

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(DOKTORA TEZİ)

KALP KRİZİNİN VE KALP YETMEZLİĞİNİN HIZLI TESPİTİ İÇİN
TANI KİTİ GELİŞTİRİLMESİ

Mehmet Özgün ÖZEN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat ELİBOL

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 612.01.00

Sunuş Tarihi : 18.06.2015

Bornova-İZMİR

2015

Mehmet Özgün ÖZEN tarafından Doktora tezi olarak sunulan “**Kalp Krizinin ve Kalp Yetmezliğinin Hızlı Tespiti için Tanı Kiti Geliştirilmesi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 18/06/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Murat ELİBOL

.....

Raportör Üye : Doç. Dr. Gaye ÖNGEN

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Kağan KILINÇ

.....

Üye : Doç. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hakan Ümit YILDIZ

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum **“Kalp Krizinin ve Kalp Yetmezliğinin Hızlı Tespiti için Tanı Kiti Geliştirilmesi”** başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

30/05/2015

İmzası



Adı-Soyadı

Mehmet Özgün ÖZEN

ÖZET**KALP KRİZİNİN VE KALP YETMEZLİĞİNİN HIZLI TESPİTİ İÇİN
TANI KİTİ GELİŞTİRİLMESİ****ÖZEN, Mehmet Özgün**

Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat ELİBOL

Haziran 2015, 156 sayfa

Kalp krizi ve kalp yetmezliğinin görülme sıklığı gelişmiş toplumlarda azalırken gelişmemiş ve gelişmekte olan toplumlarda artmaktadır. Bunun başlıca sebebi gelişmiş ülkelerdeki tanı ve tedavi sistemlerinin gelişmiş ve daha kolay ulaşılabilir durumda olmasıdır. Kalp krizi ve yetmezliğinin tanısında, yüksek isabet oranı ile tanının konması ve hastanın yönlendirileceği polikliniğin belirlenmesi, özellikle acil servisler başta olmak üzere tüm poliklinikler için önemlidir. Halka açık alanlarda, ambulans, otobüs, uçak gibi taşıtlarda ve hatta her bireyin cebinde bulunabilecek ve hızlı bir şekilde sonuç verebilen tanı kitlerinin varlığı doğru zamanda doğru müdahalenin yapılması ile sonuçlanıp hayatta kalım oranlarının iyileştirilmesini sağlayacaktır. Bu çalışmada *in vitro* immünizasyon ile elde edilen hibridoma klonları karakterize edildi ve ürettikleri anti-hFABP monoklonal antikorları ve anti-NT-proBNP monoklonal antikorları kullanılarak yanal akış prensibi ile çalışan tanı kitleri tasarlandı. Tasarlanan kitlerinin tespit limitleri PBS içinde hazırlanan protein çözeltileri için sırasıyla 10 ng/mL ve 1000 ng/mL olarak belirlendi. Tanı kitlerinin hassaslaştırılması adına lokalize yüzeysel plazmon salınımı (LSPR) prensibi ile çalışan, hem 96 gözlü mikrolept formatında hem de taşınabilir tek kullanımlık mikroakışkan çip formatında kitler tasarlandı. Elde edilen bu kitlerin hassasiyeti PBS'te ve insan serumunda hazırlanmış protein çözeltileri ile yapılan denemeler ile belirlendi ve sırasıyla PBS için de hFABP 1 pg/mL, NT-proBNP 100 pg/mL; serumda hFABP 10 pg/mL, NT-proBNP ise 1

pg/mL konsantrasyonlarda dahi tespit edilebildi. Taşınabilir tek kullanımlık mikroakışkan çipler için yapılan deneme ise kitlerin PBS içinde hazırlanan hFABP ve NT-proBNP çözeltilerini 10 pg/mL konsantrasyonlarda dahi tespit edebildiği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: *in vitro* immünizasyon, hFABP, NT-proBNP, yanal akış tanı kiti, lokalize yüzey plazmon rezonansı, taşınabilir, mikroakışkan

ABSTRACT**DEVELOPING RAPID TEST KITS FOR DETECTION OF HEART
ATTACK AND CONGESTIVE HEART FAILURE****OZEN, Mehmet Ozgun**

PhD. in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Murat ELIBOL

June 2015, 156 pages

The aim of this thesis was to obtain hybridoma cells that produce anti-hFABP and anti-NT-proBNP monoclonal antibodies to design sensitive diagnostic test kits for detection of heart attack and congestive heart failure. For this purpose, hybridoma clones that produce anti-hFABP and anti-NT-proBNP monoclonal antibodies were obtained by *in vitro* immunization methodology and characterized by growth kinetics, isotyping and HPLC. Lateral flow immunoassays (LFIA) and localized-surface plasmon resonance (LSPR)-based diagnostic test kits in the form of 96 well plate and microfluidic chips were designed by using produced antibodies in combination of commercial ones. The detection limits of the lateral flow immunoassays (LFIA) were determined as 10 ng/mL and 1000 ng/mL for hFABP and NT-proBNP in PBS, respectively. The sensitivity of the LSPR-based diagnostic kits in both 96 well plate and microfluidic chip forms were found to be dramatically increased compared to that of LFIA. 96 well plate LSPR-based diagnostic kits was found to be able to detect 1 pg/mL hFABP in PBS and 10 pg/mL hFABP in serum while detecting 100 pg/mL NT-proBNP in PBS and 1 pg/mL NT-proBNP in serum. The sensitivity of the single-use microfluidic chips was determined as 10 pg/mL for hFABP and NT-proBNP in PBS. Consequently, LFIA based assays are easy to produce, portable, requires no reading system with less sensitivity. On the other hand, LSPR based systems are far more sensitive than developed LFIA kits (10 pg/mL). The only disadvantage of LSPR-based kits is the need of a spectrophotometer for analysis. But with the production of portable LSPR-based microfluidic chips this disadvantage is not going to be concern with high sensitive, easy to use portable set-ups.

Keywords: *In vitro* immunization, hFABP, NT-proBNP, lateral flow immunoassay, localized surface plasmon resonance, portable, microfluidic, chip

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca sadece bir danışman olarak değil, arkadaş ve aile büyüğü olarak ihtiyacım olduğunda bana bilgi ve aidiyet duygusunu tattıran Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN'a, her zaman yanımda olan Prof. Dr. Murat ELİBOL'a, katkılarından ötürü Yrd.Doç.Dr. Kağan KILINÇ'a ve bu çalışmaların yapılmasına imkan sağlayan Prof. Dr. Fazilet VARDAR SUKAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Biyomühendislik Bölümümüzde ve EgeReact ekibinde bana ve çalışmalarına katkı sağlayan tüm akademisyen, öğretim görevlisi, araştırma görevlisi büyüklerime ve arkadaşlarıma, ihtiyacım olduğunda desteklerini esirgemeyen Ar.Gör.Dr. Emek ASLAN'a, Ar.Gör.Dr. Işık ÇOBAN'a, Yrd.Doç.Dr. İsmal Hakkı AKGÜN'e, Hilal Betül AKKALE'ye, Ar.Gör. Şeyma ÇOĞAN TAŞDEMİR'e, yüksek lisans öğrencileri Merve ÇALIŞKAN'a, Ilgın KIMIZ'a ve Öznur ÖZASLAN'a, HPLC analizleri için Ar.Gör.Dr. Tuğba KESKİN GÜNDOĞDU'ya ve Prof.Dr. Nuri AZBAR'a, SDS-PAGE ve protein miktar analizleri için Ar.Gör.Dr. Bilge Debeleç BÜTÜNER ve Prof.Dr. Kemal Sami KORMAZ'a, LSPR ve mikroakışkan sistemler konusunda bana kattıklarından ötürü Dr. Fatih İNCİ ve Doç. Dr. Utkan DEMİRCİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi ve tezimle bağlantılı çalışmalarını maddi olarak destekleyen Türklab Tıbbi Malzemeler San. Tic. A.Ş. ve SK Teknoloji Ar&Ge Ltd. Şti.'ye, T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı SANTEZ Birimi'ne, TÜBİTAK BİDEB 2214-A, TÜBİTAK BİDEB 2241-A Proje Koordinatörlükleri'ne, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Fonu'na, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Araştırma Fonu'na ve Yüksek Öğretim Kurumu Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı'na teşekkür ederim.

Destekleri ve hayatımdaki yeri paha biçilmez İmran ÖZER'e ve aileme teşekkür ederim.

Mehmet Özgün ÖZEN

İzmir – 2015

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii
1 GİRİŞ.....	1
2 LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Kalp Krizi ve Kalp Yetmezliği.....	3
2.1.1 Biyobelirteçler.....	4
2.1.2 Tanı	4
2.1.3 Kalp Yetmezliği'nin Tanısında Biyobelirteçler	10
2.2 Antikorlar, İmmün Sistem ve Edinilmiş Bağışıklık.....	11
2.3 Monoklonal Antikor (mAb) Teknolojisi.....	20
2.3.1 İmmünizasyon.....	21
2.3.2 Miyelomaların Seçimi ve Hazırlanması.....	22
2.3.3 Füzyon.....	24
2.4 Yanal Akış İmmünolojik Tesler	42
2.4.1 LFIAYapısı ve Çalışma Prensipleri	43
2.4.2 Lokalize Yüzey Plazmon Resonansı (LSPR)	47
3 MATERYAL VE YÖNTEM.....	50
3.1 Materyal.....	50
3.1.1 Balb/c ırkı fareler.....	50
3.1.2 Hücre Hatları	50
3.1.3 Besi Ortamları.....	51
3.1.4 Kitler.....	54
3.1.5 Kimyasallar.....	54

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.6 Proteinler ve mAb'lar.....	56
3.1.7 Sarf Malzemeler.....	57
3.1.8 Konsantrasyon Ekipmanları.....	57
3.1.9 Tanı Kiti Üretimi.....	57
3.1.10 Cihazlar.....	58
3.2 Yöntem.....	63
3.2.1 EL-4 Hücre Kültürü ve Şartlandırma Ortamı Eldesi.....	63
3.2.2 Ag8 Miyeloma Hücre Kültürleri.....	64
3.2.3 <i>In vitro</i> immünizasyon.....	65
3.2.4 Dolaylı ELISA.....	67
3.2.5 Kimyasal (PEG ile) Füzyon.....	67
3.2.6 Klonlama (Sınırlayıcı Dilüsyon Yöntemi).....	68
3.2.7 Hibridomaların Eldesi ve Karakterizasyonu.....	69
3.2.8 Hibridoma ve mAb Üretimleri.....	75
3.2.9 mAb'ların Saflaştırılması.....	76
3.2.10 Tanı Kitlerinin Oluşturulması.....	80
4 BULGULAR VE TARTIŞMA.....	87
4.1 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	87
4.1.1 EL-4 Hücre Kültürleri ve IL-2.....	87
4.1.2 Ag8 Miyeloma Hücre Kültürleri.....	90
4.1.3 <i>In vitro</i> İmmünizasyon ve Dolaylı ELISA.....	91
4.1.4 Hibridoma Kültürleri.....	93
4.1.5 Biyoreaktör Üretimleri.....	112
4.2 mAb'ların Konsantrasyonu ve Saflaştırılması.....	116
4.3 SDS-PAGE.....	117
4.4 Tanı Kiti Eldesi.....	118
4.4.1 LFIA Kitleri.....	118
4.4.2 LSPR Kitleri.....	120
4.4.3 LSPR Temelli Mikroakışkan Çiplerin Denenmesi.....	127

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

5 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	128
TEŞEKKÜR.....	132
KAYNAKLAR DİZİNİ	134
ÖZGEÇMİŞ	155

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Farelerden elde edilen antikorların <i>in vivo</i> 'da yarattığı sorunları gidermek adına kullanılan kimerik, insansılaştırılmış ve insan antikorları üretilmeye ve kullanılmaya başlanmıştır.....	17
2.2 DNA sentez yol izleri, a. Pürin sentezi, b. Pirimidin sentezi 'Salvage yol izi'.	23
2.3 Dolaylı ELISA yönteminin çalışma prensibini gösterir illüstrasyon (www.abcam.com).	28
2.4 'Hollow fiber' biyoreaktör sistemi (FiberCell Systems, 2015).	34
2.5 Akışkanlaştırılmış yatak hayvan hücre kültürü biyoreaktör sistemi (Jenkins, 1999).	35
2.6 10 – 100 L çalışma hacmine sahip 'Wave' biyoreaktör (GE Healthcare, Life Sciences, 2015).	36
2.7 İki farklı firma tarafından piyasaya sunulan çalkalamalı biyoreaktörler, A. Sartorius Stedim Biotech GmbH, B. Kühne AG.....	38
2.8 LFIA konponentleri ve çalışma prensibi.....	44
2.9 Gümüş nanopartiküller etrafındaki elektrik alan ve elektron bulutunun rezonansı (Kelly et al., 2003)	49
3.1 <i>In vitro</i> immünizasyon basamakları.....	66
3.2 İmmünize olmuş lenfositler ile Ag8 miyeloma hücrelerinin PEG ile füzyonu.....	68
3.3 1 L'lik çalışma hacminde 1F114F63PH8 kesikli üretimi.	76
3.4 VivaSpin20 filtration tubes (GE HealthCare, Almanya)	77
3.5 Orta ölçekli konsantrasyon işlemleri için kurulan çapraz akış filtrasyon sistemi.	78
3.6 Diyaliz işleminin öncesinde ve sonrasında örneğin görüntüsü.	79
3.7 I gM mAb saflaştırma kolonu ve toplanan fraksiyonlar.	80

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.8 LFIA test yönteminin komponentleri ve akış yönü.	81
3.9 İnşa edilen LSPR tespit yüzeylerinin şematik gösterimi.	84
3.10 Üretilen mikroakışkan LSPR çiplerini oluşturan komponentler.....	85
3.11 Tek kullanımlık μ -akışkan LSPR çipleri ve taşınabilir spektrofotometre sistemi.	85
4.1 EL-4 hücrelerinin PMA içermeyen besi ortamında 11 günlük kültürünü gösterir üreme eğrisi.	88
4.2 Farklı PMA konsantrasyonları için üretilen IL-2 miktarı.	89
4.3 Farklı PMA konsantrasyonlarında kültürde değişen canlı ve ölü hücre sayısı.	89
4.4 PMA yokluğunda (A) ve 10 ng/mL PMA varlığında (B) EL-4 hücre morfolojisindeki değişim.	90
4.5 Ag8 miyeloma hücre hattı üreme eğrisi.	91
4.6 İmmünizasyon ve ELISA için farklı hFABP konsantrasyonlarının kullanıldığı optimizasyon çalışmasından alınan sonuçlar.....	92
4.7 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarına ait statik kültür, kesikli işletme modunda canlı hücre sayısı.	98
4.8 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarına ait statik kültür, yarı kesikli işletme modundaki canlı hücre sayısı.....	99
4.9 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarına ait statik kültür, kesikli işletme modunda hücre canlılık değerleri.	100
4.10 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarına ait statik kültür, yarı kesikli işletme modunda hücre canlılık değerleri.	100

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.11 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının statik kültürde kesikli işletme modunda mAb üretimi.	101
4.12 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının statik kültürde yarı kesikli işletme modunda mAb üretimi.....	102
4.13 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının statik kültürde yarı kesikli işletme modunda kümülatif mAb üretimi.	102
4.14 1F114F63PG11 klonunun statik kültürde kesikli işletme modunda glikoz tüketimi ve laktik asit salımı.....	103
4.16 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının kromozom sayısının belirlendiği metafaz plakları.	105
4.17 Triptik soy brot (A, 1F114F63PG11; B, 1F114F63PH8); tiyoglikolat brot (C, 1F114F63PG11; D, 1F114F63PH8); Sabouroud dekstroz agar (E, 1F114F63PG11; F, 1F114F63PG11).....	106
4.18 2G7C3A35D12 klonuna ait statik kültürlerdeki kesikil ve yarı kesikli işletme modundaki üreme kinetiği.	107
4.19 2G7C3A35D12 klonuna ait statik kültürdeki kesikli ve yarı kesikli işletme modundaki hücre canlılık değerleri.....	108
4.20 2G7C3A35D12 klonuna ait statik kültürdeki kesikli ve yarı kesikli işletme modunda antikor titresini gösteren absorbans değerleri (@450 nm).....	108
4.21 2G7C3A35D12 klonuna ait statik kültürdeki kesikli işletme modunda antikor glikoz tüketimi ve laktik asit salımı.	109
4.22 2G7C3A35D12 klonuna ait metafaz plakları.	110
4.23 Triptik soy brot (A), tiyoglikolat brot (B), Sabouroud dekstroz agar (C).....	111

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.24 RPMI 1640 besi ortamında 1 L’de yüzeyel havalandırma ile yapılan anti-hFABP mAb’u üretimi, hücre sayısının zamanla değişimi.	112
4.25 %50 ISF-1 ortamına adapte edilen 1F114F63PH8 klonuna ait; A. Zamana bağlı hücre konsantrasyonu; B.Zamana bağlı toplam hücre sayısı, C. Zamana bağlı % canlılık değerleri.	116
4.26 %50 ISF-1 ortamına adapte olan 1F114F63PH8 klonunun biyoreaktörde fedbatch modunda üretimi.	116
4.27 Safılaştırılan mAb’lara ait dolaylı ELISA sonuçlarının antikör miktarına çevrilmesi için; A.Protein standart eğrisi, B.Dolaylı ELISA sonuçlarının protein miktarına çevrimini sağlayacak ‘mAb Kalibrasyon Eğrisi’, C. Elüsyon ve bağlanma tamponları ile toplanan fraksiyonlardaki mAb miktarı, D. RPMI 1640 ve %50 ISF-1 ile yapılan üretimlerden alınan mAb miktarı sonuçları.	117
4.28 Elde edilen hibridomalar tarafından üretilen anti-hFABP monoklonal antikörlerinin SDS-PAGE görüntüsü.....	118
4.29 Farklı konsantrasyonlar hFABP proteini içeren ve içermeyen PBS çözeltisi ile yapılan performans denemesi.	119
4.30 Farklı konsantrasyonlar NT-proBNP proteini içeren ve içermeyen PBS çözeltisi ile yapılan performans denemesi.	120
4.31 96 gözlü mikroleptte yapılan 1 µg/mL hFABP tespiti.....	121
4.32 LSPR yüzeylerde PBS içinde hazırlanmış hFABP (0, 100 fg/mL – 1 µg/mL) tespiti, A. hFABP konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi kalibrasyon eğrisi, B. LSPR yüzeylerde hFABP tespit limiti, C. Yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.....	122

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.33 LSPR yüzeylerde insan serumu içinde hazırlanmış hFABP (0, 100 fg/mL – 1 µg/mL) tespiti, A. hFABP konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi kalibrasyon eğrisi, B. LSPR yüzeylerde hFABP tespit limiti, C. Yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği. 123
- 4.34 LSPR yüzeylerde PBS içinde hazırlanmış NT-proBNP (0, 100 fg/mL – 1 µg/mL) tespiti, A. NT-proBNP konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi kalibrasyon eğrisi, B. LSPR yüzeylerde NT-proBNP tespit limiti, C. Yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği. 125
- 4.35 LSPR yüzeylerde insan serumu içinde hazırlanmış NT-proBNP (0, 100 fg/mL – 1 µg/mL) tespiti, A. NT-proBNP konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi kalibrasyon eğrisi, B. LSPR yüzeylerde NT-proBNP tespit limiti, C. Yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği. 126
- 4.36 Taşınabilir spektrofotometre sistemi ile değerlendirilmiş LSPR temelli mikroakışkan çiplere ait sonuçlar. 127

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Füzyon sonrası seçilimin sağlanmasında kullanılan HAT ortamının etkisi. mekanizması	24
2.2 Farklı değişkenler ile yapılan füzyon çalışmaları.....	26
2.3 İmmünglobülin izotipleri ve özellikleri (Dreamstime, 2015).....	31
2.4 mAb saflaştırma sürecinde kullanılacak birim işlemler (Liu et al., 2010). ..	40
2.5 Araştırma, geliştirme ve ticari üretilere kullanılan farklı belirteçler.	46
3.1 Ayırma jeli içeriği.....	72
3.2 Ön ayırma jeli içeriği.....	73
3.3 Yürütme tamponunun içeriği.....	73
3.4 Kuyucuklara eklenecek örnek ve çöktürme solüsyonu miktarları.....	73
3.5 Boyama solüsyonunun içeriği.	73
3.6 Boya uzaklaştırma solüsyonunun içeriği.....	74
4.1 hFABP'a karşı yapılan immünizasyon sonrasında hibridoma üremesi belirlenen gözlerden alınan örneklerle ait dolaylı ELISA sonuçları (ABS @450 nm).	93
4.2 Klonlanan 1F11 hibridomalardan elde edilen klonların absorbens değerleri (@450 nm).....	95
4.3 Klonlanan 2G7 hibridoma hattından elde edilen klonların absorbens değerleri (@450 nm).....	96
4.4 NT-proBNP'e karşı antikor ürettiği belirlenen klonların dolaylı ELISA değerleri (@450 nm).....	96
4.5 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının ürettiği mAb'ların izotipleri.	104

ÇİZELGELER DİZİNİ**Çizelge****Sayfa**

4.62G7C3A35D12 hibridoma klonunun ürettiği antikorun alt sınıfı.	
.....	109

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
ACS	Akut kronore sendrom
CBAG	Koroner arter by-pas greftleme
CDR	Complementarity determining regions
CK	Kreatin kinaz
CK-MB ve CK-MM	Kreatin kinaz izoenzimleri
DHS	Donör at serumu
EBV	Epstein-Barr virüsü
ECG	Elektrokardiyografik
EL-4	Timosit hücreleri
FBS	Fötal sığır serumu
hFABP	Kalp tipi yağ asidi bağlayıcı protein
HIV	İnsan immünyetmezlik virüsü
HRP	Horse radish peroxidase
IMA	İskemi ile modifiye albümin
KLH	Keyhole limpet haemocyanin
LDH	Laktat dehidrogenaz
LFIA	Yanal akışlı immün test
LSPR	Lokalize yüzey plasmon rezonansı
MBP	Mannan bağlanma proteinin
MDP	Asertilmuramil-L-alanin-D-izoglutamin
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
MMP-9	Matriks metalloproteinaz 9
MPO	Miyeloperoksidaz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devamı)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
NSTM-ACS ST	Segment artışının gözlenmediği
NT-proBNP	Beyin natriüretik peptit aminoterminal ucu
PAPP-A	Gebeliğe bağlı plazma proteini-A
PCI	Perkütanöz koroner girişim
PMA	Forbol miristat asetat
RIA	Radyo immün analiz
SPR	Yüzey plazmon rezonans
ST-STEMI	ST segment artışının gözleendiği ACS
UA SF	Anstabil anjin

1 GİRİŞ

Kalp krizi geçirmiş ya da kalp yetmezliğine bireylerin sayısı gelişmiş ülkelerde hızla azalırken gelişmekte olan ülkelerde artmaya devam etmektedir. Gelişmiş ülkelerde tedavi ve ilaçlara ulaşım bireyler için daha kolay iken gelişmekte olan ülkelerde eğitim seviyesi, yaşam tarzı ve standartları, tedavi ve ilaçlara ulaşım gibi değişkenler sebebiyle bu rahatsızlıklar görülmeye devam etmekte ve görölme sıklığı artmaktadır. Kalp krizi genellikle akut gelişen bir durum iken kalp yetmezliği uzun dönem bireylerin tedavi ve hayat tarzlarındaki değişiklikler ile birlikte yaşamaya devam edebilmelerini sağlamaktadır. Kalp krizinde göğüs ağrısı, sol kolun uyuşması ve EKG de görülen Q ve P dalgalarındaki değişimler birey ve doktorlar için birer belirteç olsa da bu belirteçlerin gözlenmediği kalp krizi vakaları da bulunmaktadır. Bu gibi vakalarda bireyin durumunu doğru değerlendirmek, hastanede ise doğru polikliniğe yönlendirmek, herhangi bir sağlık kuruluşunda değil ise bu kuruluşlara hızlı bir şekilde sevkini sağlamak adına biyobelirteçler diğer hastalıklarda olduğu gibi sıklıkla kullanılmaktadır.

Kalp krizinde hasar gören kalp kası hücrelerinden salınan biyobelirteçler önemli bir yere sahip iken bazılarının kalp kası hücrelerine spesifik olmaması tanı da tek başına kullanılmalarını engellemektedir. Kalp kirizinde ise bireylerin ırk, cinsiyet, yaş, kullandıkları ilaçlar ve böbrek fonksiyonu gibi değişkenler kalp yetmezliği ile ilgili biyobelirteçlerin popülasyondaki sınır değerlerinde dalgalanmalara sebep olabilmektedir. Bu sebeple çoklu biyobelirteç taramaları tanıda her gün daha önemli bir yere gelmektedir.

Yanal akışlı test sistemleri 40 yıldan uzun süredir başta gebeliğin tespiti olmak üzere bir çok alanda çeşitli biyobelirteçlerin, bakterilerin, molekül ve hormonun tespitinde kullanılmıştır. Kullanım kolaylığı, uzmanlık ve ekstra bir okuucuya ihtiyaç duymaması, maliyeti ve kolay ulaşılabilirliği sebebiyle bir çok alanda kendine yer bulan sistemler hassasiyetleri ELISA sistemlerine yakın olarak belirtilmesine rağmen sonuçları ‘var’ ‘yok’ olarak vermekte, herhangi bir kantitatif sonuç vermemektedir.

Yüzey plazmon rezonansı (SPR) altın yüzeylerde tutunmuş moleküller sebebiyle yüzeyden yansıyan ışığın yansıma açısındaki değişimlerin izlenerek kaydedildiği bir metottur. Lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) ise metalik nanopartiküllerin üzerlerinde bulunan elektron bulutlarının üzerlerine gönderilen ışığı sönümlmelerine bağlı olarak değişimlerin incelendiği bir metottur. LSPR yüzeyler üzerine tanıda kullanılabilecek özellikler inşa edilerek farklı moleküllerin, bakterilerin, virüslerin, protein ve antikorların tespitinde kullanılmıştır. Bu şekilde geliştirilen yüzeyler ile pikogram/mL konsantrasyonu sahip proteinlerin ve 100 kopya/mL seviyesindeki virüslerin tespitinin mümkün olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Doktora tezi kapsamında yapılan bu çalışmada yanal akış prensibi ile çalışan tanı kitlerinin üretimi için kalp tipi yağ asidi bağlayıcı protein (hFABP) ve beyin natriüretik peptidin amino terminal ucu (NT-proBNP) hedef protein olarak kullanıldı ve *in vitro* immünizasyon metodu kullanılarak bu proteinlere afinitesi olan monoklonal antikorları üreten hibridoma hücreleri elde edildi. Daha sonra bu antikorlar saflaştırıldı ve tanı kitlerinin üretiminde kullanıldı.

Daha hassas tanı kitlerinin elde edilebilmesi için lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) yöntemi kullanılmıştır. Hem 96 gözlü mikroyet formatında hem de taşıyabilir tek kullanımlık mikroyet çip formatında üretilen kitler yine taşıyabilir spektrofotometre sistemi ile analiz edilmiş ve her iki yönteminde taşıyabilir sistemler olarak hem bireysel hemde profesyonel kullanımda yüksek hassasiyete sahip düşük maliyetli testlerin üretilip uzmanlık gerektirmeyen sistemler ile kullanılıp bireylerin nerede olursa olsun tanı almasını sağlayabileceği gösterildi.

2 LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Kalp Krizi ve Kalp Yetmezliği

Akut koroner sendrom (ACS), akut miyokardiyal enfarktüs (AMI) ve anstabil anjin (UA)'i kapsayan, koroner kan akışındaki tutarsız ya da tahmin edilemeyen azalmaya bağlı miyokardiyal iskemiye neden olan ölçülebilen miyokardiyal nekroz ile karakterize bir şemsiyedir. ACS, görülme anındaki elektrokardiyografik (ECG) değişikliklere bağlı olarak ST segment artışının gözlemlendiği (ST-STEMI) ve ST segment artışının gözlenmediği (NSTM-ACS) olarak ikiye ayrılmaktadır.

Bir çok bireyde ACS oluşması için önemli noktalar, enfarktüsün görüldüğü arterdeki bir aterosklerotik plağın yırtılarak kısmen ya da tamamen bir oklüzyon oluşturması ya da koroner ağaçtaki distal embolizasyonlardır (Fuster et al., 1992). Fakat ACS, plak yırtılmasının ve trombozun olmadığı, miyokardiyumdaki arz-talep dengesinin bozulduğu; düşük kan basıncı, anemi, enfeksiyon ve taşiaritmi gibi durumlarda da oluşabilmektedir (Thygesen et al., 2012).

Gelişmiş ülkelerde yaşam tarzlarının değişmesine bağlı olarak düşen sigara kullanım oranı ve serum kolesterol seviyeleri gibi etmenlerden ötürü ACS olgularında azalma görülmektedir (Wilhelmsen et al., 2008, Vamos et al., 2009, Schmidt et al., 2012). Buna rağmen AMI görülen hastalarda STEMI görülme oranı azalırken, NSTEMI oranı yükselmekte ve NSTEMI daha yaygın hale gelmektedir (Rogers et al., 2008). STEMI görülme sıklığının düşmesi ölüm oranlarının da azalmasını beraberinde getirmiştir. Örneğin İsveç'te 1997'de STEMI'yi takip eden standart 30-gün ölüm oranı %12,9 iken bu rakam 2007'de %6,3'e düşmüştür. Bu düşüşte önemli role sahip olan etmenler ise revaskülarizasyon (perkütanöz koroner girişim, PCI ve koroner arter by-pas greftleme, CBAG), anti-platelet ve anti-koagulan ajanlar, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri ve statinlerin daha fazla kullanılmasıdır (Jernberg et al., 2011).

2.1.1 Biyobelirteçler

Biyobelirteçlerin serum ya da plazmadaki değerlerinin ölçülmesi tanı, teşhis ve uygun tedavinin seçilmesi açısından önemli olabilmektedir. Bu amaçla bir çok biyobelirteç tavisye edilmiş ve değerlendirilmiştir (Chan and Ng, 2010, Sirica, 2010) ACS’de gözlenebilecek biyobelirteçler yansıttıkları farklı patofizyolojik değişikliğe bağlı olarak gruplandırılabilir.

2.1.2 Tanı

1954’e kadar, AMI tanısında kullanılabilecek bir biyobelirteç olarak glutamik okzaloasetik transaminaz enzimine kadar bir bilgi bulunmamaktadır (Karmen et al., 1954) ve klinik tanı hastanın hikayesine ve ECG’de Q dalgalarının oluşmasına bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Günümüzde ise miyokardiyal hasarda artan seviyelerine bağlı olarak kardiyak troponin I (cTnI) ya da kardiyak troponin T (cTnT) AMI tanısında kullanılmaktadır (Thygesen et al., 2012). AMI teşhisinde kullanılabilecek uygun bir biyobelirteç şu özelliklere sahip olmalıdır (Adams et al., 1993; Lindahl, 2013):

- Miyokardiyumda yüksek konsantrasyonda bulunmalıdır,
- Normal ya da patolojik durumlarda diğer dokularda bulunmamalıdır,
- Normal koşullarda plazmada tespit edilmemelidir,
- Miyokardiyumda görülecek geri dönüşümsüz hasarlarda salınmalıdır,
- Miyokardiyal hasarla doğru orantılı olarak salınmalıdır,
- Plazmaya hızlı bir şekilde salınarak tanı için uygun bir zaman aralığında plazmada bulunmalıdır,
- Tespiti için hızlı, güvenilir ve düşük maliyetli yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlamalıdır.

Kardiyak troponinler bu kriterlerden bir çoğuna sahip olsa da hepsine sahip değildirler. Yüksek hassasiyetli troponin testleri analitik hassasiyeti ilk nesil testlere nazaran 3 mertebe arttırsa da troponinlerin normal koşullarda da plazmada tespit edilebilir seviyede olduğunu göstermişlerdir (Apple et al, 2012). Diğer taraftan kardiyak troponinlerin sadece geri dönüşümsüz miyokardiyal hasardan sonra salındığı inancı da ortadan kaldırılmıştır (Mousavi et al., 2009). UA teşhisi konan hastalarda ilk jenerasyon testlerde gözlenen plazma troponin seviyelerindeki dalgalanma, hassas testler ile tespit edilebilmiş ve miyokardiyal hasardan iz taşımayan gerçek UA'nın gerçekliğinin sorgulanmasına sebep olmuştur (Wilson et al., 2009, Venge et al., 2009). Ayrıca yüksek hassasiyete sahip troponin testleri ile erken biyobelirteçleri olarak adlandırılan miyogloblin ve kalp tipi yağ asidi bağlayıcı protein ile beraber salınmaya başlandığı gösterilmiştir. Bu sebeple kardiyak troponinler ile birlikte incelendiğinde klinik olarak anlamlı sonuçlar elde edilmesini sağlayacak biyobelirteçlerin seçilmesi zor bir durum haline gelmiştir (Eggers et al., 2004, Eggers et al., 2012). Fakat AMI geçiren hastaların %10-20 kadarının ilk müdahale esnasında artmayan troponin seviyelerine sahip olması, AMI teşhisini doğrulamak için en az 3'er saatlik aralar ile yapılacak seri ölçümleri gerekli kılmıştır (Thygesen et al., 2012).

ACS'nin özellikle de AMI'nin tanısı için yerine getirilmemiş ve hastaya ilk müdahalede kesin bir sonuç sağlayacak klinik bir ihtiyaç bulunmaktadır. Bu sebeple ACS'nin diğer önemli patofizyolojik etkileri olan; iskemi, koagülasyon sisteminin aktivasyonu ya da plak yırtılmasını temsil edecek ilave biyobelirteçlerin kullanılması daha mantıklı olacaktır. İskemi için kullanılacak bir biyobelirteç olması adına iskemi ile modifiye albümin (IMA)'ın kullanıldığı ilk çalışmalarda olumlu sonuçlar alınsa da, sonuçlar klinik olarak ikna edici ve tutarlı olmamıştır (Lin et al., 2012). IMA testi FDA tarafından onaylansa da klinikte kullanılmamaktadır. AMI'nin erken tanısında plak yırtılmasının tespiti için değerlendirilen birden fazla biyobelirtecin kullanıldığı bir çalışmada; miyeloperoksidaz (MPO), matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9), gebeliğe bağlı plazma proteini-A (PAPP-A), CD40L ve D-dimer'in sadece cTnT'den elde edilen verilere klinik olarak anlamlı bilgiler ekmediği belirtilmiştir (McCann et al., 2008). ACS'nin tanısı için kullanılabilecek yeni biyobelirteçlere ait verilerin

derlendiği sistematik bir çalışmada, tek bir biyobelirtecın enflamasyonu, plak yırtılmasını, koagülasyon sisteminin veya trombositlerin aktive olmasını yansıtamayacağını, kardiyak troponinler ile birlikte kullanıldığında dahi yeterli bilginin elde edilemeyeceği belirtilmiştir. Kalp tipi yağ asidi bağlayıcı protein (h-FABP), B tipi natriüretik peptit (BNP), BNP amino terminal ucu, (NT-proBNP), copeptin (vazopresin prohormonu karboksil ucu) gibi biyobelirteçlerin kullanıldığı çalışmalarda ise farklı sonuçlar alınmıştır (Eggers et al., 2004, Eggers et al., 2012). ACS hastalarının tanısında ve risk değerlendirmesinde troponinin tek başına kullanımasının yerine çoklu biyobelirteç stratejisinin kullanılmasının önemli katkı sağlayacağı bir çok çalışmada tavsiye edilmiştir (Laterza et al., 2002). Araştırmacılar için önemli bir engel tanıyı ve tedaviyi yönlendirecek aday biyobelirteçlerin belirlenmesi olacaktır (Kilic et al., 2009).

35 yıl kadar önce kardiyak nekrozun tespitinde, laktat dehidrogenaz (LDH), kreatin kinaz (CK) ve kreatin kinaz izoenzimleri (CK-MB ve CK-MM) kullanılmaktaydı. 47 hasta ile yapılan çalışmada CK-MB'nin serumdaki en yüksek konsantrasyonuna ulaşma zamanı 6 saat, CK için 18 saat ve LDH için ise 48 saat olarak belirlenmiştir (Lott and Stang, 1980). Uzmanlar tarafından klinik öyküsü, fiziksel ve EKG bulguları ile destekleniş CK-MB testleri miyokardiyal hasarın belirlenmesi için altın standart değerindeydi. Fakat teknolojik gelişmelere bağlı olarak testlerin artan hassasiyeti sayesinde CK-MB değerlerinin iskelet kas hasarında da dolaşıma salındığı tespit edilmiştir. İskelet kas dokusunun vücutta kalp kas dokusunda daha fazla olması sebebiyle genellikle kas hasarının dolaşımda daha büyük artışlara sebep olduğu gösterilmiştir (Saenger and Jaffe, 2008).

Troponin kardiyak hasarın tespiti için sıkça kullanılan bir biyobelirteç olmuştur. Troponin kompleksi (troponin I, T, C) aktin filamenti üzerinde tropomiyozin boyunca bulunurlar. Troponin proteininin miyokardiyal dokuya özgün cTnI ve cTnT izoformları bulunmaktadır (Sacks, 1999).

Erken tanı; hastaların triyajından başlayarak hastanede uygun birimlere yönlendirilmeleri ve gereksinim duyan hastalara daha agresif tedavi yöntemlerinin uygulanmasını sağlamaktadır. Proteinlerin ve enzimlerin büyüklüğü ve hücre

içindeki dağılımları miyokardiyal hasardan sonra kan dolaşımına ne zaman katılacaklarını belirlemektedir. Sitoplazmada bulunan küçük proteinler ilk önce, çekirdek ve mitokondriyal proteinler daha sonra, yapısal proteinler ise en son kan akışına karışmaktadırlar. Yapısal proteinlerin en son görülmesinin sebebi hücreler arası matriksin degradasyonun en geç gerçekleşmesidir (Ramasamy, 2011).

FABP'ler uzun zincirli yağ asitlerine geri dönüşümlü ve kovalent olmayan bağlarla bağlanan hücre içi proteinlerdir. FABP'ler görece küçük yapıya sahip (15kDa), yağ asidi metabolizmasının olduğu dokuların bulunduğu; kalp, karaciğer ve bağırsak gibi organlarda bulunurlar. Bulundukları dokuya özelleşmiş 9 farklı FABP bulunmaktadır (Glaz et al., 1996). Kalp tipi FABP (h-FABP) tespitinde kullanılan testler Pelsers ve ekibi tarafından incelenmiştir (Pelsers et al., 2005). İlk olarak poliklonal antikorlar, h-FABP'in biyobelirteç olarak tespit edilmesinde kullanılmışsa da, monoklonal antikorların kullanıldığı bir ve iki adımlı ELISA sistemler ardından gelmiştir (Ohkaru et al., 1995, Wodzig et al., 1997). Chan ve ekibi farklı h-FABP immunosensörlerinin karakteristiklerini incelemiştir. Farklı ülkelerden 4 farklı hastanenin katıldığı çok merkezli bir çalışmada, h-FABP'in bir plazma biyobelirteci olarak AMI'nin erken tanısında kullanılıp kullanılmayacağı ELISA ile araştırılmıştır (Chan et al., 2005). Başka bir prototip immunosensör de aynı çok merkezli çalışma mantığı ile test edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde h-FABP'in klinik uygulamalar için faydalı olacağı ortaya konmuştur (Key et al, 1999). Kalitatif yanıl akışlı test sistemleri de yatak başı testler olarak kullanılmıştır (Chan et al., 2003). Tek basamaklı bir h-FABP testi olan "CardioDetect" geliştirilmiştir. Bu test dört ana elementten oluşmaktadır; örnek membranı (kan ayırıcı), konjugat membranı, nitroselüloz bir membran ve emici membran. h-FABP'a özgül fare-monoklonal antikor nitroselüloz membranındaki test bölgesine immobilize edilmiştir. Anti-fare IgG antikor ise aynı membranındaki kontrol bölgesine immobilize edilmiştir. Bir diğer anti-h-FABP monoklonal antikor ise dedektör antikor olarak altın nanopartiküller ile konjuge edilip konjugat membranına emdirilmiştir. Örnek membranına damlatılan örnek içindeki h-FABP proteini altın nanopartiküller konjuge edilmiş anti-h-FABP monoklonal antikorları ile kompleks oluşturur ve bu kompleks test çizgisine immobilize edilmiş monoklonal antikorlar tarafından tutulur, biriken

altın nanopartikülü miktarına bağlı olarak pembe-kırmızı renkli test çizgisini oluşturur. Fazla miktarda bulunan dedektör antikoru ise kontrol çizgisindeki antikorlar tarafından tutulur ve iki çizgide oluşarak testin doğru bir şekilde çalıştığını gösterir. Sadece kontrol bölgesinde çizgi oluşması ise örnekte tespit limitinin altında h-FABP bulunduğunu ya da hiç bulunmadığını göstermektedir. Acil servise 4 saatten daha kısa süre içinde göğüs ağrısı şikayetine bağlı olarak kalp krizi şüphesiyle başvuran 64 hastada uygulanan testlerde; “CardioDetect”’in hassasiyeti %62,5, özgüllüğü ise %100 olarak bulunurken, cTnI’nin hassasiyeti %50, özgüllüğü ise %80 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada cTnI’nin referans limiti 0,05 ng/mL olarak bulunmuştur. Göğüs ağrısını takip eden 4 saat – 12 saat aralığındaki hastalarda ise “CardioDetect” ve cTnI’nin hassasiyeti %100 olarak bulunmuştur (Alhashemi, 2006). h-FABP, MI’den 5-6 saat sonra plazmada en yüksek seviyesine ulaşırken 36 saat sonra normal seviyeye döndüğünden erken bir biyobelirteç olarak önerilmektedir (Glatz et al., 1994). Pelsers ve ekibinin derlediği sonuçlara göre hasta kabulde alınan kan örnekleri incelendiğinde h-FABP’den elde edilen alıcı işletme eğrisi ‘*receiver operatin curve*’ grafiklerinde miyoglobine nazaran istatistiksel olarak daha geniş bir alan kapladığı görülmüştür (Pelsers et al, 2005). Özgüllük ve hassasiyet değerlerinin verilmediği çalışmalarda h-FABP, miyoglobinden daha iyi ya da benzer sonuçlar vermiştir. Okamoto ve ekibi, 140 hastada h-FABP, CK-MB ve miyoglobinin, semptomlar görüldükten 12 saat sonra örnek alarak yaptıkları çalışmada, bu biyobelirteçlerin hassasiyet ve özgüllük değerlerini sırasıyla; %92,9 ve %67,3; %88,6 ve %57,1; %18,6 ve %98 olarak bulmuşlardır (Okamoto et al., 2000). 664 hasta ile yapılan ileri çalışmada ise kardiyoloji polikliniğine 4 saatten daha kısa süre için akut iskemik tip göğüs ağrısı ile başvuran bireylerden başvuruda alınan kan örneklerinde h-FABP’nin hassasiyet değerlerinin cTnT’den (%73’e karşı %55) istatistiksel olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir (McCann et al., 2008). h-FABP’nin MI’ün tespitinin yanında prognostik değeri de az sayıdaki çalışma ile ortaya konmuştur. ACS şüphesi ile takip edilen hastalarda miyokardiyal nekroz biyobelirteçleri olan h-FABP, cTnI ve CK-MB’nin kandaki oranları göğüs ağrısından sonraki 12 saat boyunca takip edilmiştir. Artan h-FABP değerlerinin 1 yıllık takip çalışması sonrasında en iyi tahmin biyobelirteci olduğu belirlenmiştir (Erlikh et al., 2005).

