflenen molekülün yada yapının birçok bölgesine aynı anda etkileştikleri için küçük değişimlerden monoklonal antikorlar gibi aşırı oranda etkilenmemektedirler.[28]

2.5 Hibridoma Teknolojisi

Yüzyılın son çeyreğinde in vitro antikor üreten hücrelerin kültür ömürlerini uzatabilmek için çeşitli araştırma grupları oldukça değişik yöntemler üzerine çalışmışlardır. Kohler ve Milstein (1975), başarılı bir hibrit(melez) hücre hattı oluşturabilmek için antikor üretme yeteneği gösteren B-lenfositleri ile sürekli bölünme isteğindeki ilik kanseri hücreleri olan myeloma hücrelerini sendai virüsü ile hücresel füzyona uğratmış sonuç olarak in vitro koşullarda sürekli üreyen ve antikor üreten hibrit hücre hattı elde etmişlerdir. [6], [7], [8].

2.6 İmmünizasyon İçin Seçilen Denek Hayvanlarının Özellikleri

Doğumundan 6-8 hafta geçmiş Balb/c farelerin antijenlerle karşılaştıkları zaman gösterdikleri verimli etkileşimden dolayı tercih edilmişlerdir. Literatür ve deneyim üzere bilindiği gibi 5-10 seferlik immünizasyon yeterli gelmektedir. Cinsiyet bakımından daha kolay alışmaları ve erkeklere nazaran daha pasif yapılarından dolayı dişi cinsiyetteki fareler seçilmiştir.

2.7 Füzyon Çalışmalarında Kullanılacak Hücrelerin Özellikleri

Hibridomalar türler arası olarak farklı türdelerden elde edilmiş hücreler ile oluşturulabilmesine rağmen verimli ve uzun süre canlılığını koruyan hibridomaların elde edilmesi adına tür içi hücrelerin (aynı türün veya mümkünse aynı bireyin) füzyonu antikor üretiminde başarılı sonuçlar sağlamaktadır. Bundan dolayı yaygın olarak kullanılan Balb/C türü farelerden elde edilen myelomalar ile aynı türün bireylerine uygulanan immünizasyon sonucu izole edilen dalaklardan izole edilen B-lenfositleri ile füzyon gerçekleştirilir.

Myeloma hücreleri ile B-lenfositleri füzyonu sırasında elektrofüzyon, kimyasal füzyon ve virüs füzyonu teknikleri kullanılabilir iken kimyasal füsojenlerden polietilen glikol (Peg) ile çalışmak maliyet ve pratiklik açısından daha kolaydır. Bununla beraber elektrofüzyon tekniği daha hızlı füzyon sağlamasına rağmen çoklu hücre füzyonuna neden olarak 2 den fazla hücrenin füzyonu ile çok çekirdekli yapı oluşturmamasından dolayı sıkıntı çıkarabilmektedir. PEG'in ilk kez Pontecorvo tarafından 1975 yılında kullanılmıştır. PEG bu iki hücre hattının plazma membranlarını birleşmesini sağlayarak iki ya da daha fazla çekirdek ile tek bir hücre oluşumunu sağlamaktadır. Mitoza kadar bu çekirdek yapısı korunur. Mitoz sırasında kromozomlar arasında seçim gerçekleşir, eğer antikoru sentezleyen kromozom bölünen hücrelerden kaybedilirse veya oluşan hücrelerden birine geçmez ise antikör üretmeyen fakat sürekli bölünme yeteneğini de barındıran hibrit hücreler oluşabilir. Bu durumda antikör üretmeyen hibrit hücrelerin kültürden uzaklaştırılması gerekebilir.

İlk kez 1964 yılında Littlefield tarafından aktarıldığına göre; myeloma hücreleri genel olarak pürin nükleotid biyosentez enziminde mutasyon taşımaktadırlar. Myeloma hücrelerindeki en yaygın mutasyon purin biyosentezinde görev alan hipoksantin fosforiboziltransferaz (HGPRT) mutasyonudur. Hücreler çoğunlukla pürin ve pirimidin sentezi aracılığıyla DNA larını kopyalarak üretirler. Pürin veya pirimidinin birinin olmaması DNA sentezinin bloke olmasına neden olmakta ve hücrenin ölümü gerçekleşmektedir. Aminopterin 28 gibi ilaçlar da novo nükleotid sentez yolunu bloke ederek, hibridoma seçim sürecinin gerçekleştirilmesini sağlarlar. Bu sayede bu sentezi yapamayan myeloma hücreleri kültürden apoptoza uğrayarak kaybolurlar [29].

2.8 Adjuvanlar

Aşılanmanın amacı, aşı etmenlerine karşı güçlü immün yanıt oluşturmaktır. Aşıda kullanılan adjuvanlar, immün yanıtı arttırmaya yardımcı olmaktadır. Adjuvan kavramı ilk kez Ramon tarafından 1926 yılında, abse alanına inoküle edilen adjuvanın yüksek antikör oluşturma yoluyla oluşturulmuştur. [30].

Doğal formunda bulunan antijenin bağışıklık yanıtını arttırabilmektedirler. Koruyucu bağışıklama için, çok sayıda immünizasyon uygulamasını azaltır.

Özellikle tek aşılama ile immünizasyonu oluşması ve yolla immünizasyon maliyetlerini düşürmek için kullanılabilirler.

İmmün cevabı baskılanmış yaşlı yetişkinlerin veya çocukların bağışıklığını güçlendirmek, ortaya çıkarmak ve geliştirmek amacıyla kullanılmaktadırlar. [31]

Tez çalışmasında mikoplazma hücre lizatının parafin yağında 1mg/ml konstrasyonda bulunduğu Freund's Complete Adjuvant(Komple Freund Adjuvanı) ile polimer yapıdaki halihazırda Rusya ve BDT(Bağımsız Devletler Topluluğu) üye ülkelerinde eczanelerde satılan immünostimulan "Polioksidoniy"(Polioksidonyum) kullanılmıştır.



3.1 Materyal

3.1.1 Ekipmanlar, Cihazlar Ve Kimyasallar

- Laminar hava akımlı steril kabinler (Laminar flow -Thermo Scientific Hera safe, Faster BH-EN 2006)
- Otoklav(Hirayama hve-50)
- Vortex
- İnvert Mikroskop (Olympus CKX41)
- 0,22 µm ve 0,45 µm'lik şırınga filtreleri (MILLIPORE, TPP, Sartorius)
- Su banyoları (GFL (gesellschaft für labortechnik) mbH)
- Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF)
- pH metre (HANNA instruments)
- ELISA yıkama cihazı (Thermo) Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
- Karbondioksitli inkübatör (New Brunswick scientific CO-150 37°C, FrioCell 111 25)
- Işık mikroskobu (Olympus)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR3000)
- Buz makinesi (Scotsman AF100)
- Vortex (LMS(laboratory medical supplies) VTX-3000L)
- Su banyoları (GFL (gesellschaft für labortechnik) mbH, Kerman)
- Isıtıcı karıştırıcı (Heidolph instruments)
- ELISA çoklu plak yıkama cihazı (Thermo)
- SDS-PAGE jel elektroforez sistemi (Hoefer)
- Güç kaynağı (Hoefer)
- Dondurucular (Beko(+4,-20°C), Arçelik(+4,-20°C), GFL(-40°C))
- -195°C azot tankı ve azot taşıma tankları (DMC air liquid systems)
- UV-spektrofotometre (Jasco V-530)
- Saf su ve ultra saf su sistemleri (GFL2104)

- 10, 50, 100, 1000 µl'lik mikropipetler (Thermo, Pippetman)
- 100,300 µl 'lik çok kanallı pipetler (Thermo)
- ELISA 96 kuyulu plakları (TPP)
- Hücre kültürü 96 kuyulu plaklar (TPP)
- Hücre kültür flaskları -25 cm², 75 cm² (TPP, Corning)
- Serolojik pipet tabancası (Thermo)
- Serolojik pipetler -1,5,10 ml (Blau Brand Germany)
- Kriyotüpler (TPP)
- Makas, diseksiyon seti (Müller - Germany)
- Süzgeç (BD Falcon)
- 50-1000ml'lik otoklavlanabilir cam şişeler (ISOLAB, SCHOTT)
- Hücre sayımı için thoma lamı (Menzel superior)
- 0,22 µm ve 0, 45 µm'lik şırınga filtreleri (MILLIPORE, TPP, Sartorius)
- Keçiden üretilmiş anti-fare IgG-AP konjugatı (Millipore)
- Freund's complete adjuvan (Sigma)
- Polioksidonium
- Hidroklorik asit, HCl (Riedel-de Haën)
- Yağsız süt tozu (AppliChem)
- 8-Azaguanin (Sigma)
- Hipoksantin aminopterin timidin, 50X HAT (PAN)
- Hipoksantin timidin, 100X HT (Gibco)
- Polietilen glikol-1500, PEG-1500 (Roche)
- Amonyum sülfat, (NH₄)₂SO₄ (merck)
- Sodyum klorür, NaCl (Sigma)
- Sodyum bikarbonat, NaHCO₃ (Merck)
- Glisin, (Fluka)
- Magnezyum klorür, MgCl₂ (Fluka)
- Çinko Klorür, ZnCl₂ (Fluka)
- Sodyum azid, NaN₃ (Sigma)
- Potasyum hidroksit, KOH (Merck)
- Dipotasyum fosfat, K₂HPO₄ (Sigma)

- Monopotasyum fosfat, KH_2PO_4 (Sigma)
- Sodyum di hidrojen fosfat mono hidrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Disodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4 (Merck)
- KCl (Sigma)
- EDTA (AppliChem)
- DMSO(Sigma, Hibri-Max)
- Formalin (Sigma)
- Tween-20 (MP Biomedicals LLC)
- Paranitrofenil fosfat (Sigma)
- RPMI-1640 (Fenol redli ve fenol redsiz) besiyerleri (GIBCO Invitrogen)
- HEPES (AppliChem)
- FBS-fetal bovine serum (GIBCO Invitrogen)
- Tris (Sigma)
- DMSO (AppliChem)
- Streptomisin-Penisilin (GIBCO)

3.1.2 Hücre Hatları

3.1.2.1 Myeloma Hücre Hattı

Hibridoma çalışmaları için Balb/c tipi farelerden izole edilen kemik iliği kanser hücresi olup, antikor üretimi olmayıp, TK(Timidin Kinaz) yolu mutasyonuna sahiptir. Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hayvan Hücre Kültürü Laboratuvarı emekli öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. S.İsmet Deliloğlu Gürhan tarafından geçmişte laboratuvarımıza temin edilmiştir. Bu hücre hatının tam kodu P3-X63-Ag8.653 olarak literatürde geçmekte ve ATCC'nin listesinde bulunmaktadır.

3.1.2.2 Mcf-7 İnsan Meme Kanser Hücre Hattı

Temel antijen kaynağı ve hedef hücre tipi olarak kullanıldı. Çalışmanın temel amacı olan insan dişisi meme kanser hücresi hattına karşı poliklonal antikor üretilmesi aşı hammadde üreticisi, ELİSA kaplamasından antijen kaynağı, çok katlı kültür çalışmasında şartlandırılmış besiyeri üreticisi kaynağı olarak kullanıldı.

3.1.2.3 J774 Balb/C Fare Makrofaj Hücre Hattı

Zor olarak kültürü yapılan, nüklear ve dolayısıyla metabolizmal yükleri yüksek olan hücrelerin yaşamlarını desteklemek amacıyla hazırlanan destekleyici şartlandırılmış besiyeri üretiminde metabolit sağlayıcısı olarak kullanıldı.

3.1.3 Üzerinde Çalışmaların Gerçekleştiği Ve B Lenfosit İzole Edilmesi İçin Kullanılan Denek Hayvanı

Balb/c tipi, 4 hafta anne sütü ile beslenerek anneden geç ayrılmış, 6 haftasını doldurup yedinci haftasında olan, albino tipi 20 adet farede immünizasyon(aşıma) gerçekleştirilmiş ve bu canlıların veteriner sedatif tipi bayıltıcılar altında etik kurallara sadık kalınarak hayatlarına son verilip dalakları toplandı. Her immünizasyon işleminden önce mandibular ven tahribatı ile kanları toplanmış, kan serumları alınmış ve soğuk zincir altında hayvan merkezinden laboratuara transfer edilmiştir.

3.1.4 Kültür Besiyerleri

3.1.4.1 DMEM-High Glikoz Besiyeri

Ticari DMEM- high glikoz besiyerinin litresinde 10 ml streptomisin ve penisilin içeren genel kullanım besiyeridir. DH0 kısaltması ile daha kolay diğer besiyerlerinden ayırt edilebilmesi adına tez içerisinde kullanılmıştır.

3.1.4.2 RPMI-1640 Besiyeri

Ticari RPMI-1640 besiyerinin allikotlanarak saklanan litresinde 10 ml streptomisin ve penisilin içeren genel kullanım besiyeridir. RP0 kısaltması ile daha kolay diğer besiyerlerinden ayırt edilebilmesi adına tez içerisinde kullanılmıştır.

3.2 Metot

3.2.1 Özel Kùltür Besiyerlerinin Hazırlanması

3.2.1.1 DH10 Besiyerinin Hazırlanması

DH0 besiyerinden 45 ml alınarak 5 ml FBS eklendi, +4 °C buzdolabında ağzı parafilmlenerek saklandı.

3.2.1.2 DH15 Besiyerinin Hazırlanması

DH0 besiyerinden 42,5 ml alınarak 7,5 ml FBS eklendi, +4 °C buzdolabında ağzı parafilmlenerek saklandı.

3.2.1.3 DH20 Besiyerinin Hazırlanması

DH0 besiyerinden 40 ml alınarak 10 ml FBS eklendi, +4 °C buzdolabında ağzı parafilmlenerek saklandı.

3.2.1.4 RP10 Besiyerinin Hazırlanması

RP0 besiyerinden 45 ml alınarak 5 ml FBS eklendi, +4 °C buzdolabında ağzı parafilmlenerek saklandı.

3.2.1.5 RP20 Besiyerinin Hazırlanması

RP0 besiyerinden 40 ml alınarak 10 ml FBS eklendi, +4 °C buzdolabında ağzı parafilmlenerek saklandı.

3.2.1.6 DH15-MCF20-20 Şartlandırılmış Besiyeri Hazırlanması

DH20 besiyeri ile 24 saat inkube edilmiş MCF-7 hücrelerinin süpernatantları pipetle toplanır. 1000 rpmde 15 dk +4 °C de santrifüj edilir. Santrifüjün ardından süpernatant dikkatlice alınır. 0,20 mikronluk filtreden süzölür. Filtreden geçirilen şartlandırılmış besiyeri %20 oranında DH15 Besiyeri ile karıştırılarak hazırlandı. DH15 terimi %15 FBS bulunan besiyerini, MCF20 terimi MCF-7 hücreleri ile bir gün süre ile şartlandırılmış DH20 besiyerini, en sondaki 20 oranı ise şartlandırılmış besiyerinin tüm besiyerine oranını temsil eder.

3.2.1.7 DH20-MCF20-20 Şartlandırılmış Besiyeri Hazırlanması

DH20 besiyeri ile 24 saat inkube edilmiş MCF-7 hücrelerinin süpernatantları pipetle toplanır. 1000 rpmde 15 dk +4 °C de santrifüj edilir. Santrifüjün ardından süpernatant dikkatlice alınır. 0,20 mikronluk filtreden süzülür. Filtreden geçirilen şartlandırılmış besiyeri %20 oranında DH20 Besiyeri ile karıştırılarak hazırlandı.

3.2.1.8 RP20-J744-20-20 Şartlandırılmış Besiyeri Hazırlanması

RP20 besiyeri ile 24 saat inkube edilmiş J774 hücrelerinin süpernatantları pipetle toplanır. 1000 rpmde 15 dk +4 °C de santrifüj edilir. Santrifüjün ardından süpernatant dikkatlice alınır. 0,20 mikronluk filtreden süzülür. Filtreden geçirilen şartlandırılmış besiyeri %20 oranında RP20 Besiyeri ile karıştırılarak hazırlandı.

3.2.1.9 HAT Besiyerinin Hazırlanması

Hipoksantin aminopterin timidin (50X HAT) kültür süplemanı 50 ml RP20-J774-20-20 şartlandırılmış besiyerine 1 ml eklenerek hazırlandı.

3.2.1.10 HT Besiyerinin Hazırlanması

Hipoksantin timidin (50X HT) kültür süplemanı 50 ml RP20-J774-20-20 şartlandırılmış besiyerine 1 ml eklenerek hazırlandı.

3.2.1.11 Hibridoma Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması

RP20-J774-20-20 şartlandırılmış besiyerinden 1 ml, hibridoma için özel olarak üretilen Sigma HibriMAX ticari DMSO dan 1 ml ve hibridoma kültüründe daha önce test edilerek kontrol edilmiş FBS den 8 ml eklenerek hazırlanır.

3.2.2 Solüsyonların Hazırlanması

3.2.2.1 Hücre Kültürü PBS'i Hazırlanması

8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.44 gr Na₂HPO₄ ile 0.24 gr KH₂PO₄ 1 litrelik cam şişeye alındı. Üzerine 1 litre saf su ile tamamlandı. 121 °C de 20 dakika süreyle otoklavlandı[13].

3.2.2.2 Pasajlama PBS'i Hazırlanması

8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.44 gr Na₂HPO₄ , 0.24 gr KH₂PO₄, 5mg/lt ZnCl₂ ve 8mg MgCl₂ 1 litrelik cam şişeye alındı. Üzerine 1 litre saf su ile tamamlandı. 121 °C de 20 dakika süreyle otoklavlandı.

3.2.2.3 Elisa İçin Pbs Tamponu Hazırlanması

8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 1,8 g Na₂HPO₄.2H₂O ve 2 g KCl tartılıp distile su eklenerek pH'ı 7,4'e ayarlandı, ardından 1 lt'ye tamamlanarak süzüldü ve otoklavlandı. Otoklavlanmadan kullanılsa çapraz reaksiyon verebilir. Kimyasal ve biyolojik olarak kontaminasyondan uzak olarak imal edilmesi önerilir. Şişeleri ayrıldı, sadece elisa PBS için kullanıldı[13].

3.2.2.4 PBST Tamponu Hazırlanması

Hazırlanan ELİSA PBS (tuzlu fosfat tamponuna) tamponuna %0,05 (hacim/hacim) olacak şekilde tween-20 (polisorbat-20) eklendi. 1 lt PBS e 500 µl polisorbat-20 eklenmelidir. Eklendikten sonra şişe çalkalanmamalıdır, köpük yaparak sonucu etkileyebilir[13].

3.2.2.5 Kaplama Tamponu Hazırlanması (pH; 9,6)

1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃ ve 0,2 g NaN₃ tartılarak pH'ı 9,6'ya ayarlanır, ardından distile su ile 1lt'ye tamamlandı. İçerdiği sodyum azidin toksisitesi gereği 10 ml'si insan için ölümcül olabilir. Sodyum azidin şelasyonu bulunmadığı için içeceklerden uzak tutulmalıdır. Sodyum azid ve karbonatlı elisa kaplama solüsyonu olarak literatürde bulunmaktadır[13].

3.2.2.6 Antijen Kaplama Tamponu Hazırlanması

Sodyum azidli karbonat kaplama solüsyonu (coating buffer) 15 ml lik falkon tüplere konulur. İçerisine antijen stoğu eklendi. Antijen stoğunun 1 mg/ml konsantrasyonda ayarlanabilmesi için aşı hazırlama bölümündeki formül kullanılabilir. %1 oranında antijen solüsyonu ile kaplama 1 solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon için 9,9 ml kaplama tamponuna 0,1 ml stok antijen solüsyonu(1mg/ml) eklendi[13].

3.2.2.7 Bloklama Çözeltisi Hazırlanması

100 ml kaplama tamponuna %2 (ağırlık/hacim) olacak şekilde yağsız süt tozu eklendi. Süt tozunda biyolojik kontaminasyon var ise hatalı sonuç vermektedir. Yağsız süt tozunun steril PBS de, ağzı kapalı olarak, oksijensiz ortamda, oda sıcaklığında, mikrobiyal bozunma süresi veya koku oluşumu süresi 4 haftadan kısa sürede ise süt tozu kullanılmamalıdır. Bloklama çözeltisi içerdiği sodyum azid nedeniyle geç bozunur fakat 2 haftadan fazla saklanması önerilmez[13].

3.2.2.8 PBSTM Tamponu Hazırlanması

PBST(tween-20 eklenmiş tuzlu fosfat tamponu) çözeltisine %2 (ağırlık/hacim) olacak şekilde yağsız süt tozu eklenir. 50 miliresine 1 gram süt tozu tartılıp karıştırılır. Alimunyum folyo ile kaplanır. +4 °C de 2 haftadan fazla saklanmamalıdır[13].

3.2.2.9 Substrat Tamponu Hazırlanması (PH:10,4)

0,02 g ZnCl₂, 0,04 g MgCl₂ ve 1,5 g glisin tartılarak distile su ile çözüldü pH; 10,4'e ayarlandı ve 200 ml'ye tamamlandı. Alimunyum folya ile kapatılarak +4 °C de 1 ay kadar saklanabilir. Ticari alkale fosfatazın aktivitesi yüksek pH'larda çalışabilecek şekildedir[13] .

3.2.2.10 Substrat Çözeltisi Hazırlanması

25 mg paranitrofenil fosfat 25 ml substrat tamponunda (pH:10,4) çözündürüldü. Substratın tartıldığı eppendorf da alimunyum folyo ile kapatılmalıdır. Substratın substrat ekleme süresi gelmeden önce tamponla karıştırılmaması yanlış pozitifleri ve yüksek ölçüm değerlerini engeller. Karıştırılırsa da oda sıcaklığında 2,5 saat içerisinde 450 nm de 0,060-0,075 absorbans artışına neden olur.[13]

3.2.3 Kriyobanktan MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Çıkarılması

Sıvı azot tankında dondurularak saklanan MCF-7 hücreleri içeren kriyotüp kriyobanktan çıkarıldı . Oda sıcaklığındaki su içerisinde çözünene kadar bekletildi. Kriyotüp içerisindeki mediumun erimesi tamamlandıktan sonra 15 ml lik falcon tüpe alındı.2 ml %10 FBS li DMEM-High glikoz besiyeri (DH10) kriyotüpten alınan

besiyerinin içerisine yavaşça(damlatılarak,30 sn) eklendi. Pipetaj ile hücreler süspanse edildi. 5 dk süreyle 1000 rpm de +4 °C soğutmalı santrifüjde santrifüjlendi ve süpernatantı atıldı. DH15 besiyeri eklenerek pipetajlanıp 25 cm² lik flaska ekildi. %5 CO₂ li Karbondioksit 37 °C inkubasyona bırakıldı[10],[11],[12],[13].

3.2.4 MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Üretilmesi

MCF-7 hücrelerinin kriyobanktan çıkarılmasının ardından 24 saat süre ile inkube edildi. Üst sıvı döküldü ve 25 cm² flaks için 5 ml DH15 taze olarak eklendi. 48 saatin sonunda hücreler pasajlandı[10],[11],[12],[13].

3.2.5 MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Biyokütle Üretim Optimizasyonu

5 cm² flakslar için 5-10 ml 75 cm² lik flaks için ise 10-25 ml hacmindeki besiyeri aralıklarında çalışıldı. Kriyobanktan çıkarıldıktan sonra 1 sefer pasaj yapılmış hücreler ile 24 saatlik üretim zamanları arasında ölçümler gerçekleştirilerek ve optimizasyon çalışması yapılmıştır.

3.2.6 MCF-7 İnsan Dişisi Meme Kanseri Hücrelerinin Biyokütle Üretiminde De-Novo Plato-ph Üretim Tekniği

Plato-pH üretim metodu hücrelerin üreme hızlarını arttırmak ve hücrelerin lizasyonu sonucu elde edilecek aşı hammaddesinde bulunan ECM(ekstra cellular matrix, hücre dış yapıları) proteinlerinin yoğunluğu arttırmak için geliştirilmiş bir tekniktir. Teknik, bilimsel gelenekçi yaklaşımlar gibi, global standart uygulama yöntemi olarak herkesin aynı şartlarda uyguladığında aynı sonucu alabileceği şekilde bir teknik olmaktan ziyade, biraz daha hücre kültürünü uygulayan kişinin ustalığına dayanan bir uygulamadır. Bu tekniği belirtilen verimlerde, minimum 1 sene hücre kültüründe ve minimum 4 yada 5 hücre hattında deneyim kazanmış hücre kültürü çalışan araştırmacıların uygulayabileceği tahmin edilmektedir. Uygulanan yaklaşım hücrelerin içinde bulunduğu durumu mikroskopik yöntem ile tayin etmek, ardından uygun gelen adımı uygulayarak hücreleri çok katlı hızla büyüyen bir yığın halinde üretilip sonuç olarak pasajlama sırasında bu yığınların

arasında kalan ECM proteinlerinin tripsin tarafından sindirilmesini azaltmaktan ibarettir. Kısaca çok katlı kültürün flaks gibi düz yüzeylerde biyokütle üretimini ve bu biyokütleden elde edilen lizatın ECM içeriğini yükseltmek amaçlanmıştır.

Ekimi yapılan hücrelerle ortama eklenen besiyerleri hızla büyüyen hücre popülasyonuna çoğunlukla yetmez. Çoğu araştırmacı bu durumda besiyerini tazeler eder. Bu durumda pasajı gelmeyen hücreler metabolizmaları gereği G0 durumunda daha uzun süre kalırlar. Bu süre artışı hem kültürün pasajlanma zamanını yükseltir hemde harcanan besiyerini artırır. Bu amaçla bu zamanın azaltılması amacıyla yüksek hücre sayılı inokülümmler kullanılmalıdır.

Hücreler ortam pH ı düştüğünde tripsin eklenmesine ihtiyaç duymadan büyük oranlarda yüzeyden ayrılırlar, ayrılırken sırasında pH düzenlenmez ve/veya besiyeri eklenmez ise hücreler ölürler. Eğer pH ölüm hızının artmaya başlamadan uygun değere düşerse hücreler tekrar yüzeye veya yüzeyde tutunan hücrelere tutunurlar.

Plato fazı olarak geçen hücre büyümesinin 3. zamanı hücrelerin canlı kalabilmek için daha çok aktif taşıma ile hücre içine besin çektiği bir dönemdir. pH dengeli kalır ise bir süre daha üreme devam eder.

Plato-pH tekniği yukarıda bahsi geçen 3 noktanın kesişiminde sürekli uygulanarak gerçekleştirilmesidir. Hücreler yüksek inokülümde ekilir, ortam pH ile hücre kültürünün plato (durgun,stationery) fazı(dönemi) çakıştırılır. Bu çakıştırma için hücre üreme hızlarının ve besiyeri tüketim hızı ile pH düşme hızının iyi tahmin edilmesi gerekmektedir. Hücrelerin Pasajının geldiği ve pH ın düşerek rejenerasyonun geldiği noktada iki noktaya dikkat edilir.

Bir, pH indikatörü olan fenolün rengi yani mediumun rengin elma suyu sarısı renginde olmalıdır. Konfluenti yüzde 95 üzerinde olan ve medium rengi limon sarısına geçmemiş flaksta mikroskopik gözlem ile yüzeye yapışan hücrelerin minimum %20 kadarının yüzeyden ayrılması beklenir. Ayrılmanın gerçekleştiği ve elma suyu renginden limon sarısı rengine geçiş durumunda besiyeri içeriğine göre %20 taze besiyeri eklenerek hücrelerin yeniden yapışması sağlanır. Her Plato pH

döngüsünde hücre katları yaklaşık bir kat artar. 4. seferin sonunda 4 katlı bir kültür elde edilmiş olup hücreler pasajlanır ve PBS'e alınarak saklanır.

Aşırı pH artışı veya aşırı hücre kalkması durumunda teknik uygulaması durdurulmaz ve besiyeri rejenere edilmez ise hücrelerin büyük çoğunluğu ölmektedir. Ayrıca teknik için uygulama zaman aralığı sefer başına 6 saatlik bir dönemde uygulanabilir ve fazla süre beklenirse hücrelerin kaybıyla, az süre beklenir ise verimin logaritmik düşüşü ile karşılaşılır.

3.2.7 MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattının Pasajlanması

%100 konflüente ulaşan yani flaks yüzeyini tamamen kaplayan olan çok katlı MCF-7 kültürü içeren flaksların içerisindeki besiyeri döküldü ve 75 cm² lik flasklar için 10 ml 25 cm² lik flasklar için 5ml steril PBS ile eklenerek tek sefer hafifçe çalkalandıktan sonra dökülerek yıkandı. Ardından Pasajlama PBS(5mg/lt ZnCl₂ ve 8mg/lt MgCl₂ eklenmiş) ile %75 dilue edilerek hazırlanmış Tripsin solüsyonundan 75 cm² lik flasklar için 3 ml 25 cm² lik flasklar için 2 ml eklenerek 5-7 dk süreyle %5 CO₂ içeren 37 °C deki inkubatörde inkubasyona bırakıldı.

Hafifçe flask kenarına vurularak hücrelerin toplu halde kalkması sağlandı. Ardından DH10 besiyeri 75 cm² lik flasklar için 3 ml 25 cm² lik flasklar için 2 ml eklenerek tripsinin aktivitesi durduruldu. 5 dk süreyle 1000 rpm devirde +4 °C deki soğutmalı santrifüj ile santrifüj edildi. 3 ml Kültür PBS eklenerek pipetajlanarak homojen hale getirilen hücreler tekrar 5 dk süreyle 1000 rpm devirde +4 °C deki soğutmalı santrifüj ile santrifüj edildi. Kültür PBS ile yıkama basamağı 2 kez daha tekrar edildi. Son yıkamanın ardından 1 ml kültür PBS ile sulandırılarak -40 °C de hücreler saklandı.

3.2.8 MCF-7 İnsan Dişisi Meme Kanseri Hücrelerinin

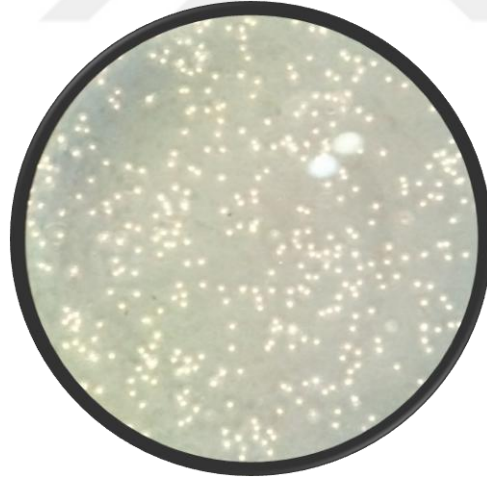
Kriyoprezervasyona Hazırlanması

Tripsinlenip, DH10 besiyeri eklenerek tripsin aktivitesi durdurulan solüsyondaki flask yüzeyinden ayrılan hücreler 5 dk süreyle 1000 rpm devirde +4 °C deki soğutmalı santrifüj ile santrifüj edildi. Süpernatantı döküldü ve %10 DMSO, %20 FBS içeren DMEM-High besiyeri içerisine mililitre başına 1*10⁶ hücre düşecek şekilde thoma lamında sayıldı. DMSO lu besiyeri hücreler üzerine yavaşça

damlatılarak (20-40 sn) eklendi. Hücreler pipetaj ile süspanse edildi ve kriyotüpe alındı. Kriyotüpün üzeri kodlandı, Kriyobank formuna kodu ile kriyobankta saklandığı bölme işlendi. Kriyotüp +4 °C deki dolaba koyularak 1 saat bekletildi. -20 °C deki buzluğa konularak 2 saat bekletildi. -40 °C deki derin dondurucuya koyularak 1 gün bekletildi. Ardından kriyobanktaki sıvı azot içerisine alındı[10],[11],[12],[13].

3.2.9 Fare Myeloma Ag8 Hücre Hattının Kültürü

2015 yılında 8-Azoguanin ile muamele edildikten sonra kriyobankta saklanmış Ag-8 balb/c fare myelom hücre hattı kriyotüpu kriyobantan çıkarıldı. Oda sıcaklığındaki suda eriyene kadar bekletildi. %20 FBS içeren RPMI 1640 besiyeri(R20) damlatılarak hücrelerin üzerine eklendi. 1250 rpm de 5 dk süreyle santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. 5 ml R20 besiyeri ile 25 cm² lik flaska alındı. 4 gün sonra pasajı gelen Ag8 hücreleri flakstan hafifçe flask çalkalanarak (fiziksel metot) kaldırıldı. 1250 rpm de 5 dk santrifüj edildi ve 3 adet 75 cm² lik flaska ekildi. Günlük kontrol edildi. Besiyeri gerektiğinde R20 ile değiştirildi[13].(Şekil 3.1)



Şekil 3.1 Ag8 Balb/c fare myeloma hücrelerinin mikroskopi görüntüsü(10X,ikinci gün)

3.2.10 Fare Makrofaj Hücre Hattının (J774, Balb/C Dişi Retikulum Hücre Sarkoması) Kültürü

J774 fare makrofaj hücre hattı kriyotüpü kriyobanktan çıkarıldı . Oda sıcaklığındaki suda eriyene kadar bekletildi. %20 FBS içeren RPMI 1640 besiyeri(R20) damlatılarak hücrelerin üzerine eklendi. 1250 rpm de 5 dk süreyle santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. 5 ml R20 besiyeri ile 25 cm² lik flaska alındı. 2 gün sonra pasajı gelen J774 hücreleri fiziksel metot ile flakstan kaldırıldı. 1250 rpm de 5 dk santrifüj edildi ve 3 adet 75 cm² lik flaska ekildi. Günlük kontrol edildi. Besiyeri gerektiğinde R20 ile değiştirildi[13].

3.2.11 J774 Hücre Hattı İle Şartlandırılmış Besiyeri Üretimi

%90 konfulte ulaşan 75 cm² j774 flaskının besiyeri R20 ile değiştirildi.24 saatin ardından besiyeri toplandı. 1250 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant toplandı ve 0,22 µm lik filtreden geçirildikten sonra +4 °C lik dolapta saklandı[13].

3.2.12 Hibridoma Hücrelerinin Kriyoprezervasyonu

Yarı süspanse haldeki hibridoma hücreleri yavaşça pipetaj ile kaldırıldı. Falkona alınan hibridomalar 1000 rmp'de 5 dk santifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant döküldü ve hücreler resüspanse hale getirildi. Mililitre başına 5*10⁶ hücre düşecek şekilde thoma lamında sayılarak hibridomalara dondurma solüsyonu yavaş olarak eklendi. Hücreler pipetaj süspanse edildi ve kriyotüpe alındı. Kriyotüpün üzeri kodlandı, Kriyobank formuna kodu ile kriyobankta saklandığı bölme yazıldı. Kriyotüp +4 °C deki dolaba koyularak 1 saat bekletildi. -20 °C deki buzluğa konularak 2 saat bekletildi. -40 °C deki derin dondurucuya koyularak 1 gün bekletildi. Ardından kriyobanktaki sıvı azot içerisine alındı[13].