Hasta başvurusundan taburcu edilinceye kadar olan süreçte takip edilen h-FABP seviyeleri kronik kalp krizi hastalarında hastadaki kardiyak durumun takip edilmesi için uygun olduğu gösterilmiştir. h-FABP konsantrasyonu kalıcı olarak artan hastalarda, kalp kası ölümü ve kardiyak sorunlardan tekrar hastaneye başvurma'nın daha yüksek oranda gerçekleştiği belirlenmiştir (Nizeki et al., 2008). Birçok çalışmada h-FABP'in ACS sonrası uzun dönem mortalitenin tahmininde kullanılabileceği ve diğer klinik risk tahminleyicilerden ve biyobelirteçlerden etkilenmediği gösterilmiştir. Bir başka çalışma da yüksek riske sahip hastaların troponin negatif olmalarına rağmen uzun dönem h-FABP seviyelerinin yaş ve kreatin seviyelerinden bağımsız olarak takip edilebileceği bildirilmiştir (Viswanathan et al., 2010).

Troponin proteinine özgül ilk test geliştirdikleri anti-cTnI poliklonal antikorlarını kullanan Cummins ve ekibi tarafından bildirilmiştir (Cummins et al., 1987). Monoklonal antikorların kullanıldığı çalışmalar ise cTnI ve cTnT testleri takip eden yıllarda sunulmuştur (Katus et al., 1992, Bodor et al., 1992). Daha sonra ise testler ticari olarak ulaşılabilir ve otomatize bir hal almıştır. İlk cTnT test iskelet kasındaki TnT ile çapraz reaksiyon vermesine rağmen sonraki çalışmalarda daha özgül cTnT testleri geliştirilmiştir. Patent korunması sebebiyle şu an sadece tek bir ticari cTnT testi piyasada bulunmaktayken (Roche Diagnostics, Almanya), çok sayıda cTnI testi kullanıma sunulmuştur. Her testin kendine özgü bir metodu bulunması ve kullanılan antikorlar ile sistem elementlerindeki farklılıklar sebebiyle testlerin minimum tespit değerleri farklıdır ve karşılaştırılmaları doğru değildir. Ayrıca AMI'den sonra serumda dolaşan troponin degradasyon ürünleri farklı antikorlar tarafından farklı oranda yakalandıkları için testlerin özgüllük değerleri de değişebilmektedir. Geliştirilen referans standard materyali olan SRM 2921 sayesinde testlerin karşılaştırılmasındaki varyasyon belirli bir değere kadar indirilebilmiştir (Gaze and Collinson, 2008). Farklı nesillerde cTnT ve cTnI testi analitik ve klinik çalışmalar ile valide edilmiştir.

AMI şüphesiyle başvuran hastalara uygulanan ilk jenerasyon cTnT testi, CK-MB kütle tespiti ile aynı tanısal hassaslığa sahip olmasıyla birlikte, CK-MB enzim aktivitesi testlerinden daha etkin sonuçlar vermiştir (Katus et al., 1991). Kardiyak troponinlerin ölçümü enfarkt bölgesinin büyüklüğünün tahmininde

faydalı olduğu karşılaştırılmalı manyetik rezonans görüntülemeler ile kanıtlanmıştır (Giannitsis et al, 2008). Kardiyak troponin testlerinin klinik uygulamaları evrilmeye devam etmektedir. Bu evrimin büyük bir parçası ticari olarak ulaşabilir testlerin analitik performanslarının geliştirilmesi sayesinde olmuştur. Günümüzde, her test için profesyonel kurumlar tarafından MI tanısında kullanılmak üzere tek bir karar limiti ve referans popülasyonun %99'unu temsil eden bir risk kademelendirmesi tavsiye edilmektedir (Morrow et al., 2007).

2.1.3 Kalp Yetmezliği'nin Tanısında Biyobelirteçler

Natriüretik peptitler, kardiyak stres ve ventriküler fonksiyon bozukluk durumlarına karşı gelişen sistemik tepkinin bir sonucu olarak kalpten salınan vazoaktif hormonlardır. Sentezlenmelerinden sonra öncül proBNP (108 aminoasit) korin enzimiyle aktif BNP (aminoasit 77-108) hormonu ve inaktif NT-proBNP (aminoasit 1-76) fragmanına parçalanır. HPLC ile yapılan ayırmada plazmada bu üç peptidin de bulunduğu gösterilmiştir. BNP'nin N terminal aminoasitleri enzimatik parçalanma sonrasında hızlı bir şekilde kana karışmaktadır. Farklı mekanizmalar ile dolaşımdan uzaklaştırıldıkları için BNP'nin yarı ömrü NT-proBNP'den daha kısadır (yaklaşık 3 saat). NT-proBNP'nin uzaklaştırılması için vücudun kullandığı temel yol renal atılım iken, BNP'de böbrekler, çevresel dokular ve plazmadaki parçalanmanın da sorumlu olduğu birden fazla uzaklaştırma mekanizması çalışmaktadır (Buchner et al., 2009). Böbrekler aracılığı ile olan atılımın yavaşlaması kandaki BNP ve NT-proBNP seviyesini arttırmaktadır (Van Kimmenade et al., 2009). Srisawasdi ve ekibi NT-proBNP ile BNP arasındaki oranın eksponansiyel olarak artmasının böbreklerdeki fonksiyon bozukluğu sebebiyle olabileceğini ve bu peptitlerin tanıda kullanılma potansiyelinde unutulmaması gereken bir nokta olduğunu vurgulamışlardır (Srisawasdi et al., 2010). Bir çok yazar tarafından BNP ve NT-proBNP'nin tanıda kullanılması ile nefes darlığı şikayeti bulunan hastalar için akut kalp yetmezliğinin elenebileceği gösterilmiştir (McCullough et al., 2002, Januzzi et al., 2005). Sonuçların sağlıklı olarak değerlendirilebilmesi için örneklem içindeki bireylerden belirli aralıklarda alınacak örnekler arasındaki

varyasyonun belirlenmesi gerekmektedir. Örneklem içi varyasyonlara bakıldığında sağlıklı bireylerdeki sonuçların anlamlı olabilmesi için NT-proBNP değerinin en az %26 artması gerektiği belirlenmiştir (D'Eril et al., 2003). STEMI şikayeti ile başvuran hastalarda yapılan tek bir NT-proBNP analizi, sonraki 40 ay boyunca hastaların ölüm oranlarının belirlenmesini sağlamıştır. Yaş, diyabet, konjestif kalp yetmezliği, ECG değişimleri, cTnT gibi bir çok değişkenin olduğu bir çalışmada, NT-proBNP tek başına önemli bir tahminleyici biyobelirteç olarak rol oynamıştır (Jernberg et al., 2002). Bir başka çalışmada ise, NT-proBNP seviyelerinin yaş, yüksek tansiyon, diyabet, sigara kullanımı ile orantılı olarak arttığını, böbrek fonksiyonu ve kilo ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (Timoteo et al., 2009). ACS'den şüphelenilen fakat cTnT değeri 0,01 ng/mL'den daha düşük olduğu için düşük risk grubunda bulunan hastaların başvurusunda alınan NT-proBNP ölçümleri yüksek risk grubunda bulunan bireylerin belirlenmesini sağlamıştır (Weber et al., 2008). ACS hastalarına ait NT-proBNP temel seviyelerinin 24 saat boyunca ölçüldüğü bir çalışmada, obezite hastalarında düşük NT-proBNP değerlerine rastlanırken konjestif kalp yetmezliğine sahip hastalarda yüksek NT-proBNP temel seviyesi gözlenmiştir. 24 saat boyunca yapılan ölçümlerin NT-proBNP'nin prognostik değerini geliştirmediği belirtilmiştir (Kwan et al., 2007). Diğer çalışmalarda da tavsiye edildiği üzere, risk tahmini için NT-proBNP kullanılacağına, temel NT-proBNP seviyesinin belirlenmesinden sonraki 24-96 saat aralığındaki ikinci bir ölçüm (Norgaard et al., 2008), 72. saatte alınacak bir başka örnek (Heeschen, et al., 2004) ile temel seviye karşılaştırıldığında değerli prognostik bir veri elde edilebilmektedir. Buchner ve ekibi, başarılı bir şekilde reperfüze edilen STEMI ve NSTEMI hastalarında düşen NT-proBNP seviyesinin temel seviye, 24 saat ve 96 saat olarak yapılacak seri ölçümler ile yeniden reperfüzyonun gerekliliğinin belirlenebildiğini göstermişlerdir (Buchner et al., 2010).

2.2 Antikorlar, İmmün Sistem ve Edinilmiş Bağışıklık

İmmün sistem vücutta bulunan birçok farklı doku ve organdan oluşan bir sistemdir. Lenfositler ise vücuttaki beyaz kan hücrelerinin %20 – 40'ını

oluşturmaktadır. Ayrıca, edinilmiş bağışıklığın yanında immünolojik tepkilerin çeşitliliği, özgüllüğü, hafızası ve tanınmada da görevlidir. Lenfositler kanda sürekli bulunmalarının yanında lenf düğümlerinde de bulunurlar. Doku boşluğuna, lenfoit organlara da ulaşarak bağışıklık sistemine bütünlük sağlarlar. Edinilmiş bağışıklık hümmoral ve hücre temelli tepkilerden oluşmaktadır. Hümmoral tepkiler antijen ile etkileşen B hücrelerin sonuç olarak çoğalmasını ve farklılaşarak antikor salgılayan plazma hücrelerine dönüşmesini içermektedir (Akshaya et al., 2008).

Antikorlar hümmoral bağışıklığın efektörleri olarak antijenlere karşı üretilen yapılardır; 1939 yılında A. Tiselius ve E.A. Kabat tarafından tanımlanmış serum globülinleridir (Tiselius and Kabat, 1939). B lenfositleri tarafından membrana bağımlı olarak üretilirler ve bu membran bağımlı moleküller, antijenler için B hücre reseptörleri olarak özellik gösterirler. Antijenler B hücrelere bağımlı antikora bağlandıklarında B hücre tepkileri başlar (hümmoral bağışıklığın tanınma aşaması). Antikorlar ayrıca stimüle edilmiş B hücreler tarafından da salınarak antijenlerin elimine edilmesini sağlayan mekanizmaları tetikler. Poliklonal antikorlar (pAb) farklı antijenik epitoplara bağlanma yeteneğindeki heterojen antijen karışımı olarak adlandırılırken, monoklonal antikorlar (mAb) tamamı tek bir epitopu hedefleyen, aynı klondan gelen tek tip antikorları ifade etmektedirler (Liddell and Cryer, 1993).

2.2.1.1 Poliklonal Antikorlar (pAb) ve Monoklonal Antikorlar (mAb)

Poliklonal salgısal tepki aynı antijendeki farklı epitoplara karşı farklı özgüllükte, farklı sınıfa ait farklı afiniteye sahip antikorlar ile patojene karşı etkili bir savunma mekanizması geliştirilir. Poliklonal tepkide yer alan antikor çeşitliliğinden ötürü poliklonal anti-serumun tekrar üretilmesi zordur. Bu sebeple üretilen antikorlar, hayvandan hayvana ya da aynı hayvanda farklı zamanlarda alınan örneklerde dahi seviye ve kalite olarak değişebilmektedir.

Köhler ve Milstein tarafından geliştirilen hibridoma teknolojisi ile büyük miktarlarda ve yüksek özgüllüğe sahip monoklonal antikorların üretimini önü açılmıştır (Köhler and Milstein, 1975). Monoklonal antikorlar tek bir B hücre

klonu tarafından üretilmekte olup kompleks bir antijendeki tek bir epitopa özgüdürler. Tüm monoklonal antikor molekülleri aminoasit sekansı ve bağlanma özellikleri olarak aynı olmasının yanında ölümsüzlük özelliği kazanan hibridomalar tarafından sürekli olarak üretilirler. Tek bir epitopu hedeflediklerinden çapraz reaksiyonlar da en aza indirgenmektedir (Köhler and Milstein, 1975).

2.2.1.2 mAb'ların Avantajları ve Dezavantajları

- Kararlı bir yapı gösteren antikorlar için sınırsız kaynak oluşturması,
- Saflaştırılamamış antijenler için özgül antikorların elde edilebilir olması,
- Afinite ve özgüllüğün çalışmaya uyabilecek şekilde seçilebilmesi,
- Bir antijenin belirli ya da birden fazla epitopu için antikorların elde edilebilir olması,
- Büyük ölçekte immünreaktifliği etkilemeden saflaştırmanın mümkün olması,
- İmmün testlerde özgül olmayan bağlanmaların, çapraz reaksiyonların en düşük düzeye indirilebilmesi,
- Genelde antijenin (enzim gibi) biyolojik aktivitesini etkilememesi,
- Hibridomaların elde edilmesi için gereken sürenin uzun olması,
- Elde edilmesinin ve üretiminin uzmanlık gerektirmesi,
- Üretimin maliyetli olması,
- Monoklonal olması dolayısıyla istenen biyolojik tepkiden daha düşük sonuçlar alınabilir.
- Sadece bir epitopu tanımasıdır (Chames et al., 2009).

2.2.1.3 mAb'ların Kullanım Alanları

mAb'lar sık rastlanmayan antikor ve antijenlerin saflaştırılmasında, tanı ve tedavi olmak üzere üç ana alanda kullanılabilir olduklarını kanıtlamışlardır.

- Kan gruplarına ve insan lökosit antijenlerine karşı geliştirilen monoklonal antikorlar ile doku eşlemeleri ve doku tiplendirmelerinde,
- Sağlıklı ve sağlıklı olmayan hücrelerin yüzey antijenlerine spesifik olarak üretilen monoklonal antikorlar tanımlama, ayırma ve hücrelerin sınıflandırılmasında kullanılarak, tanıda hastalık evrelerinin parazitik, otoimmün ve malignant evrede olup olmadıklarının belirlenmesinde,
- Pasif immünizasyonun gerektiği tedavi basamaklarında,
- Kanseri hücrelerinin hedeflendiği kanser tedavisinde,
- Floresan veya enzim ile konjuge edilmiş mAb'lar ELISA, RIA gibi tekniklerde,
- Serumdaki protein ya da ilaç seviyelerinin ölçülmesinde ve izlenmesinde,
- Hormonların belirlenmesinde ve miktarlarının ölçülmesinde,
- Otoantikorların belirlenmesi ile otoimmün hastalıkların tanısında,
- Enfeksiyöz ajanların belirlenmesinde,
- Epitop eşleştirmede ve moleküler modelleme ile makromoleküllerin yüzeylerinin antijenik profillerinin belirlenmesinde ve görselleştirilmesinde kullanılmaktadırlar (Collins, 1986; Nelson et al., 2000).

2.2.1.4 Hibridoma Teknolojisinde *in vitro* İmmünizasyon

Lenfositler tarafından belirli bir antijene karşı salınan antikorlar her hastalıkta dolaşımdaki kanda sürekli bulunmaz. Bu durum antijenlere karşı geliştirilecek antikorları sınırlamaktadır. *In vivo* immünizasyon tekniği, bir organizmaya spesifik bir antijenin sunulması işlemidir. Bu amaçla fareler ve sıçanlar sıklıkla kullanılmaktadır. Bir miktar deney hayvanı ise antikor üreten lenfositlerin kaynağı olan dalak ve lenf nodlarının izolasyonu için

kullanılmaktadır. Antijen reaktif öncül hücrelerinin eksikliğinden çok; tolerans (antijen spesifik tepkisizlik) ve antijene karşı olan hiyerarşik tepki (immünojen karışımındaki bir ya da birkaç komponente karşı seçici tepkisizlik) nedeniyle *in vivo* uyarımlarda yeterli sayıda antijen spesifik B lenfositin uyarılması önemli sorunlardan biridir (Reading, 1986). Oluşan toleransı kırmak ve supresyonun üstesinden gelmek için *in vitro* sistemler geliştirilmiştir. *in vivo*'da toleransı kırmak adına yapılan işlemler immünize organizmalarda canlılıkla ilgili sorunlar oluşturabilmektedirler (Boss, 1986) *in vivo* immünizasyonlarda, '*self antijenler*'e (vücuttan orijin alan antijenler) ve korunmuş, karakterize yapılarda gözlenen hücrel immün tepki düzenlemeleri *in vitro* gözlenmediğinden böyle antijenlere daha kuvvetli tepkiler alınabilmektedir. *in vitro* immünizasyon işlemlerinde daha az antijen gerektirmektedir ve daha kısa sürede tamamlanabilmektedirler. Kültürdeki lenfositlerin immünize edilmesi için gereken süre 4 – 5 gün kadardır. Ayrıca *in vivo*'da *self antijenlere* ve toksik antijenlere karşı antikor geliştirmek zordur. Zayıf immünojenik özellik gösteren antijenler için yeterli miktarda antikor üretimi de *in vivo*'da üstesinden gelinmesi gereken bir noktadır (Liddell and Cryer, 1993).

Antijenin doğası ve büyüklüğü de *in vitro* stimülasyonu sınırlandırmaktadır. 10.000 daltondan daha büyük moleküler ağırlığa sahip globüler proteinler optimum tepkiyi oluştururlar. İnsanların bağışıklanmasındaki etik problemlerden ötürü *in vivo*'da kullanılacak antijen ve veriliş yönü sınırlandırılmıştır (Boss, 1986). *in vitro* immünizasyon tekniklerinin kullanılması ile *in vivo* immünizasyonlarda karşılaşılan çeşitli sorunların çözülebileceği ve terapötik olarak kıymetli antikorların üretiminin yapılabileceği düşünülmektedir. Monoklonal antikorların tanı ve tedavi uygulamalarında ve araştırmalardaki kullanımları için büyük bir potansiyeli mevcuttur. Bir çok araştırmacının amaçları arasında büyük miktarda spesifik monoklonal antikor üretimi için optimize metotlar geliştirmek bulunmaktadır.

Son yirmi yılda kemirgen türevli antikorlar hem *in vitro* hem de *in vivo* immünizasyon ile üretilmiştir. İnsan kaynaklı mAb üretimi ise tekrarlanabilir metotların oluşturulmasındaki eksikliklerden ötürü geri kalmıştır. Başlarda in

vivo’da belirli bir antijene karşı immünize edilen lenfositler ya da bir hastalıktan muzdarip bireylerin lenfositleri *in vitro*’da immünize edilmiştir.

Bu metotlar mAb üretiminde bir miktar başarılı olsalar dahi halen bazı sınırlamalar da bulunmaktadır. Diğerlerinin yanında antikor mühendisliğinin dahil olduğu mAb üretim metotları da kullanımdadır. Gelecek vaat etmelerinin sebebi ise sahip oldukları ileri teknoloji sayesinde daha kaliteli mAb’ların üretimini mümkün kılmış olmalarıdır. Kimerik antikorlar fare değişken bölgeleri ve insan değişken olmayan bölgelerinden oluşabilmekte olup %25 insana ait olmayan proteinler insan anti-antikor tepkisine sebep olmaktadır. Sadece ‘*complementarity determining regions*, (CDR)’ bölgelerini, insan antikorlarının çerçeve bölgelerine greflenmesi potansiyel riski düşürse de hala %6-10 fare proteinleri içermektedir. Transgenik farelerden elde edilen, insan immunoglobulin genlerini içeren antikorlar sahip oldukları proteinlerden ötürü insansılaştırılmış olarak kabul edilmektedir. Fakat farklı bir türün immünizasyonu yoluyla elde edildiklerinden epitop özgünlüğü ve glikozilasyon desenlerindeki farklılıklar *in vivo*’daki verimi ve immünojenisitetlerini etkilemektedir (Kalantarov et al., 2002). Bu çekinceler değerlendirilirse, insan lenfositlerinin *in vitro* immünizasyonu insan antikorlarının elde edilmesinde kullanılabilecek uygulamalardan biridir. *in vitro* immünizasyon’da B-lenfositlerin antijen spesifik birincil yanıtın kültürde elde edilmesidir. *in vitro* immünizasyon ile mAb’ların geliştirilmesi B-lenfosit kaynağı, antijenik uyarım için gerekli şartların sağlanması, antijen ile aktiveleştirilmiş hücrelerin ölümsüzleştirilmesi, hibridomaların kararlılığı ve saflaştırılacak antikorların yeterli miktarda üretilmesi gibi önemli aşamalar ile mümkündür. Sahip olduğu avantajlardan ötürü gelecek vaat eden bir yöntemdir.



Şekil 2.1 Farelerden elde edilen antikorların *in vivo*'da yarattığı sorunları gidermek adına kullanılan kimerik, insansılaştırılmış ve insan antikorları üretilmeye ve kullanılmaya başlanmıştır.

2.2.1.5 *In vitro* ve *in vivo* immünizasyonun karşılaştırması

Terapötik olarak değerli insan mAb'larının üretimi için bulaşıcı bir hastalığa yakalanmış olan bireyden alınan lenfositler izole edilirler ve ölümsüzleştirilirler. Örnek olarak, HIV ile enfekte olan insanların kan dolaşımında bulunan lenfositler izole edilmiş EBV ile transforme edilerek ölümsüzleştirilmiş ve HIV'in gp41 ve p24 antijenik determinantlarına karşı monoklonal antikorların eldesi sağlanmıştır (Gorny et al., 1989). *In vivo* immünizasyon yöntemi ile elde edilmiş birçok önemli mAb mevcuttur. *in vivo*'da en fazla kullanılan antijenler 'keyhole limpet haemocyanin (KLH)', polisakkaritler gibi bakteriyel komponentler (Gorny et al., 1989) ve tetanoz toksoidi gibi atenüe edilmiş bakteriyel toksinleridir. Kemirgen dalak hücrelerinin *in vitro*'da aktive edilebileceği fikri Anderson ve ekibi tarafından, normal timüs hücreleri ile kemirgen dalak hücrelerinin bir B-hücre mitojeni ile birlikte kültüre edilmesi temeline dayanmaktadır (Anderson and Grey, 1973). T hücre bağımlı antijenlerin ayrılmış, işleminden geçirilmemiş fare dalak hücrelerinin B lenfositleri aktive etmediği ve belirgin miktarda antikor üretmediği görülmüştür. B hücre üreme faktörü, (BCGF), B hücre farklılaşma faktörü (BCDF), IFN- γ , IL-1 ve IL-2 sağlayan genç timosit kültürleri ya da karışık lenfosit kültürleri üremenin teşviki için kullanılabilmektedir. Forbol miristat asetat (PMA) ile stimüle edilmiş EL-4 timosit hücreleri gibi metotlar kullanılarak *in vitro* aktivasyon şartları optimize edilmiştir. EL-4 hücrelerinden elde edilen lenfokinlerin karışık lenfosit kültürleri ile karşılaştırıldıklarında *in vitro* immünizasyona 2 – 3 kat daha fazla destek oldukları gösterilmiştir (Borrebaeck

and Iler, 1986). Adjuvan peptit, N-asertilmuramil-L-alanin-D-izoglutamin (MDP) ve dekstran sülfatın da özgül hibridoma elde edilme verimini arttırdığı rapor edilmiştir (Borrebaeck, 1987). *In vitro*'da immünize edilen dalak hücreleri ile toplamda 50'den fazla fare kökenli mAb üretilmiştir. Ayrıca moleküllerin yanında toplama kanallarındaki epitelyum hücreleri gibi bütün halde hücrelerin kullanıldığı immünizasyonlar da gerçekleştirilmiştir. Bu metotta hücrelerin yüzey proteinlerinin ekstraksiyonu ve çözünmesi olmamasına rağmen membran proteinlerine karşı mAb üretimi gerçekleştirilebilmiştir (Gilbert et al., 1990).

2.2.1.6 Fare'den insan mAb'larına

mAb'ların ana kullanım alanlarından birisi insanlarda karşılaşılan rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmasıdır. Farelerde üretilen mAb'ların insan tedavisinde kullanıldıklarında yaşanan dezavantajlar; antikorların kan dolaşımında hızlı bir şekilde elimine olması, fare proteinlerine karşı tetiklenen immün tepki sebebiyle mAb'ların nötralizasyonu ve başarısızlıkla sonuçlanmasıdır. Ayrıca ciddi semptomlar ile birlikte aşırı duyarlılık reaksiyonlarının oluşması da muhtemeldir. İnsanlarda fare kökenli mAb'ların kullanıldığında karşılaşılabilecek durumlar; ateş, kaşıntı, kusma, ürtiker, solunum yollarında kasılmalar, taşikardi, solunum güçlüğü ve benzerleridir (Borrebaeck, 1989).

2.2.1.7 İnsan monoklonal antikorları (hmAb)

İnsan mAb'ları insan bağışıklık sisteminde diğer organizmalarda üretilen antikorların bağlanamadığı epitoplara bağlanma yeteneğindedir. Ksenojenik immünizasyonlarda baskın olarak kan grup antijenleri, MHC'ler üzerindeki monomorfik çerçeve epitoplari gibi immünodominant yapılara karşı antikorlar oluşmaktadır. hmAb'ları diğer taraftan polimorfik MHC epitoplari, tümörler ile ilgili antijenler (değişmiş öz antijenler) ve ksenojenik bağışıklık sisteminden kaçan diğer determinantları tanıma yönelimindedir (Borrebaeck, 1989). Fare antikorlarının karbonhidrat sekansları insan efektör hücrelerinin Fc reseptörüne arjinin bağlı insan sekansları ile karşılaştırıldığında daha az uyumludur. Bu

antijenlerin opsonizasyonunu önlerken fagositozu arttırmaktadır (Borrebaeck and Iler, 1986). *In vitro* immünizasyon ile elde edilen antikorların çoğunluğu IgM izotipine sahipken sadece bir kısmı IgG izotipindedir. Ayrıca, fare mAb'ları insan kanser terapisinde kullanıldıklarında; tümör bölgesine sınırlı penetrasyon, mAb'ların insan vücudundaki yarılanma süresinde kısalma ve konak efektör fonksiyonlarının iyileşmesinde gecikme görülmüştür (Stern and Herrmann, 2005). hmAb'ları en iyi şekilde insan hastalıklarının teşhis ve tedavisinde kullanılacaktır. Örneğin, HIV'e karşı geliştirilmiş hmAb'lar tanı kitlerinde standart sağlayarak vücut sıvılarında göreceli olmayan ya da kesin miktarda anti-HIV antikorlarının belirlenmesini sağlayabilecektir. Aynı zamanda anti-idiotipik aşılarda geliştirilmesi ve HIV virüsüne ait immüno-dominant bölgelerin belirlenerek insanlar ve diğer türler tarafından tanınan bölgelerinin belirlenmesinde kullanılabileceklerdir (Gorny et al., 1989).

2.2.1.8 *In vitro* İmmünizasyon için Lenfosit Kaynakları

In vitro immünizasyonlar için en iyi kaynak, içerdiği antijen spesifik B hücreleri sebebiyle dalaktır (Wasserman et al., 1986). Elde edilecek dalak hücreleri T ve B hücre popülasyonları olarak fraksiyonlanabilir ve immünizasyon çalışmalarında kullanılabilirler. Hücreleri ayırma işlemi ise özgül antikorların kullanımı ya da FACS kullanılarak yapılabilmektedir. *in vitro* kültürasyonu için T yardımcı hücrelerinin B hücrelerine oranı en az 0,4 olmalıdır. Bu oran sağlandığında serum, lenfokinler ve istenen antijen kullanılarak immünizasyon çalışmaları gerçekleştirilebilirler (Ho and Mass, 1992). Hücrelerin fraksiyonları halinde ayrıldığı allojenik, endojen stimülasyonların saf lenfokinlerin yerine kullanıldığı metotlar da tanımlanmıştır. Dalak hücrelerinin kullanıldığı immünizasyon çalışmaları genellikle IgM sınıfı antikorların eldesi ile sonuçlanmaktadır. IgG sınıfı antikorların eldesi için ise hafıza hücrelerinin kullanılması gereklidir. Hafıza hücrelerinin daha önce karşılaşmış olma ihtimali olan antijenik yapılar için ise IgG sınıfı antikorların elde edilmesi ihtimali daha yüksektir. Bu çapraz reaksiyon uyarımı 'orjinal antijenik sin' olarak bilinir ve *in vitro*'da baskılayıcı ve düzenleyici etkilerin olmadığı durumlarda gerçekleşir.

Vucüt içine enjekte edilen antijen sayesinde olgunlaştırılan B-lenfositler *in vitro*'da stimüle edilebilirler. Stimülasyon bir poliklonal B hücre aktivatörü olan mitojen özellikli şekerçi boyası gibi bir protein varlığında ya da antijenin kendisiyle gerçekleştirilebilir. *In vivo* immünizasyonun sonunda uygulanan arttırıcı enjeksiyondan sonra hücrelerin *in vitro* tetiklenmesinin mAb üretim verimini arttırdığı belirlenmiştir (Butler et al., 1983). Bu şekilde olan çalışmalarda, arttırıcı immünizasyonlardan 6-8 gün sonra antikor üreten lenfositler periferel kanda bulunabilirler. Fakat 14 gün sonra bu hücrelerin sayısı temel seviyelere kadar düşmektedir. *in vivo* immunize edilmiş antijen spesifik B hücreler kültüre alındıktan sonra *in vitro* tetiklenerek daha fazla antikor üretmeleri sağlanabilmektedir. Her antijenik stimülasyon poliklonal bir tepki oluşturmaktadır (Volkman et al., 1981). Stimülasyon ve spesifik antijene karşı oluşturulan antikorların birbirlerinden ayrıldığı nokta antijen konsantrasyonu, hücre konsantrasyonu ve hücre kültür yüzeyi gibi bir çok faktöre bağlıdır.

2.3 Monoklonal Antikor (mAb) Teknolojisi

mAb üretim yönteminin aşamaları aşağıdaki gibidir:

- Başarılı bir immünizasyon,
- Bu esnada miyeloma kültürlerinin, hücrelerinin hazırlanması,
- Bağışıklığın kontrolü,
- Füzyon
- Hibridomaların elde edilmesi,
- Hibridomalardan sentezlenen antikorların kontrolü,
- Hibridomaların klonlanması,
- Pozitif mAb'ların eldesi,
- mAb'ların saflaştırılması,
- mAb'ların amaçlanan işlemlerde kullanılması.

2.3.1 İmmünizasyon

Monoklonal antikor üretiminin en önemli ön şartı özgün olarak antikor üreten hibridoma klonunun elde edileceği, antikor üretme yeteneği olan hücre kaynağının bulunmasıdır. Bu kaynakların elde edilmesi için iki seçenek mevcuttur;

- Birincisi hücrelerin yabancı madde ile kendi normal ortamlarında karşılaşmaları, *in vivo*;
- İkincisi ise daha önceden hassaslaştırılmış ya da hiç hassaslaştırılmayan hücrelerin donörden alınarak antijen ile vücut dışında, *in vitro* karşılaştırılmasıdır.

Hücrelerin hassaslaştırılması için seçilen immünojen, donör ve kullanılacak sunuş yöntemine göre birçok metot tanımlanmıştır.

Monoklonal antikor üretiminde kullanılacak deney hayvanının seçimi miyeloma hücre hattının kaynağına göre belirlenmektedir. İndüklenmiş miyeloma hücre hatlarının çoğu Balb/c fare ırkından elde edildiği için monoklonal antikor üretiminde bu ırk sıklıkla kullanılmaktadır (Peters and Baumgarten, 1992).

Farklı yaştaki deney hayvanlarına ihtiyaç olduğundan ve immünizasyon süresi haftalar sürdüğünden deney hayvanlarının bakılması için bir tesis gereklidir. Bu sebeple seçilecek deney hayvanı kolonisinin uygun özelliklere sahip ve düşük maliyetli olması gerekmektedir. Böyle bir deney hayvanı kolonisi immünizasyon çalışmalarında, asidik sıvının (periton boşluğunda patolojik olarak biriken sıvı) eldesinde, besleyici hücre tabakasının eldesinde ve immünize edilmemiş serumun sağlanmasında kullanılabilir. Herhangi bir sınırlama olmamasına rağmen dişi deney hayvanlarının immünizasyonda, daha sakin bir doğaları olması ve uzun süreli bakımlarının erkek bireylere nazaran kolay olması sebebiyle daha çok kullanıldığı bildirilmiştir. Bununla beraber, erkeklerin daha iyi bağışık yanıt verdiği de göz ardı edilmemelidir. Diğer taraftan kullanılacak koloninin dengede tutulması için de asidik sıvı üretiminde erkek deney hayvanları kullanılabilir. Belirli bir bağışıklığın sağlanması için 8–12 haftalık fareler, asidik sıvı üretimi için ise 3–6 aylık tamamen erişkin fareler kullanılabilir.

Besleyici tabaka olarak timositler kullanılacak ise donör olarak en fazla 10 haftalık genç fareler seçilmelidir (Peters and Baumgarten, 1992).

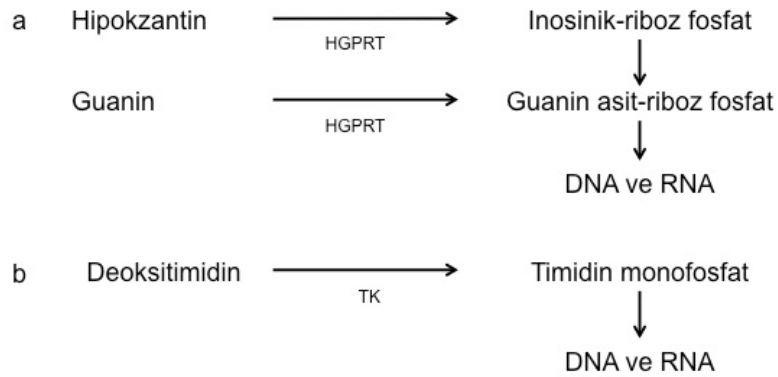
Antijenler temel olarak immünoglobülinler ile etkileşme yeteneğinde olan ya da onlara bağlanabilme yeteneğindeki moleküllerdir. Bu alanda yapılacak çalışmalarda antijenin yapısının bilinmesi önemlidir. mAb ya da pAb üretimi için kullanılan antijenler aynı zamanda immünojenlerdir. İmmünojen alıcıya verildikten sonra antikor oluşturma kapasitesi olan moleküllerdir. Bazı maddeler immünojenik özellik göstermeyen antijenlerdir ve genel olarak sadece makromoleküller hem antijenik hem de immünojenik özellik göstermektedirler. İmmünojenik özellik gösterebilen maddelerin hem kompleks bir yapıya sahip olmaları hem de alıcı için yabancı olmaları gerekmektedir. Proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, yağlar, hücrenin farklı kısımları ya da organelleri, bakteriler, virüsler ve ksenobiyotikler gibi birçok doğal ve sentetik yapı immünojen olarak kullanılmıştır. Bu yapılarda farklı antikorlar ile etkileşebilen, tekrar eden ya da katlanmış moleküler yapılardan oluşan bir çok antijenik bölge (epitop) bulunmaktadır. Epitoplara karşı antikor gelişebilmesi yine alıcı tarafından yabancı olarak tanımlanmasına bağlıdır (Liddell and Cryer, 1993).

Özellikle proteinler için moleküler yapı ve immünojenite arasındaki ilişki sıklıkla çalışılmıştır. Moleküler büyüklük önemli bir rol oynarken, 1000 Da'dan daha küçük moleküllerin antikor üretimini tetiklemek için yetersiz olduğu belirtilmiştir. Poliklonal antiserum üretiminde ise baskın epitoplara olan immün yanıtın asıl ilgilenilen epitoplara olan immün yanıtı gizleyebildiği rapor edilmiştir. Bu sorunun üstesinden gelmek için de farklı immünizasyon stratejileri geliştirilmiştir. Monoklonal antikor üretiminde ise daha minör epitoplara spesifik antikorların eldesi için ise füzyon sonrası tarama metotları kullanılmaktadır (Liddell and Cryer, 1993).

2.3.2 Miyelomaların Seçimi ve Hazırlanması

Antikor üreten B-lenfositlerin antikor üretmeyen miyeloma hücreleri ile hibritleştirilmesi ile antijen spesifik antikorların eldesi mümkün olmuştur. Fakat

hibridizasyon (füzyon) sonrası elde edilen hücre süspansiyonunda (miyeloma–dalak hücre hibritleri) istenen hibritlerin, hibridomaların ayrılması gerekmektedir. İstenen seçim yöntemi, hücrelerin biyosentetik yol izinin bloklanmasına bağlı olarak guanozin üretimi için ‘salvage’ yol izini kullanma kapasitesine bağlıdır (Şekil 2.2) (aminopterin varlığına bağlı olarak). *Salvage* yol izi ise hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) enzimin varlığına bağlıdır. HGPRT enzimini sentezleyemeyen hücreler hipoksantin, aminopterin ve timidin içeren ortamda, DNA’nın elde edilmesini sağlayan pürin prekürsörlerinin sentezindeki iki yol izinin bloklanmasına sebep olur. Fakat HGPRT⁻ bir hücre HGPRT⁺ bir hücre ile füzyona uğratıldıktan sonra seçici ortamda üreyebilmektedir. Bu sebeple sağlıklı bir seçim için HGPRT⁻ miyeloma hücreleri ve HGPRT⁺ lenfosit hibritleri hipoksantin-aminopterin-timidin (HAT) ortamında kültüre edilebilirler (Liddell and Cryer, 1993).



Şekil 2.2 DNA sentez yol izleri, a. Pürin sentezi, b. Pirimidin sentezi ‘Salvage yol izi’.

HGPRT⁻ miyeloma hücrelerinin izolasyonu, enzimin tüm hücrelerde bulunması sebebiyle kolaydır. Genin kaybolması için ise tek bir mutasyon yeterlidir. HGPRT⁻ hücrelerin seçimi HGPRT enzimi ile DNA’ya katılan toksik baz analogları olan 8-azaguanin (8-AG) ya da 6-tiyoguanin (6-TG) ortamda bulunmasına bağlıdır. Miyeloma hücreleri genelde HGPRT⁻ varyantlardan seçilerek karakterizasyon işlem basamakları kısaltılır (HGPRT⁺ miyeloma hatlarından HGPRT⁻ miyeloma hatlarının eldesi için; 6–8 haftalık inhibitör enzim

ile kültivasyon, çoklu klonlama işlemi sonrasında normal duruma dönmeyen ve üreme kapasitesi yüksek miyeloma hattının oluşturulması).

Çizelge 2.1 Füzyon sonrası seçilimin sağlanması kullarılan HAT ortamının etkisi. mekanizması

Hücre tipi	DNA Sentezi		HAT Ortamında Hayatta Kalma
	Salvage Yol İzi	De novo Yol İzi	
Miyeloma	HGPRT ⁻	Aminopterin hassasiyeti	lm (DNA sentezi olmaz)
Dalak	HGPRT ⁺	Aminopterin hassasiyeti	ölüm (<i>in vitro</i> 'da sınırlı yaşam)
Miyeloma-Dalak hibriti	HGPRT ⁺	Aminopterin hassasiyeti	Hayatta kalır
Miyeloma-miyeloma hibriti	HGPRT ⁻	Aminopterin hassasiyeti	lm (DNA sentezi olmaz)
Dalak-dalak hibriti	HGPRT ⁺	Aminopterin hassasiyeti	ölüm (<i>in vitro</i> 'da sınırlı yaşam)

Miyeloma hatlarının seçilmesinde antikor üretmiyor olması da önemlidir. Füzyon işlemi sonrasında elde edilecek hibritlerin sadece kullarılan hedef immnojene karşı monoklonal antikor üretmesi beklenmektedir.

Miyeloma kültürlerinin sürdürülmesi için bilindik hücre kültürü yöntemlerinin dışında dikkat edilmesi gereken bir konu yoktur. Hücreler serum varlığında CO₂ içeren inkübatörlerde, hücre sayısı $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ hücre/mL aralığında olacak şekilde kültüre edilirler. Hücre konsantrasyonu arttığında ise kültür hacimsel olarak taze besi ortamı ile aynı oranlarda hücre içerecek şekilde pasajlanır.