3.2.13 Antijen Amaçlı Lizat Hazırlama Metotları

3.2.13.1 Otoklavlama Yöntemi İle Lizat Hazırlama

15 ml lik falcon içerisindeki içerisindeki MCF-7 hücreleri düşük ayarda vortexlendi ve 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant atıldı. Hücreler 1 ml PBS ile resüspanse edilerek lizatının hazırlanması için ağzı steril

edilmiş gazlı bez ile sarılı pamukla kapatılmış steril pastör şisesine alınır. Sonra şise otoklav poşetine alındı ve poşet bantlanarak sağlama alındı.

Yeni temizlenmiş otoklav cihazı 121 °C de 20 dk süreyle ayarlandı ve çalıştırıldı. Otoklavlamadan sonra otoklav hızlı soğutma yoluyla soğutulup 85 derecede açıldı. Pasör şisesi dışarıda soğumaya bırakılmadan laminar flow kabin içerisine otoklav poşeti ile alındı ve soğumaya bırakıldı. Soğumanın ardından pastör şisesi içerisinde kalan sıvı ile birlikte denatüre olmuş ve topaklanmış kalıntıları kuvvetlice pipetlenerek homojenize edilir. 15 ml lik falkon tüpe alındı. Ardından 10.000 rpm de 3 dk santrifüjde santrifüj edildi.

Süpernantantı dikkatlice hacmi pipet ile ölçülerek alındı. Kalan hücre debris falkon tüpde saklandı. Süpernatanta antijen hazırlanma kodu, hücre üretim batch kodu verildi. Lizattaki protein miktarının tayini amacıyla spektrofotometrede 260 ve 280 nm de ölçümleri alındı. Lizat -40 °C saklandı ve eritilir eritilmez kullanıldı.

3.2.13.2 Dondurma-Çözdürme Yöntemi İle Lizat Hazırlama

Sıvı azot kabına sıvı azot konularak hazırlandı. 37.5 °C ye ayarlanmış su banyosu hazırlandı. 15 ml lik falcon içerisindeki içerisindeki MCF-7 hücreleri düşük ayarda vortekslendi ve 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant atıldı.

Hücreler 1 ml PBS ile resüspanse edildi. Falcon tüpün tabanındaki 1 ml lik hücre karışımı sıvı azot ile örtülecek şekilde sıvı azot kabına konuldu ve kabın ağzı kapatıldı. 15 dakika süre ile hücre süspansiyonunun donması ve sıcaklığının düşmesi beklendi. Sıvı azotta 15 dk bekletilen falkon tüp 37.5 °C lik su banyosuna alınır ve 15 dk süreyle eriyip ısınması beklendi. Sıvı azot ile dondurma ve su banyosunda çözündürme işlemi 5 sefer gerçekleştirildi. Beşinci seferin sonunda karışım hafif ayarda vortekslenerek karıştırıldı ve 10000 rpm de 3 dk santrifüj edildi.

Süpernantantı dikkatlice hacmi pipet ile ölçülerek alındı. Kalan hücre debris falkon tüpde saklandı. Süpernatanta antijen hazırlanma kodu, hücre üretim batch kodu verildi. Lizattaki protein miktarının tayini amacıyla spektrofotometrede 260 ve 280 nm de ölçümleri alındı. Lizat -40 °C saklandı ve eritilir eritilmez kullanıldı.

3.2.13.3 Sonikasyon Yöntemi İle Lizat Hazırlama

Sonikasyon için kullanılan prosedür laboratuarda bulunan sonikatörün teknik özellikleri(Şekil 3.2), MCF-7 hücrelerinin literatürden elde edilen fiziksel değerleri(Şekil 3.3 yaklaşık hücre hacmi,aktin yapılarının bulunma sıklığı yarıçapı esneklil verileri vb. veriler) harmonik frekansı ve bu frekanslardaki ses dalgasının MCF-7 hücre bütünlüğü üzerine etkileri(Şekil 3.4) göz önüne alınarak seçildi. Bu seçim sırasında literatürdeki veriler kullanılmış ayrıca sonikatörün teknik rehberinden özellikleri incelenerek sonikatörün bu spesifikasyonlar üretildiği ve o an itibari ile bu değerde çalıştığı varsayıldı.[32,33]

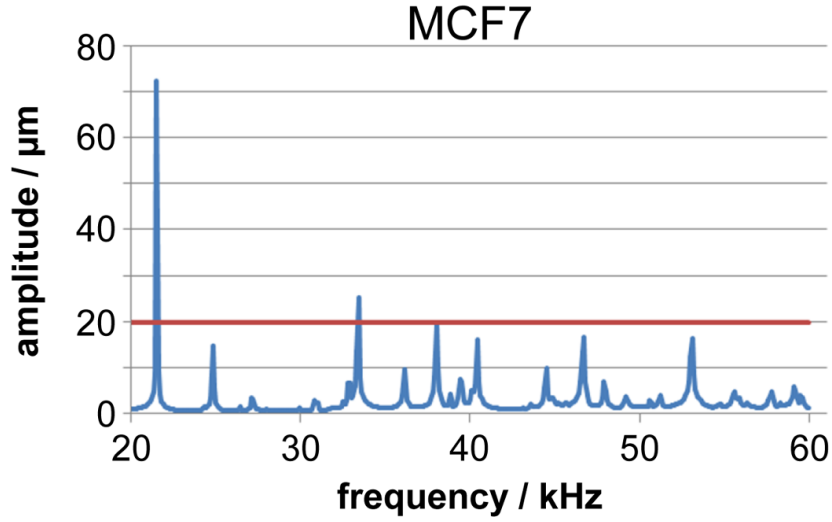
Generator	GM 2070	GM 2200	GM 2070-U	GM 2200-U
HF-output	70 W	200 W	70 W	200 W
HF-frequency	20 kHz	20 kHz	20 kHz	20 kHz
Mains supply	230 V~, 50/60 Hz		115 V~ oder 230 V~, 50/60 Hz	
Weight	2,5 kg		5,5 kg	
Dimensions (l x w x h)	257 x 180 x 115 mm		255 x 272 x 115 mm	

Cable length: 2 m
Ultrasonic frequency: 20 kHz $\pm$ 500 Hz
Time setting range: 00:01 – 99:59 [mm:ss] or continuous operation
Ultrasonic operating mode: pulsing or continuous
Amplitude setting range: 10 – 100 in 1% increments
Operating elements: Power turner, keypad buttons
Remote control (ON/OFF): buttons on ultrasound converter,
foot switch TS 8 (optional)
Degree of protection: IP 42

Şekil 3.2 Sonikatör spesifikasyonu[32]

parameter / unit	MCF7
cell volume / μm^3	3375–16873 ^a
hydrodynamic mass / kg ^b	1.74–7.34 x 10 ⁻¹²
actin cortex diameter / μm	1.27–2.17 (13.5%) [14, 45]
actin cortex density / g/cm ³	1.15 [14]
actin cortex E-modulus / kPa	1.125 [45]
actin cortex Poisson's ratio	0.4999 [53]
cytoplasm density / g/cm ³	1.05 ^c
cytoplasm Young's modulus / kPa	0.15 or 0.47
cytoplasm Poisson's ratio	0.4999 [53]
nucleus volume / μm^3	1122–1572 [27]
nucleus eccentricity / μm	1.35–1.65 [29]
nucleus density / g/cm ³	1.3
nucleus Young's modulus / kPa	0.15[28] or 4.7 [14, 15, 30]
nucleus Poisson's ratio	0.4999 [53]

Şekil 3.3 MCF-7 Hücrelerinin fiziksel aralıkları[33]



Şekil 3.4 MCF-7 hücrelerinin harmonik frekansları[33]

15 ml lik falcon içerisindeki içerisindeki MCF-7 hücreleri düşük ayarda vortexlendi ve 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant atıldı. Hücreler 1 ml PBS ile resüspanse edildi. Süspanse haldeki hücreleri ve çözücü olarak PBS içeren 15 ml lik falkon sonikatör probuna bağlanır ve ağzı parafilm ile örtüldü.

Sonikatör çalıştırılmadan önce 15 ml falkon tüp 8 ml çizgisine kadar, içi buzlu su dolu ve etrafı buza gömülmüş erlen içerisinde bulunan tuzlu suya daldırılıp 2 dakika ısı dengelenme için beklendi. Bu durumdaki suyun ısı iletim katsayısı yaklaşık 0.5610 W/mK olup proptan üretilen ısıyı hızla transfer edebilmektedir. Bununla beraber Protein içeren PBS tamponunun ısı iletim katsayısı bu değere nazaran oldukça düşük olduğu için sonikasyon sırasında prop sınırında oluşan lokal ısıyı hızla transfer edemeyebilmektedir. Tüm işlem soğutma olmadan yapılırsa ısı kaybı ihmal edildiğinde süspansiyonun sıcaklığı yaklaşık 45 °C ye kadar çıkabilmektedir.

Sonikatör 40 saniye süreyle ve 3 siklusa(Cycle) ayarlandı. Sonikatör jeneratörünün güç potansiyometresi %40 a ayarlandı. 40 sn aralıkla uğlanan işlem arasında ısı dengenin oluşması ve lokal ısının transfer edilerek lokal sıcaklığın düşmesi için 10-15 sn lik aralıkla beklendi. Sonikasyon 5 sefer tekrar edildi.

Sonikasyonun ardından berraklaşan çözelti 10.000 rpm de 3 dk santrifüj edildi. Süpernantantı dikkatlice hacmi pipet ile ölçülerek alındı. Kalan hücre deprisi

falkon tüpde saklandı. Süpernatanta antijen hazırlanma kodu, hücre üretim batch kodu verildi. Lizattaki protein miktarının tayini amacıyla spektrofotometrede 260 ve 280 nm de ölçümleri alındı. Lizat -40 °C saklandı ve eritilir eritilmez kullanıldı.

3.2.14 Lizatlardaki Protein (Antijen) Miktarının Tayini

Lizatlardaki protein miktarlarının ölçülmesi amacıyla Lowry metodu kullanıldı ve hesaplamalar modifiye edilmiş Warburg-Christian denklemiyle hesaplanıldı.

3.2.14.1 Lizatların Spektrofotometrik Ölçümü

-40 °C donmuş durumdaki lizatlar çözündürüldü ve vortekslendi. İçerisinde gözlenen partiküller 10.000 rpm de 3 dk santrifüjlendi, süpernatant alındı ve çökelen kısım atıldı. Laminar flow kabininde 100 µl lizat alındı ve 1400 µl saf su ile endorf içerisinde karıştırıldı. Seyreltme katsayısı 15 olarak kaydedildi. Spektrofotometre de Sabit absorbans değerine gelindikten sonra 3 kez ölçüm alındı ve kaydedildi. 3 kez tekrar edilen ölçümlerin aritmetik ortalaması alındı [13].

3.2.14.2 Modifiye Warburg-Christian Denklemiyle Protein Miktarları Hesaplanması

a)Aritmetik ortalama formülü;

$$\text{Ortalama Absorbans} = \frac{\text{Birinci ölçüm} + \text{İkinci ölçüm} + \text{Üçüncü ölçüm}}{3} \quad (3.1)$$

b)Modifiye Warburg-Christian denklemiyle Protein konsantrasyonunun Belirlenmesi:

$$\text{Protein konsantrasyonu (mg/ml)} = (1,5 * \text{ABS}_{280 \text{ nm}}) - (0,75 * \text{ABS}_{260 \text{ nm}}) \quad (3.2)$$

Ortalama absorbans 3 ayrı ölçüm alınarak denklem 3.1 de yerine yazılıp hesaplandı. 260 nm de 280 nm dalga boyu için hesaplanan ortalama absorbans değerleri denklem 3.2 yerine konularak protein konsantrasyonları hesaplandı. Hesaplanan protein miktarları antijen stoğu olarak kaydedildi.

3.2.15 Formülasyonların Makrofaj Kültür Sisteminde Nitrik Oksit İmmünostimülasyonunun İncelenmesi

İnsan meme kanserine karşı poliklonal ve ya monoklonal antikor üretirmesinde uygun protein miktarı ile uygun adjuvantların kombinasyonunun seçilmesi de

oldukça önemlidir. İnsan meme kanser hücre lizatından elde edilen farklı protein miktarları ile adjuvan (polioksidonium,Freund) karışımlarının makrofaj hücre kültür sisteminde immünostimulan etkinliği incelendi. Deneylerde Makrofaj Hücrelerinin Kültürü J774 fare makrofaj hücre hattı %10 FBS içeren RPMI1640 (medyumda ve %5 CO₂ 37°C etüvde gerçekleştirildi . Makrofajların Antijen ve Adjuvanlarla Muamelesi için Makrofaj hücreleri 96lık well plate 10.000 hücre/well olacak şekilde ekildi ve 24 saat %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübasyonun ardından çeşitli konstrasyonlarda (2,5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml, 30µg/ml, 40µg/ml, 50µg/ml, 80µg/ml, 160µg/ml) hazırlanan formülasyonlar besiyeri ile ayarlanarak eklendi. 48 saat inkübasyonun ardından süpernatantlar toplanarak Griess reaktifi ile reaksiyona sokuldu. Reaksiyonun ardından 540 nm de absorbanlar alındı[12].

3.2.15.1 Makrofaj Kültürünün yapılması:

%10 FBS içeren RPMI 1640 besiyeri 25 cm² 'lik flaskta yaklaşık çoğaltılan j774 fare makrofaj hücreleri Thoma lamı ile sayılarak 96 lı hücre kültür pleyti üzerine kuyu başına 10.000 j774 makrofaj hücresi olarak şekilde ekildi[12].

3.2.15.2 Griess reaktifi'nin hazırlanması:

20 ml distile suya 2,5 ml fosforik asit eklendi. Bu çözeltiye sırasıyla 0,1 g N-(1-Naphthyl)Ethylenediamine ve 1 g Sulfanilamide eklenerek karıştırıcıda çözünmesi sağlandı. Ardından çözelti distile su ile 100 ml ye tamamlandı[12].

3.2.15.3 Standartların hazırlanması:

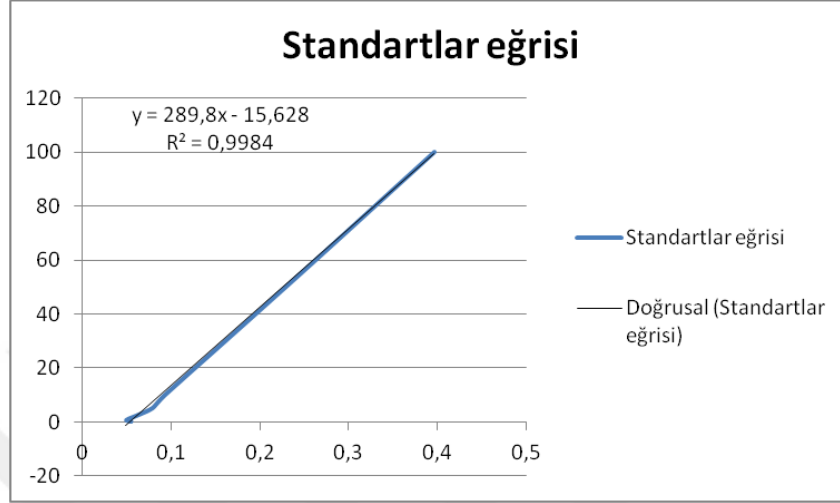
10 ml RPMI 1640 besiyeri içinde 0,345 g Sodyum Nitrite(sodyum nitrit) 500µM olacak şekilde çözüldü. Daha sonra çeşitli konsantrasyonlarda(100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM, 1, µM 0,5 µM, 0 µM) standart ayarlandı[12].

3.2.15.4 Griess reaktifi ile antijen eklerak 48 saat inkube edilmiş j774 makrofaj hücrelerinin süpernatantının reaksiyona sokulması:

Standartlardan ve NO ölçümü yapılacak kültür ortamından 50 µl alınarak 96'lık plate eklendi. Örneklerin üzerine 50 µl Griess reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk. İnkübasyona bırakıldı. 540 nm'de 96 well pleyt okuyucuda(Plate reader)

absorbanslar ölçüldü. Standartlar kullanılarak nmol/ml biriminden NO miktarı belirlendi[12].

3.2.15.5 Kalibrasyon Doğrusu Denkleminde İnterpolasyon ile Sonuçların Değerlendirilmesi;



Şekil 3.5 Nitrik oksit standartları kalibrasyon eğrisi

Standartlar eğrisi üzerinde microsoft excell ile çıkarılan doğru denklemi ve R^2 değeri şekil 3.5 de görülmektedir. İnterpolasyon metodunun tam tersi olarak uygun olarak denklemdeki absorbans değerleri x eğrisi üzerinde ve konsantrasyonlar ise y eğrisi üzerinde görülmektedir. Denklemde x'de yerine konulan absorbans ile konsantrasyon hesaplandı. Kuyulardaki sıvı hacmi üzerinden ise üretilen NO miktarı mol cinsinden hesaplanılabilmektedir.