2.3.3 Füzyon

Köhler ve Milstein'dan önce de hibrit hücrelerin eldesi mümkündü. *In vitro*'da iki somatik hücre hibridize edilerek iki ya da daha fazla çekirdeėe sahip

heterokaryositler elde edilmektedir. Genetik çalışmalarda ve hibridoma teknolojisinde ortak olan sorun ise bu heterokaryositlerin hangi bağımsız olarak çoğalmasındı (Köhler and Milstein, 1975). Füzyondan sonraki ilk mitotik bölünmede oluşan kardeş hücreler tek çekirdekte ebeveyn hücrelere ait tüm kromozomları bulundurmaktadırlar. Fakat takip eden bölünmelerden sonra kromozom kayıpları yaşanır ve en sonunda ebeveyn hücrelerin kromozomlarından bazılarını içeren stabil yeni bir hücre hattı elde edilir.

Füzyon işleminin başarısını ve kullanım alanını genişletmek için yapılması gereken rastlantısal hücre füzyonunun frekansını ve dolayısıyla elde edilebilecek hibritlerin sayısını arttırmaktır. Bu amaçla hibridomaların eldesi için kullanılan ilk ajan inaktive edilmiş Sendai virüsüdür (Köhler and Milstein, 1976). Bu virüs ile 37 °C’de kültüre edilen hücrelerin membranında hasarlar meydana gelir ve yan yana bulunan hücreler arasında sitoplazmik köprüler oluşur. Hücrelerin onarım mekanizmaları eşliğinde bu köprüler genişler ve hücreler birleşmiş olurlar. Bu yöntem farklı hücre tipleri için verimsiz oluşu, virüs üretimindeki yoğun iş emeği gereksinimi, üretimler arasındaki varyasyon (çeşitlilik) ve viral genlerin hücrelere girişi ihtimaline bağlıdır. Ayrıca bu şekilde elde edilen hibritlerin IgM antikoru üretme olasılığı yüksektir.

Bu güne kadar birçok kimyasal füzyon ajanı kullanılmış olup, bunlar arasında polietilen glikol (PEG) en yüksek verimlilik gösterildiği için çoklukla tercih edilmiştir (Pontecorvo, 1975).

2.3.3.1 Polietilen glikol (PEG) ile füzyon:

PEG, hibridoma teknolojisinde kullanılmasının yanında (Geftter et al., 1977), Fazekas de St Groth ve Scheidegger tarafından bildirildiği gibi farklı değişkenler ile etkileşimi de incelenmiştir (Fazekas de St Groth and Scheidegger, 1980) (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Farklı değişkenler ile yapılan füzyon çalışmaları.

Parametre	Düşük	Yüksek
PEG konsantrasyonu	%30	%50
pH	8,0	8,2
İşlem süresi	%30 için 7 dakikaya kadar	%50 için 1 – 2 dakika
Sıcaklık	20 °C	37 °C
Hücre oranı (lenfosit:miyeloma)	1:1	1:10
PEG'in moleküler ağırlığı (kDA)	1500	4000

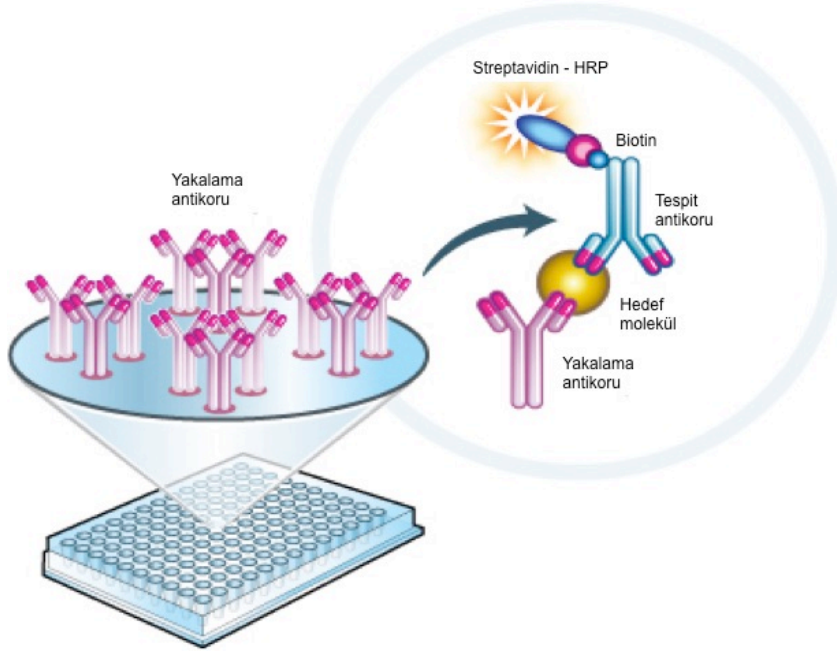
2.3.3.2 Elektrofüzyon

Zimmermann tarafından geliştirilmiş bir tekniktir (Zimmermann, 1982, 1986) ve bir çok farklı hücre ile çalışılmıştır (Ohnishi et al., 1987; Bischoff et al., 1982; Borrebaeck and Hagen, 1989). Hücreler düşük elektrik alan kuvvetleri altında bir araya getirilerek dizilimleri sağlanır. Ardından uygulanan yüksek değerdeki elektrik alan kuvvetleri ile de füzyon gerçekleştirilir. Hücrelerin dizilimi için kullanılan düşük elektrik alan kuvvetleri 10–40 V aralığında ve 5–20 sn süre ile uygulanır ve dizilim ile hücrelerin füzyona uğrama ihtimalleri artmaktadır. Füzyon için uygulanan yüksek elektrik alan kuvvetleri ise 10 μ s–1 ms aralığındaki sürelerde 200–3000 V verilerek oluşturulur. Hücre süspansiyonunun sıcaklığının istenmeyen değerlere yükselmemesi için fizyolojik olmayan düşük iyonik güce sahip tampon solüsyonların kullanıldığı ortamlarda işlemin gerçekleştirilmesi bir dezavantajdır. Hücrelerin dizilim işleminde hücreler elektrotlara doğru hareket etme eğilimindedirler. Bbu sebeple füzyon işleminde ikiden fazla hücrenin birleştiği hibritlerin elde edilme ihtimali artmaktadır. Ayrıca, buralarda oluşacak hücre birikimi füzyona uğrayacak hücre sayısını değiştirdiğinden işlemin verimi düşmektedir. Elektrotlar arasındaki mesafe elektrik alanı oluşturabilmek adına birbirine yakın olması gerektiğinden bu alandaki çalışmalarda en fazla 22 μ m elektrot aralığındaki kuvvetler ile kullanılmıştır (Vienken and Zimmermann, 1985). Son yıllarda ise elektrot aralığı 10 mm'ye kadar çıkan petri içine yerleştirilen sistemler geliştirilmiştir (Harvard Apparatus, ABD). Elektrofüzyon işleminde kullanılan kuvvetlerde çalışma hacmi 10–200 μ l aralığında, toplamda 10^6 hücre ile gerçekleştirilirken yeni sistemlerde hacim 50 μ l–5 ml aralığında benzer hücre konsantrasyonları ile yapılabilmektedir.

PEG'in kullanıldığı füzyon çalışmalarında ise 10^8 lenfosit hücresi 10^7 - 10^8 miyeloma hücresi ile karıştırılmaktadır.

2.3.3.3 Hibridomaların Eldesi ve Tarama

Füzyon sonrasında hücre süspansiyonu 96 gözlü kültür kaplarında HAT ortamı ile kültüre alınır ve günlük mikroskopik bakı ile kültürler hem kontaminasyon hem de hibrit hücrelerin varlığı açısından kontrol edilirler. Kullanılan HAT ortamı ile ortamda bulunan B-lenfosit hibritleri ve miyeloma hibritleri ya da füzyona uğramamış B-lenfosit ve miyelomalar canlılıklarını sürdüremezler (Çizelge 2.1). İki hafta sonrasında kültür kabının gözlerinde bulunan hibridomaların yeterli miktarda antikor ürettiği kabul edilir ve gözlerden alınan örnekler ile seçilen tarama metodu kullanılarak pozitif gözler aranır. Pozitif gözlerin belirlenmesi genellikle ELISA ile gerçekleştirilir. Ticari olarak bulunan kitlerin yanında araştırmacılar sıklıkla, optimize ettikleri sistemleri kullanırlar. ELISA temel olarak Şekil 2.3'te gösterildiği şekilde çalışmaktadır. Örnekte bulunduğu düşünülen moleküle spesifik yapılar; antijen aranıyor ise antikorlar, antikor aranıyor ise antijenler sabit bir yüzeye immobilize edilirler. Daha sonra olası spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için boş kalan alanlar sığır serum albümini ya da süt tozu gibi düşük maliyetli protein yapısındaki proteinler ile kaplanır. Örnek sisteme uygulanır. Her basamakta yıkama işlemi yapılarak bağlanmayan fazla reaktifler ya da biyolojik yapılar (kan ve serum gibi içeriği karmaşık örnekler ile çalışıldığında) ortamdan uzaklaştırılır. Bu aşamadan sonra bir enzim (örn. *horse radish peroxidase*, HRP) ya da bir florokrom özellikli bir molekül (örn. floreseyin izotiyosiyanat (FITC)) ile işaretlenmiş antikor sisteme eklenir. Bu antikor genelde ikincil antikor olarak adlandırılır ve bu antikorum hedef moleküle bağlanması bağlı bulunduğu enzime ait substratın ortama eklendiğinde gerçekleşecek renk değişimi ile ya da floresan işaretçinin varlığının ve yoğunluğunun belirlenmesi ile örnekte ne kadar hedef molekül olduğu tespit edilir (Zola, 2000).



Şekil 2.3 Dolaylı ELISA yönteminin çalışma prensibini gösterir illüstrasyon (www.abcam.com).

2.3.3.4 Klonlama

Rastlantısal olarak gerçekleşen füzyon işleminden sonra, kullanılan tekniğin verimine bağlı olarak çok sayıda hibridoma elde edilmektedir. Bu hibridomaların birbirlerinden tek tek ayrılması ile sadece tek bir hibridoma tarafından, tek bir epitopa karşı üretilen antikorların eldesi mümkündür. Klonlama ile elde edilecek tek hücrelerden oluşan kolonilerin mAb salgılaması beklenir. Günümüzde dört adet klonlama tekniği kullanılmaktadır. Bunlar; yumuşak agarda klonlama, seyrelterek klonlama, floresansla aktive edilmiş hücre ayrıştırma ve manyetik partiküller ile klonlamadır (Zola, 2000).

Seyrelterek klonlama işleminde hücreler seri olarak besi ortamıyla seyreltilir ve 96 gözlü kültür kabının bir gözüne 1-2 hibridoma düşecek şekilde dağıtılır. Kültür takip edilerek gerekli işlemler yapılır. Yumuşak agar ile klonlama tekniğinde farklı iki konsantrasyonda hazırlanan agar ile hücreler üç boyutlu kültürlerle alınır. Sadece transforme hücreler bu agar gibi materyallerde üreyebildiğinden hibridomalar da bu ortamda rahatlıkla ürer ve daha sonra immünpresipitasyon metodu ile antikor üretimi kontrol edilebilir. Floresans ile

aktive edilmiş hücre ayrıştırma (FACS) işleminde ise hücre süspansiyonun içinde, istenen hücreler floresans kaplı partüküllere tutunurlar ve floresans sinyal yardımı ile ayrılabilirler. Diğer metotta ise antijen kaplı paramanyetik boncuklar hücre süspansiyonu ile karıştırılır. Kaplanan antijene karşı antikor üretebilen hücreler bu boncuklara tutunurlar, oluşturulan manyetik alanda manyetik özellik kazanan paramanyetik boncuklar toplanarak diğer hibridomalardan ayrıştırılmış olurlar.

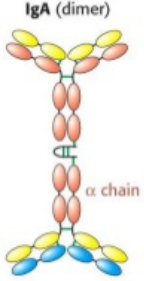
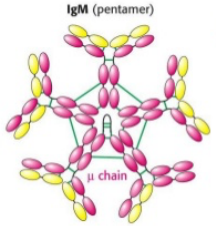
2.3.3.5 Karakterizasyon

Füzyon sonucu elde edilen hibridomalar heterojen karakter göstermektedirler. Klonlama ile aynı monoklonal antikor üreten klonlar elde edilse de bu hücreler arasında dahi farklılıklar bulunmaktadır. Hücreler arasındaki genetik farklılıklar fenotipik olarak da kendilerini gösterebilmektedirler. Bu açıdan bakıldığında karakterizasyon işlemi hem üretilen monoklonal antikor hem de onu üreten hibridoma hücreleri için gerçekleştirilmektedir. Hibridoma hücrelerinin karakterizasyonu için yapılacak çalışmalardan bazıları; karyotip analizi, izoenzim analizi, DNA parmak izi analizi, üreme kinetiklerinin belirlenmesi, spesifik üreme hızı ve ikilenme sürelerinin belirlenmesi, antikor üretim hızı, glikoz tüketim hızı ve laktik asit salım hızıdır (Freshney, 2005, Nalbantsoy et al., 2010).

Üretilen mAb'ların karakterizasyonunda ise fonksiyonel ve yapısal analizler söz konusudur. Bu amaçla antikorun titresi, afinitesi, epitop analizi ve izotiplendirme çalışmaları yapılabilir (Zola, 2000; Freshney, 2005; Nalbantsoy et al., 2010). Antikor titresinin belirlenmesi için belirli miktarda antijen farklı konsantrasyonlarda mAb ile reaksiyona sokulur ve antijene en düşük konsantrasyonda bağlanan antikor konsantrasyonu belirlenir (Nalbantsoy et al., 2010). Hedeflenen moleküle afinitesi olduğu belirlenen mAb'ların karakterizasyonundaki bir diğer basamak antikorların hangi immünglobülin alt tipine ait olduğunun belirlenmesidir. Bilinen 5 çeşit antikor tipi vardır ve görevleri şu şekilde sıralanmaktadır (Bilgehan, 2008).

- **IgA:** Mukus, göz yaşı, tükürük ve semen gibi vücut tarafından salgılanan sıvılarda bulunur. Görevi patojenleri iç dokulara geçmeden önce durdurmağıdır,
- **IgD:** B-hücrelerin yüzeyinde bulunur ve hücre dışındaki antijenlere bağlanır. Bu bağlanma B-hücrelerinin hassaslaşmasında görev almaktadır.
- **IgE:** Bazofil ve mast hücre yüzeyine bağlanır, alerjenlere karşı geliştirilir.
- **IgG:** Vücuttaki immünglobülinlerin %80'ini oluştururlar. Sorumlulukları virüs, bakteri ve bakteriyel toksinleri elimine etmektir.
- **IgM:** Yabancı bir molekül ile vücut ilk karşılaştığında üretilen antikordur. Üretilen IgG seviyesi arttıkça IgM seviyesi düşer. Kan uyuşmazlıklarından sorumlu anti-A ve anti-B antikorları IgM izotipinde antikorlardır.

Çizelge 2.3 İmmünglobülin izotipleri ve özellikleri (Dreamstime, 2015).

İmmünglobülin İzotipi	Serumdaki Konsantrasyonları (mg/mL)	Kütle (kDa)	Hafif Zincir	Ağır Zincir	Zincir Yapısı	Şematik
IgA	3	180-500	κ ya da λ	α	$(\kappa_2\alpha_2)_n$ ya da $(\lambda_2\alpha_2)$	 IgA (dimer)
IgD	0.1	175	κ ya da λ	δ	$\kappa_2\delta_2$ ya da $\lambda_2\delta_2$	 IgD
IgE	0.001	200	κ ya da λ	ϵ	$\kappa_2\epsilon_2$ ya da $\lambda_2\epsilon_2$	 IgE
IgG	12	150	κ ya da λ	γ	$\kappa_2\gamma_2$ ya da $\lambda_2\gamma_2$	 IgG
IgM	1	900	κ ya da λ	μ	$\kappa_2\mu_2$ ya da $\lambda_2\mu_2$	 IgM (pentamer)

2.3.3.6 Büyük Ölçekte Antikor Üretimi

Tarihsel olarak hücre kültürü 20. yüzyılın başında kullanılmaya başlanmıştır (Harrison, 1907; Carrel, 1912). Uzun yıllar boyunca küçük ölçekte araştırma amaçlı olarak çalışılırken diğer taraftan da büyük ölçekli biyoreaktörler mikrobiyal fermantasyon amacıyla kullanılmaktaydı. Endüstriyel ölçekte hücre kültürü biyoreaktörleri o dönemde başlayan geniş kapsamlı aşı programlarındaki ihtiyacı karşılamak üzere 1950'lerin ortalarında kullanılmaya başlanmıştır. Öncesinde ise görece daha sınırlı ölçekte olmak üzere aşı üretim döner şişelerde yapılmaktaydı. İlk etapta kullanılan biyoreaktörler özellikle yüzeye tutunan hücreler için tasarlandığından hücreler için tutunma yüzeyleri içermektedirler (Spier and Griffiths, 1990; Spier et al., 1997). Ticari olarak üretilen ilk süspansiyon hücre kültürü ürünlerinin (süspanse BHK kültüründe Şap virüsü aşısı üretimi ve Namalva hücrelerinde interferon üretimi) itici güç olması ile hücre kültürü sistemleri, mikrobiyal kültür sistemlerine hücre kültürünün gereksinimi olan mekanik hassasiyet değişkeninin temel alınması ile geliştirilmeye devam edilmiştir (Finter, 1991). 1970'lerde ise monoklonal antikor üretimi prensibinin doğması ve gelişmesi ile artan nutrient temini ve atık ürünlerin uzaklaştırılması perspektifi ile birim hacimdeki ürün veriminin artmasını sağlayacak çeşitli biyoreaktör ve kültür sistemi geliştirilmiştir (Ozturk et al., 2006). Bu özelleşmiş sistemler 'hollow fiber', akışkanlaştırılmış yatak biyoreaktörler, 'Wave' biyoreaktörler, 'Shake' biyoreaktörler ve hücrelerin belirli bir bölgede tutulup taze ortamın bu bölgeden perfüze edildiği biyoreaktörler geliştirilmiştir (Scheirer, 1988). Bu reaktörlerin geliştirilmesindeki temel amaç; yüksek seviyede, sürekli ürün üretimi için hücrelere uygun ortam sağlamak adına hücre kültürünün temel zorluklarından olan yavaş hücre üremesi, ve düşük final hücre konsantrasyonu problemleridir. Aynı zamanda birçok hücre tutuklama aparatı karıştırılmalı tank biyoreaktörlerde ve hava kaldırmalı biyoreaktörlerde kullanılarak ortamın sürekli değiştirilmesini ve ürün verimini arttırması için kullanılmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde elde edilebilen tamamen insansılaştırılmış antikorların üretimi için süspanse hücre kültürü biyoreaktörleri daha 20 m³ gibi büyük ölçeklere kadar çıkabilecek şekilde geliştirilmiş ve optimize edilerek yılda kilogram bazında antikor üretimi sağlanmıştır (Sinclair, 2001). Kullanılan ve

geliştirilen biyoreaktör sistemlerinin her birinin bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

‘Hollow fiber’ Biyoreaktörler

‘Hollow fiber’ Bbiyoreaktörlere örnek olması adına Şekil 2.4’te ticari bir ürününe ait görsel verilmiştir. Literatüre göre bu tip reaktörler;

- Küçük hacimde büyük bir yüzey alanı sağlarlar ($3.000 \text{ cm}^2/20 \text{ mL}$),
- Homojen fiber dağılımı sayesinde homojen hücre yerleşimi gözlenir, ölü noktalar elimine edilir,
- Hücre canlılığı daha uzun süreler yüksek değerlerde seyreder,
- Tamamen kapalı sistemler olduğu için biyogüvenlik şartlarına uygundur,
- Yüksek sayıda hücre ile çalışılmasına olanak sağlar (10^{11} ’e kadar),
- Üretim ile aynı anda ürünün konsantre edilmesini sağlar,
- Kapalı sistemde oldukları için sistem esnek değildir,
- Herhangi bir olumsuzlukta (Kontaminasyon, yanlış kullanım, vs) sistemin geri dönüşü yoktur,
- Sistemin sıcaklığı dışarıdan kontrol edilmektedir.

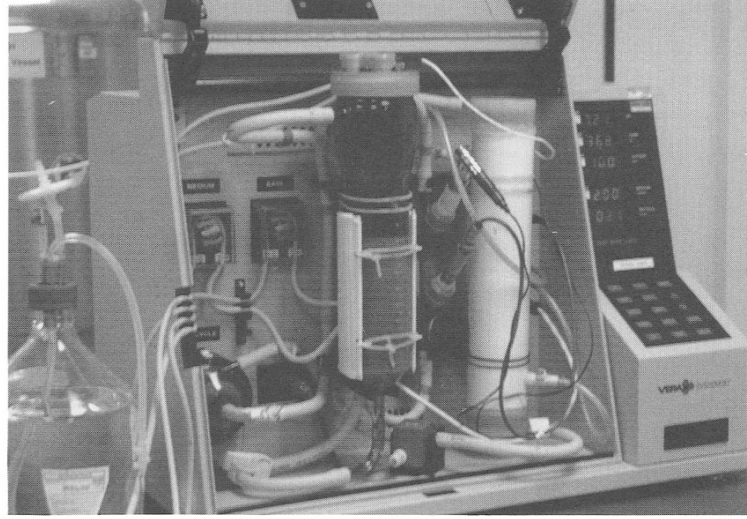


Şekil 2.4 ‘Hollow fiber’ biyoreaktör sistemi (FiberCell Systems, 2015)

Akışkanlaştırılmış Yatak Biyoreaktörler

Akışkanlaştırılmış yatak biyoreaktörler hayvan hücre kültürü biyoproses sistemlerine mikrobiyal sistemlerden adapte edilmiştir. Şekil 2.5’te ticari bir örneğe ait görseli aşağıda ise avantaj ve dezavantajları verilmiştir.

- Akışkanlaştırılmış biyoreaktör sistemlerinde kullanılacak hücre tipi hem süspanse hem de bir yüzeye bağımlı hücreler için kullanabildiğinden uzun adaptasyon sürelerine ihtiyaç duyulmaz,
- Yüksek hücre yoğunluğuna çıkılabildiği için alınan ürün miktarı da fazladır,
- Gerekli tasarım parametreleri belirlendiğinde sistemin ölçeği arttırılabilir,
- Sistem perfüzyon kültür prensibine dayandığından besi ortamının sürekli akışı sağlanır ve kullanılan ortamın maliyeti önem kazanmaktadır,
- Özellikle tutunan hücreler için sistemdeki toplam ya da birim hacimdeki hücre sayısının belirlenmesi güçtür (Jenkins, 1999).



Şekil 2.5 Akışkanlaştırılmış yatak hayvan hücre kültürü biyoreaktör sistemi (Jenkins, 1999).

‘Wave’ Biyoreaktörler

Kullanıma hazır bir platform olarak özellikle biyofarmasötik üreten firmaların validasyon ve kalite ihtiyacını karşılayabilen, 1 L–1.000 L aralığında geniş bir yelpazede hizmet verebilen ve tek kullanımlık torba-biyoreaktörlerin kullanıldığı sistemlerdir. Torba biyoreaktör üzerinde bulunduğu sistem vasıtasıyla içerideki besi ortamı ve hücrelerin dalga hareketi ile sallanması sonucu karışım ve gaz alış-verişi sağlanır. Gerçekleşen doğal ve hassas hareketler hücreler üzerindeki kayma gerilimini çok düşürdüğünden hücreler yüksek konsantrasyonda dahi yüksek canlılık gösterirler (GE Healthcare Life Sciences, 2015) (Şekil 2.6).

- Kullanıma hazır ürünler, sterilizasyon, çapraz kontaminasyon, temizlik ve validasyon için harcanan kaynakların (zaman, işgücü, maliyet) minimize edilmesini hatta sıfırlanmasını sağlamaktadır,
- Torba biyoreaktör sistemlerinde kullanılacak tüm filtre ve bağlantı ekipmanları steril olarak sağlandığından İyi Üretim Uygulamaları (GMP) için uygun bir sistemdir,
- Süspansiyon, mikrotayıyıcı, kesikli, kesikli beslemeli ve perfüzyon kültürler için seçenekli konfigürasyon sunabilmektedir,
- 10^7 hücre/mL gibi yüksek canlı hücre sayısına ulaşılabilir,

- Torba biyoreaktörlerin maliyeti klasik karıştırılmalı tank biyoreaktörler ile karşılaştırıldığında yeni bir maliyet kalemi olarak ortaya çıkmaktadır,
- Sistemler genellikle dikey değil yatay olarak dizayn edildiğinden klasik karıştırılmalı tank biyoreaktörlere nazaran daha fazla yer kaplarlar.



Şekil 2.6 10 – 100 L çalışma hacmine sahip ‘Wave’ biyoreaktör (GE Healthcare, Life Sciences, 2015).

Karıştırılmalı Tank Biyoreaktörler

Bir çok alternatif geliştirilmiş olsa da endüstriyel üretimlerin bir çoğunda geleneksel karıştırılmalı tank biyoreaktörler (STR) kullanılmaktadır (Chu and Robinson, 2001). STR’lerin seçilmesindeki temel neden basitliği, izlenmesinin ve ölçek büyütmesinin görece daha kolay olmasıdır. Mikrobiyal sistemlerden edinilen bilgi birikimi hayvan hücre kültürleri için de kullanılmıştır ve gaz kütle transferinin veriminin artırılması için yapılabilecek iyileştirmeler belirlenmiştir. Karıştırma, genellikle aksiyal akış sağlayan bir bıçak (çoklukla ‘Rushton turbine’) yardımıyla, biyoreaktörün bulunma noktasına bakılmaksızın, tümünde yeterli eşitlikte kompozisyon sağlayacak bir bıçak hızı ile sağlanmaktadır.

Küçük hacimli biyoreaktörlerde sistemin homejenitesini sağlamak daha kolay iken, ölçek büyüdükçe bazı sorunlar baş göstermektedir. Biyoreaktörlerde bulunan hücrelerin ölme nedenlerinin başında apoptoz gelmektedir. Düşük oksijen ya da nutrient varlığı, ideal kültür ortamında rastlanan büyük dalgalanmalar (pH gibi) ve atık metabolitlerin aşırı birikimi hücreleri apoptoza sürükleyebilmektedir

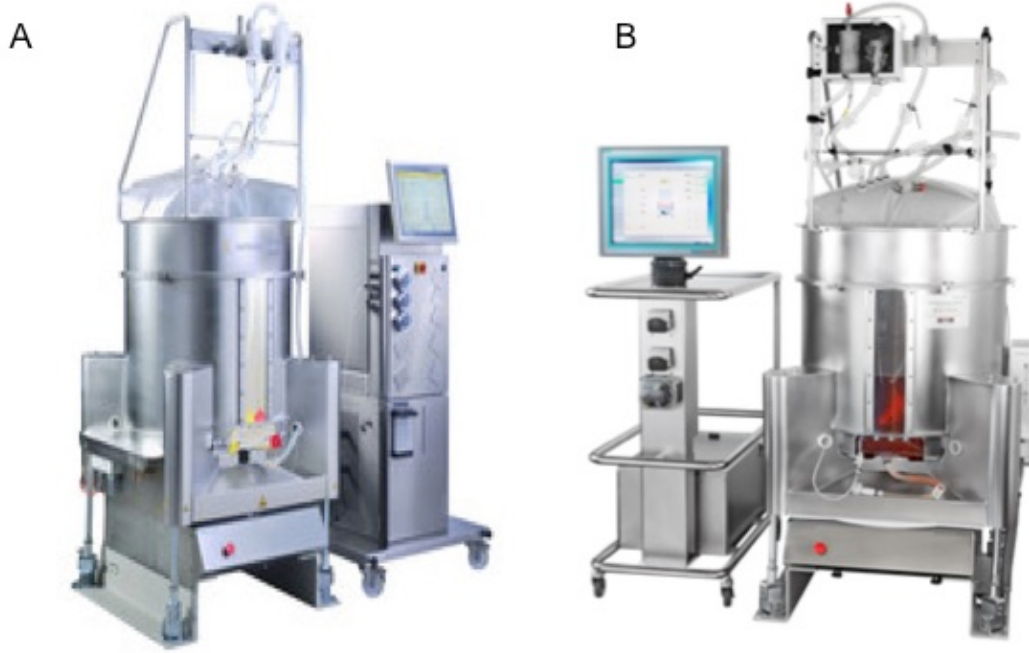
(Bailey and Ollis, 1986). Karıştırma hızının mikrobiyal kültürlerde kullanıldığı şekilde yüksek değerlere çıkarılamaması hücrelerin kayma gerilimi gibi kuvvetlerin hayvan hücreleri üzerindeki etkilerinin daha büyük olmasıdır. Biyoreaktöre direkt olarak gaz gönderilememesinin sebebi de yine hücreler üzerindeki olumsuz etkisidir (Oh et al., 1992). Karıştırma hızı arttırıldığında oluşan küçük vortekslerde kabarcıklar hapsolür, hapsolan kabarcıkları ise patlayarak hücrelere zarar verirler. Hidrodinamik kuvvetlerin hücre canlılığı üzerindeki dolaylı etkilerinden biri de budur (Kioukia et al., 1992).

Hava Kaldırmalı Biyoreaktörler

Endsütriyel uygulamalar için STR'lar standardize edilmiş biyoreaktör sistemleri olsalar da Lonza Biologics plc (İngiltere) gibi dünyanın en önemli mAb üreticilerinde hava kaldırmalı biyoreaktörler de kullanılmaktadır. STR'lar ile karşılaştırıldığında karıştırma şaftının olmaması sistemin enerji verimini arttırırken oluşturduğu hidrodinamik ortam hücreler için daha uygundur. Her ne kadar günümüz teknolojilerinde düşük ihtimal de olsa, şaftın olmaması olası bir kontaminasyon noktasını da elimine etmektedir. STR'larda homojen bir kültür ortamı sağlamak üzere kullanılan yüksek karıştırma hızlarının sebep olduğu hücre hasarları; hücrelerin birbirlerine ya da karıştırıcı bıçaklarına olan temasları, hücrelerin şaşırtıcılar gibi sabit olan biyoreaktör ekipmanlarına olan teması ve baloncukların patlamasına sebep olan vorteksler olarak sıralanabilir. Hava kaldırmalı biyoreaktörlerde ise bu ekipmanlar kullanılmadığından olası etkiler de en aza indirgenmektedir (Warnock and Al-Rubeai, 2006). Diğer yandan yapılan bir çalışmada, IL-2 üretimde karşılaştırmalı olarak kullanılan baloncuksuz havalandırmalı bir STR ile hava kaldırmalı biyoreaktörde, hücrelerin hava kaldırmalı biyoreaktörde daha yüksek metabolik aktiviteye sahip oldukları gösterilmesine rağmen, hava kaldırmalı reaktörde ürün verimi daha düşük, hücrelerin laktat dehidrogenaz (LDH) salımının daha fazla olduğu bildirilmiştir (Hesse et al., 2003).

Çalkalamalı Biyoreaktörler

Wurm ve ekibi tarafından tanımlanan orbital düzlemde çalkalanan biyoreaktörlerdir. Sartorius Stedim Biotech GmbH (Almanya) Kühner AG (İsviçre) tarafından ticarileştirilen biyoreaktörlerin hacimleri 200 L'ye kadar uzanmaktadır. Klasik çalkalayıcı mantığı ile hareket eden bir düzlemde bulunan reaktörde çalkalama ile havalandırma yüzeyel olarak yapılırken hem karıştırma hem de havalandırma için biyoreaktör içinde ilave bir ekipman kullanılmaması karıştırma verimini olumlu olarak etkilemektedir. Sistem tek kullanımlık torba biyoreaktörlerin sisteme adapte edilmesi ve sağladığı avantajlar ile büyük ölçekte biyofarmasötik üretimi yapan firmalar tarafından son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır (Liu, 2001; Muller et al., 2005; Stettler et al., 2007; Tissot et al., 2010; Werner et al., 2010; Zhang et al., 2008, 2009) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 İki farklı firma tarafından piyasaya sunulan çalkalamalı biyoreaktörler, A. Sartorius Stedim Biotech GmbH, B. Kühne AG.

2.3.3.7 Saflaştırma

Kullanılan mAb saflaştırma süreçleri, özellikle de son kullanıcılar insan ise güvenilir ve tahmin edilebilir ürünlerin elde edilmesini sağlamalıdır. Konak hücre proteinleri, DNA, fırsatçı ve endojen virüsler, endotoksinler ve diğer kontaminantlar uzaklaştırılırken kabul edilebilir verimle saflaştırma gerçekleştirilmelidir. Ayrıca saflaştırma işlemleri boyunca sisteme eklenen kimyasallar ya da safsızlıklar da süreç sonunda uzaklaştırılmış olmalıdır. Bu safsızlıklar kopan Protein A, reçine ve filtrelerden ekstrakte olabilen yapılar, tampon sıvı kalıntıları ve deterjan kalıntıları olabilirler. Memeli hücre kültür sistemlerinden mAb saflaştırma adımlarının ilki kültür sıvısından hücre ve hücre kalıntılarının ayrılarak kromatografi için hazır bir hale getirilmesidir. Bu işlem için genellikle santrifügasyon, derin filtrasyon ve steril filtrasyon gibi yöntemler kullanılırken diğer yaklaşımlar da ölçek ve işletme değişkenlerine bağlı olarak seçilebilir (Liu et al., 2010).

Biyofarmasötik endüstrisinde, kararlı olması sebebiyle kromatografi kritik ve kabul gören bir ayırma saflaştırma metodudur. mAb saflaştırma süreçlerinin çoğunda tek basamakta yüksek saflık ve geri kazanım sağladığı için Protein A temelli kromatografi işlemi kullanılır. Protein A kromatografisinden sonra düşük oranda işlem ve ürün temelli safsızlıkların uzaklaştırılması gerekir. Katyon ve anyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, karışım modu kromatografisi ve hidroksiapatit kromatografisi gibi metotlardan bir ya da ikisinin kullanıldığı adımlar ile saflaştırma süreci iyileştirilebilmektedir. Bu basamaklar viral, konak hücre proteinleri ve DNA'nın ve istenmeyen parçaların ve diğer kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Son olarak saflaştırılmış mAb'lar konsantre edilir ve ultrafiltrasyon sonrası son ürün formülasyon tamponu ile paketlenir (Liu et al., 2010). Çizelge 2.4'te mAb üretiminin ardından kullanılacak saflaştırma birim işlemleri özetlenmiştir.

IgG sınıfı antikorlarının yanında, immün yanıtta üretilen ilk antikor olma özelliğinden ötürü IgM sınıfı antikorların da saflaştırılması ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Johnson et al., 1986/1987; Nevens et al., 1992; Nilson et al., 1993; Shibuya et al., 1988). Bu çalışmalardan alınan en önemli sonuçlar, saflaştırma

basamaklarını en aza indirgeyerek kolon dolgu materyali olarak mannan bağlanma proteinin (MBP) kullanıldığı ve afinite esaslı saflaştırma sağlayan yöntemlerde elde edilmiştir. Nevens ve arkadaşlarının aldığı sonuçlara göre fare asidik sıvısından 1 mg/mL konsantrasyonuna kadar IgM antikoru saflaştırılabilmiş, kolon rejenere edildikten sonra en az 10 kez daha yine fare asidik sıvısı ile kullanıldığında %95 oranında antikor saflaştırabildiği rapor edilmiştir (Nevens et al., 1992).

Çizelge 2.4 mAb saflaştırma sürecinde kullanılacak birim işlemler (Liu et al., 2010).

Birim işlem	Matris	Fonksiyon	Sınırlandırmalar	Saflaştırma sürecindeki yeri
Santrifüjasyon	Mekanik ekipman	Konak hücrelerin santrifügal kuvvetler ile ayrılarak süpernatant eldesi	Kayma hasarının uygun sistem tasarımı ile en aza indirgenmesi	İlk toplama basamağı
Derin filtrasyon	Filtre	Hücre, hücre kalıntısı, proteinler ve DNA'nın uzaklaştırılması	Muamele, kullanım sonrası uzaklaştırma, akış dağılımı	İlk ya da ikinci toplama basamağı
Flokülasyon	Kimyasal	Katıların topaklanarak katı-sıvı ayırımına olanak sağlar (santrifüj, filtrasyon)	Kayma hassasiyeti, flokülasyon ajanının kalıntıları ve alt akım işlemlerine etkisi	Toplama
Protein A afinite kromatografisi	Reçine	Kültür ortamından mAb saflaştırmasının ilk basamağıdır. Üretim ile ilgili safsızlıkların yüksek verimle uzaklaştırılmasını sağlar	mAb bağlanma kapasitesi, yüksek maliyet, küçük kolonların çok kez kullanımı ile maliyet düşürülebilir.	Birinci kromatografi basamağı
Kasyon değişim kromatografisi	Reçine	İyileştirme basamağı olarak istenmeyen ürünlerin uzaklaştırılması	mAb bağlanma kapasitesi, maliyet veya işletme kısıtları nedeniyle tek üretim çok kez işlenebilir.	İkinci ya da üçüncü kromatografi basamağı
	Reçine	mAb'ların süpernatantından yakalanmasını sağlar. Süreç ile ilgili safsızlıkların azaltılmasını sağlar.	mAb bağlanma kapasitesi, maliyet veya işletme kısıtları nedeniyle tek üretim çok kez işlenebilir. Kullanılmış besleme akışındaki kalıntılar rejenerasyonu ve tekrar kullanımı sınırlandırır.	Birinci kromatografi basamağı

	Membran	Süreç ile ilgili safsızlık ve agregatları bağlayarak iyileştirme basamağı olarak kullanılabilir.	Safsızlık kapasitesi	bağlama	Parvo virüs filtrasyonu öncesi ön filtre
Anyon değişim kromatografisi	Reçine	Konak hücre proteinleri, DNA, virüsler ve hücre kültürü sürecinden gelen safsızlıkları ve Protein A afinite kromatografisi kullanılmış ise kopan kolon parçaları ve agregatlarını yakalar.	mAb	bağlama	İkinci ya da üçüncü kromatografi basamağı
	Membran	Konak hücre proteinleri, DNA, virüsler ve hücre kültürü sürecinden gelen safsızlıkları ve Protein A afinite kromatografisi kullanılmış ise kopan kolon parçalarını yakalayarak iyileştirme basamağı olarak kullanılır.	Kolona	yüklenen üründeki safsızlık oranı fazla ise işlem verimi ve maliyeti artar.	İkinci ya da üçüncü kromatografi basamağı
Hidrofobik etkileşim kromatografisi	Reçine	İstenmeyen ürün varyantlarının ve agregatların, virüslerin, konak hücre proteinlerini DNA ve diğer safsızlıkların ayrılmasında iyileştirme basamağı olarak kullanılır.	mAb	bağlama	İkinci ya da üçüncü kromatografi basamağı
Aniyonik hidrofobik karışım modu	Reçine	Hücre kültürü prosesi temelli kalıntı protein, DNA ve diğer safsızlıkların ayrılmasında iyileştirme basamağı olarak kullanılır.	mAb	bağlama	İkinci ya da üçüncü kromatografi basamağı
Aniyonik karışım modu	Membran	Hücre kültür sürecinden gelen protein, DNA, virüs ve istenmeyen safsızlıkların ayrılmasında iyileştirme basamağı olarak kullanılır.	Kolona	yüklenen üründeki safsızlık oranı fazla ise işlem verimi ve maliyeti artar.	Üçüncü kromatografi basamağı
Seramik hidroksiapatit kromatografisi	Reçine	Konak hücre proteinleri, DNA, virüsler ve hücre kültürü sürecinden gelen safsızlıkları ve Protein A afinite kromatografisi kullanılmış ise kopan kolon parçalarını yakalayarak iyileştirme basamağı olarak kullanılır.	mAb	bağlama	İkinci ya da üçüncü kromatografi basamağı
Hidrofobik yük indüksiyon kromatografisi	Reçine	Hücre kültür sıvısından mAb'ların yakalanma basamağında kullanılabilir. Kalan safsızlıkların ayrılmasında iyileştirme basamağı olarak kullanılabilir.	Safsızlıkların uzaklaştırılmasında Protein A kromatografisi kadar verimli değildir. Sınırlı mAb bağlama kapasitesi.		Birinci, ikinci ya da üçüncü kromatografi basamağı

Viral filtrasyon	Membran	Filtrenin por çapına bağlı olarak geniş bir aralıkta virüs ayrımını sağlar.	Yüksek maliyetlidir. Birikime hassastır, verim düşer.	İkinci ve üçüncü kromatografi basamağı sonrasında
Yüzeyel akış filtrasyonu (TFF) - Mikrofiltrasyon	Membran	Birincil hücre kültürü toplama basamağında kullanılır.	Yüksek katı içeriğine sahip hücre kültür sıvısının filtrasyonu esnasında membranda biriken tortuya hassastır. Hücre parçalanması ve yüksek akış hızları verimi düşürür.	Toplama basamağı
TFF - Ultrafiltrasyon	Membran	Saflaştırılmış ortamın ya da birleştirilmiş üretimlerin konsantre edilmesinde ve tampon değişiminde kullanılır.	Tampon değişimi, yüksek ürün geri kazanımını ve yüksek konsantrasyonda ürün formülasyonu için sistem tasarımının dikkatli yapılması gerekir.	Son formülasyon ve birleştirilmiş ürünlerde
Yüksek performanslı TFF	Membran	Büyüklik ve elektriksel yük farklılıklarının ayırma ve saflaştırma için kullanıldığı iki boyutlu birim işlemidir.	Komplike bir işlemdir. Hali hazırda ticari uygulaması yoktur.	Saflaştırma, konsantrasyon ve tampon değişiminde.
Steril filtrasyon	Membran	Partikül uzaklaştırmada, ara işlemlerde ve son depolama ile paketleme de sterilite sağlanması amacıyla kullanılır.	Genellikle büyük partikül yüküne sahip sıvılar için uygun değildir. Por tıkanmasına sıkça rastlanır.	Saflaştırma sürecinin her noktasında

2.4 Yanal Akış İmmünolojik Testler

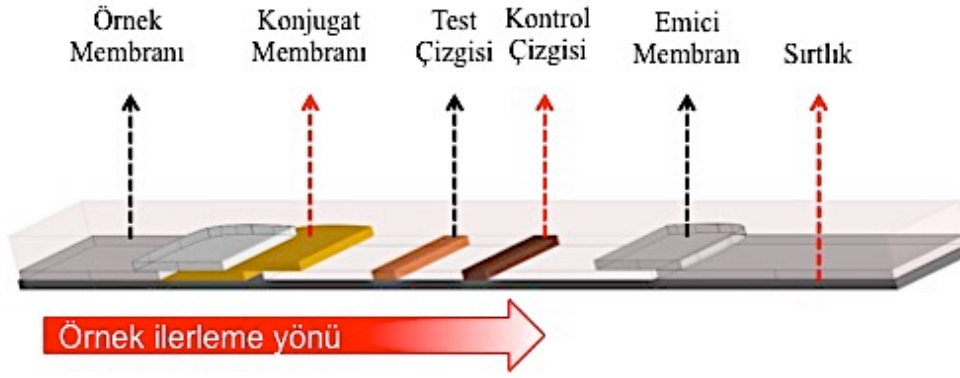
Geleneksel olarak, tanı teknolojilerinde; gerektirdiği alt yapı sayesinde yüksek hassasiyete sahip metotların kullanıldığı merkezileştirilmiş bir yaklaşımdan, daha düşük hassasiyete sahip, alt yapı gerektirmeyen, merkezi olmayan hatta hasta başında kullanılabilen (POC) cihazlara doğru bir yönelim vardır. Yanal akış immünolojik testler (LFIA) bu yönelimin genellikle en sonunda bulunmaktadır. Teknolojik gelişmeler sayesinde performansları artan LFIA'ler yüksek doğruluk ve hassasiyet, alt yapı gereksinimi ve kullanım kolaylığı gibi avantajlara sahiptir. Bu teknolojinin gelişen uygulamaları ile testler merkezlerden küçük hastaneler, poliklinikler, mobil araçlar ve hatta evlere kadar inmiştir. Sahip olduğu yüksek hassasiyetli platform olan yanal akışlı strip, gelişen teknoloji ile eklenen kartuşlar ve okuyucular ile gerçek bir laboratuvar-temelli sistem haline

gelmiştir. En çok aranan unsurlar olan; yüksek hassasiyet ve kolay kullanım birleştirilen mobil sistemler ile LFIA'ların diğer uygulamaları olarak öne çıkmaktadır. Özetlemek gerekirse, ilk etapta laboratuvar temelli test sonuçları ile yakın sonuçlar vermeyen LFIA sistemleri bir çok amaca hizmet eden güvenilir hale gelmiştir. Kullanılan materyaller, reaktifler, geliştirme metotları, üretimde kullanılan ekipmanlar, üretim süreçlerindeki teknoloji ve yeni jenerasyon teknolojiler sayesinde LFIA testlerinin evrimi gerçekleşmiştir ve devam etmektedir (Wild, 2013).

2.4.1 LFIA Yapısı ve Çalışma Prensipleri

LFIA testlerinin genel yapısı Şekil 2.8'de verilmiştir. Bir ya da daha fazla görevi olan membranlar birbiri üzerine gelerek bütün yapıyı oluştururlar ve sert bir zemin üzerine yapıştırılırlar (Wild, 2013).

Test kullanılacağı zaman örnek, stripteki örnek uygulama membranına damlatılır. Burada örnek testin kalan kısımlarıyla uyum sağlaması için şartlandırılır. Şartlandırılan örnek konjugat membranına doğru ilerler. Konjugat membranında partiküler bir konjugat immobilize edilmiştir. Bu konjugat genellikle kolloidal altın nanopartiküller ya da renkli, floresan veya paramanyetik lateks partiküllerdir. Testin formatı ile ilgili olarak bu partiküller bir antijen ya da antikor ile konjuge edilmiştir. Örnek konjugat membranında bulunan kurutulmuş konjugatı harekete geçirirken örnekteki hedef molekül ile konjugat etkileşir ve birlikte stripin bir sonraki bölgesi olan reaksiyon bölgesine geçerler. Reaksiyon bölgesi testin diğer biyolojik etmenlerinin üzerinde immobilize edildiği porlu bir nitroselüloz membrandır. Immobilize edilmiş biyolojik komponentler genellikle protein yapıdaki antijen ve/veya antikorlardır. Reaksiyon bölgesinde çizgiler halinde bulunurlar ve konjugat ile etkileşerek gelen kompleksi yakalarlar. Kullanılan örnekten fazlası reaksiyon bölgesini geçerek emici membran tarafından tutuklanır. Sonuçlar ise reaksiyon bölgesinde tutuklanan konjugat miktarına bağlı olarak oluşan ya da oluşmayan çizgiler yardımıyla çıplak göz ile veya bir okuyucu yardımıyla ortaya konur (Wild, 2013).



Şekil 2.8 LFIA konponentleri ve çalışma prensibi.

LFIA’da Kullanılabilen Belirteçler

LFIA için ideal belirteçler birden fazla metot ve teknoloji ile tespit edilebilmesinin yanında, kullanışlı ve yüksek dinamik aralığa sahip olmalıdırlar. Biyolojik ve/veya kimyasal aktivite ve bütünlük kaybı olmadan, biyolojik ve kimyasal maddeler ile kolayca konjuge edilebilmelidirler. Spesifik olmayan bağlanma karakteristiği az ya da hiç olmamalıdır. Bu özellikler şu şekilde özetlenebilir (Wong and Tse, 2009).

- Değişen ortamlarda stabil karakter göstermelidir (ortamın kimyasal içeriği, sıcaklık vb.),
- Maliyeti düşük olmalıdır,
- Diğer moleküller ile konjugasyonu düşük maliyetli, kolay ve ölçeklendirilebilir olmalıdır,
- Konjugasyon sonrasındaki proses basamakları kolay olmalıdır,
- Birden çok metot için kullanılabilmelidir,
- Yeni teknolojilere adaptasyonu kolay olmalıdır.

Fakat tüm bu özellikleri bünyesinde barındıran bir belirteç yoktur. Bu nedenle kullanılacak belirteç aşağıdaki parametrelere göre seçilmelidir:

- Belirleme / görselleştirme yöntemi,
- Yakalanacak analite uygunluk,
- Yakalama alanı,
- Gelecekteki ihtiyaçlar,
- Uygulanacağı test metoduna uygunluğu ve saklanabilirliği,
- Biyolojik ve/veya kimyasal hedef moleküller ile bağlandığında kendisinin ve diğer molekülün üç boyutlu yapısında değişikliğe neden olmaması,
- Maliyeti açısından sanayiye uygulanabilirlik.

Bilimsel çalışmalarda ve ticari üretimlerde kullanılan farklı belirteçler Çizelge 2.5'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.5 Araştırma, geliştirme ve ticari üretilere kullanılan farklı belirteçler.

Belirteç	Avantajları	Dezavantajları	Referans
Lipozomlar	Yüksek konsantrasyonda sinyal molekülü enkapsüle edilerek testlerin hassasiyetleri artırılabilir	¹ Lipozomların kurutulup yeniden şekillendirilmesi ile ilgili bilgi sınırlı olduğunda sıvı formda kullanılır, ² Lipozomların parçalanması için kullanılacak yüzey aktif maddelerin test hassasiyetini etkileyebilir	(Edwards and Baeumner, 2006; Rongen et al., 1997)
Kolloidal Karbon	¹ Kararlı ² Yüksek renk kontrastı sağlar, ³ Kolay konjugasyon, ⁴ Düşük maliyet	¹ Konjugasyon için optimum pH değeri deneyseldir, ² Konjugasyon işleminin süresi uzun	(Wong and Tse, 2009)
Floresan Problar	Antikor:Florofofor oranı 100 – 1.000 kat artırılarak testlerin hassasiyeti artırılabilir	¹ Kısa yarı ömürlü florofoforlar, ² Yüksek yoğunlukta kullanılan florofoforlar konjuge edilecek molekülün yapısını fizokimyasal olarak değiştirir	(Eberhard et al., 2007; Bonenberger and Doumanas, 2006)
Kuantum Noktalar (QDots)	¹ Yüksek floresan ve uzun yarı ömür. ² Değişen çap ile farklı renklerin elde edilebilmesi.	Yakalama molekülü ve kuantum noktalarının konjugasyonunun optimizasyonu	(Han et al., 2001; Rosenthal, 2001)
Frekans Yükseltici Fosforlar	Floresan ile karşılaştırıldığında daha uzun süre ışık yayar		(Zijlmans et al., 1999; Niedbala et al., 2001)
Lüminesans Belirteçler	¹ Fotodedektör yeterlidir, floresan belirteçlerde olduğu gibi ekstra bir ışık kaynağına gereksinim yoktur. ² Maliyeti bu nedenle daha düşüktür.	¹ Işık sızıntısı, arka okumaların değerlerini artırır. ² Işığa aşırı hassas sistemlerdir. ³ Reaktiflerin ve çözgenlerin saflığının yüksek olması gereksinimi. ⁴ Reaktif ve örneğin etkin bir şekilde karışması gereklidir.	(Wong and Tse, 2009)
Belirteç Enzimler	Sinyal amplifikasyonlarına olanak vermesi.	¹ Enzim konjugatları odak sıcaklığında uzun süre saklanamaz. ² LFIA’da yıkama basamağının olmaması. ³ Reaksiyon ürünlerinin hızlı bir şekilde ortama yayılıp sinyalin kaybolması	(Litman et al., 1980; Zuk et al., 1985)
Paramanyetik Partiküller	Manyetik alan varlığında manyetik özellik gösterirler.	Manyetik akının ölçülmesi için ilave ekipman ihtiyacı	(Wong and Tse, 2009)
Lateks Partiküller	¹ Basit adsorbsiyon veya kimyasal bağ yapabilme. ² Düşük maliyet. ³ Zor konjugatlanan floresan belirteçlerin kullanılmasına olanak verir.	Negatif yüklü proteinlere, polisakkaritlere ve peptidlere tutunmaları zordur.	(Katz et al., 1984; Katz et al., 1990)

	⁴ Partikül yüzeyi kaplanarak farklı metotlar birleştirilebilir.		
	¹ Düşük maliyet.		
	² Tekrarlanabilir üretim metotları.		
	³ Kolay ulaşılabilir.	Çözeltideki AuNP	(Faulk and Taylor, 1971; Wong and Tse, 2009)
Kolloidal Altın	⁴ Sık kullanılması sebebiyle fazla literatür bilgisi.	konsantrasyonu iyonik etkileşimlere bağlıdır.	
	⁵ Sıvı ve katı formda da kararlı olması.		

2.4.2 Lokalize Yüzey Plazmon Rezonansı (LSPR)

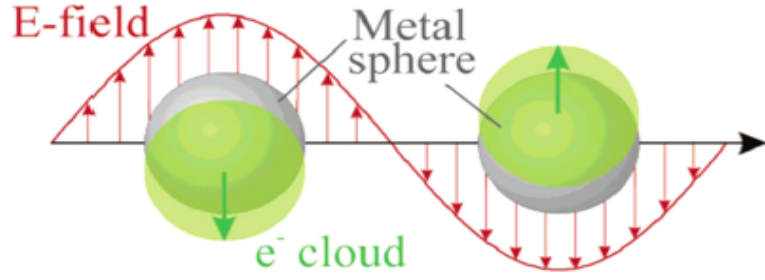
Optik tespit metotları, refraktif indeks değişiminin takip edilmesi, tutunma ve spektroskopi temelli ölçümler gibi bir çok metotta kullanılmaktadır (Fan et al., 2008). Fotonik kristal fiberleri, nano/mikro rezonatör yapılar, interferometrik cihazlar, plazmonik nano/mikro cihazlar ve yüzey plazmon rezonansı (SPR) temelli platformlar optik sensörlerin temel aldığı refraktif indeks değişiminin kullanıldığı teknolojiler arasındadır (Fan et al., 2008; Quavi et al., 2009; Yanik et al., 2010; Gao et al., 2011). Plazmonik; optik teknolojileri, hastalık tanısı ve taraması, güvenlik, gıda güvenliği ve biyolojik görüntüleme gibi uygulamalarda kullanılmaktadır. Plazmonik ve mikroakışkan teknolojilerinin entegrasyonu sayesinde; sağlık ve yatak başı tanı (POC) uygulamaları için ucuz, kullanışlı ve taşınabilir sistemler kolaylıkla geliştirilebilir. Bu entegrasyon sensör uygulamaları için floresan tespit, tutunma, transmisyon ve polarizasyon ölçümlerinin çip üzerine taşınmasını sağlamaktadır (Lab-on-chip, LoC) (Monat et al., 2007; Guo et al., 2011; Chin et al., 2007).

Mikro akışkan teknolojisi, maliyetli reaktiflerin kullanımını minimuma indirerek sıvıların mikro-ölçekte idare edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca ucuz olan mikroçip üretimi, büyük hacimli üretilmeye imkan sağlamaktadır (Wang et al., 2012; Alyassin et al., 2009; Gurkan et al., 2012; Wang et al., 2012). Örnek zenginleştirme (konsantrasyon), izolasyon, karıştırma ve ayrıştırma gibi bir çok alanda kullanılarak mikroakışkan teknolojisi moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve savunma alanlarında kullanılmıştır (Whitesides, 2006). Bu karakteristikleri mikroakışkan ve plazmonik teknolojilerinin POC ve yoğun bakım ünitelerinde

çözüm sunabilecek ideal teknolojiler olduğunu göstermektedir. SPR gibi optik tespit platformlarının mikroakışkan teknolojisi ile entegrasyonu ucuz, dayanıklı, hassas biyosensör LOC cihazlarının POC çözümlerinde yer alabileceğini yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Yager et al., 2006). Bu cihazların tek kullanımlık olması ve güvenli bir şekilde kontaminasyona sebep olmayacak şekilde ortamdan uzaklaştırılabilir olması önemlidir. LOC sistemleri, hastalığa ya da tıbbi duruma bağlı olmakla birlikte görece ucuz parçalardan üretilebilir ve minimum eğitim ile kolaylıkla kullanılabilirler. Sistem taşınabilir, güvenli ve pil ile çalışabilen bir hale getirilebilir (Tokel et al., 2014).

SPR ve lokalize yüzey plazmon rezonansı (localized surface plasmon resonance, LSPR) teknolojileri metal yüzeylere ya da nanopartiküllere yakın olarak bulunan dalga yayılımı ya da elektromanyetik alan artması fenomeni temeli ile çalışmaktadır. Düz metal yüzeylerdeki artan uyarılmış yüzey plazmon polaritonları SPR sistemlerinde kullanılmaktadır. LSPR sisteminde ise birbirine yakın nanopartiküller arasındaki artan alan ve sınırlama kullanılmaktadır. Nanopartiküller etrafındaki elektromanyetik alan salınımları sebebiyle lokalize terimi kullanılmaktadır. LSPR sensörlerinde biyosensör özelliği plazmon durumlarının değişiminde dalga boyunun 10 nm ve daha fazla kayması ile olmaktadır (Willems and Van Duyne, 2007; Brolo, 2012). SPR biyosensörleri biyo-ajanların tespitinde veya niceliklerinin belirlenmesinde rezonans açısındaki değişimi kullanırlar. LSPR ölçümlerinde ise sönümlenme eğrilerinden elde edilen absorbans veya spektral değişimler kullanılır.

LSPR tespit yönteminde metal nanopartiküllerin yakın çevrelerindeki elektromanyetik alana tepki olarak değişen rekraktif indekslerinin elde edildiği spektroskopik veriler kullanılmaktadır. Nanopartiküller üzerine ışık çarptığında partiküller elektronlar uyarılır ve kondüksiyon bandındaki elektronlar toplu olarak salınım yaparlar (Willems and Van Duyne, 2007). Rezonanstaki salınımların sonucu olarak nanopartiküller, belirli bir dalga boyu aralığında kuvvetli bir biçimde ışığı saçarlar. Metal nanopartiküllerin etrafındaki plazmonik rezonans Maxwell denklemiyle açıklanır ve Şekil 2.9 görselleştirilmiştir (Kelly et al., 2003).



Şekil 2.9 Gümüş nanopartiküller etrafındaki elektrik alan ve elektron bulutunun rezonansı (Kelly et al., 2003)

Biyotespit uygulamalarında bir analitin nanopartiküller üzerine tutunması refraktif indekste bir değişime dolayısıyla da sönümlenme maksimum dalga boyu değeri, λ_{max} değerinin kaydığı gözlenir. Bu kayma Denklem 2.1 ile hesaplanır (Eustis and El-Sayed, 2006). Bu grafikte m hassasiyet faktörünü, Δn refraktif indekste ki değişimi, d efektif tutunma tabakasının kalınlığını ve l_d azalan elektromanyetik alandaki azalmayı temsil etmektedir.

$$\Delta\lambda_{max} \cong m\Delta n \left[1 - \exp\left(-2d/l_d\right) \right] \quad (\text{Denklem 2.1})$$

LSPR tanı sistemlerinin kullanıldığı çalışmalarda görünür spektrumunu kapsayan beyaz ışık kaynağı kullanılır (Myers and Lee, 2007). Saçılan ışık spektrofotometre tarafından toplanır ve spektradaki değişiklikler bağlanma verilerine çevrilir (Willems and Van Duyne, 2007). LSPR çalışmalarında ışık direk olarak örneğe, bir prizma ya da bir ızgara deseni olmadan gönderilebildiği için uyarılma açısının önemi daha düşüktür. Ayrıca LSPR yüzeyleri ısı değişimlere SPR yüzeyler ile karşılaştırıldığında daha az hassastır (Mayer and Hafner, 2011; Abdulhalim and Zourob, 2011; Haes and Duyne, 2004). LSPR uygulamaları taşınabilir spektrometrelerin varlığı göz önüne alındığında taşınabilir tanı uygulamalarına çevrilmeleri daha kolaydır.

3 MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Balb/c ırkı fareler

Çalışmada kullanılan Balb/c ırkı 4-6 haftalık fareler, Dokuz Eylül Üniversitesi, Multidisipliner Laboratuvarı Deney Hayvanları Birimi'nden, Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 30.07.2010 tarih ve 2010-113 numaralı onayı ile temin edilip çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.2 Hücre Hatları

3.1.2.1 EL-4 Hücre Hattı

In vitro immünizasyon çalışmalarında immünizasyon ortamınının %25'i olarak kullanılan şartlandırılmış ortamın elde edildiği hücre hattıdır. Kültür Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonun'dan (ATCC) EL4.IL2 kodu ile satın alınmıştır. Kültür %10 at serumu (DHS, Sigma, ABD) içeren yüksek glikoz içeriğine sahip (4,5 g/mL) DMEM kültür ortamı ile çoğaltılmıştır. Hücrelerin saklanması için %10 DMSO (Sigma, ABD) ve %90 fetal sıgır serumu (FBS, Biochrom, Almanya) içeren dondurma ortamı kullanılmıştır ve ampüller -196 °C'de stoklanmıştır.

3.1.2.2 Miyeloma Hücre Hattı

Ag8 miyeloma hücre hattı HÜKÜK'ten (Hayvan Hücre Kültürü Koleksiyonu, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Şap Enstitüsü, Ankara) temin edilmiştir. Kültürler, %10 FBS ve 2 mM L-glutamin (Biochrom, Almanya) içeren RPMI 1640 besi ortamı ile hazırlanmıştır. Hücrelerin saklanması için %10 DMSO ve %90 FBS içeren dondurma ortamı kullanılmış ve ampüller -196 °C'de stoklanmıştır.

3.1.3 Besi Ortamları

3.1.3.1 Miyeloma Kültür Ortamı

Ag8 hücrelerinin kültivasyonu için %10 FBS (Biochrom, Almanya), 2 mM L-glutamin (Biochrom, Almanya), 10 µg/mL gentamisin (Biochrom, Almanya) içeren RPMI 1640 (Biochrom, Almanya) besi ortamı kullanılmıştır.

3.1.3.2 Şartlandırma Ortamı

EL-4 hücrelerinin kültüre edilmesinde %10 DHS, 2 mM L-glutamin (Biochrom, Almanya), 10 µg/mL gentamisin (Biochrom, Almanya) içeren yüksek glikoz içeriğine sahip (4,5 g/L) DMEM besi ortamı kullanılmıştır. *In vitro* immünizasyonda kullanılacak şartlandırılmış ortamın eldesi için ise 1×10^6 hücre/mL konsantrasyonundaki kültüre 10 µg/mL forbol-12-miristat-13-asetat (PMA, Sigma ABD) eklenmiş ve bir gece inkübasyon sonrasında hücreler santrifügasyon ile uzaklaştırılmışlardır (1500 rpm, 10 daika). Kullanılmayan şartlandırılmış ortam ise -80 °C derin dondurucuda kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

3.1.3.3 *In vitro* İmmünizasyon Ortamı

In vitro immünizasyon için üç farklı besi ortamı aşağıdaki sıra ile kullanılmıştır.

Birinci Ortam

Kendisine karşı antikor üretilmesi istenen protein (100 ng/mL h-FABP ya da 100 ng/mL NT-proBNP), 10 µg/ml N-asetil-murail-L-alanil-L-isoglutamin (MDP, Sigma, ABD) fenol kırmızısı içermeyen RPMI 1640 (FKİ-RPMI 1640, Biochrom, ABD) besi ortamı ile hazırlanmıştır.

İkinci Ortam

İzole edilen B-lenfositlerin immünizasyonu için gerekli sitokinleri içeren ortamdır. İkinci ortam; %2 tavşan serumu (Sigma, ABD), %25 şartlandırılmış ortam (EL-4 hücre kültür süpernatantı), 2 mM L-glutamin (Biochrom, Almanya), 10 µg/ml gentamisin (Biochrom, Almanya), 10 IU pensilin (Biochrom, Almanya), 10 µg/ml streptomisin (Biochrom, Almanya), 10 ng/ml interlökin-4 (IL-4) (Sigma, ABD), 2 ng/ml interlökin-6 (IL-6) (Sigma, ABD), 2 ng/ml interlökin-2 (IL-2) (Sigma, ABD), 10 pg/ml interlökin-1 α (IL-1 α) (Sigma, ABD) kullanılarak hazırlanmıştır.

Üçüncü Ortam

İmmünize edilmekte olan B-hücrelerinin antikor üretimini teşvik etmek amacıyla immünizasyon kültürlerine 5. günlerinde 20 ng/ml interferon gama (IFN- γ) ve 10 ng/ml interlökin-10 (IL-10) eklenmiştir.

3.1.3.4 Hibridoma Kültür Ortamları

Hibridoma eldesi ve üretimi için kullanılan farklı içeriklere sahip besi ortamları şu şekildedir;

HAT Ortamı

Füzyon işleminden sonraki 14 gün boyunca kullanılan besi ortamıdır. %20 FBS (Sigma, ABD), %10 DHS (Sigma, ABD), 2 mM L-glutamin (Biochrom, Almanya), 10 µg/mL gentamisin (Biochrom, Almanya), 100 µM hipoksantin, 0,4 µM aminopterin, 16 µM timidin (HAT, Sigma, ABD), %1 HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Biochrom, Almanya) FKİ-RPMI 1640 (Biochrom, Almanya) besi ortamına eklenerek hazırlanmıştır.

HT Ortamı

HAT ortamının ardından 7 gün boyunca kullanılan besi ortamıdır. %20 FBS (Sigma, ABD), %10 DHS (Sigma, ABD), 2 mM L-glutamin (Biochrom,

Almanya), 10 µg/mL gentamisin (Biochrom, Almanya), 100 µM hipoksantin, 16 µM timidin (HT, Sigma, ABD), %1 HEPES (Biochrom, Almanya) FKİ-RPMI 1640 (Biochrom, Almanya) besi ortamına eklenerek hazırlanmıştır.

Hibridoma Üretim Ortamı

İstenilen antikor ürettiği belirlenen hibridoma hücrelerinin kültüre edilmesinde kullanılan besi ortamıdır. %10 FBS (Sigma, ABD), 2 mM L-glutamin (Biochrom, Almanya), 10 µg/mL gentamisin (Biochrom, Almanya), 100 µM hipoksantin, 16 µM timidin (HT, Sigma, ABD), %1 HEPES (Biochrom, Almanya), RPMI 1640 (Biochrom, Almanya) besi ortamına eklenerek hazırlanmıştır.

mAb Üretim Ortamı

İstenilen antikor ürettiği belirlenen hibridoma hücrelerinin kültürde daha uzun süre ile ve daha fazla mAb üretmesini sağlamak adına kültürler serum konsantrasyonu düşük besi ortamına adapte edilmişlerdir. Bu amaçla mAb üretme ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamlar hibridoma üretim ortamının farklı oranlarda (%25 ve %50) ISF-1 (Biochrom, Almanya) besi ortamı ile karıştırılması ile elde edilmiştir.

3.1.3.5 Sterilitenin Kontrolü için Bakteriye Besi Ortamları

Anaerobik bakteri kontrolü için tiyoglikolat brot (TGB, Merck, Almanya), aerobik bakteri kontrolü için triptik soy brot (TSB, Lab M, İngiltere) ve fungus kontrolü için Sabouraud dekstroze agar (SDA, Merck, Almanya) üreticinin belirttiği şekillerde hazırlanmıştır.

3.1.4 Kitler

EL-4 hücreleri tarafından farklı koşullarda üretilen IL-2 miktarı, IL-2 ELISA kiti (Life Technologies, Almanya) ile belirlenmiştir. Elde edilen hibridomalar tarafından üretilen mAb'ların izotiplerinin belirlenmesinde ISO-2 (Sigma, ABD) kiti kullanılmıştır. Üretilen mAb'ların saflaştırılmasında Pierce™ IgM Saflaştırma Kiti (Thermo Fischer Scientific, ABD) kullanılmıştır. Saflaştırılan mAb fraksiyonlarındaki protein içeriğinin belirlenmesi için QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich, QPBCA, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.5 Kimyasallar

Çalışmanın tamamında kullanılan kimyasallar ile hazırlanan çözeltiler ve tamponlar şöyledir:

- Fizyolojik serum; 8,0 gr NaCl, 1.150 gr Na₂HPO₄, 0,2 gr KH₂PO₄, 0,2 gr KCl, 0,133 gr CaCl₂.2H₂O, 0,1 gr MgCl₂.6 H₂O / 1000 ml ultra saf su (pH 7,2)
- Sodyum hidroksit çözeltisi (1 M) (Merck, Almanya)
- Hidrojen peroksit çözeltisi (%30 H₂O₂, Merck, Almanya)
- 0,1 M fosfat tamponu (PBS) (Ca⁺² - Mg⁺² içermeyen); 8 g NaCl (Merck, Almanya), 0,2 g KCl (Merck, Almanya) ve 1,57 g Na₂HPO₄.2H₂O (Merck, Almanya) / 1.000 mL saf su
- ELISA yıkama solüsyonu (TPBS); %0,1 Tween-20 (Merck, Almanya) içeren 0,1 M PBS.
- ELISA konjugat solüsyonu; %0,1 HRP işaretli anti-fare IgG içeren TPBS.
- 0,05 M fosfat-sitrat tamponu (pH 5,0); 25,7 ml 0,2 M dibazik sodyum fosfat (Sigma-Aldrich, Almanya), 24,3 ml 0,1 M sitrik asit (Fisher Scientific, ABD) / 75 ml deiyonize su
- ELISA substrat solüsyonu; 30 mg o-fenilendiamin dihidroklorit/ 75 mL 0,05 M fosfat-sitrat tamponu (ışık geçirmez cam şişede)

- HPLC için yürütücü solvent; 5 mM H₂SO₄ (Merck, Almanya)
 - PEG 1500 (Sigma, ABD)
 - Bakır sülfat (CuSO₄.5H₂O) (Applichem, Almanya)
 - 4X SDS-PAGE ayırma jel tamponu; 1,5 M Tris/HCl (Sigma, ABD), %0,4 SDS (pH 8,8)
 - Akrlamid (%30); %29 akrilamid (Sigma, ABD) ve %1 N, N-metilenbisakrlamid (Sigma, ABD)
 - DAPI (4',6-diamidino-2-phenyl-indole) dilactate) (Sigma, ABD)
 - Carnoy's fiksatif; metanol:asetik asit (3:1) (Merck, Almanya)
 - Kolçisin (Biochrom, Almanya)
 - KCl (Merck, Almanya)
 - Giemsa boyası, %7,5 sol. (Applichem, Almanya)
 - Tripan mavisi (%0,4) (Merck, Almanya)
 - Kolloidal altın nanopartikül (AuNP) solüsyonları (10 nm , 20 nm ve 40 nm) (BBI Solutions, ABD)
- Biotin-BSA solüsyonu (Arista, ABD)
- Streptavidin (Arista, ABD)
 - AuNP konjugasyon solüsyonu; 0,1 M borik asit (pH 8,5) (Sigma-Aldrich, Almanya)
 - Sığır serum albümin (BSA, Sigma-Aldrich, Almanya) solüsyonları (%0,5, %1, %10), PBS içinde hazırlanmıştır.
 - Konjugat ve örnek membranı şartlandırma solüsyonu; % 2,5 süktroz (Sigma-Aldrich, Almanya) içeren 2 mM borik asit solüsyonu (Sigma-Aldrich, Almanya) (pH 7,0)
 - Nitroselüloz membran yıkama solüsyonu; 5mM Na₂HPO₄ (Merck, Almanya) (pH:7,0)
 - 11-mercaptoundecanoik asit (MUA) (Sigma, ABD)

- N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimit hidroklorit (EDC) (Sigma, ABD)
- N-hidroksisulfoksiniimit (NHS) (Sigma, ABD)
- 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) (MES) (Sigma, ABD)
- Protein G (Sigma, ABD)
- Absolut etanol (Sigma, ABD)
- NT-proBNP (HyTest, Finlandiya) proteini rekonstrüksiyon tamponu; 0.15 M NaCl (Sigma, ABD), 0.01% Tween 20 (Sigma, ABD) ve 0.5% BSA (Sigma, ABD) içeren 0.05 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,8)
- cTnI proteini (HyTest, Finlandiya) rekonstrüksiyon tamponu; 7M üre (Sigma, ABD), 20 mM Tris (Sigma, ABD), 5 mM EDTA (Sigma, ABD) and 15 mM 2-merkaptoetanol (Sigma, ABD) içeren üre/Tris tamponu (pH 7,5) (Sigma, ABD)
- SDS-PAGE için standart 'ladder'; PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Almanya)
- Tetrametiletilendiamin (TEMED) (Amersham Biosciences, ABD)
- Amonyum persülfat (APS) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Glisin (Sigma, Almanya)
- Trizma base (Sigma, Almanya)
- SDS (Sigma, Almanya)

3.1.6 Proteinler ve mAb'lar

Çalışmada antijen olarak kullanılıp kendisine karşı antikor üretilen proteinler, bu proteinlerin tespitinde kullanılan mAb'lar ve üretilen/satın alınan mAb'lar ile tespit çalışmalarında hedef olarak kullanılan proteinler şöyledir:

3.1.6.1 Proteinler

- h-FABP (4F29, HyTest, Finlandiya)
- NT-proBNP (4NT1, HyTest, Finlandiya)

3.1.6.2 mAb'lar

- Anti-h-FABP (9F3 ve 10E1, HyTest, Finlandiya)
- Anti-NT-proBNP (24E11 ve 15F11, HyTest, Finlandiya)

3.1.7 Sarf Malzemeler

Çalışmada kullan hücre kültürü malzemeleri Greiner Bio-One (Almanya)'dan temin edilmiştir.

3.1.8 Konsantrasyon Ekipmanları

Çalışmada yapılacak küçük hacimli konsantrasyon çalışmalarında (20 – 500 mL) VivaSpin20 (GE HealthCare, Almanya) (Şekil 3.3), orta ölçekli konsantrasyon çalışmalarında ise çapraz akışlı filtrasyon sistemi olan Sartoclon Slice Holder (Sartorius, Almanya) ve Sartoclon® Slice (100 kDa, Sartorius, Almanya) kullanılmıştır (Şekil 3.4).

Ayrıca konsantre edilen retentatın içeriğinde fosfat iyonlarının uzaklaştırılması için yapılan diyaliz işleminde 6-8 kDa '*Molecular weight cut-off*' değerine sahip diyaliz membranı kullanılmıştır (Spectra/Por, Almanya).

3.1.9 Tanı Kiti Üretimi

Çalışmada üretilen membran bazlı tanı kitlerinin üretiminde kullanılan membranlar şöyledir:

- Nitrosellüloz membran (NC) (Millipore, ABD) (sırtlık ile birlikte)

- Adsorban membran (Millipore, Almanya)
- Konjugat membranı (Millipore, Almanya)
- Nitrosellüloz membran (Millipore, ABD)

Nanoplazmonik mikroakışkan çip üretimi için lazer kesici de tasarlanan mikroçiplerin hazırlanmasında kullanılan materyaller şöyledir:

- Poli metil metakrilat (PMMA, 3,175 mm ve 1,5 mm) (McMaster-Carr, ABD)
- Çift taraflı yapışkan polimer film (DSA) (iTapestore, ABD)
- Cam lamel, 24 x 40 mm, (VWR, ABD)

3.1.10 Cihazlar

3.1.10.1 Otoklav

Hirayama, Japonya, Hiclave HVE-50 ve Hirayama Hiclave HVA-110L marka ve model numaralı otoklavlar çalışmada otoklav kullanılarak sterilize edilmesi gereken malzemeler için kullanılmıştır.

3.1.10.2 İnkübatörler

Thermo Scientific, Almanya, Heraeus HeraCell 150i marka ve model numaralı %5 CO₂ inkübatör hücre kültürasyonunda, Thermo Scientific, Almanya, Heraeus B6 marka ve model numaralı inkübatör ise sterilite çalışmaları, membran bazlı kitlerin hazırlanmasında ve ELISA çalışmalarında kullanılmıştır.

3.1.10.3 Biyoreaktör

mAb'ların pilot ölçekte üretiminin yapılması için Sartorius, Almanya, BioStat B Plus marka ve model biyoreaktör kullanılmıştır.

3.1.10.4 Santrifüjler

Eppendorf, Almanya 5810R marka ve model numaralı santrifüj hücre kültürü ve antikör konsantrasyonu çalışmalarında, Eppendorf, Almanya, MiniSpin Plus marka model numaralı mikrosantrifüj ise mAb-AuNP konjugatlarının harlanması için kullanılmıştır.

3.1.10.5 Spektrofotometreler

ELISA ve BCA değerlendirmeleri için Molecular Devices, ABD, SpectraMax 190 marka ve model numaralı mikroplyt okuyucu, hazırlanan nanoplazmonik mikroplytlerin değerlendirilmesi için Tecan, İsviçre, M1000i marka ve model numaralı mikroplyt okuyucu, hazırlanan taşınabilir nanoplazmonik mikrokışkan çiplerin okunması için ise ‘Bio-acoustic MEMS in Medicine (BAMM)’ Laboratuvarları’nda oluşturulan taşınabilir spektrofotometre sistemi kullanılmıştır. Bu sistemde spektrum aralığı 360 nm ile 2400 nm aralığında olan Tungsten halojen lamba (OceanOptics HL-2000-CA) ışık kaynağı olarak kullanıldı. Ölçümler için 450 nm ile 700 nm arası 0,3 nm spektral çözünürlük kaydedildi. Çalışma boyunca tüm spektrum verileri 1 milisaniyede HR2000+ Spektrometre (Ocean Optics, ABD) ile alındı. Beyaz ışık 0,4 mm’lik fiber optik kablolar (Premium Fiber, UV VIS, Ocean Optics, ABD) ile taşınarak örnekler gönderildi. X-Y-Z yönlendirici yardımıyla örnekler manual hareket ettirilerek ölçümler alındı

3.1.10.6 Lazer Kesici

Nanoplazmonik mikrokışkan çiplerin hazırlanması için gerekli komponentlerin kesilmesinde Universal Laser Systems Versa Laser, Avusturya, marka ve model Sınıf-1 CO₂’li lazer kesici kullanılmıştır.

3.1.10.7 Laminar Akışlı Kabin

Dalak izolasyonu ve hücre kültürü çalışmaları Heraus, Almanya, HS12 model ve marka numaralı, biyogüvenlik seviyesi-2, laminar akışlı kabinde gerçekleştirilmiştir.

3.1.10.8 Mikroskoplar

Hücre kültürü çalışmalarındaki görüntüleme işlemleri için Olympus, Japonya, CK40 32 PH marka ve model numaralı ters faz ışık mikroskobu, karyotip analizleri için ise Olympus CX31 marka ve model ışık mikroskobu kullanılmıştır. Ayrıca mikoplazma kontrolü için Leica, Almanya, DMIL marka ve model floresan mikroskop kullanılmıştır.

3.1.10.9 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Hibridoma kültürlerinden, farklı zamanlarda alınan örneklerdeki glikoz tüketimi ve laktik asit salımı miktarlarının belirlenmesi amacıyla refraktif indeks dedektörüne (RID) sahip Thermo Scientific, Almanya, Finnigan Surveyor RI plus dedektor marka ve model HPLC cihazı, Phenomenex Rhexen, ABD, RHM monosakkarit (H⁺) iyon değiştirici kolonu ile birlikte kullanılmıştır.

3.1.10.10 Su Banyosu

Çalışmalarda solüsyonların, besi ortamlarının sıcaklığının istenilen değerlere getirilmesi için Polyscience, Almanya, 911 marka ve model su banyosu kullanılmıştır.

3.1.10.11 Buzdolabı

Çalışmalarda hücre kültür malzemelerinin ve saklama şartlarına uyan kimyasalların saklanması için Indesit, Ariston, Bosch ev tipi buzdolapları ile Fisher Scientific, ABD, Laboratuvar tipi buzdolabı kullanılmıştır.

3.1.10.12 Derin Dondurucular

Çalışmada kullanılan hücre kültür malzemeleri, mAb'lar, proteinler, süpernatantların ve bunlardan elde edilen çözeltilerin saklanması için üretici veya literatürde tavsiye edilen sıcaklıklara göre Indesit, Almanya marka -20 °C ve Sanyo, Japonya, MDF-U52V marka ve model -80 °C derin dondurucular kullanılmıştır.

3.1.10.13 Sıvı Azot Tankları

EL-4 kültürleri, miyeloma kültürleri ve elde edilen hibridoma hatlarının uzun süreli korunması ve saklanması Harsco, Almanya, K serisi ve Air Liquid, Fransa, GT40 marka ve model sıvı azot tankları kullanılmıştır.

3.1.10.14 Karıştırıcılar

Hazırlanan solüsyon ve çözeltilerin homojen hale getirilmesi amacıyla IKA, Almanya, RT5 marka ve model, ELISA ve BCA çalışmalarında pleytlerin çalkalanması için Heidolph, Almanya, Titramax 100 marka ve model çalkalayıcı kullanılmıştır.

3.1.10.15 SDS-PAGE Sistemi

Saflaştırılan antikorların büyüklükleri ve saflıkları SDS-PAGE yardımıyla tek boyutlu elektroforetik ayırlama ile Bio-Rad Mini-Protean Tetra Sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.10.16 pH Metre

Çalışmada kullanılan solüsyon ve çözeltilerin pH'sının ayarlanması için WTW inoLab® , ABD, pH 7110 marka ve model numaralı pH metre kullanılmıştır.

3.1.10.17 Terazi

Çalışmada Mettler Toledo, Almanya, AB204-S marka ve model terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 EL-4 Hücre Kültürü ve Şartlandırma Ortamı Eldesi

Yapılan literatür taramalarında görüldü ki *in vitro* immünizasyon işleminde ortama salınan interlökinler ve stimulatörler vasıtasıyla işlemin başarısını arttırmak üzere timosit hücre kültürlerinden elde edilen zenginleştirilmiş vasatlar (timosit hücre kültürlerinden elde edilen süpernatantlar) kullanıldı (Borrebaeck, 1987, 1989). Fakat başarılı ve uygun miktarda süpernatant eldesi için uygun dönemdeki yaklaşık 10 kadar Balb/c farenin sakrifiye edilmesi ve timüslerinin elde edilecek primer timüs hücre kültürlerinin hazırlanması gerekmektedir. Bu kadar fazla sayıda deney hayvanının kullanılmasını önlemek adına ticari olarak temin edilen ve PMA varlığında IL-2 ürettiği bildirilen EL-4 süspanse timosit hücre hattı satın alınmış ve üreme kinetiği çıkarıldı. Ayrıca farklı konsantrasyonlardaki PMA varlığında hücrelerin ürettiği IL-2 miktarı ve morfolojileri de incelendi.

3.2.1.1 EL-4 Hücre Kültürü Hazırlanması

Kültürler DMEM (4,5 g/Lsükroz, % 10 DHS, 2 mM L-glutamin, 10 µg/mL gentamisin) besi ortamı kullanırken, şartlandırılmış ortam (IL-2 içeren ortam) eldesi için ise aynı ortama 10 ng/mL PMA eklenmiştir. 10 ng/mL, 20 ng/mL, 30 ng/mL içeren besi ortamı ile 12 saatlik kültivasyon sonrasında mL'deki IL-2 miktarı üreticinin tavsiyesi doğrultusunda IL-2 ELISA kiti ile belirlendi.

3.2.1.2 EL-4 Hücre Kültürünün Pasajlanması

Kültürlerdeki ortalama hücre sayısı 1×10^6 hücre/mL olana kadar hücreler kültüre edildi, bu konsantrasyona ulaştıklarında ise 2×10^5 hücre/mL'ye hazırlanan besi ortamıyla seyreltilerek hacimsel olarak pasajlandı. Hücreler 1000 rpm, 4 °C, 6 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş ve toplandı.