3.2.16 Antijen Stoklarının Hazırlanması

Her lizasyon (antijen hazırlama metodu) metodu için ayrı ayrı stoklanmış örneklerden, spektrofotometre ile belirlenen protein konsantrasyonundaki antijenin aşı formülasyonu amacıyla hazırlanması için öncelikle 1 mg/ml konsantrasyona ayarlanması yapıldı. Bunun için stok antijen solüsyona kültür PBS'i eklenerek dilüsyon yapıldı. Lizasyon sonrası 1 mg/ml protein konsantrasyonundan düşük konsantrasyondaki lizatlar yeterli konsantrasyonda antijen içermedikleri için kullanılmayarak atılmışlardır. Aşağıdaki birimsiz antijen dilüsyon formülü kullanılarak eklenmesi gereken Kültür PBS'i hacmi hesaplandı.

Hesaplanan miktarda Kùltür PBS'i ile stok antijen solýsyonu karýýtýrlýp pipetajlandı ve immùnizat (aşı) hazýrlanması için kullandı.

Y= Lizat hacmi(ml cinsinden)

X=Lizat antijen(protein) konsantrasyonu (mg/ml cinsinden)

K= Eklenecek PBS hacmi(ml cinsinden)

T=1 mg/ml, sabit katsayısı

$$K = Y(X - T)$$

3.2.17 İmmùnizat Hazýrlanması

3.2.17.1 İmmùnizat Grupları Ve Kodları

Araştırýlacak formülasyonlar adjuvan tipine göre Polioksidonyum ve Freund grubu (Comple Freund's Adjuvan,CFA) olarak iki ana gruba ve antijen hazýrlama tekniğine göre 3 alt gruba ayrıldı. Bu gruplar için özel bir kod sistemi geliştirildi. Hayvan grupları 6 karakterli kodlandı. İlk karakter antijenin elde edildiği hücre hattının kısaltması 2. , 3. ve 4. karakterler antijen hazýrlama metotlarının kısaltmalarını 5. karakter Adjuvan tipini, 6. karakter ise hayvanın numarasını göstermektedir. MCF-7 için Kodlamalar ve kodlamaların açıklamaları tablo 3.1 gösterilmektedir.

Tablo 3.1 Aşı formülasyonları tablosu

Grup kodu	Hücre Kodu	Lizat hazırlama metodu	Kullanılan Adjuvan
MSonF	MCF-7	sonikasyon	Freund grubu
MSonP	MCF-7	sonikasyon	Polioksidonyum
MOtoF	MCF-7	otoklav	Freund grubu
MOtoP	MCF-7	otoklav	Polioksidonyum
MDoçF	MCF-7	dondurma-çözme	Freund grubu
MDoçp	MCF-7	dondurma-çözme	Polioksidonyum
MKon1	Hücresiz	Lizat yok	Adjuvan yok

3.2.17.2 Polioksidonyum Grubu Aşıların Hazırlanması

Polioksidonyum solüsyonunun hazırlanması

Rusya veya Bağımsız Devletler Topluluğu (BDT) üye devletlerinden kişisel ilişkiler yolu ile getirilmiş halihazırda terapötik ilaç olarak BDT devletlerindeki eczanelerde bulunan bu ürünün 4 şişeli ve şişe başına 6 mg polioksidonyum içeren formülasyonu çalışma için kullanıldı. 6 mg liyofilize polimer içeren kuru toz 2,4 ml PBS ile çözülerek hazırlandı. Vortexlendi etiketlenip buz dolabında saklandı.

Sonikasyon ile hazırlanmış antijen ve polioksidonyum içeren immünizat(aşı) formülasyonunun hazırlanması:

Plastik Eppendorf tüplere 300 µl Sonikasyon ile hazırlanmış antijen konuldu. Üzerine 300 µl polioksidonyum polimer adjuvan solüsyonu eklendi. Karışım, hayvan başına 200 µl olarak insülin enjektörlerine alındı. Farklı sayıda hayvan kullanım için ise 2,5 mg/ml kontrasyonda polioksidonyum ve 1mg/ml kontrasyonda antijen için aşağıdaki formül kullanıldı;

Hayvan sayısı = N

Hayvan başına İmmünizat hacmi=200 µl

Lizat miktarı=100*N µl

Polioksidonyum miktarı=100*N µl

Otoklavlama ile hazırlanmış antijen ve polioksidonyum içeren immünizat(aşı) formülasyonunun hazırlanması:

Plastik Eppendorf tüplere 300 µl otoklavlama ile hazırlanmış antijen konuldu. Üzerine 300 µl polioksidonyum polimer adjuvan solüsyonu eklendi. Karışım, hayvan başına 200 µl olarak insülin enjektörlerine alındı. Farklı sayıda hayvan kullanım için hazırlanan ise 2,5 mg/ml kontrasyonda polioksidonyum ve 1mg/ml kontrasyonda antijen için aşağıdaki formül kullanıldı;

Hayvan sayısı = N

Hayvan başına İmmünizat hacmi=200 µl

Lizat miktarı=100*N µl

Polioksidonyum miktarı=100*N µl

Dondurma-çözme ile hazırlanmış antijen ve polioksidonyum içeren immünizat(aşı) formülasyonunun hazırlanması:

Plastik Eppendorf tüplere 300 µl Dondurma-çözme ile hazırlanmış antijen konuldu. Üzerine 300 µl polioksidonyum polimer adjuvan solüsyonu eklendi. Karışım, hayvan başına 200 µl olarak insülin enjektörlerine alındı. Farklı sayıda hayvan kullanım için hazırlanan ise 2,5 mg/ml kontrasyonda polioksidonyum ve 1mg/ml kontrasyonda antijen için aşağıdaki formül kullanıldı;

Hayvan sayısı = N

Hayvan başına İmmünizat hacmi=200 µl

Lizat miktarı=100*N µl

Polioksidonyum miktarı=100*N µl

3.2.17.3 Freund(Complete Freund's Adjuvant,Cfa) Grubu Aşıların Hazırlanması

Sonikasyon ile hazırlanmış antijen ve Freund(Complete Freund's Adjuvant,CFA) içeren immünizat(aşı) formülasyonunun hazırlanması:

Plastik Eppendorf tüplere 300 µl sonikasyon ile hazırlanmış antijen konuldu. Üzerine 300 µl Komple Freund adjuvanı (1mg/ml mycoplazma lizatlı) eklendi. Karışım, hayvan başına 200 µl olarak insülin enjektörlerine alındı. Farklı sayıda hayvan kullanım için ise 1 mg/ml mycoplazma lizatı içeren komple freund adjuvanı ve 1mg/ml kontrasyonda antijen için aşağıdaki formül kullanıldı;

Hayvan sayısı = N

Hayvan başına İmmünizat hacmi=200 µl

Lizat miktarı=100*N µl

Freund Adjuvanı miktarı =100*N µl

Otoklavlama ile hazırlanmış antijen ve Freund (Complete Freund's Adjuvant,CFA) içeren immünizat(aşı) formülasyonunun hazırlanması:

Plastik Eppendorf tüplere 300 µl Otoklavlama ile hazırlanmış antijen konuldu. Üzerine 300 µl Komple Freund adjuvanı(1mg/ml mycoplazma lizatlı) eklendi. Karışım, hayvan başına 200 µl olarak insülin enjektörlerine alındı. Farklı sayıda hayvan kullanım için ise 1 mg/ml mycoplazma lizatı içeren komple freund adjuvanı ve 1mg/ml kontrasyonda antijen için aşağıdaki formül kullanıldı;

Hayvan sayısı = N

Hayvan başına İmmünizat hacmi=200 µl

Lizat miktarı=100*N µl

Freund Adjuvanı miktarı =100*N µl

Dondurma-çözme ile hazırlanmış antijen ve Freund(Complete Freund's Adjuvant,CFA) içeren immünizat(aşı) formülasyonun hazırlanması:

Plastik eppendorf tüplere 300 µl otoklavlama ile hazırlanmış antijen konuldu. Üzerine 300 µl Komple Freund adjuvanı(1mg/ml mycoplasma lizatlı) eklendi. Karışım, hayvan başına 200 µl olarak insülin enjektörlerine alındı. Farklı sayıda hayvan kullanım için ise 1 mg/ml mycoplasma lizatı içeren komple freund adjuvanı ve 1mg/ml kontrasyonda antijen için aşağıdaki formül kullanıldı;

Hayvan sayısı = N

Hayvan başına İmmünizat hacmi=200 µl

Lizat miktarı=100*N µl

Freund Adjuvanı miktarı =100*N µl

3.2.18 Hayvanların Gruplandırılması Ve İşaretlenerek Birbirinden Ayırt Edilmesi

20 adet Balb/c tipi 6. haftasını doldurmuş ve 7. haftasından olan fare aşağıdaki şekilde gruplandırıldı:

- MSonF: 3 hayvan
- MSonP: 3 hayvan
- MOtoF: 3 hayvan
- MOtoP: 3 hayvan
- MDoçF: 3 hayvan
- MDoçP: 3 hayvan
- MKont: 2 hayvan

Gruplandırılan hayvanların kuyrukları birinci hayvan için bir çizgi, ikinci hayvan için iki çizgi ve üçünü hayvan için üç çizgi olarak işaretlendi ve hayvanlar belirlendi. İşaretlemeler her immünizasyon ve serum eldesi günü tekrarlanarak silinmeleri ve hayvanların karışması engellendi. Hayvanların grup içinde

ayrılmaları ile hayvanların kodları MSonF1, MSonF2, MSonF3, MSonP1, MSonP2, MSonP3, MOtoF1, MOtoF2, MOtoF3, MOtoP1, MOtoP2, MOtoP3, MDoçF1, MDoçF2, MDoçF3, MDoçP1, MDoçP2, MDoçP3, MKont1, MKont2 şeklinde oluşturuldu.

3.2.19 Enjeksiyon Stresinin Engellenmesi

Enjeksiyon stresinin engellenmesi için hayvanlar gruplandırılır iken handling(alıştırma) edildi ve araştırmacı tarafından yeni kafeslerine konuldu. Her aşılama öncesi 15 dakika hayvanlar ile aynı ortamda bulunuldu, bu sırada konuşularak sese de alışmaları sağlandı. Kafesinde saklanma eğilimde olan hayvanlara kapalı el gösterilerek koklamaları ve araştırmacıya alışmaları sağlandı. Gömme güdüsü içerisinde olan ve kafesindeki talaşları eşeleleyen hayvanların aşılanmaları ve kan alınmaları geciktirildi ve grup içerisinde en son olarak işlemler uygulandı. Aşılamaların tüm safhasında mümkün olduğunca ilk kan alan ve enjeksiyonu yapan veteriner hekim ile çalışıldı. Hayvanlar fırsat bulundukça enselerinden sevilerek stresslerinin azalması sağlandı.

Tüm çalışma sırasında stress faktörünün immün sistem üzerindeki baskılama durumu göz önünde bulundurularak tüm hayvanların bölge değişimi aynı anda yapıldı. Tüm hayvanlar için tüm işlemler bitene kadar bütün çalışma grubunun çalışma bölgesinde kalmasına özen gösterildi. Hayvanlardan gelen Kan, idrar, dışkı, aşı, ter gibi kolular ile araştırmacılar ve çalışan veterinerden gelen ter ve nefes kokusu gibi kokulara aşılama basamakları ilerledikçe alışmaları amaçlandığı için hayvanlar olabildiğince veteriner, araştırmacı ve grup kafeslerinde diğer hayvanları ile aynı odada kalmaları sağlandı.

3.2.20 İmmünizasyon Ve Serum Eldesi

Serum eldesi için alınan tüm kanlar aşılama öncesinden alındı ve ardından aşılama yapıldı. Periton zarından enjekte edilen ilaçların dolaşıma başlama ve kana karışma zamanı yaklaşık 1-5 dk aralığında olduğu için kanların aşılamadan önce alınması serumlar içerisindeki antijen kontaminasyonu azaltmıştır. Her uygulama başlangıcında hayvanlara aşılama ve kan alımına başlamadan önce sorumlu veteriner hekim ile görüşüldü ve kafeslerinin yerleri değiştirilmeden önceki 15

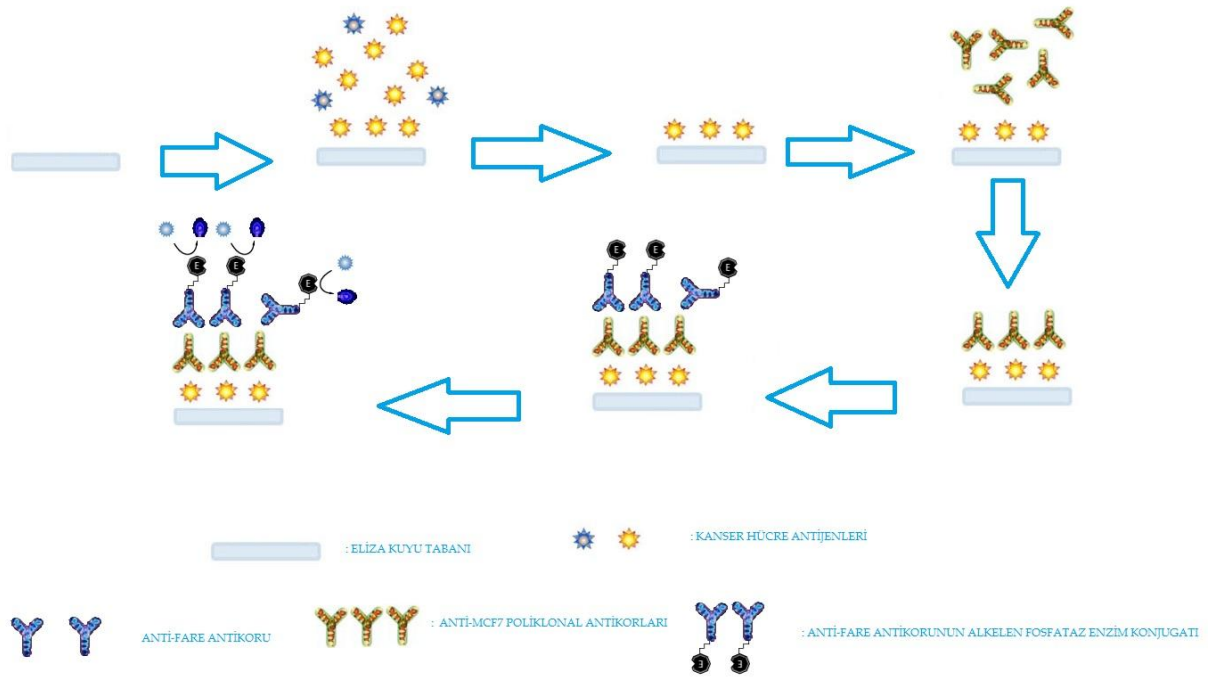
dakikalık alıştırma aşamasında kafes dışından hayvanlar tek tek kontrol edilerek oluşabilecek komplikasyon varlığı gözlemlendi.

Kanlar fare kafa boyun kısmı ana mandibular venden, ven iğne ile tahrip edilerek ve eppendorf tüpe damlatılarak alındı. Her çalışma öncesi hayvan başına 200 µl kan alındı. Kanlar aşılama aşamasının hemen ardından 4000 rpm'de 7 dakika süreyle santrifüj edildi ve süpernatant toplanarak korumalı ve içerisinde buz aküsü bulunan strafor kaplar ile bölüme getirildi dik vaziyette -40 °C derecedeki dolapta donmaları sağlandı. Fare peritonuna enjekte edilecek aşılarda sterilitelelerinin aşılama anına kadar bozulmaması için Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarlarındaki laminar kabinde ağzı kapalı olarak ayrı ayrı poşetlerine alındı ve buz aküsü bulunan strafor kaplar ile Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkez Laboratuvarına özel araç ile 30 dk sürede soğuk zincirde götürüldü. Aşılama rejimi olarak 10 günde bir öğleden sonra 14:30-16:00 saatleri arası seçildi ve uygulandı.

Tüm Aşı Formülasyonları Tüm hayvanlar için ayrı ayrı insülin enjektörlerinde laminar kabinde hazırlarak gruplandırıldığı için aşılama sırasında grup içerisindeki hayvan ve aşı karışması durumu oluşulmasına imkan verilmedi.

3.2.21 İmmünizasyon Kontrolü (MCF-7 Spesifik Elisa)

İmmünizasyon kontrolü amacıyla Balb/c tipi farelerden elde edilen kan serumlarında MCF-7 insan meme kanseri hücre hattının lizatları özgül antikorların (Poliklonal) bulunup bulunmadığının tespiti amacıyla fare serumlarının MCF-7 lizatı ile kaplanmış elisa pleytlerinde sandiviç elisa modeline uygun olarak elisaları yapıldı.(Şekil 3.6)



Şekil 3.6 Meme kanserine karşı oluşturulmuş antikorları tespit etmek amacı ile yapılan ELİSA testinin şematizasyonu

3.2.21.1 96 'LI Kuyuların Kaplanarak Mcf-7 Antikoru Özgül Elisa Pleyti Üretimi

Antijen kaplama tamponu 100µl olarak kuyulara eklendi.(Kuyu içerisinde 1µg antijen bulunur.) Alimunyum folyo ile pleytlerin üzeri kapatıldı. 4°C'de bir gece boyu inkübe buzdolabında edildi. Bir gece inkubasyondan sonra PBST tamponu ile 3 kez 300 µl hacimde elisa washer cihazında yıkandı.

3.2.21.2 96'LI Pleyt Kuyularının Bloklanması

Bloklama işlemi kullanıcak serum ve sekonder antikorun elisa pleytine bağlı serbest uçlarını engeller. Yıkama işleminin ardından Bloklama çözeltisinden kuyulara 150µl eklendi. 37°C'deki karbondioksitsiz inkubatörde 1 saat inkübe edildi. İnkubasyondan sonra PBST tamponu ile 3 kez 300 µl hacimde elisa washer cihazında yıkandı.