3.2.1.3 EL-4 Hücre Kültürünün Dondurularak Stoklanması

Dondurulmak istenen kültürler en az 5×10^5 hücre/vial olacak şekilde santrifügasyon sonrası yeniden süspanse edilerek % 90 FBS, % 10 DMSO'dan oluşan dondurma vasatı ile donduruldu. Bir gece -80°C derin dondurucuda bekletildikten sonra stoklar sıvı azot tankına (-196°C) alındı.

3.2.2 Ag8 Miyeloma Hücre Kültürleri

Farklı antijenik yapılara karşı mAb üretiminde daha önce laboratuvarımızda kullanılan miyeloma hücre hattı olan Ag8 hücre hattı bu çalışmada da kullanıldı.

3.2.2.1 Ag8 Miyeloma Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Sıvı azotta saklanan kültürler hazırlanıp hızlı bir şekilde 37°C 'ye ısıtılan su banyosu yardımıyla vial içeriğinin %75'i eriyene kadar çözündürüldü. Laminar akışlı kabinde 37°C 'ye ısıtılan besi ortamı (RPMI 1640, % 10 FBS, 2 mM L-glutamin, 10 $\mu\text{g/mL}$ gentamisin) vial damla damla eklenerek kültür tamamen çözündürülerek, 15 mL'lik bir tüpe vial içeriği ve serumlu ortam eklendi. 1000 rpm, 4°C , 6 dakika santrifügasyon işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler %0,4 tripan mavisi ile sayıldıktan sonra 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde kültürler başlatıldı.

3.2.2.2 Ag8 Miyeloma Hücre Kültürlerinin Pasajlanması ve Saklanması

1 mL'dek hücre sayısı 1×10^6 'ya ulaştığı zaman hücreler sayılarak hacimsel olarak 1×10^5 hücre/mL'ye pasajlandı ya da dondurularak saklandılar. Hücre sayısı, 1×10^6 h/mL'ye geldiğinde hücreler hacimsel olarak pasajlandı ya da dondurma vasatı ile birlikte (% 90 FBS, % 10 DMSO) hücreler 24 saat için -86°C derin dondurucuya, uzun süreli saklamalar için ise bu aşamadan sonra sıvı azot tankına alındılar.

3.2.2.3 Ag8 Üreme Kinetiğinin Belirlenmesi

Yeterli sayıya ulaşan kültürlerden üreme kinetiği belirlemek üzere 1×10^4 hücre/mL konsantrasyondaki hücre süspansiyonundan 2'şer mL alındı ve 35 mm çaplı kültür petrilerinde kültüre edildiler. 15 gün boyunca günlük hücre sayımı %0,4'lük tripan mavisi çözeltisi ile yapıldı ve hücrelerin üreme kinetiği çıkarıldı. Aşağıda verilen denklemler ile hücrelere ait spesifik büyüme hızı (Denklem 3.1) ve ikilenme süreleri (Denklem 3.2) hesaplandı (Akcael-Aslankaraoğlu et al., 2003);

$$\mu = \frac{\ln(x_1) - \ln(x_2)}{(t_2 - t_1)} \quad T_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad \text{Denklem 3.1 ve 3.2}$$

3.2.3 *In vitro* immünizasyon

In vitro immünizasyon için öncelikle Balb/c farelerden dalak izolasyonu yapıldı. Daha sonra da immünizasyon işlemine başlandı. Fareler sakrifiye edilmeden önce ketamin hidroklorür / ksilazin bileşimi ile sakınleştirildi. Bu amaçla 2 mg/kg ketamine hidroklorür ve %2 ksilazin kombine edilerek kas içine uygulandı. Bayılan hayvanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen farenin yüzeysel dezenfeksiyonu % 70'lik etanol ile yapıldıktan sonra laminar akışlı kabinde dalak organı izole edildi. Dört birim antibiyotik (40 µg/mL gentamisin, 40 IU/mL penisilin, 40 µg/mL streptomisin) içeren steril PBS (Ca^{2+} – Mg^{2+} iyonlarını içermeyen) içerisine alınan dalakların önce dış zarı dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Elde edilen organ steril, çelik süzgeçten enjektör pistonu ile geçirilerek doku daha küçük parçalara ayrıldı. Süzgeçten geçen hücre agregatı 12 ml Hank'in dengeli tuz solüsyonu (HBSS) ile süspanse edildi ve santrifüj edildi (1000 rpm, 4 °C, 6 dakika). Süpernatant uzaklaştırıldı, pelet tekrar süspanse edilerek 5 ml % 0,83'lük amonyum klorür (NH_4Cl) solüsyonu ile pipetleme yapılarak yıkama yapıldı. Santrifügasyon, 1000 rpm, 4 °C, 6 dakikada gerçekleştirildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, pelet tekrar süspanse edilerek 10 ml HBSS ile pipetlenerek 2 kez yıkandı. Yıkama sonrası süpernatant uzaklaştırıldı,

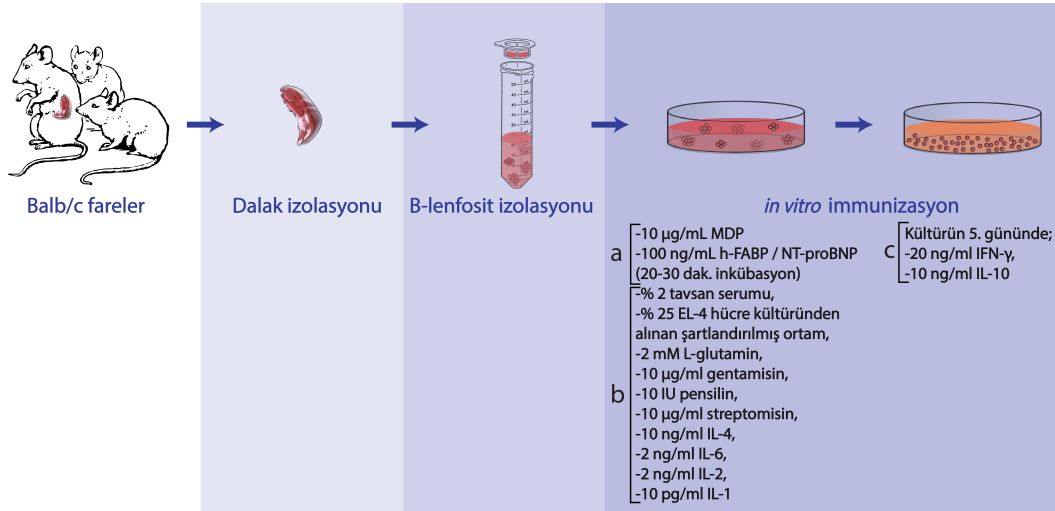
pelet tekrar süspanse edildi ve 5 ml serumsuz FKİ-RPMI 1640 ile süspanse edildi. % 0,4'lük tripan mavisi ve Neubauer hemositometresi ile yapılan hücre sayımının ardından $6,5 \times 10^6$ hücre/mL FKİ-RPMI 1640 ile 60 mm çaplı kültür petrilerine alındı. Ardından 10 µg/mL MDP ve 100 ng/mL protein (h-FABP ya da NT-proBNP) hücre süspanسیونuna eklendi. 15 – 20 dakika oda sıcaklığındaki inkübasyondan sonra aşağıdaki içeriğe sahip FKİ besi ortamı ile birlikte kültür hacmi iki katına çıkarılarak 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda kültüre alındı;

% 2 tavşan serumu, % 25 EL-4 zenginleştirilmiş ortam, 2 mM L-glutamin, 10 µg/mL gentamisin, 10 IU pensilin, 10 µg/mL streptomisin, 10 ng/mL IL-4, 2 ng/mL IL-6, 2 ng/mL IL-2, 10 pg/mL IL-1α.

Kültürün 5. gününde ortama 20 ng/mL IFN-γ ve 10 ng/mL IL-10 eklendi.

Kültürün 7. gününde kültürlerden toplanan süpernatantlardaki antikor miktarı dolaylı ELISA ile kontrol edildi.

In vitro immünizasyonun optimizasyonu için 3 farklı konsantrasyondaki (1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL) hedef protein antijen olarak kullanıldı ve immünizasyon işlemindeki verimleri incelendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 *In vitro* immünizasyon basamakları.

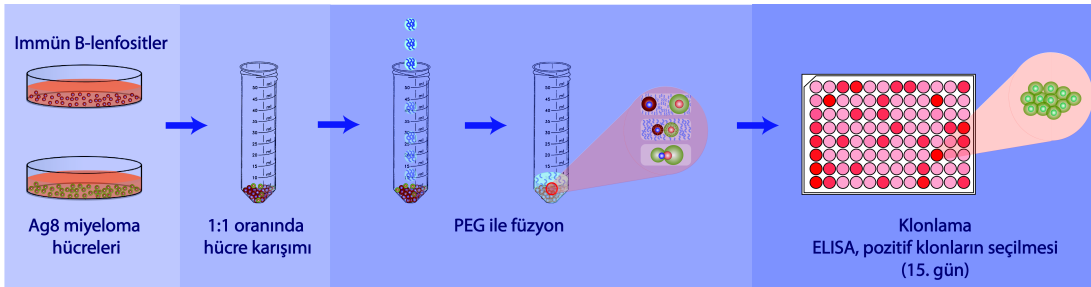
3.2.4 Dolaylı ELISA

Çalışma süresince yapılan *in vitro* immünizasyon denemelerinde ve kültürlerdeki mAb konsantrasyonu optimize edilen dolaylı ELISA yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla BSA'nın hedef protein olarak kullanıldığı immünizasyon çalışması sonrasındaki antikor titresinin belirlenmesi için yapılan dolaylı ELISA optimizasyonunda 25 ng/mL, 50 ng/mL ve 100 ng/mL h-FABP (100 µL/göz) 96 gözlü ELISA pleytlerine immobilize edildi (37 °C'de bir gece). Hazırlanan ELISA yıkama solüsyonu (TPBS) ile gözler yıkandı (200 µL/göz, 3 x 5 dakika). Gözlerdeki spesifik olmayan bağlanmaları en aza indirmek için % 0,5 BSA içeren PBS, 100 µL/göz olacak şekilde gözlerle eklendi ve oda sıcaklığında ışık geçirmeyecek şekilde 1 saat inkübe edildi. Gözler TPBS ile 200 µL/göz ile yıkandı (3 x 5 dakika). Yıkama sonrasında immunize hücrelere ait süpernatanttan alınan 100 µL örnek gözlerle eklendi ışık geçirmeyecek şekilde kaplanarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda yıkama basamağı tekrarlandı. 100 µL/göz konjugat solüsyonu gözlerle eklendikten sonra 1 saat karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında gözler yıkandı ve substrat solüsyonu eklenerek yine oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Süre sonrasında gözlerdeki substrat solüsyonu dökülmeden, spektrofotometrede 450 nm'de gözlerle ait absorbans değerleri kaydedildi. Yüksek absorbans değerleri (1'den büyük) 'pozitif' olarak değerlendirildi.

3.2.5 Kimyasal (PEG ile) Füzyon

In vitro immünizasyon sonucu elde edilen tüm immün B lenfositler ve kültürüne devam edilen tüm Ag8 miyeloma hücreleri toplandı. 1000 rpm, 4 °C, 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Pelet, %10 FBS, 2 mM L-glutamin içeren FKİ-RPMI 1640 besi ortamıyla süspanse edildi (5'er ml). Hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra her Ag8 hücresi başına bir immün B-lenfosit hücresi olacak şekilde hücre süspanسیونları birleştirildi. Hücre süspanسیونu pipetleme ile karıştırıldı ve 1000 rpm, 4 °C, 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Pelet serumsuz FKİ-RPMI 1640 besi ortamıyla yeniden süspanse edilip 1000 rpm, 4 °C, 5 dakika da santrifüj edilerek hücreler yeniden yıkandı. 0,5 ml PEG (1500 kDa) 1 dakika

içerisinde damla damla peletin üzerine eklendi. 2 kez 6 ml FKİ-RPMI 1640 besi ortamı 3'er dakika süre ile süspansiyona eklenerek PEG dilüe edildi. 4 ml %20 FBS içeren FKİ-RPMI 1640 hücre süspanسیونuna eklendi ve 1000 rpm, 4 °C, 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Hücre peleti 5 ml serumsuz FKİ-RPMI 1640 ile süspanse edildi ve tekrar 1000 rpm, 4 °C, 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Elde edilen pelet %20 FBS, %10 DHS, %1 HAT, %1 HEPES, 2 mM L-glutamin, 10 µg/mL gentamisin içeren 50 mL FKİ-RPMI 1640 ortam ile süspanse edilerek 96 gözlü kültür kaplarında (100 µL/göz) 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde kültüre alındı. Kültürlere 72. ve 144. saatlerde 50 µL/göz olacak şekilde taze besi ortamı eklendi. Kültürlerin 6. gününden itibaren 48 saat aralıkları ile 50 µL besi ortamı çekildi ve 50 µL taze besi ortamı eklenirken 14. günden itibaren bu miktar 100 µL olarak değiştirilirken besi ortamındaki % 1 HAT yerini %1 HT'ye bıraktı. Ayrıca her besi ortamı eklenmesinde besi ortamı içeriğindeki DHS yüzdesi yarı yarıya azaltılarak klonlama işlemine kadar ortamdan tamamen uzaklaştırıldı. Günlük kontroller ile hibridoma benzeri morfoloji göstererek üreyen hücrelerin bulunduğu gözler takibe alındı. Üreyen hibridoma benzeri hücre sayısı göz yüzeyinin yarısını geçtiğinde dolaylı ELISA protokolü takip edilerek üreyen hücrelerin istenilen hedefe karşı antikor üretim üretilmediği belirlendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 İmmünize olmuş lenfositler ile Ag8 miyeloma hücrelerinin PEG ile füzyonu.

3.2.6 Klonlama (Sınırlayıcı Dilüsyon Yöntemi)

Koloni oluşumunu tamamlayan ve en yüksek antikor titresini veren gözlerdeki hibridoma kolonilerinin klonlanması için koloni oluşumunun

gözlendiği ve süpernatantında yüksek titrede antikor varlığı gösterilen gözlerden alınan koloniler sayıldıktan sonra her göze 1-2 koloni düşecek şekilde %10 FBS, 50 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 10 µg/mL gentamisin içeren FKİ-RPMI 1640 besi ortamı ile seyreltilerek 96 gözlü kültür kaplarında kültüre edildiler. Kültürlerde oluşan koloniler bir kez daha aynı yöntem ile klonlandı ve elde edilen kolonilerin monoklonal antikor ürettiği kabul edildi.

3.2.7 Hibridomaların Eldesi ve Karakterizasyonu

Alınan dolaylı ELISA sonuçlarına göre yükske titrede antikor içeren gözlerdeki hibridomalar önce 96 gözlü kültür pleytinde 4 göze, daha sonra 24 gözlü kültür kabındaki 4 göze, sonrasında ise 4 adet 6 gözlü kültür kabının 4 gözüne aktarıldı ve kademeli olarak ölçeğin büyütülmesi ile görece daha fazla hibridoma elde edildi. Bu hücreler dondurularak (%90 FBS + %10 DMSO) ilk stoklar oluşturuldu. Hücre sayısı yeterli olduğunda karakterizasyon çalışmalarına başlandı.

3.2.7.1 Üreme Kinetiği

Elde edilen hibridoma hücreleri 1×10^4 hücre/mL olacak şekilde 35 mm çaplı hücre kültür petrilere 2 mL olarak ekildi ve günlük olarak alınan örnekler ile aşağıdaki analizler yapıldı. Hücre konsantrasyonu sabit tutularak farklı işletme şekillerinde (kesikli ve yarı kesikli) hücrelerdeki kinetik değişimler incelenirken kullanılan ISF-1 besi ortamı ile hibridomaların serumsuzlaştırılmış ortamdaki davranışları da kaydedildi.

Hücre Sayısı

%0,4 Tripan mavisi solüsyonu ile boya almama esasına bağlı olarak Neubauer lamı ile sayıldı.

Glikoz Tüketimi ve Laktik Asit Salımı

Kültürlerden alınıp -20°C 'de stoklanan örnekler, ultrasaf su ile 1/1000 oranında seyreltildi, $0,22\ \mu\text{m}$ por çapına sahip filtreden geçirildi. Örneklerdeki glikoz ve laktik asit miktarları belirlenirken Phenomenex Rezex RHM Monosaccharide (H^+) $300\ \text{mm} \times 7,8\ \text{mm}$ iyon değişim kolonuna sahip, Thermo Refraktif İndeks Detektörlü HPLC kullanıldı. Kolon ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla 65°C ve 45°C iken, enjeksiyon hacmi $15\ \mu\text{L}$ 'dir. Hareketli faz olarak $5\ \text{mM}$ 'lık H_2SO_4 çözeltisi $0,8\ \text{mL/dakika}$ akış hızı ile kullanıldı. Analitik standartlar ve çözenler Ehrenstorfer, Almanya'dan temin edildi.

Antikor Üretimi

Dolaylı ELISA ile kültür örneklerindeki mAb titresini belirlendi.

3.2.7.2 Karyotip Analizi

Elde edilen hibridomalara ait metafaz plakları sayılarak ortalama kaç adet kromozoma sahip oldukları belirlendi. Bu amaçla kullanılacak lamalar -20°C 'de %70'lik etanol içerisinde bekletilirken kültür örneklerden santrifüj ile ($1000\ \text{rpm}$, 4°C , 5 dakika) hücreler ayrıldı. $15\ \text{mL}$ 'lik tüp içerisinde, $5\ \text{mL}$ serumsuz RPMI 1640 ile tekrar süspanse edilip son konsantrasyonu $0,05 - 0,1\ \mu\text{g/mL}$ olacak şekilde kolçisin ilave edildi. Hücreler 1 saat 37°C 'de inkübe edilip mitotik evredeki hücrelerde mikrotübül polimerizasyonu engellendi. İnkübasyon sonunda hücreler santrifügasyon ile çöktürülüp ($1100\ \text{rpm}$, 4°C , 10 dakika) süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet $10\ \text{mL}$ $75\ \text{mM}$ 'lık hipotonik KCl çözeltisi ile 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi. Santrifügasyon işlemi tekrarlandı. $0,5\ \text{mL}$ 'si tüpte kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet homojenize edildi. 4°C 'de bekletilen Carnoy's fiksatif (1:3, glasiyal asetik asit : etanol) hücre süspanسیونunun üzerine damla damla (agregasyonu engellemek adına) eklenirken tüp vorteks yardımıyla karıştırıldı. Bu işleme toplam sıvı hacmi $10\ \text{mL}$ 'ye gelen kadar devam edildi. Hücreler $1100\ \text{rpm}$, 4°C 10 dakika santrifüj edildi. Fiksatif eklemesi iki kez daha tekrarlandı. Santrifüj edilen hücreler $0,5\ \text{mL}$ Carnoy's fiksatif ile süspanse edilerek %70'lik etanol içerisinde -20°C 'de

bekletilen lamalar üzerine 15 – 20 cm yukarıdan pastör pipeti ile damlatılarak yayma preparatlar hazırlandı. Oda sıcaklığında kurutulan lamaların üzerine metanol eklenerek hücreler lama sabitlendi. Oda sıcaklığında kurutulan lamalara %7,5 oranında hazırlanan Giemsa solüsyonu eklendi ve aynı ortamda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında lamalar distile su ile yıkandı ve ışık mikroskopunda metafaz plakları sayıldı.

3.2.7.3 İzotiplendirme

Seçilen klonların hangi sınıf monoklonal antikor ürettiğinin belirlenmesi için ISO-2 (Sigma, Almanya) ticari kit kullanıldı. Üreticinin tavsiye ettiği şekilde kit içeriğinde sunulan izotip spesifik antikorlar 96 gözlü ELISA pleytlerine 1/1000 oranında seyreltilerek 100 µL/göz olacak şekilde eklendi. Pleyt 1 saat 37 °C de inkübe edildi. Süre sonunda solüsyon uzaklaştırıldı ve 200 µL/göz yıkama solüsyonu (TPBS) ile gözler yıkandı (3 x 5 dakika). Her göze 100 µL kültür süpernatantı eklenerek 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. TPBS ile yıkanan gözlere 100 µL konjugat solüsyonu eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi. Yıkama işleminin ardından substrat solüsyonu 100 µL/göz olacak şekilde eklendi ve aynı koşullarda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda gözlerdeki substrat solüsyonu dökülmeden 450 nm’de mikropleyt okuyucu kullanılarak çalışma sonlandırıldı.

3.2.7.4 Sterilite Kontrolleri

Üreticinin tavsiyesi doğrultusunda 29 g/L tiyoglikolat brot (TGB) solüsyonu, 30 g/L triptik soy brot (TSB) solüsyonu, 65 g/L Sabouraud %4 dekstroz agar (SDA) solüsyonu hazırlandı. Hazırlanmış olan çözeltiler 121 °C’de 15 dakika süre ile otoklavlandı. Otoklav ile steril edilen besi ortamları, laminar hava akışlı kabin içerisinde; TGB ve TSB 3 tekrar olmak üzere her tüpe 9’ar ml dağıtıldı. Sabouraud %4 dekstroz agar ise 100 mm ve 30 mm petrilere dağıtıldı. Üzerlerine 1 haftalık hibridoma kültürlerinin süpernatantlarında 1’er ml eklendi. Tüpler ve petriler 37°C’deki etüvde 14 gün boyunca inkübe edilmiş ve her gün

üreme olup olmadığı görsel olarak kontrol edildi. Mikoplazma kontrolleri ise T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Şap Enstitüsü'ndeki HÜKÜK'te yapıldı.

3.2.7.5 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)

Üretilen antikorların moleküler ağırlıkları SDS-PAGE yöntemi ile belirlendi. Bunun için 10 ml ayırma jeli hazırlandı. Ayırma jeli sisteme yüklendi ve boşlukları doldurması için üzerine izopropanol eklenerek 30 dakika beklendi. Süre sonunda izopropanol uzaklaştırıldı. Ön ayırma jeli hazırlandı, taraklar takıldıktan sonra sisteme aktarıldı. 30 dakikalık bekleme esnasında yürütme tamponu ve örnekler hazırlandı. Örnekler 5 dakika 95 °C'de bekletilerek proteinler denatüre edildi. Çizelge 3.1'de kuyucuklara eklenecek örnek miktarları verildi (çöktürme solüsyonu: 90 µl 4X Laemmli tampon + 10 µl beta merkaproetanol). Sistemdeki taraklar çıkarıldı ve yürütme tamponu eklendi, kuyucuklar da bu tampon ile yıkandı. Jelin ilk sol kuyucuğunda 'ladder' olmak üzere örnekler düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru yüklendiler. Sistemin kapağı kapatılarak Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad, Almanya) 80V'ta 3 saat çalıştırıldı. Süre sonunda jelin üzerine boyama solüsyonu eklendi. 30 dakika çalkalayıcıda oda sıcaklığında bekletilen jel üzerine boya solüsyonu döküldü ve üzeri boya uzaklaştırma solüsyonu ile kaplandı. 1 gece çalkalayıcıda bekletilen jel gözlem için çıkarıldı ve fotoğraflandı.

Çizelge 3.1 Ayırma jeli içeriği

Malzeme	Miktar (ml)
4X ayırma jel tamponu (1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) ve %0,4 SDS)	2,5
%30 akrilamid karışımı (%29 (w/v) akrilamid ve %1 (w/v) N,N'-metilen-bisakrilamid)	4
Distile su	3,4
TEMED	0,005
%10 APS	0,15

Çizelge 3.2 Ön ayırma jeli içeriği.

Malzeme	Miktar (ml)
4X ön ayırma jel tamponu (0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) ve %0,4 SDS)	1,25
%30 akrilamid karışımı (%29 (w/v) akrilamid ve %1 /w/v) N,N'-metilen-bisakrilamid)	0,85
Distile su	2,85
TEMED	0,005
%10 APS	0,075

Çizelge 3.3 Yürütme tamponunun içeriği.

Malzeme	Miktar
Glisin	14,4 g
Trizma base	3 g
SDS	1 g
Distile su	1 L

Çizelge 3.4 Kuyucuklara eklenecek örnek ve çöktürme solüsyonu miktarları

100 ng örnek için :	2,5 µl antikor	22,5 µl distile su	8 µl çöktürme solüsyonu
1 µg örnek için :	25 µl antikor	---	8 µl çöktürme solüsyonu
5 µg örnek için :	125 µl antikor	---	42 µl çöktürme solüsyonu

Çizelge 3.5 Boyama solüsyonunun içeriği.

Malzeme	Miktar
Coomassie Brilliant Blue	0,25 g
Metanol	45 ml
Distile su	10 ml

Çizelge 3.6 Boya uzaklaştırma solüsyonun içeriği.

Malzeme	Miktar
Metanol (%10)	50 ml
Glacial asetik asit (%10)	50 ml
Distile su	400 ml

3.2.8 Hibridoma ve mAb Üretimleri

Karakterize edilen hibridoma klonları farklı hacimlerde farklı işletme koşullarında üretilerek en fazla hücre sayısına ve mAb miktarına ulaşılması amaçlandı. Bu amaçla 25 cm² , 75 cm² ve 175 cm² yüzey alanına sahip süspanse kültür flasklarında ve 4 L çalışma hacmine sahip karıştırılmalı tank biyoreaktörde üretildi. Üretimlerde %10 FBS, 2 mM L-glutamin, 50 mM HEPES, 10 µg/mL gentamisin içeren RMPI 1640 besi ortamı ve bu ortamın %50 oranında ISF-1 serumsuz kültür besi ortamı ile karışımı ile gerçekleştirildi.

Flasklardaki statik kültürler 1x10⁵ hücre/mL konsantrasyon ile başlarken, biyoreaktörde ki üretimler 1x10⁶ hücre/mL ile başlatıldı. Biyoreaktörde yapılan üretimlerde yüzeyel havalandırma kullanılarak (0,1 vvm) karıştırma hızı 50 rpm olarak belirlendi (kültür hacmi arttığında 75 rpm'e kadar çıkarıldı). Kesikli üretimler için 1 L'de yapılan üretim, kesikli beslemeli üretimler için kültür süresine ve başarısına bağlı olarak son hacim 2 L oluncaya kadar devam edildi. Kültürün pH'sı CO₂ ve 50 mM NaOH solüsyonu ile sağlandı. Karıştırıcı olarak bir adet 6 bıçaklı '*Rushton tipi*' karıştırıcı bıçağı kullanıldı. Biyoreaktör üretim öncesinde tüm bağlantıları yapılarak otoklavda 121 °C'de 45 dakika boyunca tutularak steril edildi. Otoklav sonrasında tüm bağlantıları yapılan reaktör işletme sıcaklığına geldiğinde çözünmüş oksijen kalibrasyonu azot süpürme yöntemi ile yapıldı. Daha sonra 1x10⁶ hücre/mL başlangıç hücre konsantrasyonu ile üretimler gerçekleştirildi.



Şekil 3.3 1 L'lik çalışma hacminde 1F114F63PH8 kesikli üretimi.

3.2.9 mAb'ların Saflaştırılması

Statik kültürdeki flasklardan ve biyoreaktör üretimlerinden elde edilen kültür sıvısından mAb saflaştırması farklı basamaklardan oluşan bir süreç ile tamamlanmıştır.

3.2.9.1 Süpernatant Eldesi

Elde edilen kültür sıvılarından süpernatant eldesi için santrifüjasyon yöntemi uygulandı. Kontaminasyonu engellemek adına kültürler steril santrifüj tüpleri ile 3000 rpm, 4 °C, 7 dakikada santrifüj edilerek hücre ve hücre parçalarının çöktürülmüş sıvı kısım alınarak bir sonraki basamakta kullanılmak üzere 4 °C'de ya da - 20 °C'de saklandı (kısa ve uzun dönem saklama).

3.2.9.2 Konsantrasyon

Elde edilen süpernatantın saflaştırma veriminin artırılması için konsantre edildi. Bu amaçla flasklardaki üretimler için 100kDa por çapındaki membran kullanıldığı, santrifügal kuvvetler yardımıyla filtrasyonun sağlandığı VivaSpin20,

(GE Healthcare, ABD) (Şekil 3.3) kullanılırken, biyoreaktör üretimleri için Sartocoon Slice Holder (Sartorius, Almanya) ve Sartocoon® Slice (100 kDa, Sartorius, Almanya) kullanıldı (Şekil 3.4).

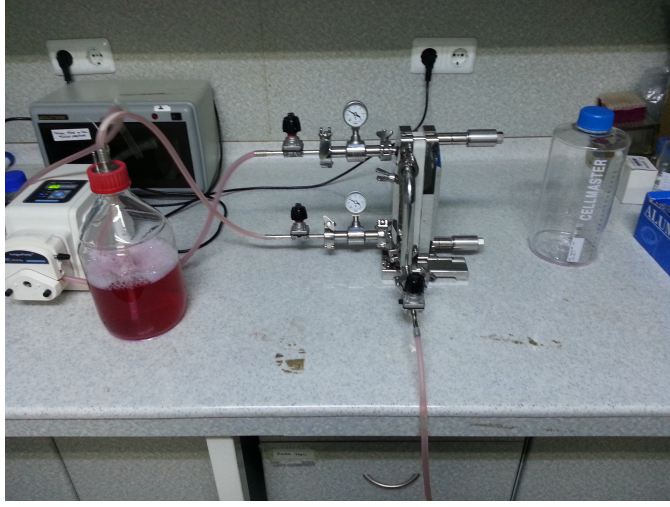
VivaSpin20 tüplerinin kullanımı için %70'lik etanol solüsyonu ile dezenfekte edilen tüpler önce distile su sonra da ultrasaf su ile yıkandılar. Yıkanan tüplere hücrelerin uzaklaştırıldığı kültür süpernatantından 20 mL eklendi ve 3000 rpm, 25 °C, 20 dakika santrifüj edildi. Bu yöntemde işlem sonunda 100kDa'dan büyük proteinler membrandan dolayı üst kompartmanda kalırken (retentant), diğer kısımlar aşağı kompartmana geçmektedir (permeat). İşlem sonrasında membranın performansına bakılarak (elde edilen retentant hacmi 1 mL'den fazla ise) tekrar kullanılıp kullanılmayacağına karar verilir. Ultrasaf su, distile su ve %70'lik etanol ile yıkanan tüpler membranın ıslanmasını önleyecek kadar ultrasaf su ilavesi ile 4 °C'de saklandı.



Şekil 3.4 VivaSpin20 filtration tubes (GE HealthCare, Almanya)

Biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerde ise toplam hacim görece daha fazla olduğundan aynı işlemler şu şekilde tekrarlanmıştır. Şekil 3.5'te görüldüğü şekilde çapraz akış filtrasyon sistemi kuruldu. Tutucu arasına yerleştirilen kaset, kasetin saklanması için kullanılan %20 etanol solüsyonunun uzaklaştırılması için 5 L distile su sistemden peristaltik pompa ile 100 rpm hızda sistem basıncı vanalar yardımıyla 0,25 – 0,5 bar aralığında tutularak geçirildi. Kültür süpernatantları aynı işletme koşulları kullanılarak sistemden geçirilerek, retentant ve permeat olarak toplandı. İşlem sonrasında sistemden aynı hacimde distile su geçirildi, 30 dakika boyunca 1 N NaOH çözeltisi ile membran dezenfekte edildikten sonra sistem

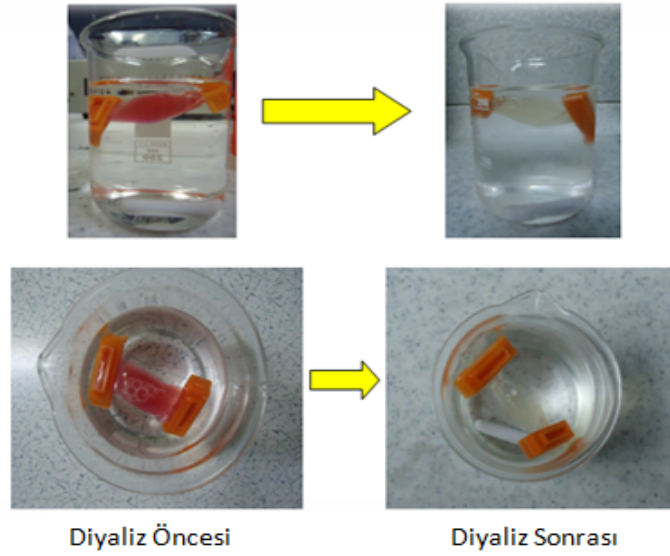
sökülerek kaset %20 etanol içerisinde karanlıkta saklandı. Kasetin ardından sistemin parçaları distile su ile yıkandı.



Şekil 3.5 Orta ölçekli konsantrasyon işlemleri için kurulan çapraz akış filtrasyon sistemi.

3.2.9.3 Diyaliz

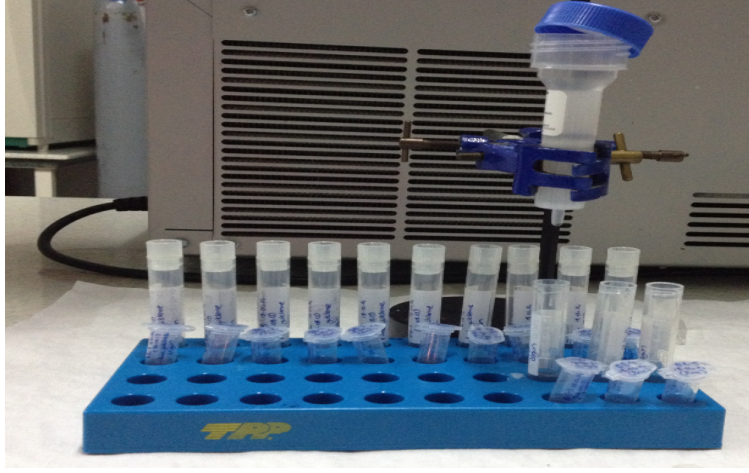
Konsantre edilen örneklerde bulunan fosfat iyonlarının uzaklaştırılarak kullanılacak bir sonraki basamak olan afinite kolon kromatografisinin verimli çalışması adına konsantrasyon sonrasında elde edilen *retenant*tan diyaliz ile söz konusu iyonlar uzaklaştırıldı. 1 mL retentant için 300 mL diyaliz tamponu (1,25 M NaCl, 0,02 M Tris, ultrasaf su ile) olacak şekilde 6-8 kDa ‘*molecular weight cut-off*, MWCO’ diyaliz membranı kullanıldı (Spectra/Por, Almanya). Retentantı içeren membran 4 °C’de manyetik karıştırıcı ile birlikte 30 rpm hızda karıştırılarak 12 saat inkübe edildi. Her 4 saatte diyaliz tamponu değiştirilerek konsantrasyon gradienti artırıldı. 12 saat sonunda diyaliz edilen örnek alınarak saklandı (kısa dönem için 4 °C, uzun dönem için –20 °C) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Diyaliz işleminin öncesinde ve sonrasında örneğin görüntüsü.

3.2.9.4 Afinite Kromatografisi

Diyaliz edilen *retenant*taki mAb'lar afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Bunun için dolgu materyali olarak IgM antikorlarına afinitesi olan mannan bağlayıcı protein (MBP) içeren kolon ve kit içeriğindeki solüsyonlar kullanıldı. MBP kolonunda önce üst daha sonra da alt kapak açıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 mL MBP kolon hazırlama tamponu ile yıkandı. 20 mL IgM bağlama tamponu kolona verildi ve akması beklendi. Diyaliz edilmiş örnek, bağlama tamponu ile 1:1 oranında seyreltilti. Seyreltilen 1 mL örnek kolona verildi ve jele tamamen geçmesi için beklendi. Kolona 0,5 mL bağlama tamponu eklenip kapakları kapatıldı ve 4 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Bekleme süresi sonunda kolona bağlama tamponu eklendi ve yıkama yapılarak bağlanmamış proteinler daha sonraki protein miktarı analizleri için 3'er mL'lik örnekler şeklinde toplandı (Şekil 3.7). Elüsyon işlemi için elüsyon tampon ve MBP kolonu oda sıcaklığına getirildi. 3 mL elüsyon tamponu kolona verildi ve jele ulaşması için beklendi. Kolonun alt kapağı kapatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bekleme süresi sonunda kolonun alt kapağı açılarak elüat toplandı. Ek fraksiyonlar için daha fazla elüsyon tampon kolona verildi. İşlem sonrasında bağlama tamponu ile yıkanan kolon 4 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.7 I gM mAb saflaştırma kolonu ve toplanan fraksiyonlar.

3.2.9.5 Antikor Titresi ve Protein Miktarı

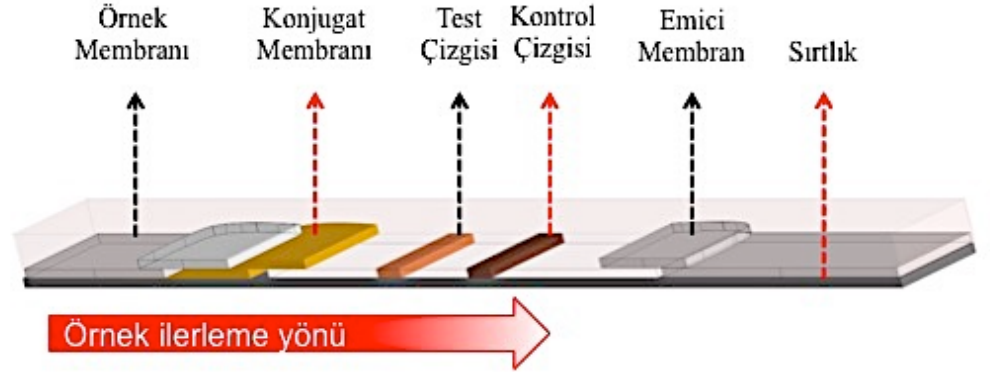
Antikor titresinin belirlenmesi için daha önce optimize edilen dolaylı ELISA prosedürü uygulandı. Protein miktarının belirlenmesi için ise QuantiPro BCA kiti kullanıldı. Bu amaç ile standart eğri için 7 adet BSA standardı 30 $\mu\text{g/mL}$ 'den başlamak üzere her seferinde %50 seyreltmeyle hazırlandı. Kit içeriğindeli reaktif madde 4,725 mL A, 4,725 mL B ve 190 μL bakır içerecek şekilde yaklaşık 9,5 mL olarak hazırlandı. Gözlere 150 μL standartlar ile örnekler eklendi ve üzerlerine aynı hacimde reaktif madde eklendi. Pleyt, alüminyum folyo ile kaplandı ve 2 saat 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı. Bekleme süresi sonunda gözlerin 562 nm'de absorbans değeri ölçüldü.

3.2.10 Tanı Kitlerinin Oluşturulması

3.2.10.1 Yanal Akışlı Tanı Kitlerinin (LFIA) Eldesi

Yanal akışlı tanı kitlerinin (LFIA) eldesi için saflaştırılan antikorların da kullanıldığı bir tasarım uygulanmıştır. Sistem, örnek membranı, konjugat membranı, nitroselüloz membran (NC), emici membran ve tüm bu membranları kendisine tutarak bir bütünlük sağlayan sırtlıktan oluşmuştur. Örnek membranının amacı uygulanan örneği bünyesinde tuttuuktan sonra sisteme belirli bir hızda vererek sonraki işlemler için süreklilik sağlamaktır. Konjugat membranı AuNP ile

konjuge mAb'ları üzerinde tutan ve örnek ile beraber etkileşerek NC membranına ilerlemesini sağlar. NC membranı üzerine immobilize edilen antikorlar ya da sinyal moleküllerini yakalama özelliğine sahip moleküller ile testlerin en aktif bölgesinin oluşturur. Emici membran ise uygulanan örneğin ve fazlasının sistemde ilerledikten sonra tutulup geri dönmemesini sağlama görevine sahiptir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 LFIA test yönteminin komponentleri ve akış yönü.

Örnek Membranı

8 cm x 0,6 boyutundaki örnek membranı, 250 μ L, %2,5 süktroz içeren 2mM borik asit solüsyonu (pH 7,0) emdirilerek bloklandı. Membran 37 $^{\circ}$ C'de etüvde 2 saat bekletilerek kurutuldu. Kurutulan membranlar hemen kullanılmayacaklar ise desikatörde saklandı.

Test Çizgisi için Konjugat Membranı Hazırlanması

Test çizgisinde biriken AuNP miktarına bağlı olarak testin negatif ya da pozitif olduğu belirlenir. AuNP'ler ise üzerlerinde konjuge oldukları anti-hFABP / anti-NT-proBNP mAb'ları ile örnekteki hFABP'ı / NT-proBNP'yi yakalayarak bir kompleks oluştururlar. Bu kompleks test çizgisine geldiğinde burada immobilize edilmiş anti-hFABP / anti-NT-proBNP mAb'ları tarafından tutulur ve biriken AuNP miktarına bağlı olarak da test çizgisi oluşur. Eğer uygulanan örnekte hedef molekül, hFABP / NT-proBNP proteini yok ise bu kompleks oluşmaz ve dolayısıyla da çizgi oluşmaz. Konjugat membranına emdirmek üzere

ticari anti-hFABP mAb'ları (9F3) / anti-NT-proBNP mAb'ları (24E11) 40 nm'lik AuNP'ler ile konjugatlandı.