3.2.21.3 Serumların Eklenmesi Ve İnkubasyonu

Serumlar -40 °C deki buz dolabından çıkarıldı, düzenlendi, oda sıcaklığında erimeye bırakıldı. Erime tamamlandıktan sonra +4 °C dolabında bekletildi.

Serumlar 1/100 dilüsyonda PBSTM ile dilue edildi. Kuyulara 150µl eklendi. Negatif ve pozitif örneklerde aynı dilüsyonda sulandırıldı. 1 saat 37°C'de karbondioksitsiz inkubatörde inkübe edilir. İnkubasyondan sonra PBST tamponu ile 3 kez 300 µl hacimde elisa washer cihazında yıkandı.

3.2.21.4 Sekonder (İkincil) Antikorların Eklenmesi Ve İnkubasyonu

Alkelen fosfataz konjuge Poliklonal Anti-Mouse IgG keçi antikor 1/1000 oranında PBST ile sulandırılarak her kuyuya 100µl eklendi. 1 saat 37°C'de oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkubasyondan sonra PBST tamponu ile 5 kez 300 µl hacimde elisa washer cihazında yıkandı.

3.2.21.5 Alkalen Fosfataz Substratının Eklenmesi (PNPP, P-Nitrofenil Fosfat)

Kuyulara substrat çözeltisi 100 µl eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk. inkübe edildi.

3.2.21.6 Sonuçların Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

ELISA plate reader 450 nm dalga boyuna ayarlandı. Okuma koluna pleyt ağzı açık olarak yerleştirildi. Absorbans değerleri cihaz tarafından okunarak kayıt edildi. Sonuçlar alınıp excell tablosuna geçirilerek grafik haline dönüştürüldü.

3.2.21.7 Elisa Planlarına Örnek Teşkil Etmesi İçin İlk 3 Plate Planı

İlk 3 immünizasyon sonucunun belirlenmesi amacıyla geçmişte yapılan elisa'nın planı aşağıdadır. ELISA planındaki tüm gruplar 3 kuyuya eklenmiş ve sonuçlar bu 3 kuyu üzerinden ortalama alınarak hesaplanmıştır.

A. Kontrol Kuyusu 1 (Kaplama Yapılmamış)

B. Kontrol Kuyusu 2 (Kaplama Yapılmış ve Antikor Eklenmemiş)

C. Standart 1 (%10 antikor)

D. Standart 2 (%25 Antikor)

E. Standart 3 (%50 antikor)

F. Standart 4 (%75 antikor)

G. Standart 5 (%100 antikor)

- H. MSonF: MCF-7 sonikasyon lizatı+ Freund grubu, 1 numaralı hayvan Aşılama Öncesi
- J. MSonF: MCF-7 sonikasyon lizatı+ Freund grubu, 2 numaralı hayvan Aşılama Öncesi
- K. MSonF: MCF-7 sonikasyon lizatı+ Freund grubu, 3 numaralı hayvan Aşılama Öncesi
- L. MSonF: MCF-7 sonikasyon lizatı+ Freund grubu, 1 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon
- M. MSonF: MCF-7 sonikasyon lizatı+ Freund grubu, 2 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon
- N. MSonF: MCF-7 sonikasyon lizatı+ Freund grubu, 3 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon
- O. MSonF: MCF-7 sonikasyon lizatı+ Freund grubu, 1 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon
- P. MSonF: MCF-7 sonikasyon lizatı+ Freund grubu, 2 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon
- R. MSonF: MCF-7 sonikasyon lizatı+ Freund grubu, 3 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon
- S. MSonP: MCF-7 sonikasyon lizatı + Polioksidonyum grubu, 1 numaralı hayvan Aşılama Öncesi
- T. MSonP: MCF-7 sonikasyon lizatı + Polioksidonyum grubu, 2 numaralı hayvan Aşılama Öncesi
- U. MSonP: MCF-7 sonikasyon lizatı + Polioksidonyum grubu, 3 numaralı hayvan Aşılama Öncesi
- V. MSonP: MCF-7 sonikasyon lizatı + POX grubu, 1 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon
- Y. MSonP: MCF-7 sonikasyon lizatı + POX grubu, 2 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon

Z. MSonP: MCF-7 sonikasyon lizatı + POX grubu, 3 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon

AA. MSonP: MCF-7 sonikasyon lizatı + POX grubu, 1 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon

AB. MSonP: MCF-7 sonikasyon lizatı + POX grubu, 2 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon

AC. MSonP: MCF-7 sonikasyon lizatı + POX grubu, 3 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon

AD. MOtoF: MCF-7 otoklav lizatı + Freund grubu, 1 numaralı hayvan Aşılama Öncesi

AF. MOtoF: MCF-7 otoklav lizatı + Freund grubu, 2 numaralı hayvan Aşılama Öncesi

AG. MOtoF: MCF-7 otoklav lizatı + Freund grubu, 3 numaralı hayvan Aşılama Öncesi

AH. MOtoF: MCF-7 otoklav lizatı + Freund grubu, 1 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon

AJ. MOtoF: MCF-7 otoklav lizatı + Freund grubu, 2 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon

AK. MOtoF: MCF-7 otoklav lizatı + Freund grubu, 3 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon

AL. MOtoF: MCF-7 otoklav lizatı + Freund grubu, 1 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon

AM. MOtoF: MCF-7 otoklav lizatı + Freund grubu, 2 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon

AN. MOtoF: MCF-7 otoklav lizatı + Freund grubu, 3 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon

AO. MOtoP: MCF-7 otoklav lizatı + Pox grubu, 1 numaralı hayvan Aşılama Öncesi

AP. MOtoP: MCF-7 otoklav lizatı + Pox grubu, 2 numaralı hayvan Aşılama Öncesi

AR. MOtoP: MCF-7 otoklav lizati + Pox grubu, 3 numaralı hayvan Aşılama Öncesi

AS. MOtoP: MCF-7 otoklav lizati + Pox grubu, 1 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon

AT. MOtoP: MCF-7 otoklav lizati + Pox grubu, 2 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon

AU. MOtoP: MCF-7 otoklav lizati + Pox grubu, 3 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon

AV. MOtoP: MCF-7 otoklav lizati + Pox grubu, 1 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon

AY. MOtoP: MCF-7 otoklav lizati + Pox grubu, 2 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon

AZ. MOtoP: MCF-7 otoklav lizati + Pox grubu, 3 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon

ABA. MDoçF: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Freund grubu, 1 numaralı hayvan Aşılama Öncesi

ABB. MDoçF: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Freund grubu, 2 numaralı hayvan Aşılama Öncesi

ABC. MDoçF: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Freund grubu, 3 numaralı hayvan Aşılama Öncesi

ABD. MDoçF: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Freund grubu, 1 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon

ABE. MDoçF: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Freund grubu, 2 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon

ABF. MDoçF: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Freund grubu, 3 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon

ABE. MDoçF: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Freund grubu, 1 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon

BAF. MDoçF: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Freund grubu, 2 numaralı hayvan
Üçüncü İmmünizasyon

ABG. MDoçF: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Freund grubu, 3 numaralı hayvan
Üçüncü İmmünizasyon

AGH. MDoçP: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Pox grubu, 1 numaralı hayvan
Aşılama Öncesi

ABJ. MDoçP: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Pox grubu, 2 numaralı hayvan
Aşılama Öncesi

ABK. MDoçP: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Pox grubu, 3 numaralı hayvan
Aşılama Öncesi

ABL. MDoçP: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Pox grubu, 1 numaralı hayvan İkinci
İmmünizasyon

ABM. MDoçP: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Pox grubu, 2 numaralı hayvan İkinci
İmmünizasyon

ABN. MDoçP: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Pox grubu, 3 numaralı hayvan İkinci
İmmünizasyon

ABO. MDoçP: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Pox grubu, 1 numaralı hayvan
Üçüncü İmmünizasyon

ABP. MDoçP: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Pox grubu, 2 numaralı hayvan
Üçüncü İmmünizasyon

ABR. MDoçP: MCF-7 dondurma-çözme lizati + Pox grubu, 3 numaralı hayvan
Üçüncü İmmünizasyon

ABS. Kont: Kontrol grubu, 1 numaralı hayvan Aşılama Öncesi

ABT. Kont: Kontrol grubu, 2 numaralı hayvan Aşılama Öncesi

ABU. Kont: Kontrol grubu, 1 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon

ABV. Kont: Kontrol grubu, 2 numaralı hayvan İkinci İmmünizasyon

ABY. Kont: Kontrol grubu, 1 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon

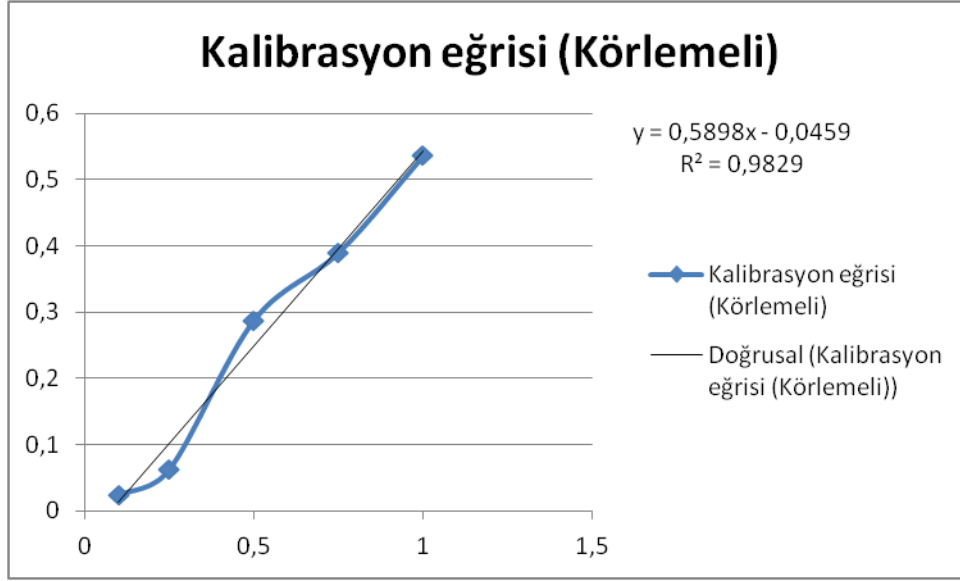
ABZ. Kont: Kontrol grubu, 2 numaralı hayvan Üçüncü İmmünizasyon

3.2.21.8 Elisa Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması Ve Elisa Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kalibrasyon eğrisi çıkarılması amacıyla, 5 adet konsantrasyonu bilinen antikor örnekleri kuyulara substrat çözeltisi ile birlikte eklendi. Okumanın ardından spektrofotometrik olarak ölçülen değerler excell programında karşılıklarına konsantrasyonlar gelecek şekilde grafiğe geçildi. Grafik oluşturma işlemi için kullanılan veriler her ELİSA pleyti için tekrar ölçüldü ve oluşturulan kalibrasyon eğrisi antikor konsantrasyonları serum antikor düzeyinin hayvan sağlık sınırlarında(Balb/c tipi farenin yaşamını idare ettirebileceği en yüksek antikor seviyesi) olup olmadığının değerlendirilmesi için kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi çıkarılması için kullanılan değer ve eğrinin kullanılması aşağıdaki gibidir(tablo 3.2, şekil 3.7);

Tablo 3.2 ELİSA kalibrasyon ölçümleri

Kalibrasyon işlemleri(Körlemeler)					
Kalibrasyon1	0,576867		0,536867	Konsatrasyon1	1
Kalibrasyon2	0,430667		0,390667	Konsatrasyon2	0,75
KALİBRASYON4	0,328667		0,288667	Konsatrasyon4	0,5
Kalibrasyon3	0,103667		0,063667	Konsatrasyon3	0,25
Kalibrasyon5	0,064333		0,024333	Konsatrasyon5	0,1
Kör:	0,04				

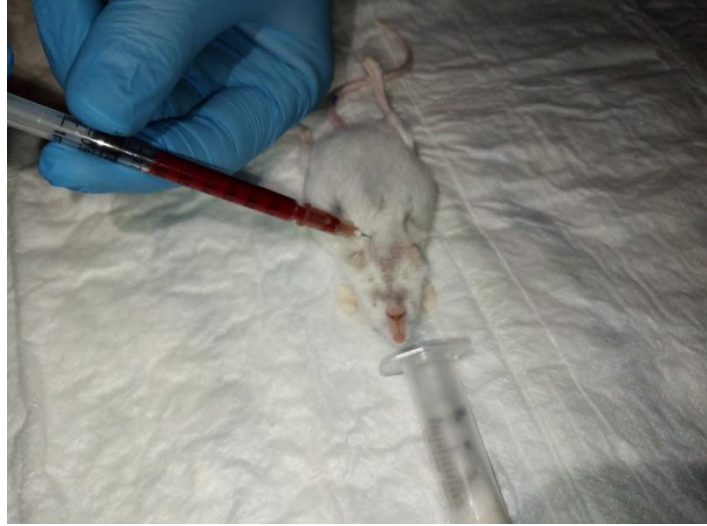


Şekil 3.7 Kalibrasyon eğrisi olarak kalibrasyon ölçümlerinin grafiği

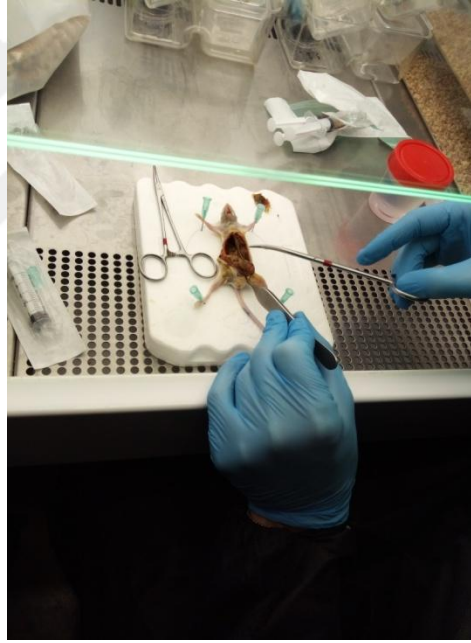
ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi için elde edilen absorbanslar kör hayvan olarak adlandırılmış kontrol grubundan elde edilen serumların ELISA absorbans değerleri ile immünize edilmiş (Aşılanmış) hayvanlardan elde edilen serumların oranlanması ile elde edildi. Kalibrasyon eğrileri için yapılan kalibrasyon kuyuları pozitif kontrol kabul edilip, her pleyt de ayrıca körleme için kör kuyusu ve negatif kontrol için ise sadece substrat solüsyonu içeren kuyu eklenmiştir. (Şekil 8,9)

3.2.22 Balb/C Sakrifikasyonu Ve Dokularının Eldesi

İnhalasyon ajanı ile bayıltılan fare %70 alkole batırıldı ve laminar flow altında sabitlendi. İlk olarak dalak bölgesinden peritonu açılan hayvanın dalağı RPMI 1640 besiyerine alındı. Hayvanın karaciğer, böbrek, akciğer, kalp, kas ve ovaryum dokuları %10 formalin içerisine konuldu. (Şekil 3.8, 3.9, 3.10)



Şekil 3.8 Balb/c Fare sakrafikasyonundan önce kalpten kan alınması



Şekil 3.9 Balb/c Fare sakrafikasyonundan sonra dalağın laminar kabinde çıkarılması



Şekil 3.10 RP0 besiyeri içerisindeki Balb/c fare dalağı

3.2.23 Hücresel Füzyon

3.2.23.1 Füzyona Hazırlık Aşamaları

Myeloma hücrelerinin hazırlanması:

Füzyondan hemen önce, flasklarından kaldırılan hücreler 50 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve 1200 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve hücre pelleti serum R0 ile süspanse edilir. Bu işlem 3 kere tekrar edildikten sonra R0 ile süspanse edilerek füzyon için gerekli sayım yapılır [13].

Dalağın Kandan Arındırılması ve Yıkama ve Splendosit eldesi:

Balb/c tipi Fareden çıkarılan dalak, RPMI 1640(R0) içeren 15 ml'lik steril falkon içerisine alındı. Laminar flow kabin içerisinde steril petriye transfer edilen dalak damarlarından bulunan kandan arındırıldı ve R0 ile yıkanır[13].

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, yeni steril petriye alınan dalak 0,70 µm'lik corning's filtre üzerinde enjektörün tersi ile ezildi ve devamlı surette üzerine R0 eklenerek kuruması engellendi. Steril petri içerisinde biriken hücreler serolojik pipet yardımı ile steril falkonlara aktarıldı.

Falconlara toplanan hücreler 800 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Kan serumunun hücrelerden uzaklaştırılması oldukça önemlidir bu sebeten dolayı bu işlem 3 kere tekrar edildi. En son santrifüjden sonra hücreler R0 ile resüspanse edildi ve füzyon için Thoma lamında sayım yapıldı[13].