1 mL kolloidal AuNP (40 nm) solüsyonu 10.000 rpm'de 4 °C'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra 100 µg (1 mg/mL'den 100 µL) anti-hFABP mAb'ı / anti-NT-proBNP mAb'ı ve 100 µL 0,1 M borik asit solüsyonu (pH 8,5) tüpe eklendi ve pelet süspanse edildi. Oda sıcaklığındaki 30 dakika inkübasyon sonrasında 10 mg/mL'lik BSA solüsyonundan (PBS içinde, pH 7,4) 100 µL eklendi ve 20 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda süspansiyon 5000 rpm'de 4 °C'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet 250 µL distile su ile süspanse edildi. 8 cm x 0,6 cm boyutlarında kesilen konjugat membranı 250 µL %2,5 süktroz içeren 2 mM borik asit solüsyonu (pH 7,0) ile bloklandı. Membranlar 37 °C'de 3 saat bekletilerek kurutuldu. Kurutma sonrasında 250 µL'lik anti-hFABP mAb-AuNP / anti-NT-proBNP mAb-AuNP konjugatı bloklanan membrana emdirildi ve 37 °C'de 2 saat bekletilerek kurutuldu. Hazırlanan membran test kiti üretiminde kullanılmayacak ise hava ve ışık geçirmez bir kaptaki, nem tutucu silika taneleri ile birlikte 4 °C'de saklandı.

Kontrol Çizgisi için Konjugat Membranının Hazırlanması

40 nm'lik AuNP ile konjuge edilmiş streptavidin (OD540:10) solüsyonu 1:10 oranında distile su ile seyreltilti. 8 cm x 0,6 cm boyutlarında kesilen konjugat membranı 250 µL %2,5 süktroz içeren 2 mM borik asit solüsyonu (pH 7,0) ile bloklandı. Membranlar 37 °C'de 3 saat bekletilerek kurutuldu. Kurutulan bloklanmış membranlara 250 µL streptavidin-AuNP konjugatı (OD540:1) emdirildi ve 37 °C'de 2 saat bekletilerek kurutuldu. Hazırlanan membran test kiti üretiminde kullanılmayacak ise hava ve ışık geçirmez bir kaptaki, nem tutucu silika taneleri ile birlikte 4 °C'de saklandı.

Nitroselüloz Membranın Hazırlığı

Test çizgilerinin oluşması için immobilize edilen yakalama antikoru olarak saflaştırılan anti-hFABP IgM mAb'ları kullanılmıştır. mAb'lar 0,5 µL/cm olacak şekilde uygulandı (10 kez). NT-proBNP tespitini sağlamak için ise antikor ürettiği belirlenen klona ait konsantre kültür sıvısı kullanılmıştır. Kontrol çizgisi için ise 1 mg/mL biyotin-BSA solüsyonu 1 µL/cm olarak nitroselüloz membrana uygulandı. Membranlar oda sıcaklığında 20 dakika kurutuldu. Membranlar %1 BSA içeren distile su solüsyonuna daldırılarak 15 dakika beklendi. Süre sonunda membran 5mM Na₂HPO₄ (pH 7,0) solüsyonundan nundan 500 µL mikropipet yardımı ile alındı ve nitroselüloz membran üzerine çok hızlı olmayacak şekilde verildi. Bu işlem 5 kez tekrarlandı. 37 °C'de 1 saat bekletilerek kurutulan membranlar test üretiminde kullanılmayak ise hava ve ışık geçirmez bir kapta, nem tutucu silika taneleri ile birlikte 4 °C'de saklandı.

Testlerin Kullanılması

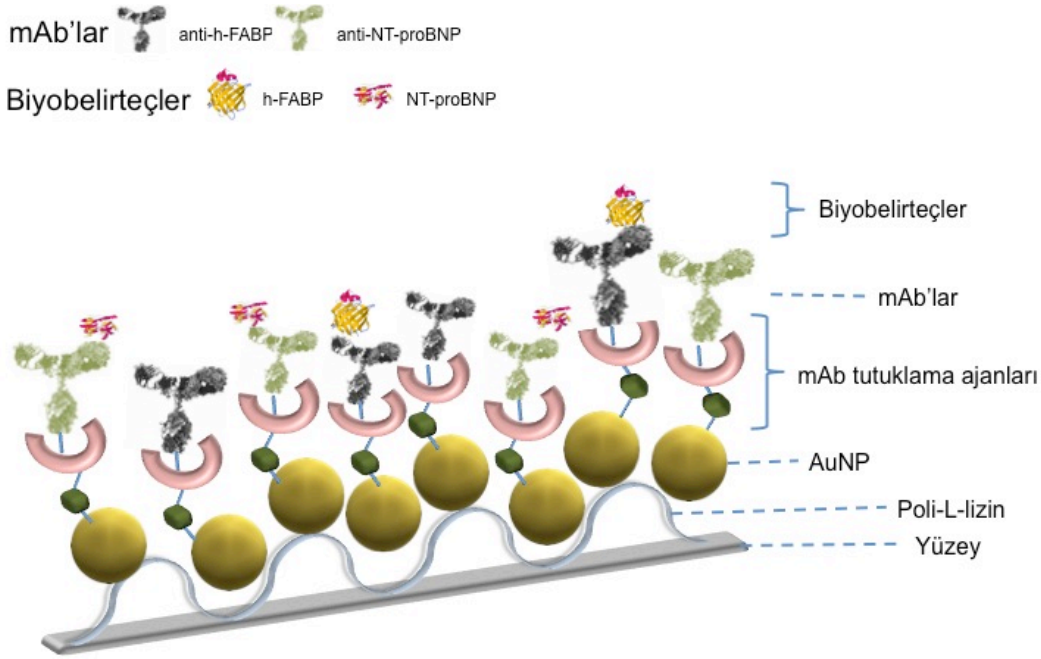
Hazırlanan membranlar Şekil 3.8'de gösterildiği şekilde birleştirildi. Farklı konsantrasyonlarda hFABP (4F29) ve NT-proBNP (4NT1) konsantrasyonlarında (1 µg – 10 ng) aralığında ultrasaf su ile hazırlanan protein solüsyonları ve kontrol olarak kullanılan PBS ile test performansları belirlendi.

3.2.10.2 LSPR Tanı Kitlerinin Eldesi

LSPR Yüzeylerin Hazırlanması

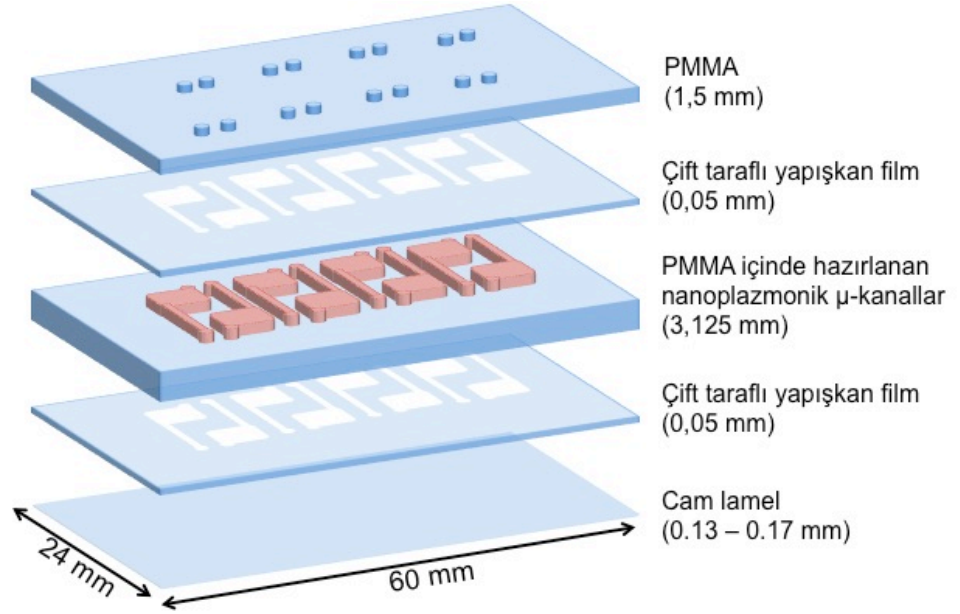
LSPR yüzeyler Inci ve arkadaşları (2013) tarafından belirlendiği şekilde hazırlandı (Inci et al., 2013). Kısaca, 96 gözlü mikropleytlere poli-L-lizin hidrobromit 0,05 mg/mL olacak şekilde (PBS içinde) 100 µL/göz olarak eklendi ve bir gece 4 °C'de inkübe edildi. Ardından gözler 300 µL/göz PBS ile 3 kez yıkandı ve bu yıkama işlemi her basamakta tekrarlandı. Yıkama işleminin ardından gözlere 50 µL 10 nm çaplı AuNP eklendi ve 4 °C'de bir gece saklandı. Sonraki basamak ise 100 µL/göz olacak şekilde 1 mM'lık MUA (11-merkaptoundesanoik asit) solüsyonu eklendi ve AuNP üzerinde karboksil grupları

oluşturuldu. 4 °C’de bir gecelik inkübasyondan sonra gözlere MES tamponu (50 mM, pH 5.0) içinde hazırlanan 100 mM N-(3-Dimethylaminopropil)-N’-etilkarbodiimit hidroklorit (EDC) ve 50 mM N-hidroksisülfosüksinimit eklenerek 4 °C’de 3 saat inkübe edildiler. Sonrasında gözlere antikorların tutunacağı protein G 0,1 mg/mL olacak şekilde eklendi ve 4 °C’de bir gece inkübe edildi. Gözlere son olarak anti-h-FABP (9F3) ve anti-NT-proBNP (24E11) antikorları (5 µg/mL) eklendi ve 4 °C’de bir gece inkübe edildi.



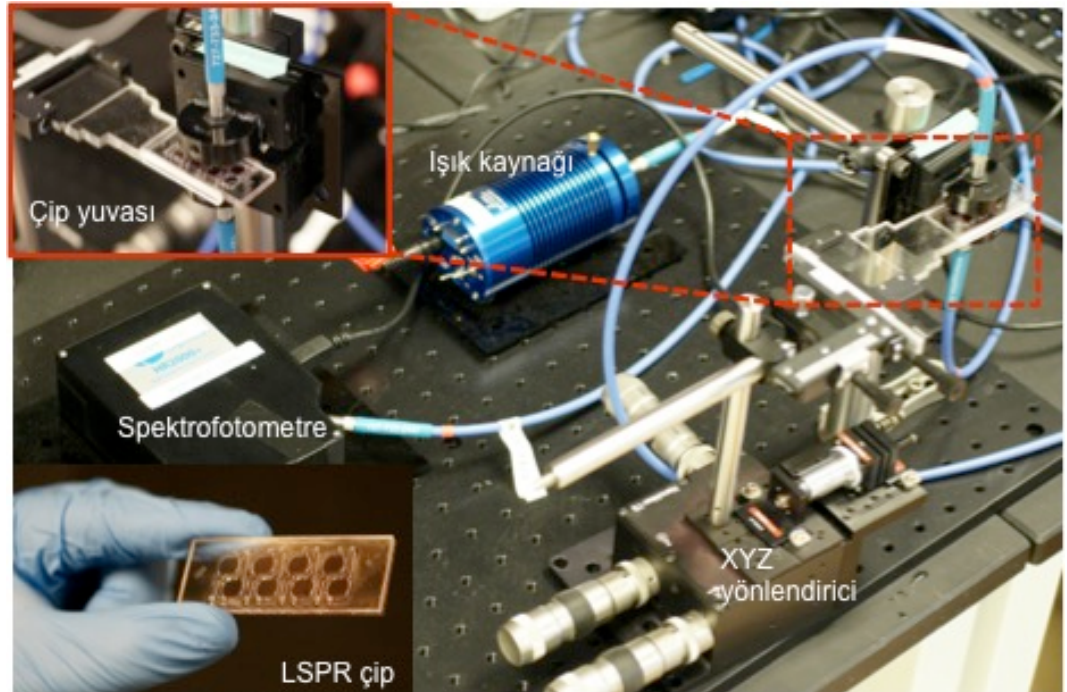
Şekil 3.9 İnşa edilen LSPR tespit yüzeylerinin şematik gösterimi.

Çalışma, 96 gözlü mikroyet formatında yapılmasının yanında taşınabilir LSPR mikroakışkan çiplerde de gerçekleştirildi. Lazer kesici yardımıyla tasarlanan çipler, Şekil 3.10’da görülen farklı kalınlık ve malzeme içeren komponentlerin kesilmesi ile hazırlandı. Buna göre; katmanları bir arada tutmaya yardımcı olan çift taraflı yapışkan filmin arasına 3,125 mm kalınlıktaki PMMA katman yerleştirildi, alt kısma cam lamel yerleştirilerek mikroakışkan gözler oluşturuldu. Daha sonra yüzey kimyası çalışmaları 96 gözlü mikroyetlerde olduğu şekliyle uygulandı. Örnek uygulanması öncesinde en üst PMMA katman da kapatılarak mikroakışkan nanoplazmonik µ-kanallar elde edildi.



Şekil 3.10 Üretilen mikroakışkan LSPR çiplerini oluşturan komponentler.

Mikroakışkan LSPR çiplerinin ölçümlerinin alınması için oluşturulan taşınabilir spektrofotometre yardımıyla tüm veriler toplandı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 Tek kullanımlık μ -akışkan LSPR çipleri ve taşınabilir spektrofotometre sistemi.

Test Performanslarının Denenmesi

Ticari olarak satın alınan hedef proteinler üretici tarafından tavsiye edilen rekonstrüksiyon tamponları ile çözündürüldü ve tavsiye edilen sıcaklıklarda saklandı. Test sisteminde kullanmak üzere PBS ve insan serumu ile 1 µg/mL'den 100 fg/mL'ye kadar hazırlanan dilüsyonlardaki hFABP, NT-proBNP proteinleri (1 µg/mL, 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL, 100 pg/mL, 10 pg/mL, 1 pg/mL, 500 fg/mL, 100 fg/mL) hazırlanan LSPR yüzeylerde denendi. Ayrıca PBS ve serum da negatif kontrol olarak kullanıldı. 1 saat boyunca 4 °C'de inkübe edilen örnekler süre sonunda yıkandı ve spektral okuma alındı.

Verilerin Toplanması

Yüzeylerin hazırlanma aşamasındaki her basamakta gözler 100 µL PBS ilavesinden sonra 350 nm'den 800 nm'ye kadar 1 nm adımla spektral olarak tarandı. Her dalga boyundaki sönümlenen ışık şiddeti değerleri belirlendi.

Verilerin Analizi

Her bir basamak için toplanan veriler yazılan MATLAB kodu ile eğri uydurma işlemi yapıldı. Bu işlemden sonra elde edilen eğrilerin tepe değerleri ve bu değere karşılık gelen dalga boyu belirlendi. Yüzeylerin performansı test edilirken, örnek uygulamasından önce ve sonra yapılan okutmaların önce ve sonraki değerlendirmelerinde elde edilen eğrinin ve eğriye ait tepe noktasının yer değiştirmesi incelendi ve sonuçlar belirlendi. Ortalama dalga boyu değerleri verilirken ortalamanın standart hatası grafiklerde gösterildi.

Hem 96 gözlü mikropleytlerden elde edilen veriler hem de taşınabilir spektrofotometre sistemi yardımıyla tek kullanımlık nanoplazmonik µ-akışkan çiplerden elde edilen veriler, aynı şekilde analiz edildi.

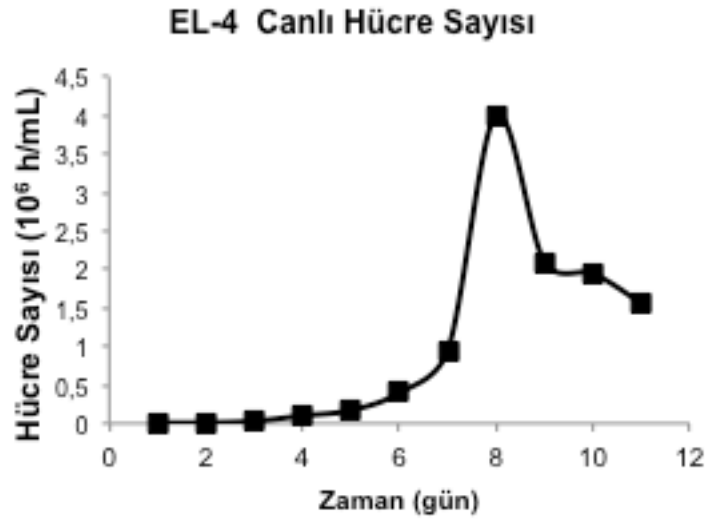
4 BULGULAR VE TARTIŞMA

Gerçekleştirilen doktora tez çalışması ile kalp krizinin ve yetmezliğinin tanısında kullanılacak LFIA ve LSPR prensibi ile çalışan hızlı tanı kitleri elde edildi. Üretilen IgM monoklonal antikorlarının kullanıldığı LFIA sisteminde 10 ng/mL hFABP tespit limitine ulaşılırken LSPR sistemlerinde 10 pg/mL tespit limitine ulaşıldı. NT-proBNP’de ise bu rakamlar sırasıyla 1000 ng/mL ve 10 ng/mL olarak belirlendi. Literatürde hem hFABP, hem de NT-proBNP için aynı ve farklı yöntemlere ait farklı tespit limitlerine rastlandı. Bu durumun kullanılan mAb’ların farklı afiniteye sahip olması ve yöntemlerden ileri geldiği düşünülmektedir (Chan et al., 2003; Mc Donnell et al., 2009; Yanyan et al., 2010).

4.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

4.1.1 EL-4 Hücre Kültürleri ve IL-2

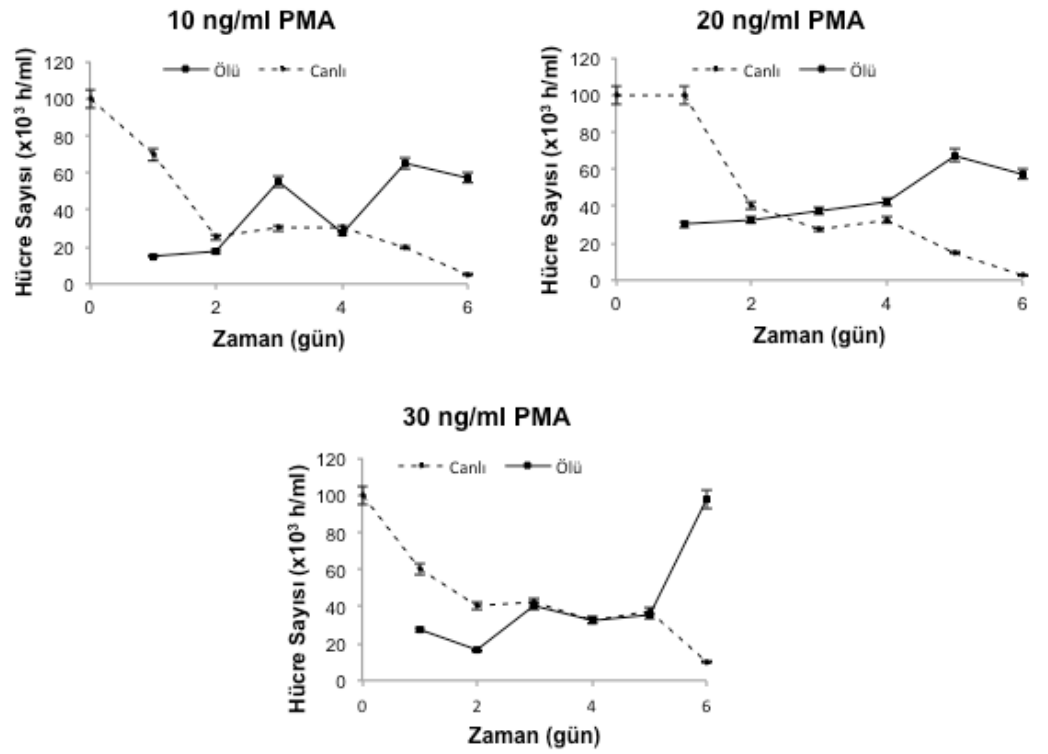
EL-4 hücrelerinin PMA varlığında IL-2 sitokinini ürettiği daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Hücreler tarafından üretilen IL-2 antikor üretimini arttırmaktadır (Yamashita et al., 2002). Bu sebeple EL-4 hücre kültürlerinden elde edilen kültür süpernatantı %25 oranında immünizasyon ortamına eklendi. Farklı konsantrasyonlarda (10 ng/mL, 20 ng/mL, 30 ng/mL) PMA içeren EL-4 kültürlerinden alınan sonuçlara göre; hücreler kullanılan üç PMA konsantrasyonunda da 6. günden itibaren canlılıklarını kaybederlerken (Şekil 4.3) kültür süpernatantında tespit edilen IL-2 miktarının değişmediği belirlendi (Şekil 4.2). PMA bulunmayan besi ortamı kullanıldığında ise hücreler kültürün 8. gününde 4×10^6 hücre/mL canlı hücre sayısına ulaşabilirken, 11. güne kadar kültürdeki canlı hücre konsantrasyonu $1,5 \times 10^6$ hücre/mL olarak tespit edildi (Şekil 4.1). Ayrıca PMA’nın olmadığı ortamda hücreler yarı süspanse ve agregatlar şeklinde üreyorken PMA ile hücre morfolojisi daha düzensiz bir hal aldı ve hücre agregatları parçalanarak hücreler bireysel olarak kültürde yer aldı (Şekil 4.4).



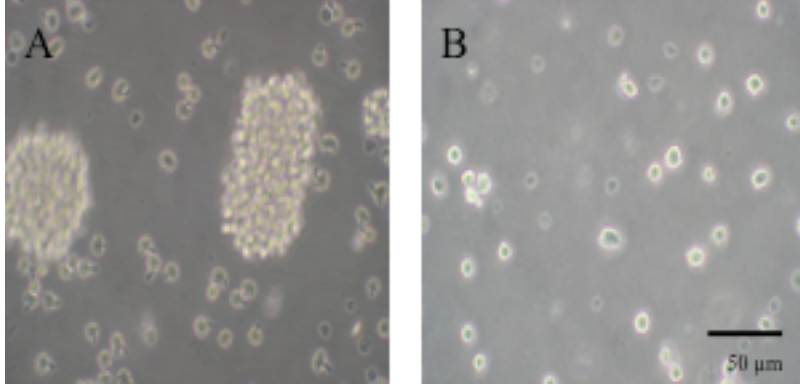
Şekil 4.1 EL-4 hücrelerinin PMA içermeyen besi ortamında 11 günlük kültürünü gösterir üreme eğrisi.



Şekil 4.2 Farklı PMA konsantrasyonları için üretilen IL-2 miktarı.



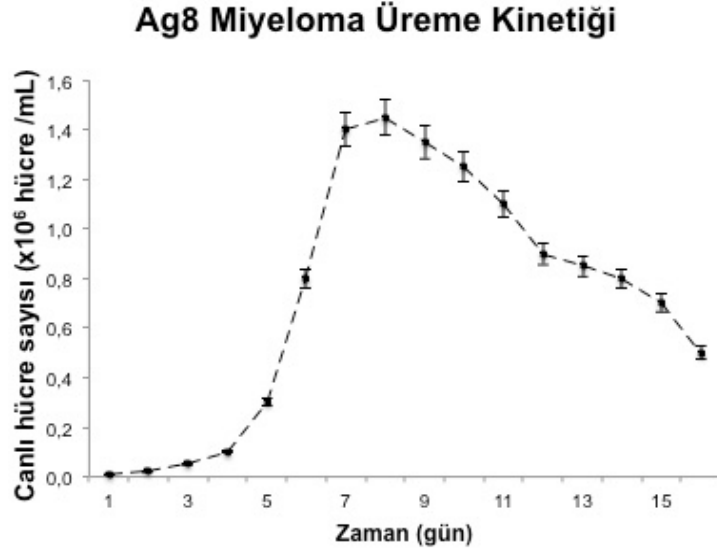
Şekil 4.3 Farklı PMA konsantrasyonlarında kültürde değişen canlı ve ölü hücre sayısı.



Şekil 4.4 PMA yokluğunda (A) ve 10 ng/mL PMA varlığında (B) EL-4 hücre morfolojisindeki değişim.

4.1.2 Ag8 Miyeloma Hücre Kültürleri

Ag8 (X63-Ag8.653) miyeloma hücreleri antikor salgılama yeteneği olmadığı ve önceki çalışmalarda saptanmış olan yüksek füzyon yeteneğinden dolayı seçildi ve füzyon çalışmalarında kullanıldı (Zhu et al., 1995; Nalbantsoy et al., 2010). Üreme kinetiği çalışmaları ile istenen sayıda Ag8 hücresinin kültürün kaçınıcı gününde elde edileceğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi. Şekil 4.5'te Ag8 miyeloma hücrelerinin günlük sayımlar ile elde edilen üreme kinetiği grafiği verildi. Bu grafiğe göre hücrelerin spesifik büyüme hızı $0,038 \text{ saat}^{-1}$ iken, ikilenme süresi 18,18 saat olarak bulundu. Elde edilen bu veriler ile yapılacak füzyon çalışmaları için gereken sayıda Ag8 hücrelerine ne kadar süre sonra ulaşılabileceği belirlendi. Buna göre 2×10^4 adet hücre ile başlanan kültürün 8. gününde yaklaşık $2,8 \times 10^6$ hücre sayısına ulaşıldı.

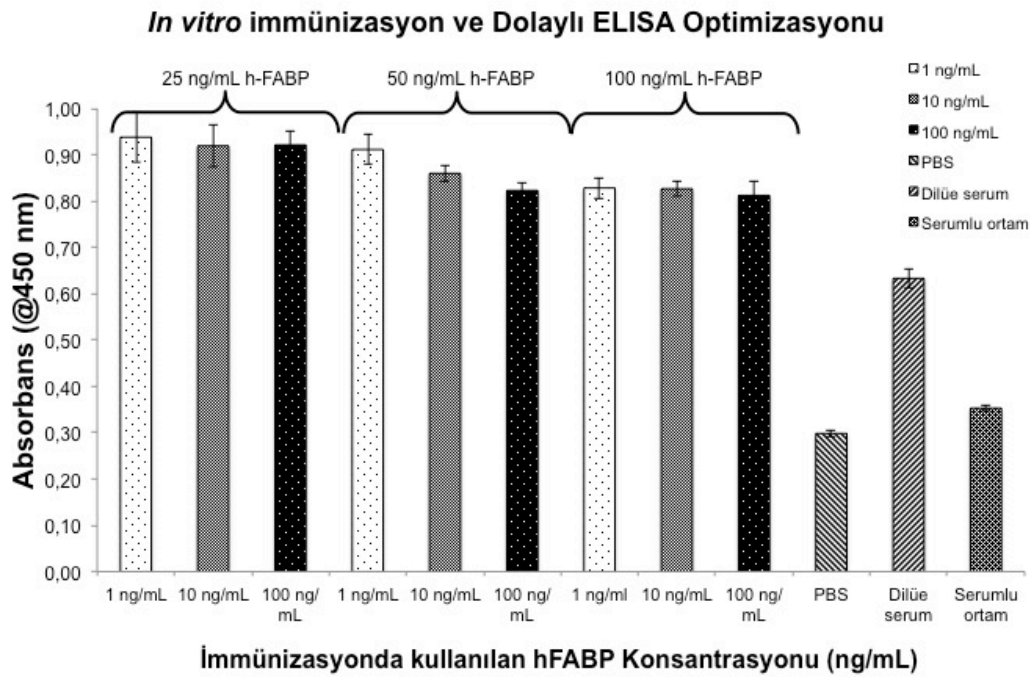


Şekil 4.5 Ag8 miyeloma hücre hattı üreme eğrisi.

4.1.3 *In vitro* İmmünizasyon ve Dolaylı ELISA

Borrebaeck tarafından, 1978 – 1986 yılları arasında gerçekleştirilen *in vitro* immünizasyon çalışmalarında alınan sonuçlara göre; elde edilen hibridomaların %80'i IgM sınıfı antikor üretirken bu oran %50'ye kadar yükseltilmiştir. IgG sınıfı antikorların *in vitro*'da elde edilebilmesi IgM – IgG geçişinin mümkün olduğu gösterilmiştir. Geçişin gözlenmediği çalışmalarda antijenin fiziksel hali, antijenin ve kullanılan sitokinlerin konsantrasyonu ve kültür süresi önemlidir. İmmünizasyonun yapıldığı kültürlerde %15-20 FCS, %2-3 tavşan serumu veya serumsuz olarak hazırlanmıştır. Kültürlerde FCS'inin kullanılmamasının nedeni, FCS proteinlerine karşı immün tepkinin oluşmasının engellenmesidir. Yerine düşük konsantrasyonda tavşan serumu kullanımı ya da serum kullanılmaması seçenekleri bulunmaktadır. (Borrebaeck, 1986). İmmünizasyon sırasında MDP ve IL2'nin birlikte kullanımının antijen spesifik tepkinin, olmadıkları kültürler ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (Souvannavong et al., 1990). Ichikawa ve ekibi; IL2, IL4, IL6 ve IL10'un kullanıldığı *in vitro* immünizasyon kültürlerinden elde ettikleri sonuçlara göre, IgM sınıfı antikor sentezleyen hibridomaların sayısı azalırken IgG sınıfı antikor üreten hibridomaların sayısı değişmemiştir (Ichikawa et al., 1999). Primer dalak B

hücrelerinin *in vitro*'da immünize edilebilmesi için Balb/c farelerden alınan hücreler, dalağın steril çelik süzgeçten geçirilip yıkanmasının ardından sentetik adjuvan peptit MDP ve antijen olarak kullanılan hFABP ve NT-proBNP proteinleri ile ayrı ayrı serumsuz ortamda 15-20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücrelerin antikor üretebilen B hücrelerine farklılaşması için gerekli sitokinler eklendi (Şekil 3.1). Kültürlerin 5. gününde ortama B hücrelerinin ürettiği antikor sınıfının IgM'den IgG'ye çevrilmesini sağlamak adına IL-1 β ve IFN- γ eklendi. İmmünizasyon işleminin optimizasyonu adına üç farklı protein konsantrasyonu seçildi (1 ng/mL, 10 ng/mL ve 100 ng/mL) ardından da immünizasyon sonrasında elde edilen süpernatant üç farklı konsantrasyonda hFABP (25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL) immobilize edildiği ELISA pleytleri kültürlerin mAb titrelerinin belirlenmesinde kullanıldı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 İmmünizasyon ve ELISA için farklı hFABP konsantrasyonlarının kullanıldığı optimizasyon çalışmasından alınan sonuçlar

Şekil 4.6'da görüldüğü üzere immünizasyon çalışmasında kullanılan antijen konsantrasyonları ve dolaylı ELISA *in vitro* çalışması için farklı miktarlarda protein ELISA pleytlerine immobilize edildiğinde elde edilen sonuçlar arasında büyük bir fark olmaması sebebiyle immünizasyon çalışmalarında 100 ng/mL

protein konsantrasyonu, dolaylı ELISA’da ise 25 ng/mL protein immobilize edilerek çalışmalara devam edildi. Pleytlere, saf olarak satın alınan protein immobilize edildiği için kullanılan protein miktarları ng seviyesindedir. İmmobilize edilen protein miktarları safsızlık olan protein karışımları ile karşılaştırıldığı μg seviyesinde kullanılmaktadır (Nalbantsoy et al., 2010).

4.1.4 Hibridoma Kültürleri

4.1.4.1 Klonlama

Anti-hFABP mAb’u Üreten Klonların Eldesi

hFABP proteinine karşı antikor üreten hibridomaların elde edilmesi için yapılan füzyon çalışmasında 116 adet içinde hibridoma benzeri klonal üremenin olduğu göz belirlendi ve 14. güne kadar gözler günlük takipler ile izlendi. 15. günde bu gözlerden alınan 100 μL süpernatant ile dolaylı ELISA yapıldı. Bu test sonucu bulguar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Bu sonuçlar dikkate alınarak en yüksek titreye sahip **1F11** gözünden alınan hibridomalar 4 adet 96 gözlü kültür kabına eşit olarak pasajlandı. Diğer klonlar ise dondurularak -196°C ’de stoklandı.

Çizelge 4.1 hFABP’a karşı yapılan immünizasyon sonrasında hibridoma üremesi belirlenen gözlerden alınan örneklerle ait dolaylı ELISA sonuçları (ABS @450 nm).

Klon	Abs	Klon	Abs	Klon	Abs	Klon	Abs	Klon	Abs
1A1	0,34	1D8	0,56	2A11	0,48	2H5	0,57	3D10	0,51
1A10	0,27	1D10	BOŞ	2B8	0,55	2H6	0,50	3E2	0,47
1B7	0,34	1E1	0,45	2B9	0,52	2H9	0,47	3E8	0,37
1C1	0,24	1E3	0,44	2B10	0,39	3A1	0,49	3E9	0,50
1C8	0,37	1E7	0,39	2C10	0,48	3A3	0,55	3E+11	0,46
1C11	0,40	1E11	0,37	2D1	0,48	3A5	0,53	3F5	0,60
1D10	0,42	1F7	0,34	2D7	0,52	3A6	0,44	3F10	0,45
1D1	0,58	1F9	0,58	2D11	1,01	3A7	0,49	3G2	0,47
1D2	0,51	1F11	1,48	2E11	0,53	3B9	0,36	3H6	0,43
1D4	0,50	1G5	0,52	2F9	0,42	3C3	0,49	4A1	0,43
1D5	0,48	1G11	0,51	2G11	0,43	3C4	0,50	4A7	0,41
1D6	0,51	1H8	0,51	2H3	0,36	3C7	0,48	4A8	0,44
4E9	0,42	5A4	0,44	5D2	0,11	5G7	0,23	4A9	0,38
4F2	0,57	5A5	0,37	5D6	0,02	5G8	0,09	4A10	0,53

4F4	0,93	5B3	0,32	5D7	0,09	5G10	0,38	4B8	0,52
4F9	0,36	5B4	0,37	5D8	0,11	5G11	0,07	4C5	0,49
4F11	0,48	5B9	0,40	5E4	0,08	5H6	0,10	4C8	0,66
4G3	0,37	5B10	0,40	5E7	0,07	5H7	1,29	4D1	0,50
4G5	0,48	5B11	0,41	5E8	0,11	5H9	0,07	4D5	0,47
4G7	0,49	5C4	0,35	5F1	0,23	5H10	-0,02	4D6	0,52
4H6	0,48	5C5	BOŞ	5F5	-0,07	5H11	-0,11	4D7	0,44
4H7	0,35	5C7	0,44	5F7	0,01	4D8	0,52	Miyeloma	0,15
4H8	0,38	5C8	1,37	5F9	-0,13	4E2	0,42		
5A1	0,32	5C9	0,38	5F11	-0,16	4E4	1,26		

4 adet 96 gözlü kültür pleyti gözüne alınan 1F11 hücreleri yüzeyi kaplayacak şekilde üredikten sonra 1 ml'lik viallerde sonraki çalışmalarda geri dönüşlerin güvenliği için stoklanlandı (-196 °C). Hücreler tekrar yüzeyi kapladıklarında ise her biri birer adet 96 gözlü kültür pleytine seyreltilerek klonlandı. Alınan sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Klonlanan 1F11 hibridomalardan elde edilen klonların absorbans değerleri (@450 nm).

Klon	ABS	Klon	ABS	Klon	ABS
1A6	2,81	4E5	2,84	4B8	2,83
1B9	2,84	4E6	2,88	4B9	2,81
1B11	2,80	4E7	2,85	4B10	2,85
1B12	2,86	4E8	2,89	4B11	2,83
1D9	2,83	4E9	2,87	4C5	2,84
1D11	2,91	4E10	2,89	4C6	2,87
1E6	2,91	4F1	2,86	4C7	2,81
1E10	2,86	4F4	2,92	4C8	2,88
1E11	2,88	4F5	2,84	4C9	2,85
1F6	2,84	4F6	2,93	4C11	2,83
1G1	2,82	4F8	2,91	4D2	2,81
1G6	2,84	4F9	2,91	4D5	2,88
1H1	2,87	4F10	2,90	4D7	2,86
2F8	2,89	4F11	2,80	4D8	2,91
2G9	2,81	4G1	2,83	4D9	2,85
4A4	2,83	4G4	2,80	4D10	2,87
4A5	2,82	4G10	2,80	4D11	2,83
4B6	2,84	4H3	2,80	4E1	2,88

Klonlama işleminin Çizelge 4.2’te verilen sonuçlarına göre elde edilen tüm klonların hFABP proteine karşı afinitesi olan mAb ürettiği saptandı. Ancak bunların arasında en yüksek titre veren süpernatantın **4F6** gözünden alındığı belirlendiği için bu gözdeki hibridomalar ile çalışmaya devam edildi. Tek bir 96 gözlü kültür pleytine alınan hibridomalar aynı şekilde dolaylı ELISA ile analiz edildiklerinde en yüksek absorbans (@450 nm) değerleri H8 ve G11 gözlerinden bulunduğundan hibridoma klonlarının kodları **1F114F6P3H8** ve **1F114F6P3G11** olarak belirlendi ve karakterizasyon işlemine başlandı.

Anti-NT-proBNP mAb’u Üreten Klonların Eldesi

Optimize edilen *in vitro* immünizasyon ve füzyon prosedürleri kullanılarak NT-proBNP’ye karşı antikor üreten hibridomaların eldesi gerçekleştirildi. İmmünizasyon sonrası elde edilen 57 hibridoma benzeri üremenin olduğu

gözlerden alınan süpernatantların dolaylı ELISA ile değerlendirilmesi sonucu 6 adet gözde pozitif sinyal alındı. Bu gözlerden **2G7** bir kez daha klonlandı. Çizelge 4.4'te klonlara ait ELISA sonuçları verilmiştir. Çizelge 4.3'te pozitif olduğu görülen diğer klonlar donduruldu ve -196 °C'de stoklandı.

Çizelge 4.3 Klonlanan 2G7 hibridoma hattından elde edilen klonların absorbands değerleri (@450 nm)

Klon	ABS	Klon	ABS	Klon	ABS	Klon	ABS
1A11	0,06	2F3	-0,08	3G8	1,48	5C6	-0,01
1B2	0,10	2F4	-0,09	5A5	0,10	5C10	0,13
1C7	0,08	2G9	-0,07	5A10	0,14	5D3	-0,04
1C8	0,05	2G7	1,60	5A6	0,02	5D7	0,88
1D8	0,41	2H8	-0,19	5B1	0,11	5E6	0,15
1F8	0,41	2B10	-0,09	5B2	-0,10	5F11	-0,12
1G3	0,51	3A8	0,57	5B3	0,12	5G1	0,20
1G4	-0,06	3C4	0,05	5B4	-0,04	5G4	0,63
1G9	-0,08	3C8	-0,13	5B5	1,44	5G8	0,60
1G10	0,04	3D10	0,32	5B7	-0,09	5G9	-0,37
1H11	-0,07	3D11	1,37	5B8	-0,19	5H4	0,13
2B11	0,07	3E7	0,06	5B9	-0,27	5H8	0,23
2C9	-0,03	3E9	0,10	5B11	-0,16	5H11	0,39
2E7	1,58	3G6	0,24	5C4	-0,02		

Çizelge 4.4 NT-proBNP'e karşı antikor ürettiği belirlenen klonların dolaylı ELISA değerleri (@450 nm).