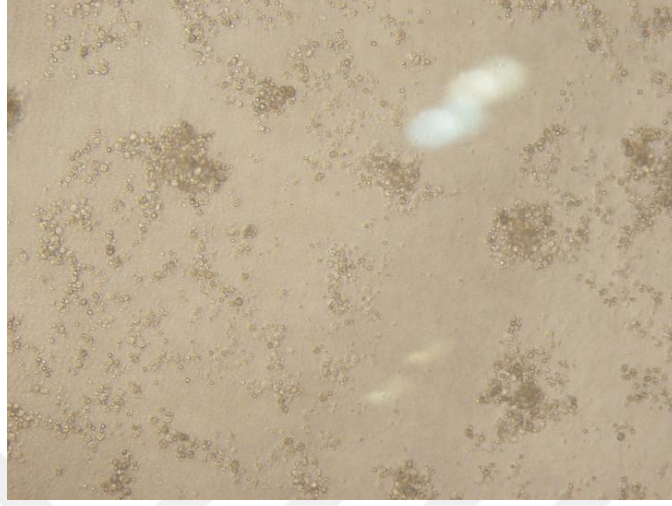
3.2.23.2 Hücresel Füzyonun Gerçekleştirilmesi

Hücreler 1 myeloma ve 10 dalak hücresi oranında karıştırıldı. Karıştırılan hücre süspansiyonları steril falcon içerisinde toplandı ve 10 dk boyunca 1250 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantın tamamının uzaklaştırılması sağlandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti hafifçe vurularak resüspanse edildi. 1 dakika boyunca pipet ile damlatarak 1ml PEG(Polietilen glikol) solüsyonu eklendi. Karıştırılma yapılmadan 1 dakika süreyle dinlendirildi. Sonrasında hücreler yavaşça pipetle karıştırıldı. Füzyon karışımına 4 ml serum içermeyen RPMI eklendi. 4 dakika boyunca yavaşça karıştırıldı. Hücrelere yavaşça 10 ml R0 eklendi. 45 dk 37 °C su banyosunda inkübe edildi. 30 ml R20 yavaşça eklendi ve 1250 rpm devirde 7 dk boyunca +4 °C deki soğutmalı santrifüjde santrifüjlendi. Polietilen Glikolün (PEG) uzaklaştırılması için süpernatant atıldı ve HAT besiyeri ile resüspanse edildi. Süspanse edilen hücre pelleti 96 kuyulu pleyt kuyu başına 100.000 hücre olacak şekilde her kuyuya 150 µl hacminde dağıtıldı. 10-14 gün boyunca %5 CO2'li inkubatörde 37°C de inkubasyona bırakıldı[13].

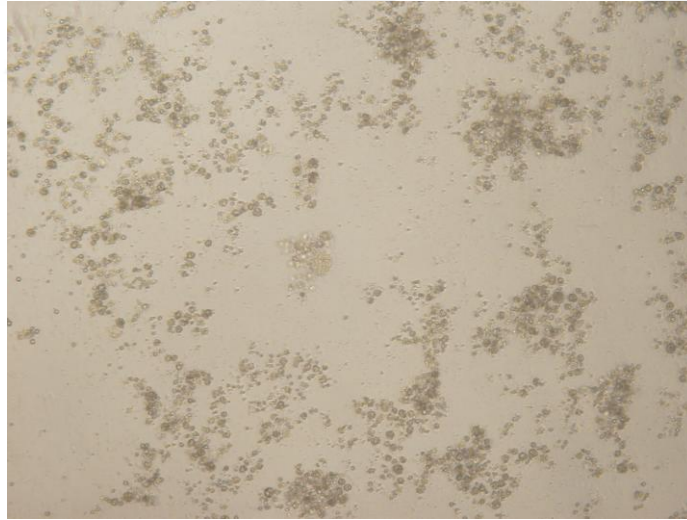
3.2.24 Füzyon Sonrası Hibrit Bakımı Ve Hibridoma Seçimi

Hibridomaların besiyerleri ölçek büyötmeye başlayana kadar iki sefer HAT iki sefer de HT besiyeri ile yenilendi. Hibridomaların kaynağı olan B hücrelerinin hücresel metabolizmasına doğrudan bağlantılı olan bu durum sırasında hibridomalar antikor üretimi yapmakta olup bu örnekler saklandı. Büyük çaplı büyötmeye geçilene kadar besiyeri rejenerasyonu ile yaklaşık 50 µl hacimde süpernatant santrifüjsüz toplandı. Toplanan süpernatantlar ELİSA için kullanıldı. Antijene özgül hibridomaları seçmek için uygulanacak ELİSA testi ile yüksek oranda antikor üretimi yapan hibridomalar belirlenerek işaretlendi. Bununla beraber çalışmaların ilerleyen safhalarında kromozom kayıplarının neden olduğu apoptoz, metabolizma hızlanması veya yavaşlaması durumları sonucu değişen ELİSA test sonuçları ölçek büyötmeye sırasında tekrar edildi[13]. Genel olarak

kuyulardan alınan süpernatant ile yapılan ELİSA çalışması süpernatant seyreltmeden gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.11 ve 3.12 de HAT ve HT besiyerindeki hibridoma hücreleri görünmektedir.



Şekil 3.11 Hibridomalar 14. günün ardından mikroskopik olarak oldukça küçük hücreler olarak gözlenebilmektedir.



Şekil 3.12 HT besiyerinde apoptoza uğrayan myeloma hücreleri

4.1 Mcf-7 İnsan Dişisi Meme Kanseri Hücrelerinin Biyokütle Üretiminde De-Novo Plato-Ph Üretim Tekniği Sonuçları

Tüm Plato-pH tekniği için uygulama döngüsü 24 saatir. 4 döngü için 4 gün harcanmaktadır. 1 gün hücrelerin ilk ekimine ve tutunmasına, 1 gün ise biyokütlenin toplanmasına için harcanmakta olup 6 günlük sürede bir 75 cm² lik flasktan 4 kat lizat proteini artışı ile % 45 harcanan besiyerinde düşüş gerçekleşmez.

Tüm tez döneminde sadece 2 sefer maksimum 8 katlı kültür uygulaması yapıldı ve bunlar olası optimizasyon üst sınır kontrolü amaçlı deneysel uygulamalardı. Aşı hammaddesi olması için lizasyona gönderilen üretimlerde ise hücreler 4 seferden fazla Plato-pH uygulamasına maruz bırakılmadı.

Tüm tez döneminde haftada 4 adet 75 cm² lik flask kullanıldı, 3 adetinden hücreler toplanarak lizasyona tabi tutuldu ayda bir sefer 25 cm² lik flasktan taze inokülüm ekimi alındı. Toplanan hücrelerin yaklaşık %75'i 4 sefer Plato-pH tekniğine maruz bırakıldı.

4.2 Mcf-7 İnsan Dişisi Meme Kanseri Hücrelerinin Biyokütle Üretim Optimizasyonu Sonuçları

Ortalama üretim hızları yaklaşık olarak; DH10 Besiyeri için 25 cm² lik flakslarda ve 5 ml hacimde 1 milyon canlı hücre inokülümü durumunda üreme hızı $1.5 \cdot 10^5$ hücre/ml*flask*gün miktarında 5 milyon canlı hücre ekimi ile üreme hızı $6 \cdot 10^5$ hücre /ml*flaks*gün miktarında, 75 cm² lik flakslarda ise 10 ml besiyeri hacminde ise 4 milyon hücrelik inokülüm için $2 \cdot 10^5$ hücre/ml*flask*gün miktarında 8 milyon hücrelik inokülüm ise $8 \cdot 10^5$ hücre/ml*flask*gün üretim hızı gözlenmiştir. DH15 besiyeri için 25 cm² lik flakslarda ve 5 ml hacimde 1 milyon canlı hücre inokülümü durumunda üreme hızı $2 \cdot 10^5$ hücre/ml*flask*gün miktarında 5 milyon canlı hücre ekimi ile üreme hızı $7-8 \cdot 10^5$ hücre /ml*flaks*gün miktarında, 75 cm² lik flakslarda

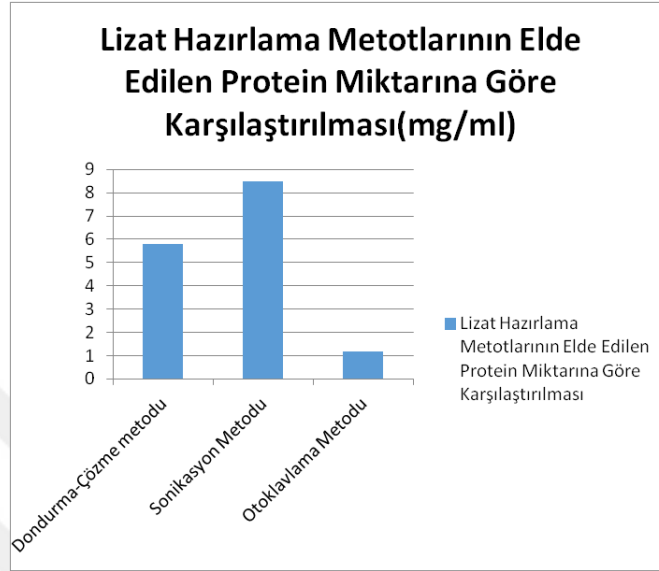
ise 10 ml besiyeri hacminde ise 4 milyon hücrelik inokülüm için $4 \cdot 10^5$ hücre/ml*flask*gün miktarında 8 milyon hücrelik inokülüm ise $8-9 \cdot 10^5$ hücre/ml*flask*gün üretim hızı gözlenmiştir. DH20 besiyeri için 25 cm² lik flasklarda ve 5 ml hacimde 1 milyon canlı hücre inokülümü durumunda üreme hızı $3-4 \cdot 10^5$ hücre/ml*flask*gün miktarında 5 milyon canlı hücre ekimi ile üreme hızı $9 \cdot 10^5$ hücre /ml*flaks*gün miktarında, 75 cm² lik flakslarda ise 10 ml besiyeri hacminde ise 4 milyon hücrelik inokülüm için $6 \cdot 10^5$ hücre/ml*flask*gün miktarında 8 milyon hücrelik inokülüm ise 10^6 hücre/ml*flask*gün üretim hızı gözlenmiştir. DH20 besiyerine %20 şartlandırılmış MCF-7 üst besiyeri yeri (DH20-24 saat süre şarlandırılmış) eklenerek hazırlanan DH20-MCF20-24 besiyeri için 25 cm² lik flasklarda ve 5 ml hacimde 1 milyon canlı hücre inokülümü durumunda üreme hızı $6 \cdot 10^5$ hücre/ml*flask*gün miktarında 5 milyon canlı hücre ekimi ile üreme hızı $10-11 \cdot 10^5$ hücre /ml*flaks*gün miktarında, 75 cm² lik flakslarda ise 10 ml besiyeri hacminde ise 4 milyon hücrelik inokülüm için $8 \cdot 10^5$ hücre/ml*flask*gün miktarında 8 milyon hücrelik inokülüm ise $3 \cdot 10^6$ hücre/ml*flask*gün üretim hızı gözlenmiştir.

Optimize normal MCF-7 biyokütlesi üretim rejimi ilk kriyobantan çıkarım sonrası DH10 besiyeri ile 4-5 gün süre ile üretim ardından 75 cm² lik flaska pasajlama, ardından ilk üretim sonrası 48-72 saate pasaj olarak ilk üretim döngüsü olarak bulunmuştur. Aşı hammaddesi için hazırlanan sürekli taze biyokütlenin üretim döngüsü için ise DH15 veya DH20 besiyerinde pasajı gelen 75 cm flakstan 4 eş parçaya bölünerek alınan inokülümlerin 4 ayrı 75 cm² flaksa ekilmesi ardından 3 adet 75 cm² lik flaskın pasajı yapılarak PBS ile stoklanıp lizasyon basamağına gönderilmiş kalan parça ise tekrar pasajlanarak döngüye alınmıştır. Hücrelerarası proteinlerin oranlarında çok fazla sapmaya neden olmamak adına sürekli üretim döngüsü maksimum 3 kez kullanılmış 3. döngüden sonra başlangıç döngüsüne gidilerek taze kültür alınmıştır.

4.3 Lizat Hazırlama Metotlarının Verimlerinin Elde Edilen Protein Miktarına Göre Karşılaştırılması

Lizat Hazırlama Metotları için yapılan protein kazanım verimi ölçümü, tek stok hücre pelleti çözülerek ve ardından üçe bölünerek hatalı ölçüm olasılığı düşürüldü.

Elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde grafiğe geçildi. Şekil 4.1 de görüldüğü üzere grafik göstermektedir ki antijen hazırlama metotlarından en verimli metot sonikasyon metodudur.



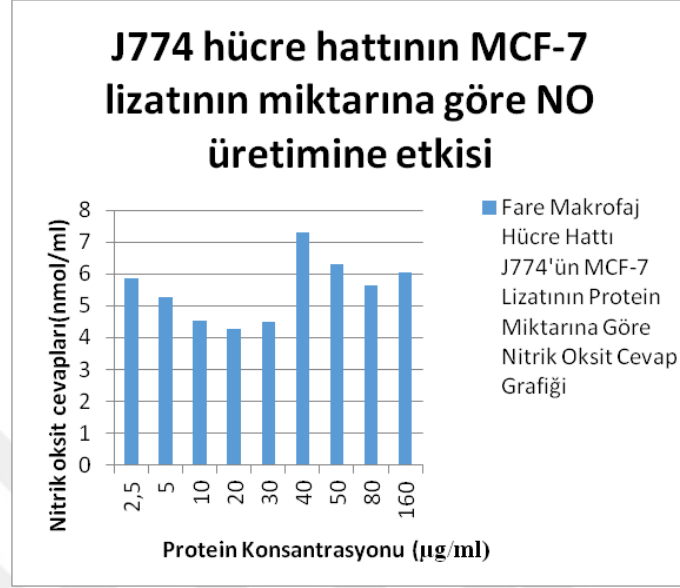
Şekil 4.1 Lizat hazırlama metotlarının elde edilen protein miktarına göre karşılaştırma grafiği

4.4 Antijen Miktarının Ve Adjuvanların Makrofaj Kültür Sistemindeki Nitrik Oksit Tepkisinin (İmmünojenitelerinin) Değerlendirilmesi

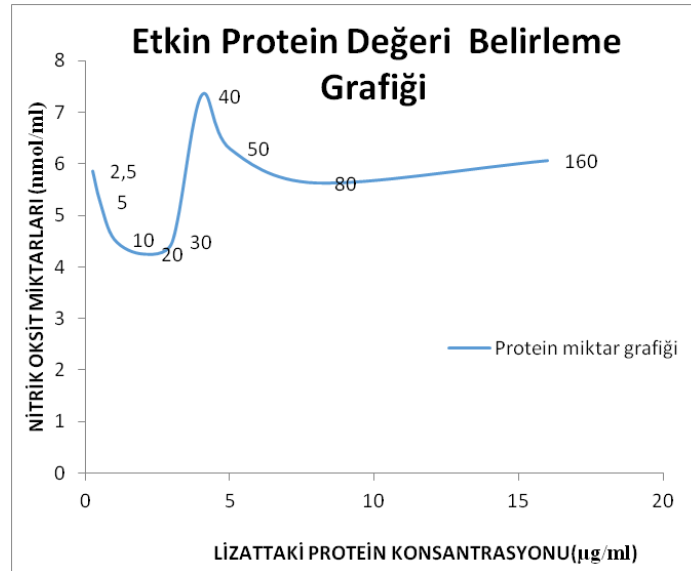
Hayvanlar aşılanmadan önce aşılanacak aşı formülasyonlarının değerlendirilmesi amacıyla makrofaj kültür sisteminde Nitrik oksit tepkileri ölçülmüştür. Şekil 4.2, 4.3, 4.4 de görüldüğü üzere sonuçlar göstermektedir ki 40 mikrogram/mililitre konsantrasyonunda makrofajların nitrik oksit üretiminde ani bir artış gerçekleşmiştir. Makropların otokrin yapısı göz önüne alındığında bu ani artışın düzgün bir sitokin salımı ile gösterildiği çıkarımı yapılabilmektedir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak Balb/c tipi farelerin 2.5 ml kan hacmi bulunmasından dolayı hayvan başına 100 mikrogram antijen uygulaması yapılmış, hayvanlardan antikor üretimi tespit edilmiş, arkasından hayvanlar sakrifiye edilerek dalakları toplanmış ve hibridomalar üretilmiştir.

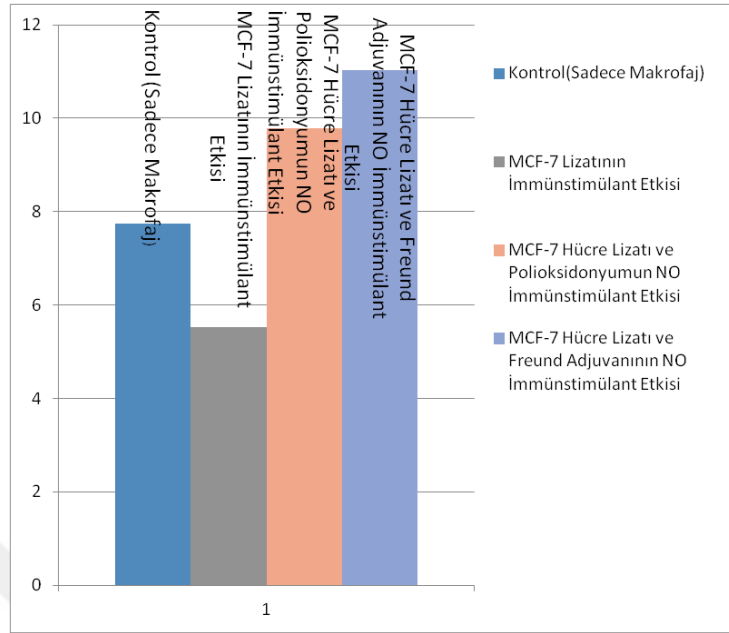
Ayrıca bu sonuç Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Öğrenci Kongresinde poster olarak juriye sunulmuştur.