1. PLEYT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,28	0,28	0,31	0,29	0,30	0,26	0,27	0,22	0,23	0,21	0,28	0,33
B	0,24	0,19	0,20	0,18	0,19	0,20	0,21	0,17	0,19	0,14	0,19	0,29
C	0,21	0,20	0,21	0,16	0,16	0,18	0,18	0,19	0,17	0,14	0,18	0,22
D	0,18	0,20	0,22	0,19	0,18	0,19	0,17	0,18	0,16	0,15	0,15	0,20
E	0,22	0,18	0,21	0,19	0,19	0,21	0,18	0,17	0,17	0,14	0,14	0,19
F	0,21	0,20	0,21	0,17	0,20	0,19	0,18	0,15	0,16	0,16	0,14	0,21
G	0,24	0,18	0,21	0,18	0,17	0,19	0,14	0,18	0,17	0,17	0,13	0,23
H	0,31	0,22	0,24	0,20	0,19	0,22	0,22	0,20	0,23	0,21	0,19	0,28
2. PLEYT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,24	0,24	0,23	0,24	0,25	0,23	0,24	0,22	0,22	0,25	0,26	0,22

B	0,24	0,25	0,24	0,20	0,21	0,19	0,20	0,22	0,21	0,23	0,23	0,22
C	0,22	0,25	0,22	0,20	0,20	0,22	0,23	0,20	0,22	0,27	0,21	0,21
D	0,26	0,22	0,18	0,21	0,22	0,21	0,22	0,21	0,21	0,21	0,23	0,22
E	0,24	0,22	0,20	0,23	0,24	0,22	0,25	0,25	0,20	0,21	0,23	0,19
F	0,28	0,23	0,23	0,24	0,21	0,22	0,22	0,22	0,22	0,20	0,21	0,22
G	0,23	0,23	0,22	0,23	0,23	0,22	0,24	0,21	0,21	0,20	0,20	0,20
H	0,23	0,25	0,21	0,23	0,25	0,23	0,21	0,22	0,24	0,21	0,22	0,20
3. PLEYT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,20	0,16	0,15	0,19	0,18	0,15	0,14	0,16	0,17	0,19	0,21	0,21
B	0,20	0,15	0,14	0,14	0,16	0,13	0,14	0,13	0,16	0,18	0,18	0,17
C	0,22	0,16	0,14	0,14	0,14	0,13	0,14	0,15	0,14	0,16	0,16	0,17
D	0,19	0,15	0,13	0,13	0,14	0,16	0,17	0,14	0,15	0,15	0,17	0,19
E	0,18	0,16	0,15	0,14	0,15	0,15	0,15	0,17	0,27	0,16	0,15	0,19
F	0,18	0,14	0,13	0,13	0,15	0,14	0,13	0,15	0,15	0,16	0,18	0,21
G	0,23	0,17	0,13	0,14	0,15	0,13	0,15	0,15	0,17	0,18	0,19	0,23
H	0,36	0,25	0,21	0,22	0,22	0,17	0,17	0,19	0,20	0,19	0,18	0,21
4. PLEYT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,24	0,19	0,16	0,18	0,16	0,15	0,19	0,19	0,15	0,25	0,28	0,29
B	0,24	0,19	0,16	0,19	0,15	0,14	0,16	0,13	0,13	0,15	0,17	0,16
C	0,22	0,17	0,16	0,16	0,16	0,14	0,16	0,17	0,16	0,17	0,15	0,18
D	0,26	0,17	0,16	0,18	0,16	0,16	0,16	0,17	0,14	0,15	0,16	0,17
E	0,21	0,17	0,16	0,18	0,19	0,16	0,17	0,15	0,15	0,16	0,17	0,16
F	0,22	0,18	0,17	0,17	0,18	0,16	0,16	0,15	0,13	0,16	0,17	0,15
G	0,21	0,18	0,17	0,23	0,22	0,17	0,15	0,15	0,13	0,15	0,18	0,16
H	0,29	0,20	0,16	0,20	0,17	0,14	0,18	0,18	0,15	0,22	0,21	0,16
5. PLEYT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,35	0,27	0,27	0,29	0,26	0,27	0,28	0,31	0,30	0,27	0,27	0,16
B	0,32	0,25	0,21	0,21	0,24	0,25	0,23	0,22	0,22	0,18	0,24	0,20
C	0,31	0,21	0,19	0,19	0,21	0,20	0,22	0,23	0,23	0,21	0,27	0,26
D	0,23	0,22	0,19	0,21	0,18	0,20	0,20	0,21	0,21	0,18	0,21	1,74
E	0,23	0,24	0,18	0,19	0,18	0,19	0,17	0,18	0,18	0,19	0,18	0,52
F	0,24	0,30	0,18	0,17	0,19	0,20	0,17	0,21	0,21	0,28	0,30	1,21
G	0,30	0,29	0,24	0,22	0,21	0,19	0,16	0,16	0,17	0,18	0,20	0,53
H	0,39	0,30	0,29	0,27	0,28	0,26	0,22	0,25	0,23	0,23	0,26	0,29

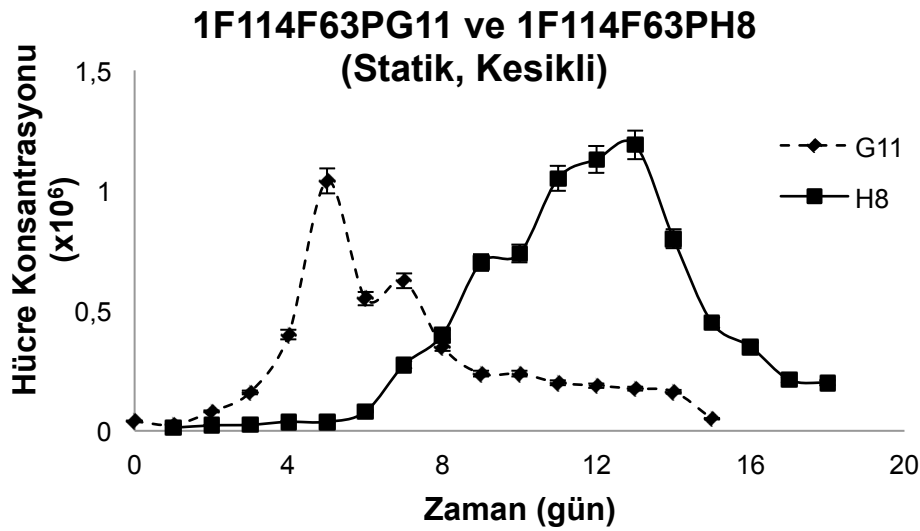
Çizelge 4.4'te görüldüğü üzere 2G7 klonunun tekrar klonlanması sonucunda elde edilen yeni klonlardan antikor titresi yüksek olan **2G7C3A35D12** klonu seçildi ve karakterize edildi.

4.1.4.2 1F114F6P3G11 ve 1F114F6P3H8 Klonlarının

Karakterizasyonu

Üreme Kinetiği

1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonları %10 FBS, 2 mM L-glutamin, 50 mM HEPES, 10 µg/mL gentamisin içeren RPMI 1640 besi ortamı ile birlikte 1×10^4 hücre/mL olacak şekilde 35 mm çaplı petrilerde kesikli ve yarı kesikli olarak üretildi. Kültürlerden toplanan örneklerdeki canlı ve toplam hücre sayısı, üretilen mAb miktarı, glikoz tüketimi ve laktik asit salımı incelendi.

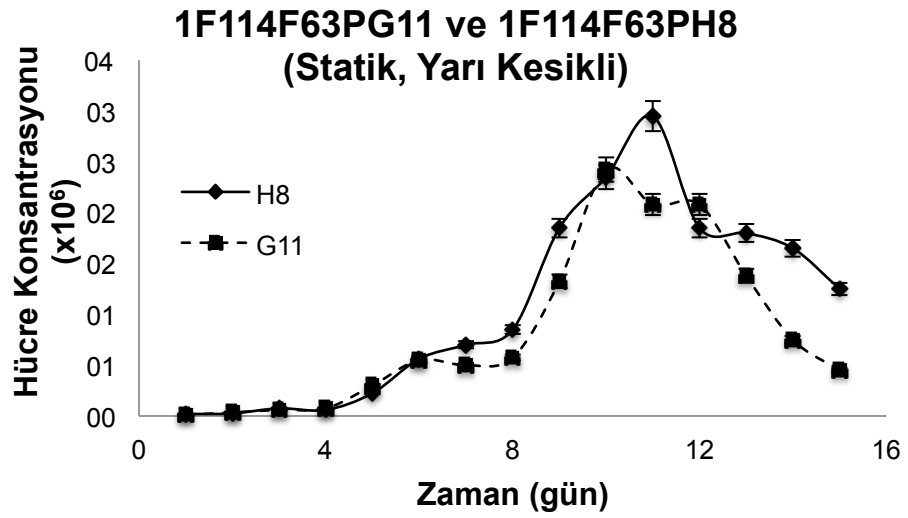


Şekil 4.7 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarına ait statik kültür, kesikli işletme modunda canlı hücre sayısı.

1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonları üretildikleri statik kültürlerde kesikli işletme modunda yapılan üretimlerde, 1F114F63PG11 klonu en yüksek hücre sayısına 5. günde ulaşırken 1F114F63PH8 klonu 13 günde ulaşmaktadır (Şekil 4.7). Yarı-kesikli işletme modunda ise her iki klonda en yüksek hücre sayısı değerine sırasıyla 11. ve 12. günlerde ulaşmaktadır (Şekil 4.7). Kesikli kültürlerde en yüksek hücre konsantrasyonu 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonları için sırasıyla 1×10^6 hücre/mL ve $1,2 \times 10^6$ hücre/mL iken aynı klonların yarı kesikli kültürlerde ise taze besi ortamının ilavesi hücre sayısına yansımış ve

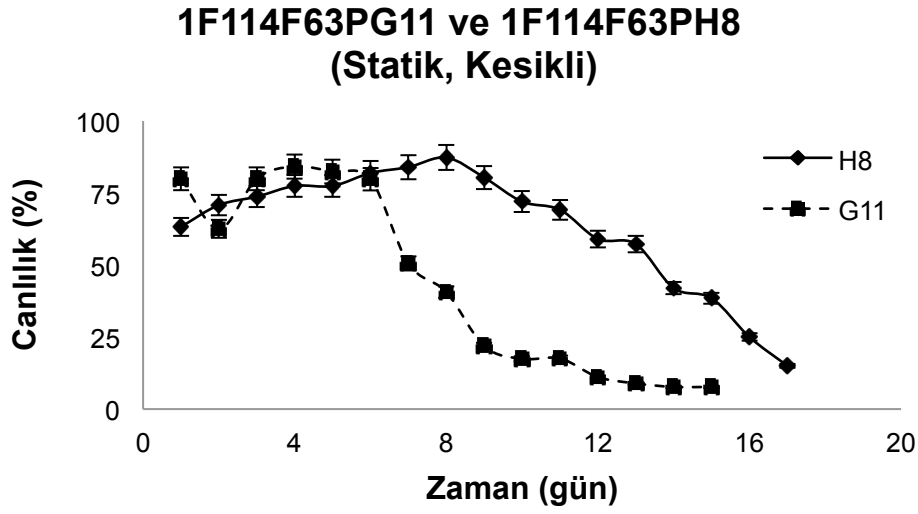
en yüksek hücre konsantrasyonu 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonları için sırasıyla $2,4 \times 10^6$ hücre/mL ve 3×10^6 hücre/mL olarak bulunmuştur. Kesikli kültürler için 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının spesifik üreme hızları ve ikilenme zamanları sırasıyla;

- $\mu = 0,52 \text{ gün}^{-1}$ ve $t_d = 30$ saat,
- $\mu = 0,58 \text{ gün}^{-1}$ ve $t_d = 28$ saat olarak bulunmuştur.

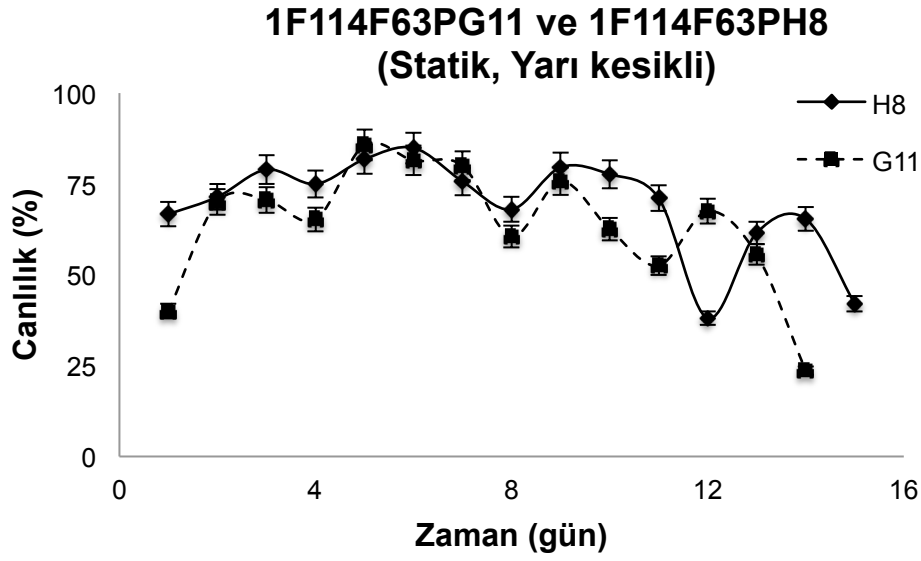


Şekil 4.8 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarına ait statik kültür, yarı kesikli işletme modundaki canlı hücre sayısı.

1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının aynı kültürlerden elde edilen % canlılık değerleri ile hazırlanan grafiklerde görüldüğü üzere hücrelerin canlılığı taze besi ortamı eklenmesi sebebiyle kesikli beslemeli kültürlerde kesikli kültürlerle nazaran daha yüksektir.

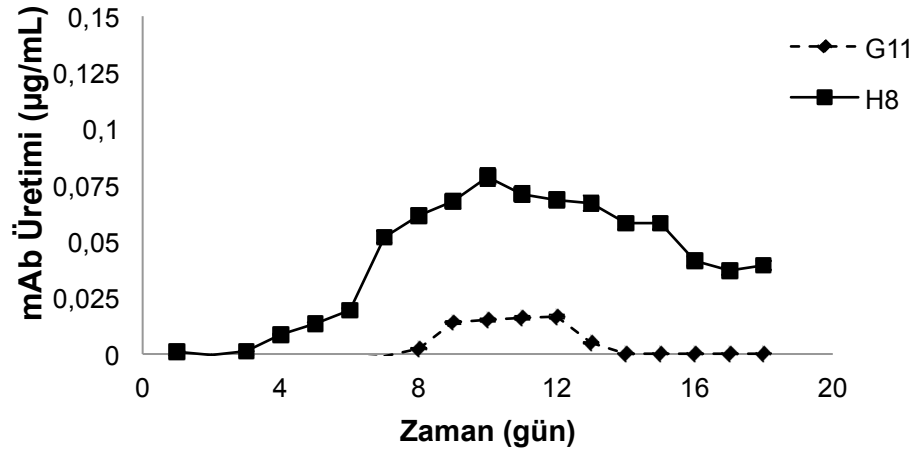


Şekil 4.9 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarına ait statik kültür, kesikli işletme modunda hücre canlılık değerleri.



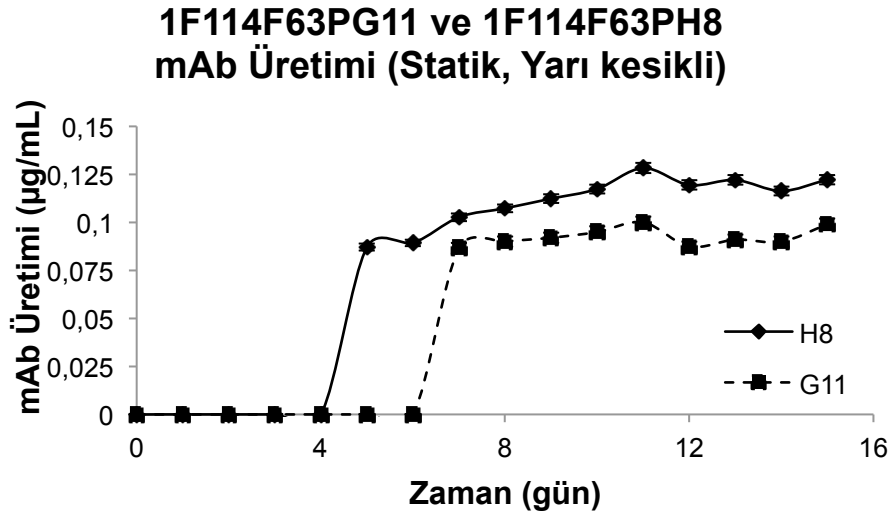
Şekil 4.10 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarına ait statik kültür, yarı kesikli işletme modunda hücre canlılık değerleri.

1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 mAb Üretimi (Statik, Kesikli)

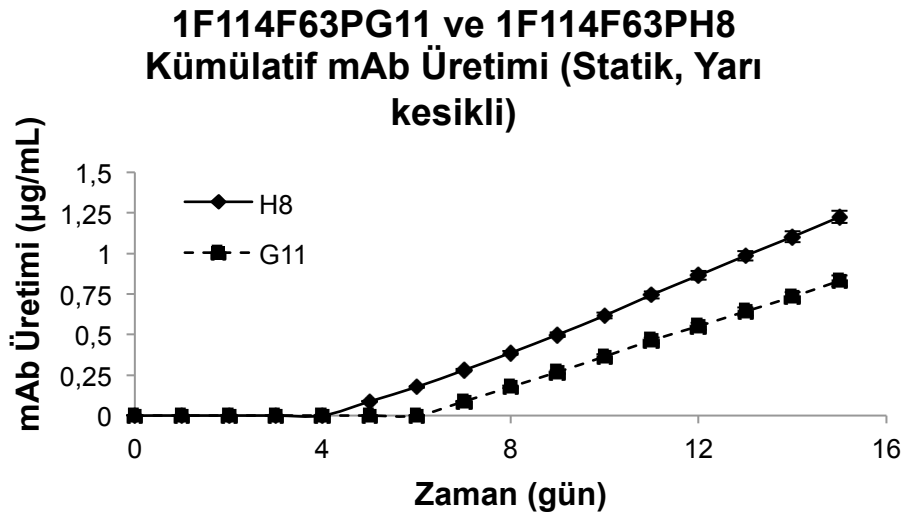


Şekil 4.11 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının statik kültürde kesikli işletme modunda mAb üretimi.

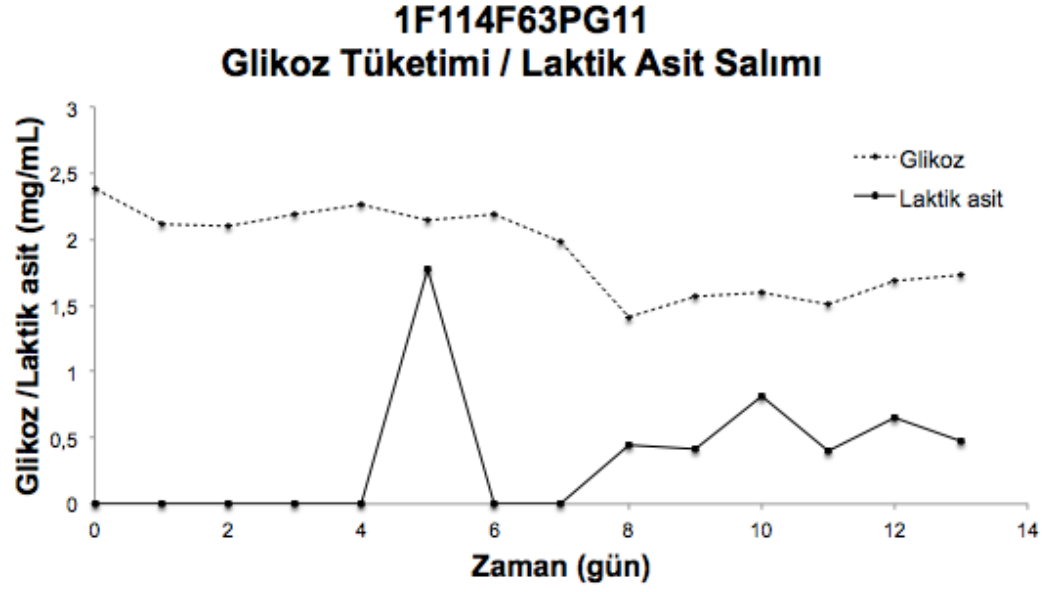
1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının kesikli kültürlerde ait mAb üretimi, glikoz tüketimi, laktik asit salım grafikleri incelendiğinde ürettikleri antikor miktarına bağlı olarak artan oranda tüketilen glikoz ve salınan laktik asit görülmektedir. Yarı kesikli kültürde hücrelerin besi ortamı kısıtının azalması sebebiyle hücre sayısının (Şekil 4.8), hücre canlılığının (Şekil 4.10) ve antikor miktarının (Şekil 4.12) arttığı gözlemlendi. Yarı kesikli kültürlerde ortamdan uzaklaştırılan besin ortamı içeriğinde bulunan mAb konsantrasyonu kümülatif olarak hesaplandığında en yüksek antikor üretiminin yaklaşık 1,25 µg/mL'ye kadar yükseldiği görüldü (Şekil 4.13).



Şekil 4.12 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının statik kültürde yarı kesikli işletme modunda mAb üretimi.

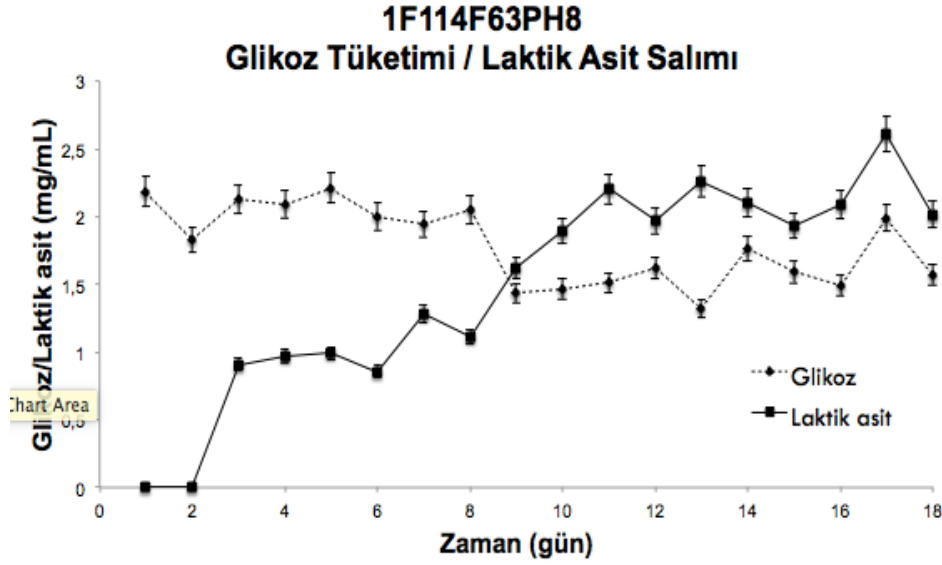


Şekil 4.13 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının statik kültürde yarı kesikli işletme modunda kümülatif mAb üretimi.



Şekil 4.14 1F114F63PG11 klonunun statik kültürde kesikli işletme modunda glikoz tüketimi ve laktik asit salımı.

Artan hücre sayısı, canlılık değerleri ve üretilen mAb miktarına bağlı olarak 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının statik kültürde tükettikleri glikoz ve ortama salınan laktik asit miktarlarına bağlı olarak ürettikleri mAb miktarının arttığı görüldü (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).



Şekil 4.15 1F114F63PH8 klonunun statik kültürde kesikli işletme modunda glikoz tüketimi ve laktik asit salımı.

İzotiplendirme

Yapılan izotiplendirme analizinin sonuçlarına göre seçilen iki hibridoma klonunun da ürettiği mAb'ların IgM olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Elde edilen IgM sınıfı antikorlar LFIA tanı kitlerinin tasarımında immobilize edilerek kullanıldılar. Pentamer yapıdaki IgM'lerdeki ikiden fazla olan tanıma bölgesi, üretilen kitlerin hassasiyetinin artırılması için kullanıldı.

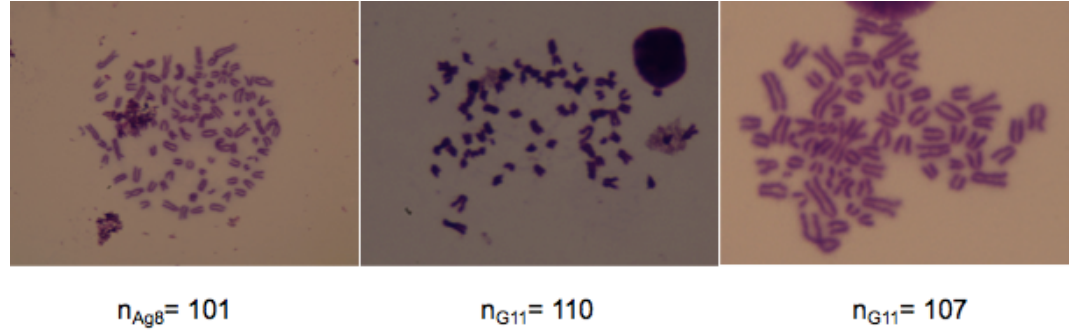
Çizelge 4.5 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının ürettiği mAb'ların izotipleri.

	IgA	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgM
1F114F63PH8	0,36	0,38	0,53	0,38	0,35	2,67
1F114F63PG11	0,09	0,10	0,13	0,11	0,08	2,24

Karyotip Analizi

Hazırlanan metafaz plaklarına göre her iki klonun da Ag8 miyeloma hücre hattı (2n=101) ve diploit fare hücrelerinden (2n=40) daha fazla sayıda kromozoma

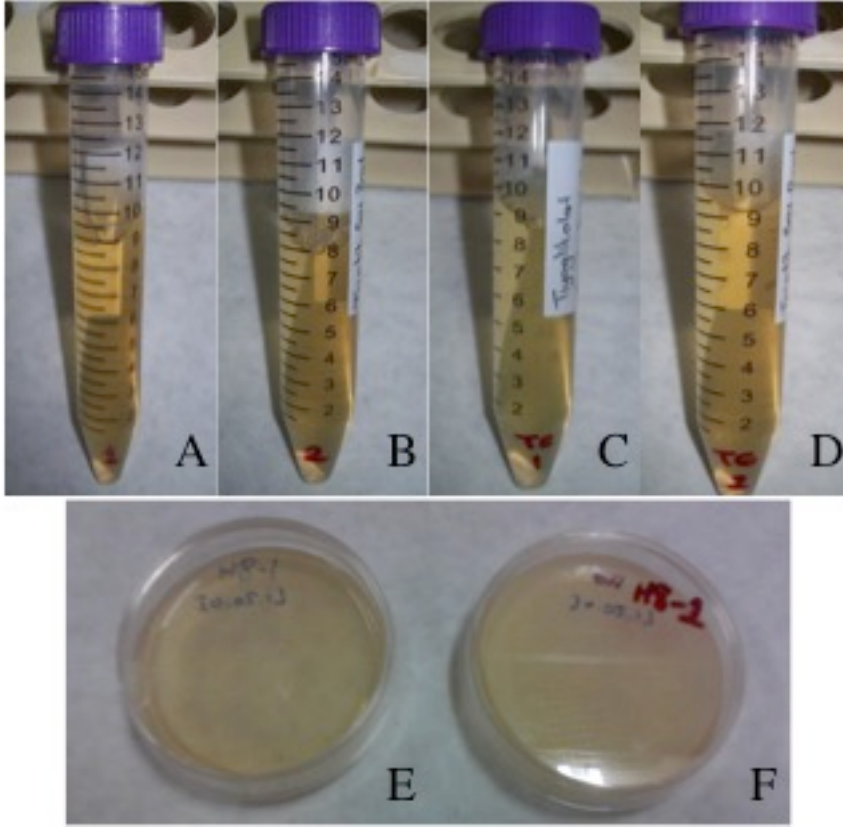
sahip olduğu gösterildi. ELISA sonucu beklenen mAb salgıladıkları saptanmış olan bu klonların, iki hücre hattının füzyonu sonucunda ilgili mAb'ı üretmekten sorumlu gen bölgelerinin de transfer edilmiş hücrelerden oluştuğunu göstermektedir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının kromozom sayısının belirlendiği metafaz plakları.

Sterilite

Elde edilen 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının bakteriden ve mikoplazmadan ari olduğu kültür süpernatantlarından alınan örneklerin 15 gün boyunca 37 °C ve 22 °C'ye ayarlanan inkübatörlerde tutularak bakteri, maya ve küf kontaminantların varlığı, var ise üremesinin teşvik edilmesi ile sağlandı. Ayrıca, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı Şap Enstitüsü, Hücre Bankası Laboratuvarı'na gönderilen örneklerde DAPI direkt floresan boyama ve PCR testleri ile yapılan analizler sonucu ilgili hibridoma klonlarında mikoplazma kontaminasyonu saptanmadığı belirlendi. Alınan mikrobiyal test sonuçları Şekil 4.17'de verildi.

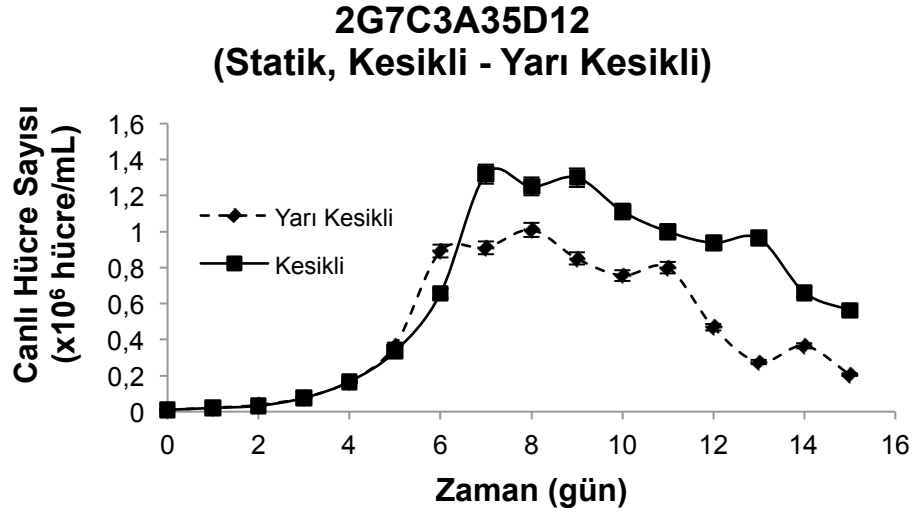


Şekil 4.17 Triptik soy brot (A, 1F114F63PG11; B, 1F114F63PH8); tiyoglikolat brot (C, 1F114F63PG11; D, 1F114F63PH8); Sabouroud dekstroaz agar (E, 1F114F63PG11; F, 1F114F63PG11).

4.1.4.3 2G7C3A35D12 Klonunun Karakterizasyonu

NT-proBNP'ye karşı antikor ürettiği belirlenen 2G7C3A35D12 klonu %10 FBS, 2 mM L-glutamin, 50 mM HEPES, 10 µg/mL gentamisin içeren RPMI 1640 besi ortamı ile birlikte 1×10^4 hücre/mL olacak şekilde 35 mm çaplı petrilerde kesikli ve yarı kesikli olarak üretildi. Kültürlerden toplanan örneklerdeki canlı ve toplam hücre sayısı, üretilen mAb miktarı, glikoz tüketimi ve laktik asit salımı incelendi.

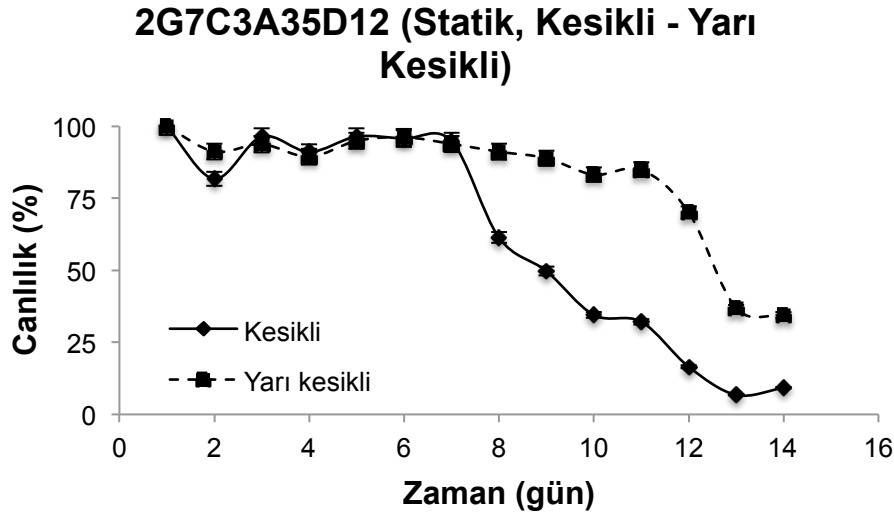
Üreme Kinetiği



Şekil 4.18 2G7C3A35D12 klonuna ait statik kültürlerdeki kesikli ve yarı kesikli işletme modundaki üreme kinetiği.

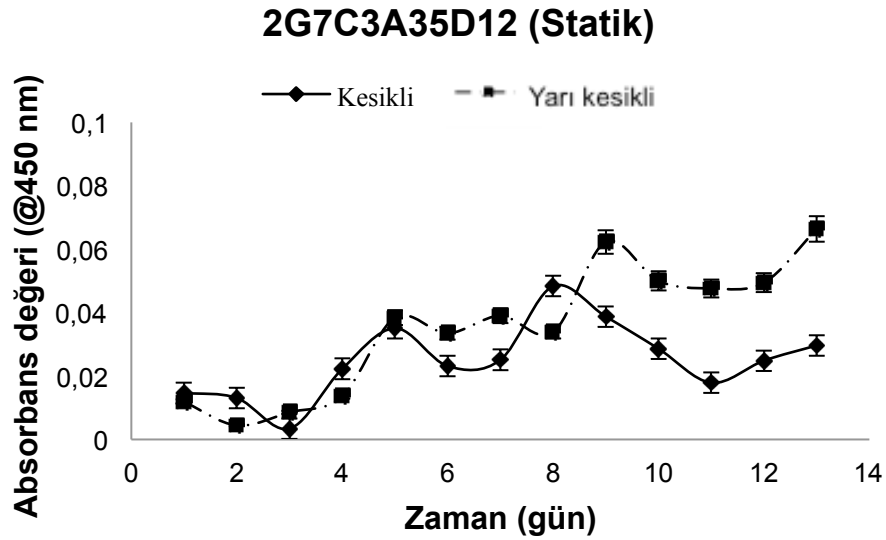
2G7C3A35D12 klonuna ait kesikli ve yarı kesikli işletme modunda gerçekleştirilen statik kültürde canlı hücre sayısı sırasıyla yaklaşık $1,3 \times 10^6$ hücre/mL ve $1,0 \times 10^6$ hücre/mL konsantrasyonuna kadar ulaşmışken hücre canlılık (%) oranları kesikli kültürde 8. günde %61'e düşerken yarı kesikli kültürde bu oran 12. günde dahi %70 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.18 ve 4.19).

Schneider ve ekibi tarafından yapılan 25 cm^2 yüzey alanına sahip flasklarda ve biyoreaktörlerde yapılan IgA mAb'u üreten hibridoma kültürlerinde canlı hücre sayısı sırasıyla $5,5 \times 10^5$ hücre/mL ve 7×10^5 hücre/mL konsantrasyonlarına ulaşılmıştır (Schneider et al., 1997). Takazawa ve ekibi ise 'hollow fiber' biyoreaktörde $7,6 \times 10^6$ hücre/mL değerine kullandıkları fare-insan hibridoma hücreleri ile ulaşmışlardır (Takazawa et al., 1987). Stoll ve ekibi tarafından yapılan çalışmada hücre kültür flaskı, karıştırılmalı tank biyoreaktör ve 'hollow fiber' tipi biyoreaktörler kullanılmıştır. Alınan sonuçlara göre karıştırılmalı tank biyoreaktörde elde edilen IgA konsantrasyonu kullanılan ekstra aminoasitlerin eklendiği ortam ile 3,5 katına çıkarken, serumsuz ortamda antijene afinite gösteren IgA fraksiyonu aminoasitlerin eklendiği ortama göre %61'den %80'e çıkmıştır (Stoll et al., 1997).

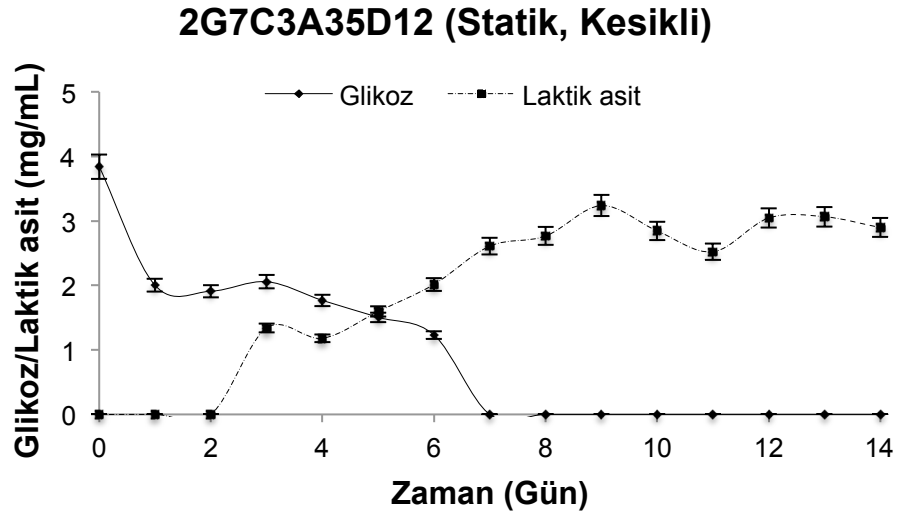


Şekil 4.19 2G7C3A35D12 klonuna ait statik kültürdeki kesikli ve yarı kesikli işletme modundaki hücre canlılık değerleri.

2G7C3A35D12 klonunun üreme kinetiği çalışmasından alınan örneklerdeki mAb titresi kullanılan dolaylı ELISA metodu kullanılarak değerlendirildi (Şekil 4.20). Şekil 4.21’de ise statik kültürde üretilen 2G7C3A35D12 klonuna ait glikoz tüketimi ve laktik asit üretimi değerleri verildi.



Şekil 4.20 2G7C3A35D12 klonuna ait statik kültürdeki kesikli ve yarı kesikli işletme modunda antikor titresini gösteren absorbans değerleri (@450 nm).



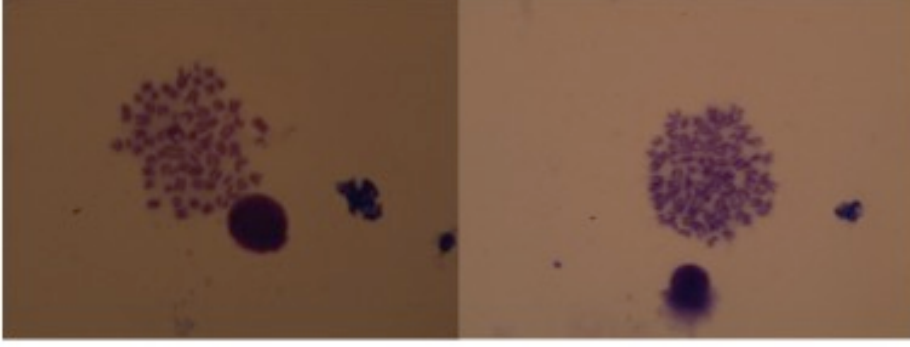
Şekil 4.21 2G7C3A35D12 klonuna ait statik kültürdeki kesikli işletme modunda antikor glüköz tüketimi ve laktik asit salımı.

İzotiplendirme

2G7C3A35D12 klonu için ELISA ile yapılan izotiplendirme testinin sonuçlarına göre hücrelerin IgA sınıfı mAb ürettikleri saptandı.

Çizelge 4.6 2G7C3A35D12 hibridoma klonunun ürettiği antikorun alt sınıfı.

	IgA	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgM
2G7C3A35D12	1,23	0,02	0,03	0,01	0,11	0,24

Karyotip Analizi

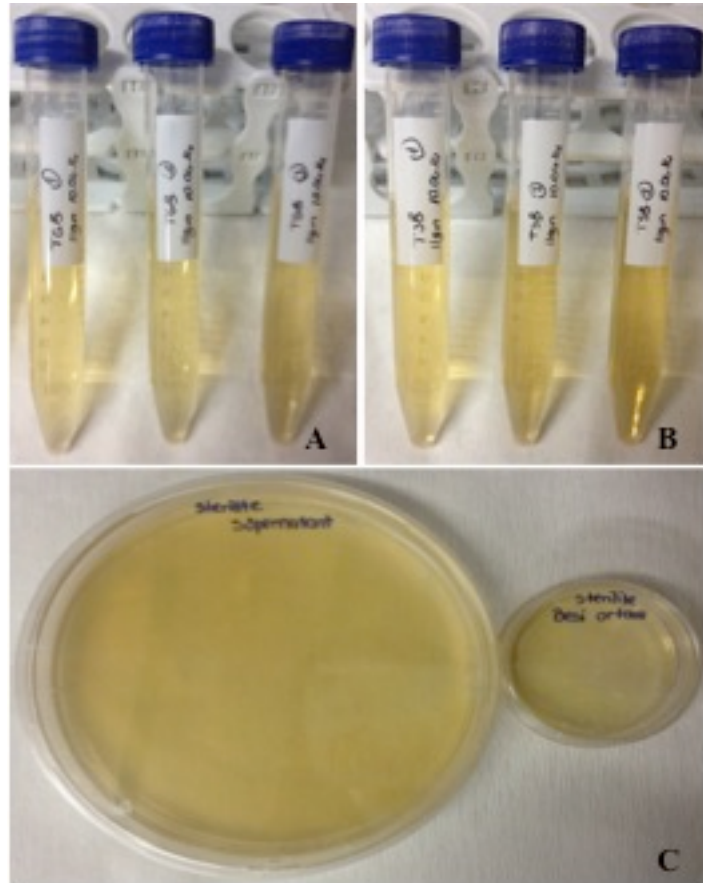
$$n_{5D12} = 74$$

Şekil 4.22 2G7C3A35D12 klonuna ait metafaz plakları.

Hazırlanan metafaz plaklarına göre 2G7C3A5D12 klonunun sayılan 25 adet metafaz plağının ortalaması olarak yaklaşık 74 adet kromozomu olduğu belirlendi (Şekil 4.22).

Sterilite

2G7C3A35D12 klonunun bakteriden ve mikoplazmadan ari olduğu kültür süpernatantlarından alınan örneklerin 15 gün boyunca 37 °C ve 22 °C'ye ayarlanan inkübatörlerde tutularak bakteri, maya ve küf kontaminantların varlığı, var ise üremesinin teşvik edilmesi ile sağlandı. Ayrıca, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı Şap Enstitüsü, Hücre Bankası Laboratuvarı'na gönderilen örneklerde DAPI direkt floresan boyama ve PCR testleri ile yapılan analizler sonucu ilgili hibridoma klonlarında mikoplazma kontaminasyonu saptanmadığı belirlendi. Alınan mikrobiyal test sonuçları Şekil 4.23'te verildi.

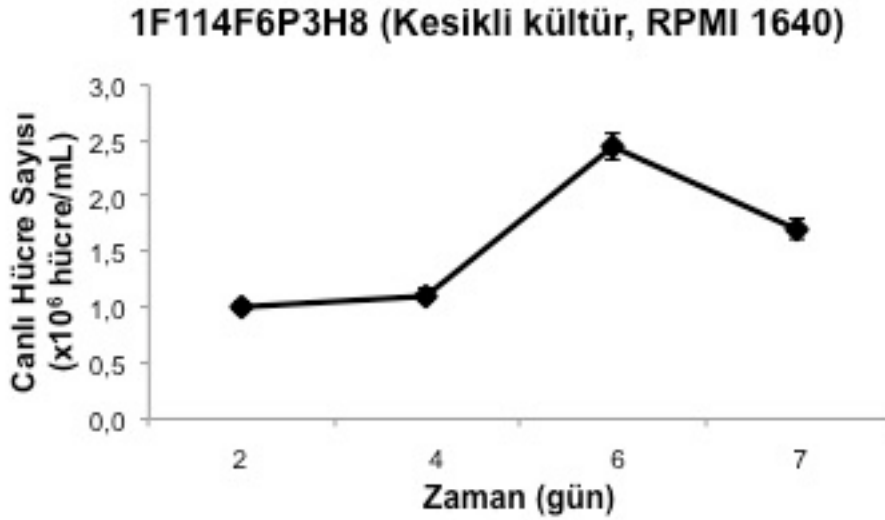


Şekil 4.23 Triptik soy brot (A), tiyoglikolat brot (B), Sabouroud dekstroze agar (C).