Şekil 4.2 J774 hücre hattında MCF-7 hücre lizatına karşılık üretilen NO miktarını gösterir çubuk grafik



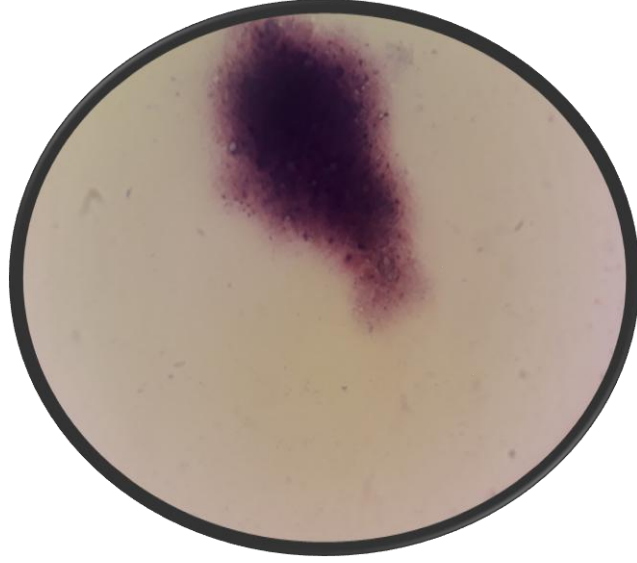
Şekil 4.3 J774 hücre hattında MCF-7 hücre lizatına karşılık üretilen NO miktarını gösterir çizgi grafik



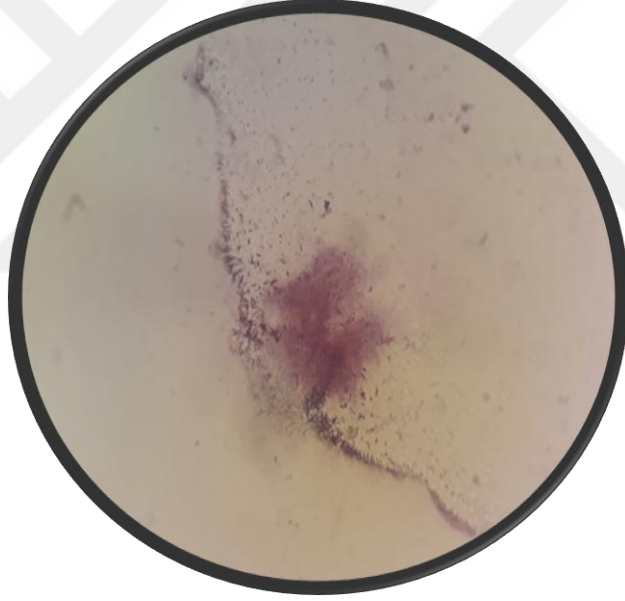
Şekil 4.4 MCF-7 lizatı birlikte kullanılan Adjuvanların NO üretimine etkisi (nmol/ml)

4.5 Lizatlardan Alınan Çökelti Hücre Artıklarının Giemza İle Boyanarak İçeriklerinin Mikroskopik Olarak Gözlemlenmesi

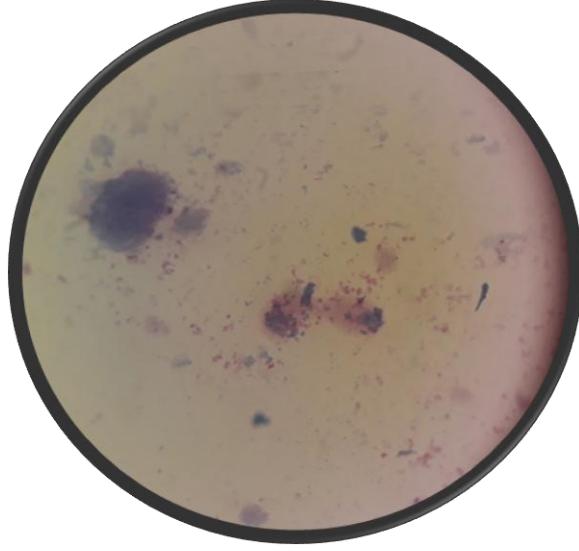
Sonikasyon,otoklavla ve dondurma çözme ile elde edilen antijenlerin dibinde kalan hücre debrislerinin görüntülerinde sadece sonikasyon ile hazırlanan antijenlerin artıklarında kromozoma benzer görünümler incelenmiştir. Kromozom gözlenmemesi olası poliklonal antikorların içerisinde otoimmün hastalıklarda genellikle yükselen anti-nükleotit antikor ve anti-çift iplik DNA antikorları varlığı gösteriyor olabilir.Bununla beraber sonikasyon metoduyla oluşturulmuş lizatta kromozom benzeri giemza boyasıyla boyanmamış yapılar gözlenmiştir. Bu yapılara kromozom benzeri yapılar olarak düşünülmüştür. (şekil 4.5, 4.6, 4.7)



Şekil 4.5 Otoklavlama sonrası pelletten alınan sürüntünün giemza boyanarak alınmış mikroskopi görüntüsü (100x)



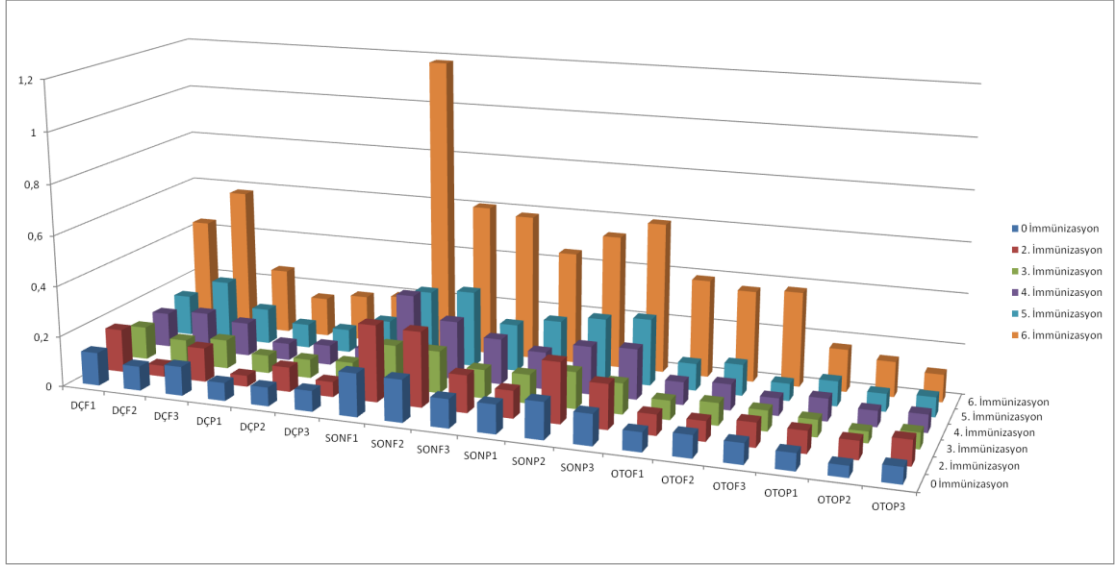
Şekil 4.6 Sonikasyon sonrası pelletten alınan sürüntünün giemza boyanarak alınmış mikroskopi görüntüsü (100x)



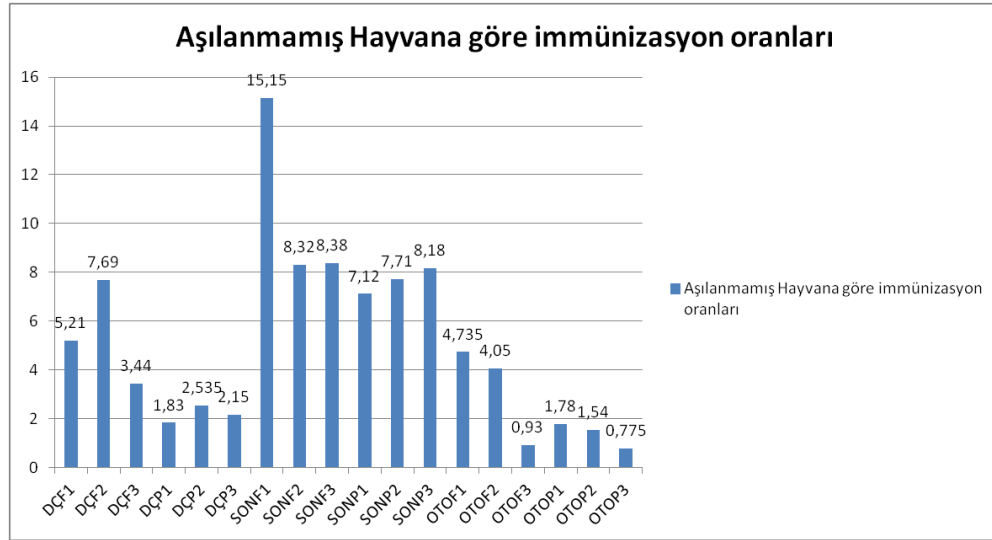
Şekil 4.7 Dondurma Çözdürme sonrası pelletten alınan sürüntünün giemza boyanarak alınmış mikroskopi görüntüsü (100x)

4.6 Balb/C Serumlarında Bulunan MCF-7 İnsan Dişi Meme Kanseri Hücre Antijenlerine Karşı Üretilmiş Antikor Miktarlarının Karşılaştırmalı İncelemeleri (Elisa Sonuçları)

Balb/c tipi aşılanmış farelerin ilk 6 aşılmasının ELİSA sonuçları göstermektedir ki sonikasyon grubu antijen ile hazırlanmış hem freund adjuvanlı hemde polioksidonyum polimer adjuvanlı immünizatların etkinliği diğerlerine nazaran oldukça yüksektir. Ayrıca komple freund grubu antijenin etkinliği polioksidonyum polimer adjuvanına nazaran çok küçük farklı yüksek olup freund adjuvanının kullanımında çıkan sağlık sorunları göz önüne alındığında polioksidonyum polimer adjuvanının oldukça iyi sonuçları olduğu söylenebilir.

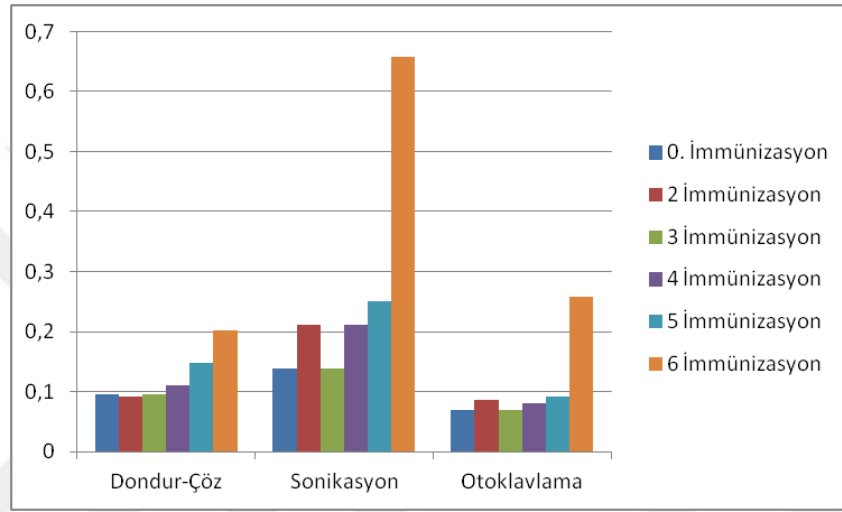


İlk 6 immünizasyon beraber değerlendirilğinde 6. immünizasyonda bir pik gözlenmiştir. Bu ani yükselme piki çoğu çalışmada olmakla beraber zamanı formülasyona göre değişebilmektedir. Şekil 4.8 de görüldüğü üzere elisa absorbans değerleri sonikasyon ile elde lizatların formülasyonları civarında yoğunlaşmıştır.



Şekil 4.9 Sakrafikasyon öncesi tüm hayvanların antikor ölçümleri

B lenfositleri elde etmek amacıyla gerçekleştirilen dalak izolasyonu için Balb/c tipi farenin sakrafikasyonu(öldürülmesi) gerekmektedir. Bu zaman aralığından sonra yürütülecek çalışmada köken aldığı canlının immün yapısından izole edileceği için izole edilen ver hibridoma oluşturulan B hücrelerindeki antikor tipleri, izotipleri gibi değerler fotoğraf karesi gibi değişmeden kalabilmektedir. Bu sebeble bu işlem öncesi immünizasyon değerleri kontrol edilmektedir. Şekil 4.9 de görüldüğü üzere absorbans değerleri immünize edilmemiş hayvana yapılan oranlama ile elde edilen grafik çalışmada yol gösterici olmuştur.

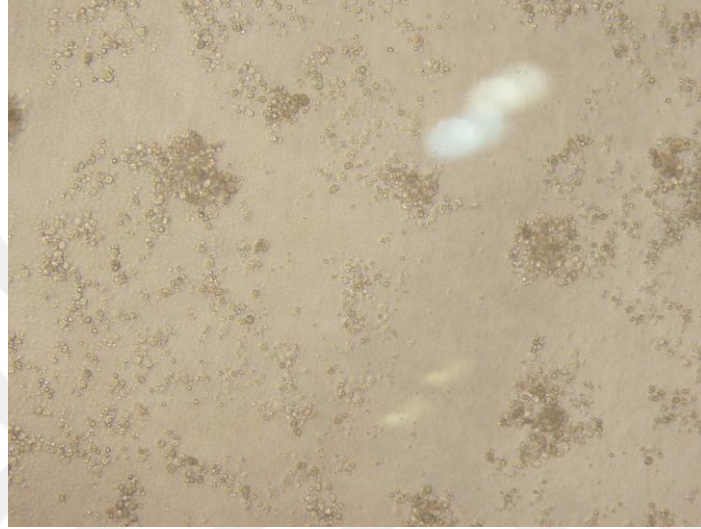


Şekil 4.10 Gruplardaki anti-MCF-7 antikor ELİSA sonuçlarının ortalamasının, grup içi ortalaması ile elde edilen immünizat formülasyonlarının sonuç grafiği (lizasyon metodunun göre gruplanmış)

İmmünizasyon için seçilen formülasyonlardaki lizat hazırlama yöntemlerinin ilk 6 immünizasyon için formülasyonların ortalama değerleri alınarak değerlendirilmiştir. Ortalama değerler adjuvan tipinden bağımsız sonuçlar elde edebilmek için uygulanmış ve küçük farklar olmasına rağmen besiyeri ile körlenmiş ayrıca immünize edilmemiş hayvanın absorbansı çıkarılarak elde edilen absorbans yükselmesi grafiği sonikasyonun lizat hazırlanmasındaki etkinliğini göstermektedir.(Şekil 4.10)

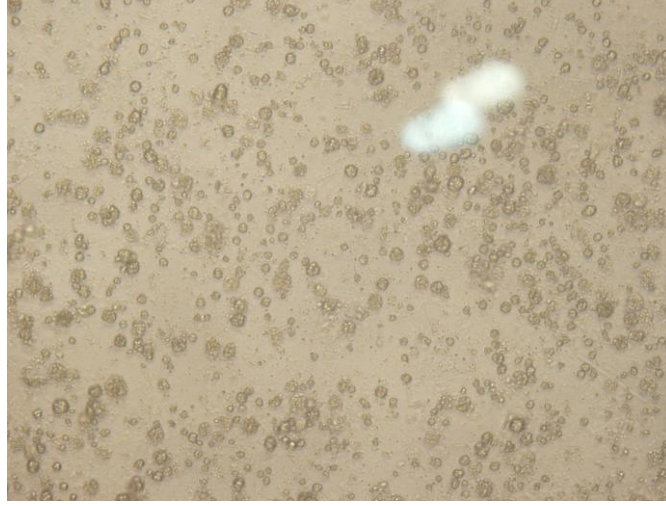
4.7 Füzyon Sonucu Elde Edilen Hibridomaların Gelişimlerinin Mikroskopik Görüntüleri

Füzyon sonunda 14.günün ardından düzenli olarak hibridomalar izlenmiş ve besiyerleri rejenere edilmiştir. Elde edilen veriler hibridomaların apoptaz yatkın bir hücre hattı olmasına rağmen düzenli bakılması durumunda bu yatkınlığın çok farkedilmediğidir.



Şekil 4.11 Hibridomaların 14. günün ardından ilk mikroskopi görüntüsü

Hibridomalar 14 günün sonunda hibrit olmayan hücrelerden yavaş yavaş ayrılmaya başlarlar. Parlak yuvarlak yapılar besiyeri yeni değiştirilmiş hibrit hücreleri göstermektedir(şekil 4.11)



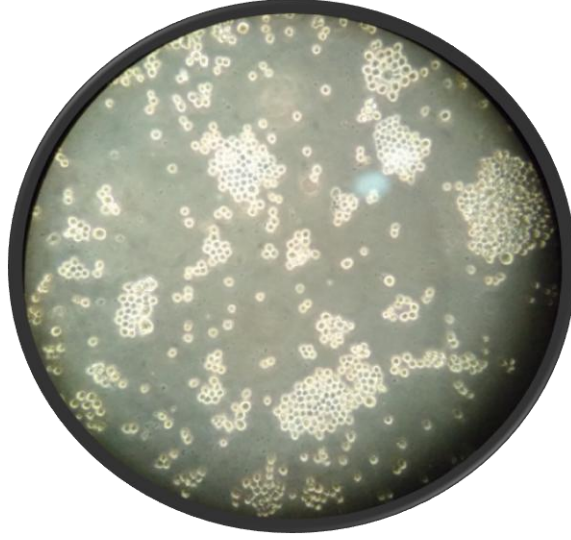
Şekil 4.12 Hibridomların füzyonun ardından 28.gündeki HAT besiyeriden HT Besiyerine geçiş sırasındaki görüntüsü

Hibridomalar 28 gün civarında hacimlerini arttıırırlar. Bu hacim artışı kısa süreli gerçekleşecek kültürün ilerleyen zamanında hacimleri zamanla büyüüp küçülecektir.(şekil 4.12)



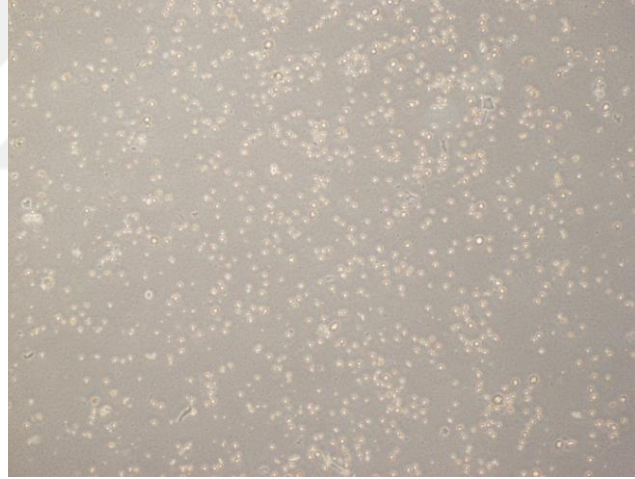
Şekil 4.13 Hibridoma bulunan kuyuların işaretlenmesi

Bir plakta aynı füzyon sonucu eş ayrılmış eşit hücre sayılı kuyucuklar bulunmasına rağmen sadece az bir bölümünde hibridoma varlığı gözlenir. (şekil 4.13)



Şekil 4.14 Hibridomların füzyonun ardından 48.günde invert mikroskopi görüntüsü(40X)

Canlı hibridomalar renkli ve yuvarlak olup koloni formasyonu şeklinde mikroskobdan gözlenirler. (şekil 4.14)

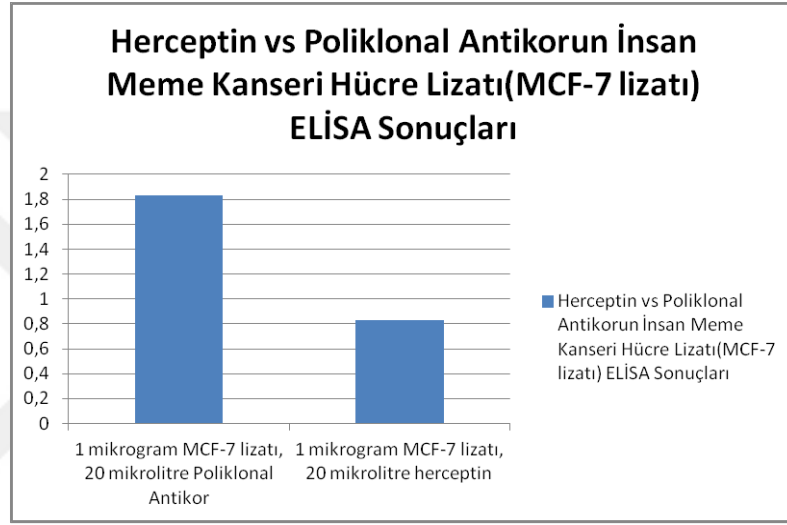


Şekil 4.15 Hibridomaların 96. günde hibridoma dondurma solüsyonunda dondurulmadan önceki mikroskopi görüntüleri (10X)

Koloni formasyonu dağıtılan hibridomalar destekleyecek yüzey bulamadıklarında degrede olurlar. Bununla beraber degrede olmayan hücrelerin şekilleri yuvarlağımsıdır. (Şekil 4.15)

4.8 Herceptin İle Tezde Üretilen Poliklonal Antikorlardan Aynı Miktarda Alınarak Yapılan Elisa Testinin Sonuçları

Herceptin monoklonal antikor olması sebebiyle tek bir epitop bölgesine içeren antikor içermektedir. Buna Karşılık poliklonal antikorlar içerdikleri poliklonal seradan dolayı birçok epitop bölgesini tanıyan parçalar içermesinden dolayı elisa testinde sonuçları yüksek çıkmaktadır. Bunun temel sebebi bağlanılacak bölgenin çarpışma alanında bulunma olasılığının çok bölgeyi hedefleyen poliklonal antikorlarda daha yüksek oluşudur.



Şekil 4.16 Herceptin ve tez kapsamında üretilen poliklonal antikorun karşılaştırmalı ELİSA Sonucu

Şekil 4.16 da görüldüğü üzere poliklonal antikorlar monoklonal antikorlara nazaran 2 katdan daha fazla etkinlik gösterebilirler. Bu etkinlik ELİSA sonuçlarına yansiyarak absorbansın yükselmesine neden olur. Bu absorbans yükselmesinin temel nedeni çoklu epitoplara bağlanan çoklu antikoru antijen yüzeyince bağlanabileceği daha fazla bölge bulmasına dolayısıyla antijene daha fazla sayıda bağlanmasına sebebiyet verir. Bu durumda antijen poliklonal antikorla sarılır ve bu sarılı yapıya birçok sekonder antikor bağlanarak çok yapısında bulunan çok sayıda enzimin ELİSA pleytinde yıkanmadan kalmasına neden olur. Bir çok enzim ise substratı renkli ürüne dönüştürerek absorbansta yükselmeye neden olur.

İmmünizat biyokütle üretiminde kullanılan ancak hibridoma teknolojisinin antijen üretiminde kullanımı bulunmayan pH modifikasyon tekniği (plato-ph üretim tekniği) kullanıldı ve sonuçlar göstermiştir ki %45 besiyeri ve kat üretim artışına neden olmuştur[34].

Literatürde lizasyon metotları olarak kullanılan fiziksel metotlardan sonikasyon, ısı lizasyon (otoklavlama) ve dondurma yöntemleri karşılaştırıldığında yazara göre farklılıklar olduğu gözlenmiş bu farklılıklara örnek olarak ise literatür derlemesi olarak yayınlanan yayın örnek gösterilebilir[35]. Bununla beraber sonik metotların lizasyon ve homojenizasyon sırasında lokalize sıcaklık artışlarının ürüne zarar vermesi ve dikkatli çalışması gerekmektedir. Azami dikkat gösterilmesi durumunda mantığa da uygun olduğu şekilde en yüksek lizat verimin sonikasyonda, yüksek verimin dondurma-çözdürme, düşük verimin ise ısı yöntemlerinden otoklavlama da olduğu rahatlıkla gözlenecektir.

Biyoproses işlemlerinde kullanılan plato tekniği(high inoculum) ile pH modifikasyonları biyokütle üretimini arttırmaya yönelik olarak sıkça kullanılmaktadır[34]. Hibrididoma teknolojisinde kullanılmayan bu tekniklerin immünizat biyokütlesi üretilmesi için de kullanılabileceği ve sonuçlarda etkileşime neden olmadığı gösterilmiştir.

8 adet poliklonal hibridoma tez sonucu olarak üretilmiş ve 10 adet immünize edilmiş Balb/c farenden elde edilen dalak dondurularak kriyobanta saklanmıştır.

Herceptin ile karşılaştırmalı yapılan ELİSA sonucu ile poliklonal antikorlarda yüksek çıkması gereken avidite değeri gösterilmiştir. Avidite oranı yaklaşık 2,25 kat olarak tespit edilmiştir.

Kanser immünizasyonu ve kanser hibridoması üretmek amacıyla gerçekleştirilen immünizasyonlarda sonikasyon yoluyla elde edilen antijenler ile polioksidonyum adjuvanı ve freund adjuvanının kullanımının immünizasyon sonucunu dondurma

Çözdürme ile elde edilen antijene nazaran %25 e yakın arttırdığı , otoklavla üretilen antijene nazaran ise 2 kata kadar yükselttiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında en etkili formülasyonun MSONF ve MSONP olduğu fakat Freund adjuvanının toksisitesi göz önüne alındığında MSONP nin etkili ve toksik olmayan formülasyon olduğu tespit edilmiştir.

Biyoproseslerde elde edilen bilgi ve deneyimin immünizasyon çalışmalarında denenerek uygulanması maliyetleri düşürüp verimi yükseltecektir. İmmünizasyon için gerekli antijenlerin biyokütle üretimleri sırasında mikrobiyal biyoproses , hayvan hücre biyoproses dallarındaki verilerin de incelenerek üretim sırasında kullanılmasını önerilmektedir.

Poliklonal antikorların aviditeleri daha yüksek olduğu için spesifikite sorunlarının aşılmasının ardından monoklonal antikorlar yerine poliklonal antikor kullanımının daha etkin olabileceği önerilmektedir.

İmmünizasyon çalışmalarında özellikle hibridoma geliştirebilmek için uygulanan immünizasyon çalışmalarında MSONP(Sonikasyon lizati-polioksidonyum adjuvanı) formülasyonunun kullanılmasını polioksidonyumun elde bulunmaması veya ulaşılamaması durumunda ise MSONF(Sonikasyon lizati-CFU) formülasyonunun kullanılması önerilmektedir. Bununla beraber CFU nun toksik olduğu unutulmamalıdır.

İmmünizasyon çalışmalarında hayvan çalışması basamağına başlanmadan önce Makrofajlar ile nitrik oksit üretiminin incelenmesinin önemli olduğu bu sonuçların immünizat formülasyonu için yol gösterici niteliğinden dolayı uygulanmasını önerilmektedir.

Tüm hayvan deneyi çalışmalarında hayvanın stres faktörünün önemli olduğu özellikle immünizasyon çalışmalarının bağışıklık sisteminin stresden kötü etkilendiği unutulmamalı mümkünse sertifika ve eğitim alınmasına rağmen daha uzun süre bu konuda çalışmış kişilerden hayvanda stres azaltılabilmesi için gerekecek yaklaşımların eğitiminin alınması önerilmektedir.

Hibridoma kriyoprezervasyonu öncesinde eldeki kriyoprotektanların başka hücreler ile kontrol edilmesi ve kontrol sonrasında hibridomaların dondurulması önemlidir.

Hibridoma teknolojisi için immünizasyon çalışmalarında hayvan sayılarının düşük tutulma alışkanlığı araştırmacılar arasında yaygın bir yaklaşım biçimi olarak ortaya çıkmaktadır. Her ihtimal düşünüldüğünde tek formülasyonun ve az sayıda hayvan kullanımının çalışmanın sonucuna direk etkisi bulunduğu göz ardı edilmemelidir. İdeal olarak hibridoma çalışmaların için minimum 3 formülasyon ve grup başına minimum 3 hayvanla çalışılması önerilmektedir.



- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* (2018) 68:394–424. 10.3322/caac.21492H. Guo and
- [2] GCO Number of New Cases in 2018, Both Sexes, All Ages. Available online
- [3] Tük,2017 Raporu
- [4] TC. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü,2015 verileri
- [5] Nardin, S., Mora, E., Varughese, F. M., D'Avanzo, F., Vachanaram, A. R., Rossi, V., ... & Gennari, A. (2020). Breast Cancer Survivorship, Quality of Life, and Late Toxicities. *Frontiers in Oncology*, 10.)
- [6] Özlem, B., Tamer, Y., Arzu, F., Tuba, Y., Nevzat, Y., (2011). “Anti-SalmonellaEnteritidis Antikorları Salgılayan Fare Hibridomalarının Geliştirilmesi ve Ön Karakterizasyonları” *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17: 667-670
- [7] Cho, Y.J., Lee, D.H., Kim, D.O., Min, W.K., Bong, K.T., Lee, G.G., Seo, J.H., (2005). “Production of a Monoclonal Antibody against Ochratoxin A and Its Application to Immunochromatographic Assay”, *J. Agric. Food Chem.*, 53:8447-8451
- [8] Volkova, O., Guselnikov, S., Mechetina, M., Chikaev, N., Baranov, K., Kulemzin, S., Reshetnikova, E., Najakshin, A. ve Taranin, A., (2014). “Development and Characterization of Domain-Specific Monoclonal Antibodies Produced Against Human SLAMF9.” DOI: 10.1089/mab.2014.0010
- [9] Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer*2017; 8(16):3131-3141
- [10] Yaman, S., (2012). Visseral Leishmaniasis Etmeni Karşı L.infantum Antijenine Karşı Hibridoma Teknolojisine Dayalı Monoklonal Antikor Üretilmesi, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- [11] Özyılmaz, Ö.A., (2014). Aşı Geliştirilmesinde Kullanılmak Üzere Çeşitli Yöntemlerle Elde Edilen L.infantum Antijenlerinin İn Vivo Oluşturduğu İmmün Yanıtın Karşılaştırılmalı Olarak İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- [12] Elçiçek, S., (2012). İmmunostimulan Polimerler İle Attenüe Edilmiş Leishmania Parazitlerinin Aşı Olarak Etkinliğinin İn Vitro ve İn Vivo İncelenmesi, Doktora Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- [13] Zorba A.P., (2015)Leishmania Tropica Parazitlerinden Elde Edilen İmmünojen Moleküllere Karşı Tanıda Kullanılmak Üzere Hibridoma Teknolojisine Dayalı Antikor Üretilmesi

- [14] Proteome profile of the MCF7 cancer cell line: a mass spectrometric evaluation , Hetal A. Sarvaiya, Jung H. Yoon² and Iulia M. Lazar , Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006;20: 3039–3055
- [15] Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. J Cancer 2017; 8(16):3131-3141
- [16] Comparison of Functional Proteomic Analyses of Human Breast Cancer Cell Lines T47D and MCF7, Juliette Adjo Aka^{1,2} and Sheng-Xiang Lin^{1,2,*} , February 2012 Volume 7 | Issue 2 | e31532 PLoS ONE
- [17] Miller, J., (1996). “The thymus in immunity”, Principles of Medical Biology, 6: 1-20
- [18] Paul, W. E., (1993). The Immune System: An Introduction, Fundamental Immunology 3rd Ed., W. E. Paul (Ed), Raven Press Ltd, New York
- [19] Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R. ve Roitt, I.M., (2011). Roitt's essential immunology, Wiley-Blackwell, New Jersey
- [20] Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. ve Shlomchik, M., (2005). Immunobiology: The Immune System in Health & Disease, Garland Science, New York
- [21] Abbas, A.K., Lichtman, A.H. ve Baker, D.L., (2004). Basic immunology: functions and disorders of the immune system, Saunders Company Ltd, Newberg
- [22] Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. ve Shlomchik, M., (2005). Immunobiology: The Immune System in Health & Disease, Garland Science, New York
- [23] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, P., (2002). Molecular biology of the cell, Garland Science, New York: 1227-1242
- [24] Lefranc, M.P. ve Lefranc, G., (2001). The immunoglobulin factsbook, Academic Press, California
- [25] Minn, A. ve Quintans, J., (1996). Designer antibodies, JAI Press, Greenwich
- [26] Walsh, G. ve Headon, D.R., (1994). Protein biotechnology, John Wiley & Sons, New Jersey
- [27] Kontermann, R., (2010). Antibody engineering, Springer Verlag, Berlin Heidelberg
- [28] Singh, A., Chaudhary, S., Agarwal, A. ve Verma, A.S., “Antibodies: Monoclonal and Polyclonal”. Chapter 15, Amity Institute of Biotechnology, Amity University Uttar Pradesh, Noida, U.P., India
- [29] Ethan, A. ve Lerner, B.A., (1981). “How to Make a Hybridoma”, Yale Journal of Biology and Medicine, 54: 387-402
- [30] Aguilar, J.C. ve Rodriguez, E.G., (2007). “Vaccine adjuvants revisited”, Vaccine, 25:3752-3762
- [31] Achal, P., Nicholas, M.V. ve Jerry, B.U., (2005). “Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants”, Nat. Med., 11: 63–S68

- [32] Bandelin Sonoplus ultrasonic homogenizers hd2070-hd2200 short operation instruction
- [33] Geltmeier, A., Rinner, B., Bade, D., Meditz, K., Witt, R., Bicker, U., ... & Maier, P. (2015). Characterization of dynamic behaviour of MCF7 and MCF10A cells in ultrasonic field using modal and harmonic analyses. PloS one, 10(8), e0134999
- [34] Vinci, V. A., & Parekh, S. R. (Eds.). (2002). Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial, and plant cells. Springer Science & Business Media
- [35] Shehadul Islam, M., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. R. (2017). A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. Micromachines, 8(3), 83. <https://doi.org/10.3390/mi8030083>



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgisi: atifcandemircioglu@gmail.com

Konferans Bildirileri

1. Yıldız Teknik Üniversitesi 2018 Yılı Öğrenci Kongresi- Hibridoma Teknolojisinde Kullanılmak Üzere İnsan Meme Kanseri Hücre Lizatı ile Farklı Adjuvanların Makrofaj Kültür Sisteminde İmmüностimulan Etkinliğinin İncelenmesi

Projeler

1. İnsan Meme Kanserinin Farklı Suşlarına Karşı Tanıya Yönelik Hibridoma Teknolojisine Dayalı Poliklonal Antikorların Üretilmesi(Nap,YTÜ- FBA-2018-3359)