4.1.5 Biyoreaktör Üretimleri

Tanı kitlerinin üretiminde kullanılacak antikorların yüksek konsantrasyonda ve büyük hacimde üretilmesi için verimli sistemlerin oluşturulması gerekir. Biyoreaktörlerde yapılan üretimler ile büyük ölçekte, yüksek hücre sayıları ile yüksek konsantrasyonda mAb eldesi mümkün olmuştur.

1F114F63PH8 klonu; %10 FBS, 2 mM L-glutamin, 10 µg/mL gentamisin, 50 mM HEPES içeren RPMI 1640 besi ortamı ve 1×10^6 hücre/mL başlangıç hücre konsantrasyonu ile kültüre edildi. Kesikli işletme modunda, 1 L çalışma hacmi ile yüzeyel havalandırma (0,1 vvm kuru hava (HABAŞ, İzmir)) yapıldı ve kültürün pH'sı biyoreaktörün mikro işlemcisi tarafından kontrol edildi [0,1 vvm CO₂ (HABAŞ, İzmir) ve 0,5 M NaOH] ve kültürün karışma hızı 50 rpm olarak seçildi. Kültürün sıcaklığı biyoreaktörün ceketini ile 37 °C'de sabit tutulmuştur. Kültürden 2., 4., 5. ve 6. günlerde örnek alınıp canlı hücre sayısı ve antikor titresi ölçüldü.



Şekil 4.24 RPMI 1640 besi ortamında 1 L'de yüzeyel havalandırma ile yapılan anti-hFABP mAb'u üretimi, hücre sayısının zamanla değişimi.

Serumsuz besi ortamlarının laboratuvar, pilot ve büyük ölçekte, özellikle antikor üretimi gibi süspanse kültürlerin kullanıldığı çalışmalarda kullanımı hem

içeriğindeki katkı maddelerinin varlığı hem de saflaştırma basamaklarında sağladığı kolaylıklardan ötürü endüstriyel üretimler için önem arz etmektedir.

Çalışmada 1F114F63PH8 klonu biyoreaktör üretimleri için serumsuz ortama adapte edildi. Bu amaçla hücreler %25 ISF-1 besi ortamı (%75:%25 RPMI 1640:ISF-1 besi ortamı) kullanılarak 2×10^5 hücre/mL başlangıç hücre konsantrasyonu ile kültüre edildiler. Ortam kompozisyonunun değişimine adapte olmaya çalışan canlı hücrelerin konsantrasyonunun önce azaldığı daha sonra ise arttığı belirlendi. Canlı hücre sayısı 1×10^6 hücre/mL'ye geldiğinde hücreler aynı besi ortamı ile pasajlandı. Hücre konsantrasyonu tekrar 1×10^6 hücre/mL'ye geldiğinde %50 ISF-1 besi ortamına (1:1, RPMI 1640 : ISF-1) geçildi. Aynı işlemler bu süreçte de tekrarlandı. İki kez %50 ISF-1 besi ortamı ile pasajlanan hücrelerin besi ortamına adapte olduğu kabul edildi. Şekil 4.25'te %50 ISF-1 ortamına adapte edilen 1F114F63PH8 klondan elde edilen veriler bulunmaktadır. Buna göre, hücrelerin her iki işletme modunda da 3×10^6 hücre/mL konsantrasyonuna ulaştıkları saptandı. Kültürdeki toplam hücre sayısı (2,5 mL) kesikli kültürde yaklaşık 6×10^6 hücreye, yarı kesikli kültürlerde ise yaklaşık 9×10^6 'ya ulaştı. Diğer taraftan kültürlerle ait canlılık değerleri kültürün 10. gününe kadar %50'nin üzerinde kaldı.

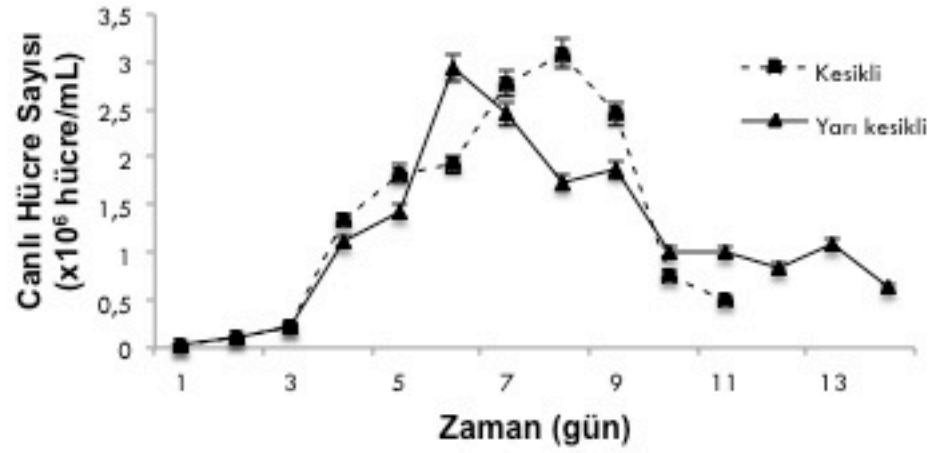
%50 ISF-1 besi ortamına adapte edilen bu klon kesikli beslemeli işletme modunda, 1 L başlangıç hacmi ve 8×10^5 hücre/mL başlangıç hücre konsantrasyonu ile kültüre edildi. Yüzeyel havalandırma (0,1 vvm kuru hava, HABAŞ, İzmir) yapıldı ve kültürün pH'sı biyoreaktörün mikro işlemcisi tarafından kontrol edildi [0,1 vvm CO₂ (HABAŞ, İzmir) ve 0,5 M NaOH]. Kültürün karışma hızı ise 50 rpm olarak seçildi. Kültürün sıcaklığı biyoreaktörün ceketini ile 37 °C'de sabit tutuldu. Kültürden günlük alınan örnekler ile canlı hücre sayısı ve antikor titresi hesaplandı.

Yüksek konsantrasyonda mAb üretimi için kullanılacak yöntemlerden biri *in vivo*'da fare asidik sıvısından elde edilmesidir. Diğer bir yöntem ise biyoreaktörlerde yapılan üretimlerdir. Fare asidik sıvısından yapılacak üretimler fare sayısı ile sınırlı olmasının yanında fareden fareye farklılık göstermektedir. Bunlara ek olarak, asidik sıvıdan mAb saflaştırma işlemi, fareden gelen yabancı

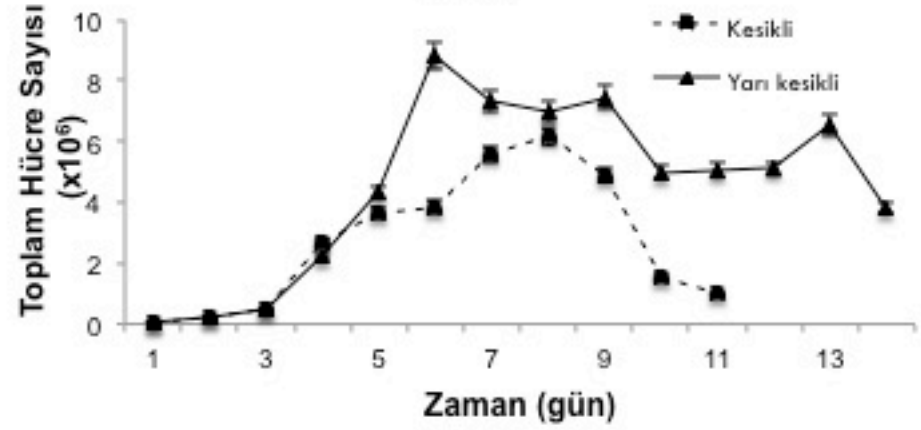
antikorların da varlığı nedeniyle görece daha zor ve pahalıdır. Ayrıca, etik kurallar gereği yapılacak üretimler hacimsel anlamda sınırlıdır. *In vitro*'da yapılan üretimler için bu etik kaygılar gereği dinamik kültürlerde daha yüksek hacimlerde (>250 mL) üretimler yapılarak yüksek konsantrasyonda mAb elde edilebilir. Farklı biyoreaktör tiplerinin farklı avantajları olsa da karıştırmalı tank biyoreaktörlerin işletilmesindeki kolaylık, farklı hücre tiplerine ya da işletme tiplerine olan uygunluğu, sistemin izin verdiği farklı çalışma hacimlerinin kullanılabilmesidir. Bu avantajlardan ötürü çalışmada karıştırmalı tank biyoreaktör kullanıldı. RPMI 1640 besi ortamının kullanıldığı kesikli biyoreaktör üretimi 1F114F63PH8 klonunun statik, kesikli üretimler ile karşılaştırıldığı canlı hücre konsantrasyonu yaklaşık iki katına çıkmıştır.

Zhang ve ekibi, yaptıkları çalışmada kesikli ve kesikli beslemeli hibridoma üretimlerinde antikor miktarı kesikli beslemeli sistemlerde 3 katına (48 mg/L – 119 mg/L), maksimum canlı hücre konsantrasyonu 2 katına ($1,1 \times 10^9$ hücre/L – $2,1 \times 10^9$ hücre/L) çıktığı belirtilmiştir (Zhang et al., 2004). Ayrıca hücre kültür flaskları ve 2 L'lik bir biyoreaktörde yapılan üretimlerin karşılaştırıldığı çalışmalarda üretilen mAb miktarının 90 mg/L'den 2,4 g/L'ye kadar çıkarılabileceği gösterilmiştir (Xie and Wang, 1996; Xie, 1997).

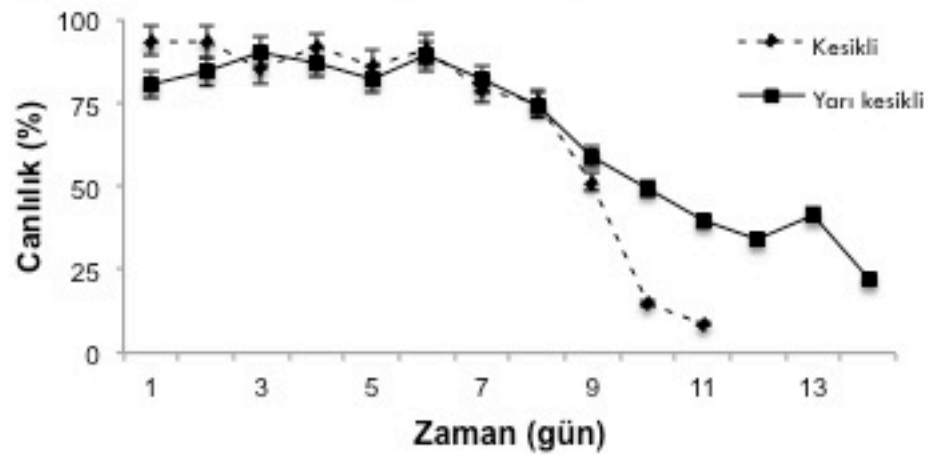
A 1F114F63PH8 (%50 ISF-1) - Canlı Hücre



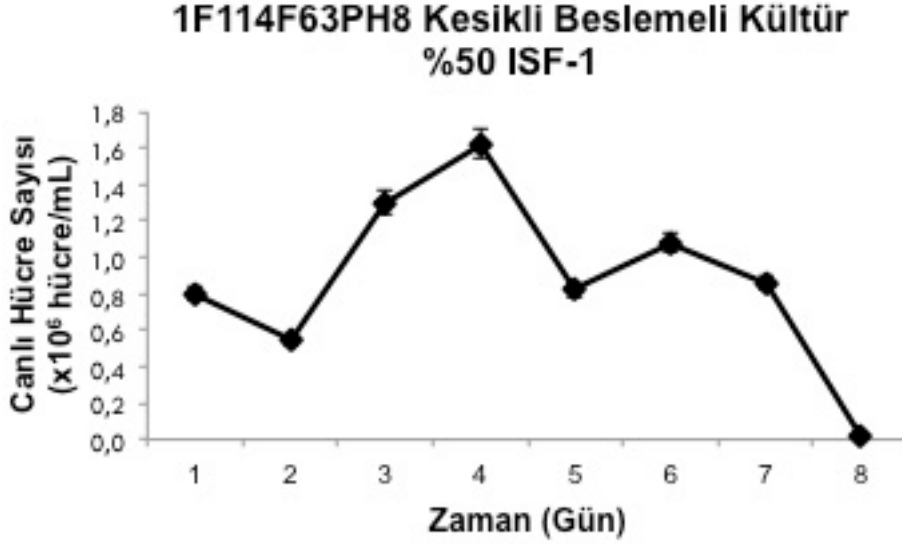
B 1F114F63PH8 (%50 ISF-1) - Toplam Canlı Hücre



C 1F114F63PH8 (%50 ISF-1) - Canlılık



Şekil 4.25 %50 ISF-1 ortamına adapte edilen 1F114F63PH8 klonuna ait; A. Zamana bağlı hücre konsantrasyonu; B.Zamana bağlı toplam hücre sayısı, C. Zamana bağlı % canlılık değerleri.



Şekil 4.26 %50 ISF-1 ortamına adapte olan 1F114F63PH8 klonunun biyoreaktörde fedbatch modunda üretimi.

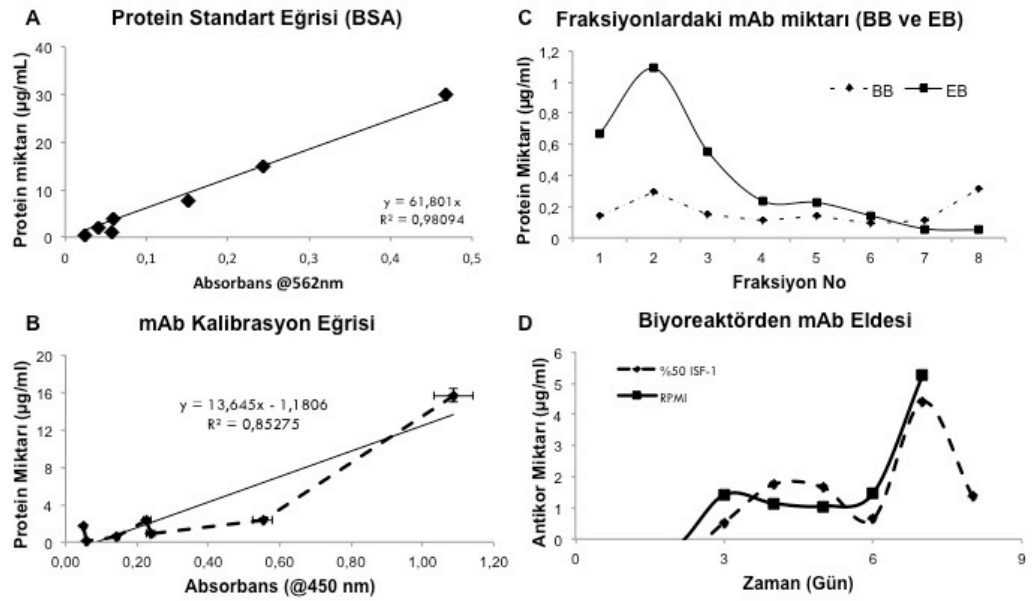
Kültürün 4. gününde canlı hücre sayısının 1×10^6 hücre/mL'yi geçtiği belirlendi ve %30 (330 mL) besi ortamı ilavesi ile hücre sayısı 1×10^6 hücre/mL'ye indirildi. Şekil 4.26'da üretimden elde edilen canlı hücre sayısı verisi bulunmaktadır.

4.2 mAb'ların Konsantrasyonu ve Saflaştırılması

1F114F63PH8 klonu birim zamanda ve hacimde ürettiği mAb miktarı daha fazla olduğu için tanı kiti çalışmalarıda gereken mAb'lar bu klon ile yapılan üretimlerden elde edildi. Dolgu materyali olarak mannan bağlanma proteini içeren kolona örnek verilmeden önce 1:1 oranında ticari kit içeriğinde verilen bağlanma tamponu ile karıştırıldı. Örnek bu aşamaya gelmeden önce konsantrasyon ve diyaliz işlemlerine tabi tutuldu. Konsantrasyon işleminde ortalama 40 mL'lik kültür üst sıvı 1 mL'ye konsantre edilmektedir. Diyaliz işleminde kayıp olmadığı

varsayılırsa antikor saflaştırma işleminde elde edilen değerler 80 mL’lik bir kültür üst sıvısını temsil etmektedir.

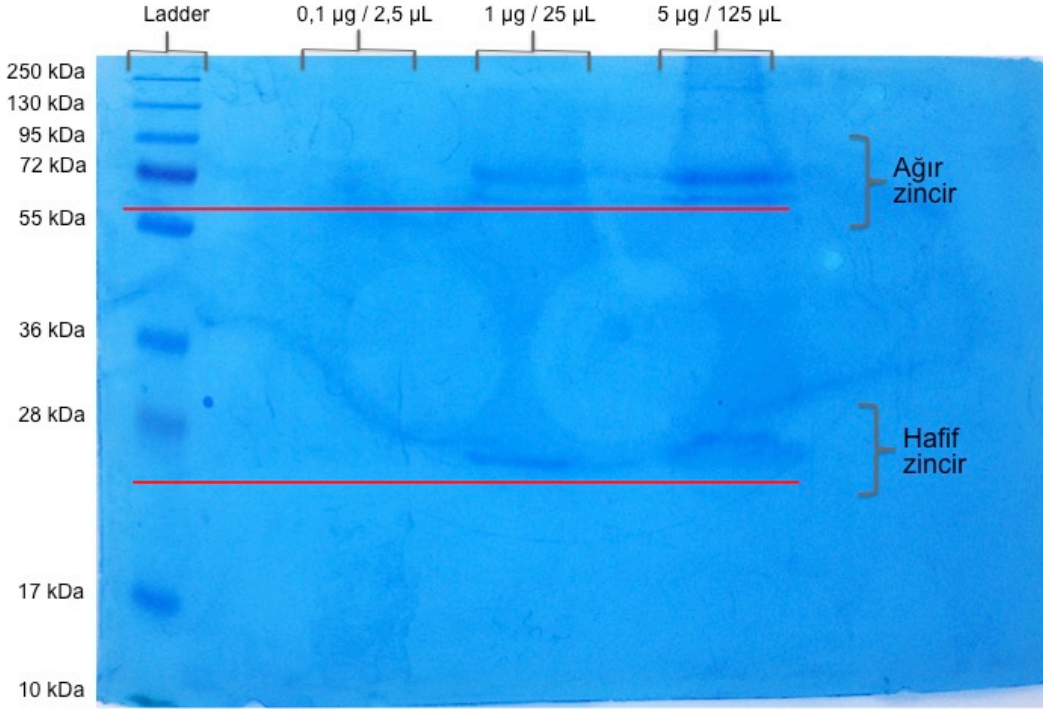
1F114F63PG11 klonu antikor üretme veriminin düşük olması sebebi ile biyoreaktör uygulamalarına dahil edilmemiştir. 2G7C3A35D12 klonu ise IgA sınıfına ait mAb ürettiğinden kullanılan saflaştırma yöntemi sonuç vermemiştir. Saflaştırılmış anti-NT-proBNP mAb’u yerine kosantre kültür ortamı tanı kiti çalışmaları kullanılmıştır.



Şekil 4.27 Saflaştırılan mAb'lara ait dolaylı ELISA sonuçlarının antikor miktarına çevrilmesi için; A.Protein standart eğrisi, B.Dolaylı ELISA sonuçlarının protein miktarına çevrimini sağlayacak 'mAb Kalibrasyon Eğrisi', C. Elüsyon ve bağlanma tamponları ile toplanan fraksiyonlardaki mAb miktarı, D. RPMI 1640 ve %50 ISF-1 ile yapılan üretimlerden alınan mAb miktarı sonuçları.

4.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE ile saflaştırılan anti-hFABP monoklonal antikorlarının saflığı ve moleküler büyüklüğü belirlenmiştir. IgG sınıfı bir antikor 2 hafif zincir (≈ 25 kDa) ve 2 adet ağır zincir (≈ 70 kDa)'den oluşmaktadır ve yaklaşık 180 – 190 kDa büyüklüğündedir. Pentamer yapıdaki bir IgM sınıfı antikor yaklaşık 900 kDa civarında bir moleküler büyüklüğe sahiptir ve yapısı gereği 5 adet IgG sınıfı antikorun büyüklüğüne eş değerdir Şekil 4.28'de görüldüğü üzere üretilen monoklonal antikorlar saf olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.28 Elde edilen hibridomalar tarafından üretilen anti-hFABP monoklonal antikorlarının SDS-PAGE görüntüsü.

4.4 Tanı Kiti Eldesi

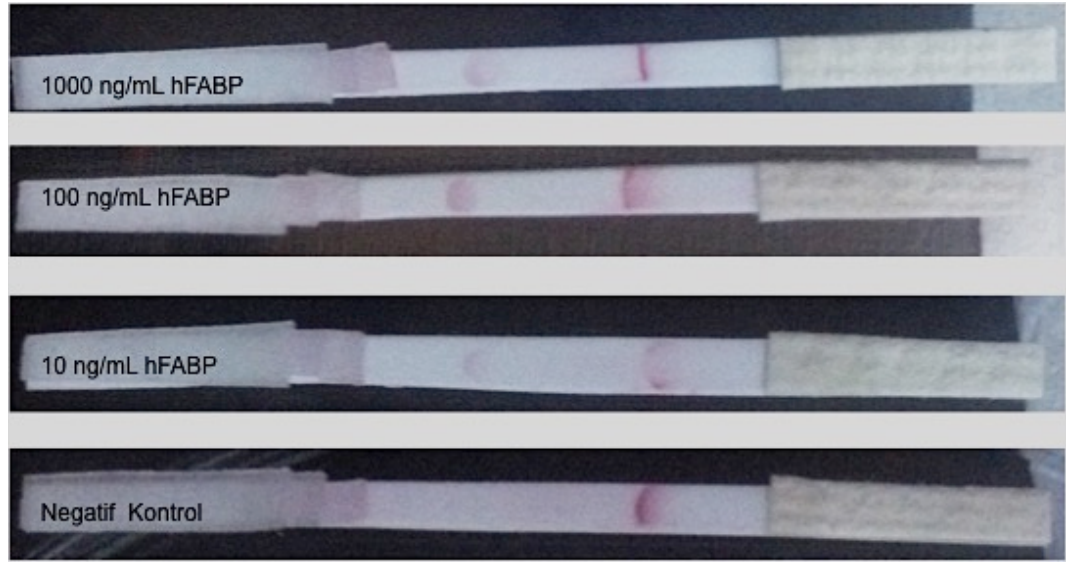
4.4.1 LFIA Kitleri

Kullanım kolaylığı ve yorumlanması için ek cihaz gerektirmeyen LFIA testleri bir çok alanda uzun yıllardır kullanılmaktadır. Hangi ortamda bulunulduğuna bakılmaksızın (laboratuvar, ev, ofis, ambulans, uçak, vb.) kullanılabilen bu test metodu ön tanıda kullanılmak üzere kullanıcıya bilgi vermektedir. Hassasiyet değerleri ELISA ile karşılaştırılabilir değerlere kadar geliştirilmiştir (Wong and Tse, 2009).

4.4.1.1 hFABP Tespiti

Daha önce belirtildiği üzere hFABP tespiti için 1F114F63PH8 klonu ile yapılan üretimlerden saflaştırılan anti-hFABP mAb'ları test kitinde NC membrana immobilize edildi. Ticari olarak elde edilen anti-hFABP mAb'u (9F3, HyTest) 40

nm çaplı AuNP ile konjuge edildikten sonra konjugat membranına emdirildi. Kontrol çizgisinin elde edilebilmesi için ise 40 nm çaplı AuNP ile konjuge edilmiş streptavidin molekülü kullanıldı. NC membranda ise kontrol çizgisinde stertavidine afinitesi yüksek olan biyotin-BSA molekülü kullanıldı. *In vitro* immünizasyon çalışmalarında da hedef protein olarak kullanılan ticari hFABP (4F29, HyTest, Finlandiya) farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak üretilen kitlerde denendi (Şekil 4.29).



Şekil 4.29 Farklı konsantrasyonlar hFABP proteini içeren ve içermeyen PBS çözeltisi ile yapılan performans denemesi.

4.4.1.2 NT-proBNP Tespiti

NT-proBNP tespiti için 2G7C3A35D12 klonunun kültüründen elde edilen retentanttaki anti-NT-proBNP mAb'ları NC membrana immobilize edildi. Ticari olarak elde edilen anti-NT-proBNP mAb'u (5B6, HyTest, Finlandiya) 40 nm çaplı AuNP ile konjuge edildikten sonra konjugat membranına emdirildi. Kontrol çizgisinin elde edilebilmesi için ise 40 nm çaplı AuNP ile konjuge edilmiş streptavidin molekülü kullanıldı. NC membranda ise kontrol çizgisinde stertavidine afinitesi yüksek olan biyotin-BSA molekülü kullanıldı. *In vitro* immünizasyon çalışmalarında da hedef protein olarak kullanılan ticari NT-

proBNP (4NT1, HyTest, Finlandiya) farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak üretilen kitlerde denendi (Şekil 4.30).



Şekil 4.30 Farklı konsantrasyonlar NT-proBNP proteini içeren ve içermeyen PBS çözeltisi ile yapılan performans denemesi.

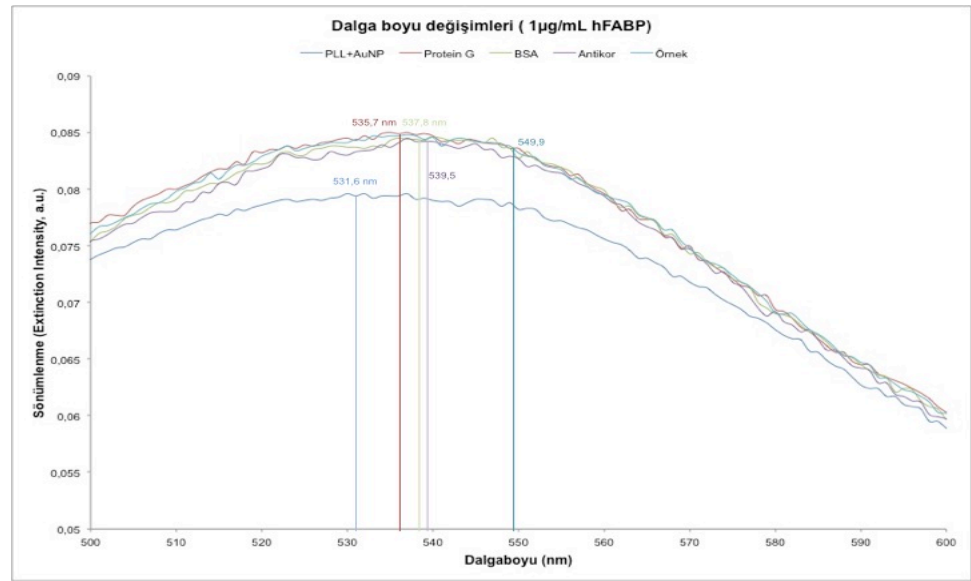
4.4.2 LSPR Kitleri

Geliştirilen LSPR tespit sistemleri bir spektrofotometreye ihtiyaç duymasına rağmen tek bir inkübasyon ve yıkama basamağı sonrasında yapılan okuma ve analiz basamağı sonrasında sonuçları elde etmek mümkündür. Taşınabilir sistemlere adapte edilen bu sistem ile LFIA' metodundan 1000 kat, ELISA'dan ise 100-1000 kat daha hassas tanı kitlerinin geliştirilmesi mümkündür. Cep telefonu gibi mobil sistemlere aktarılacak sistem kullanımı kolay uygulamalar ile birleştirilerek her ortamda kullanılabilen, hassas ve kullanımı kolay sistemler geliştirilebilir.

4.4.2.1 hFABP Tespiti

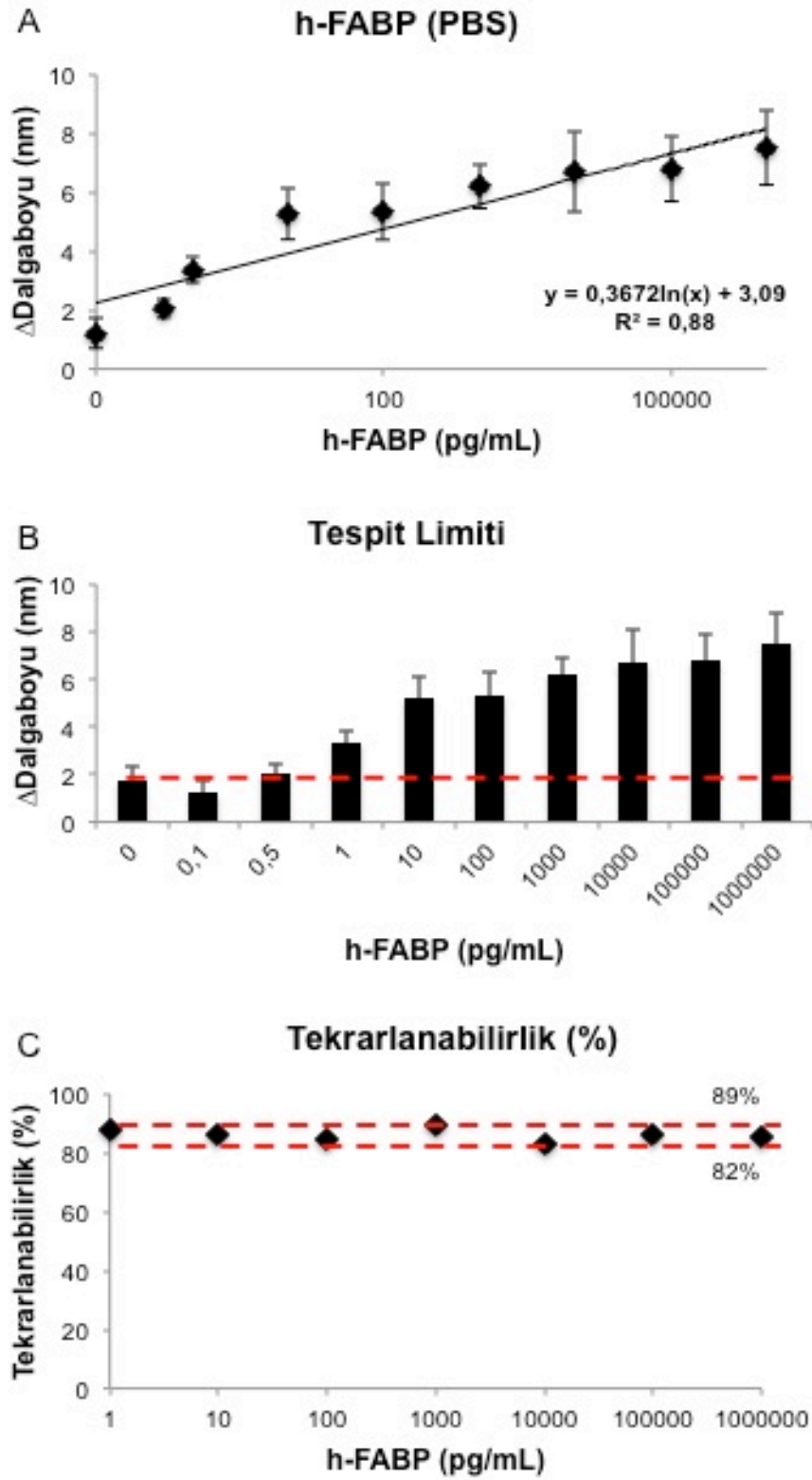
İnşaa edilen LSPR yüzeylerin üzerine hazırlanan hFABP proteini farklı konsantrasyonlarda (1 $\mu\text{g/mL}$ - 100 fg/mL) hazırlandı ve 100 $\mu\text{L/göz}$ olacak şekilde yüzeylere uygulandı. 4 $^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saatlik inkübasyonun ardından gözler 300

$\mu\text{L/göz PBS}$ (3 kez) ile yıkandı ve spektrofotometre de 350 nm - 800 nm aralığında absorbans taraması yapıldı. Her 1 nm için absorbans düşüş (*extinction intensity*) verisi kayıt edildi. Kaydedilen veri, geliştirilen MATLAB kodu kullanılarak noktasal datadan bir eğriye dönüştürüldü ve bu eğrinin tepe noktası ve bu noktaya karşılık gelen dalgaboyu kaydedildi. Elde edilen tepe noktası değeri, önceki basamakta alınan anti-hFABP mAb tepe noktası verisinden çıkarılarak sonuçlar elde edildi. Şekil 4.31’de farklı spektrofotometrik okumalarda elde edilen eğrilere ait en yüksek değerler verildi. Bu değerler birbirinden çıkarılarak elde edilen sonuçlar analiz edildi.

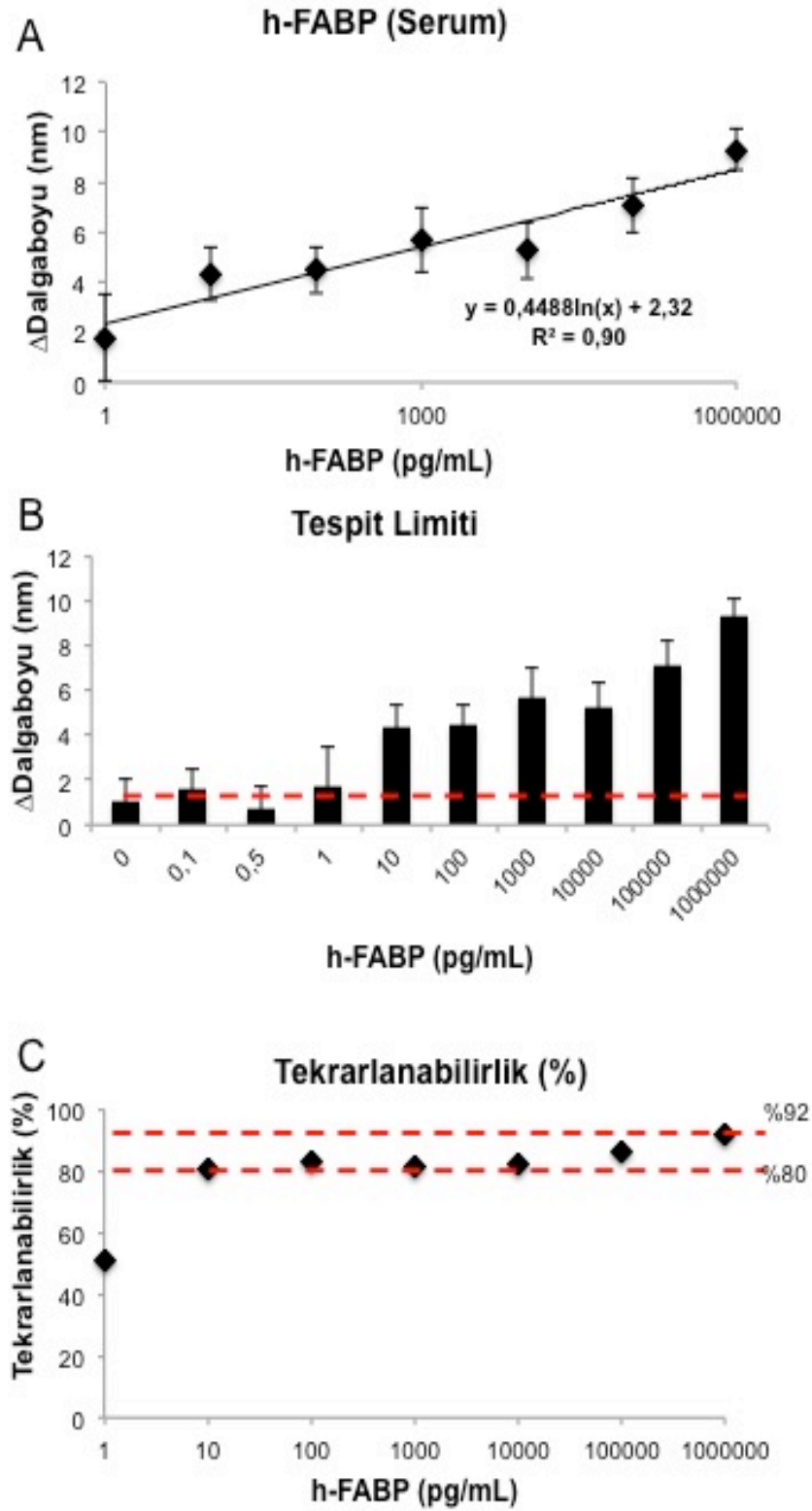


Şekil 4.31 96 gözlü mikroplyette yapılan 1 $\mu\text{g/mL}$ hFABP tespiti.

hFABP tespiti; PBS ve serum içinde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki hFABP proteini (100 fg/mL – 1 $\mu\text{g/mL}$) ile gerçekleştirildi. PBS ile yapılan uygulamanın sonuçları Şekil 4.32’de, serum ile yapılan çalışmaların sonuçları ise Şekil 4.33’te verildi.



Şekil 4.32 LSPR yüzeylerde PBS içinde hazırlanmış hFABP (0, 100 fg/mL – 1 µg/mL) tespiti, A. hFABP konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi kalibrasyon eğrisi, B. LSPR yüzeylerde hFABP tespit limiti, C. Yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.

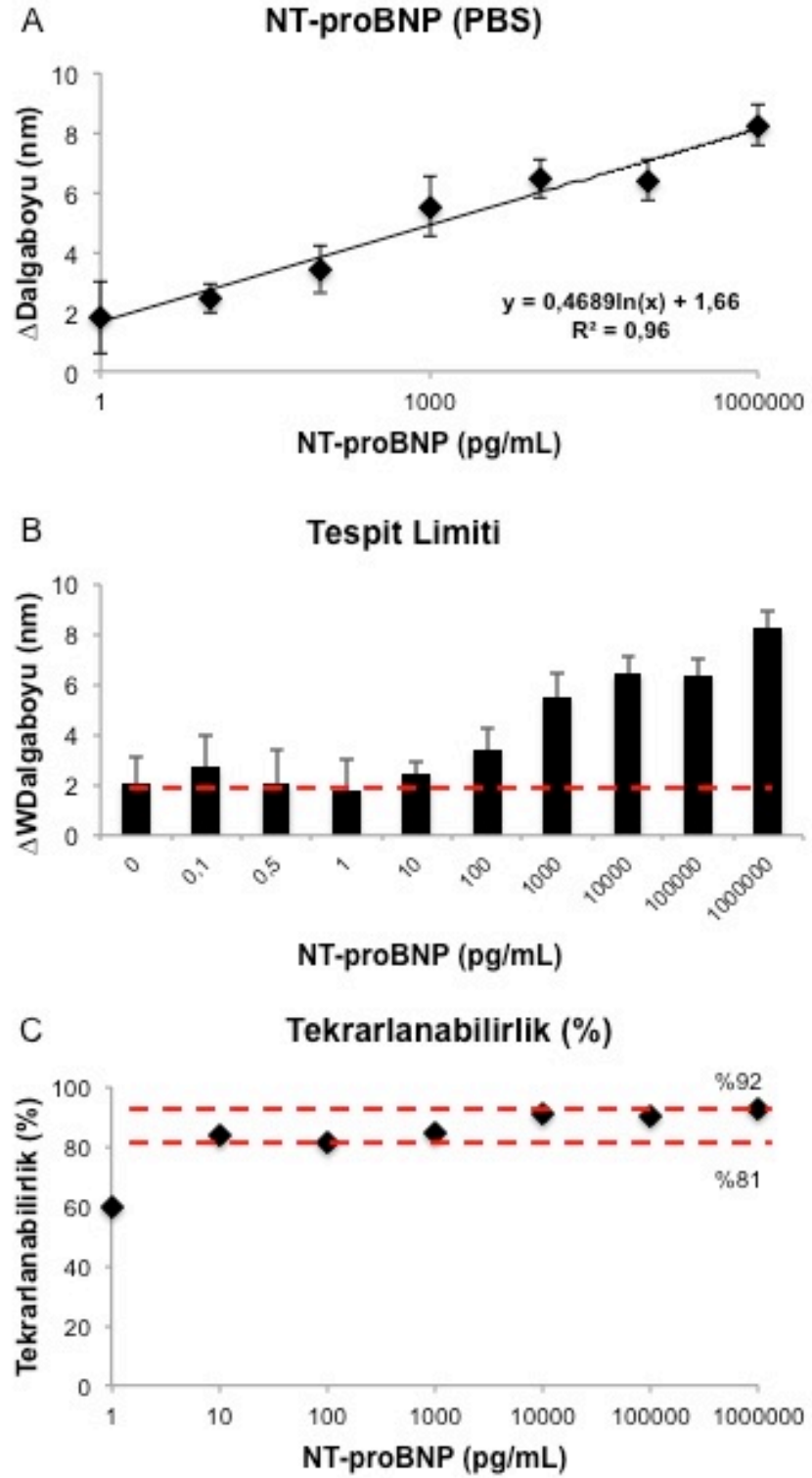


Şekil 4.33 LSPR yüzeylerde insan serumu içinde hazırlanmış hFABP (0, 100 fg/mL – 1 µg/mL) tespiti, A. hFABP konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi kalibrasyon eğrisi, B. LSPR yüzeylerde hFABP tespit limiti, C. Yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.

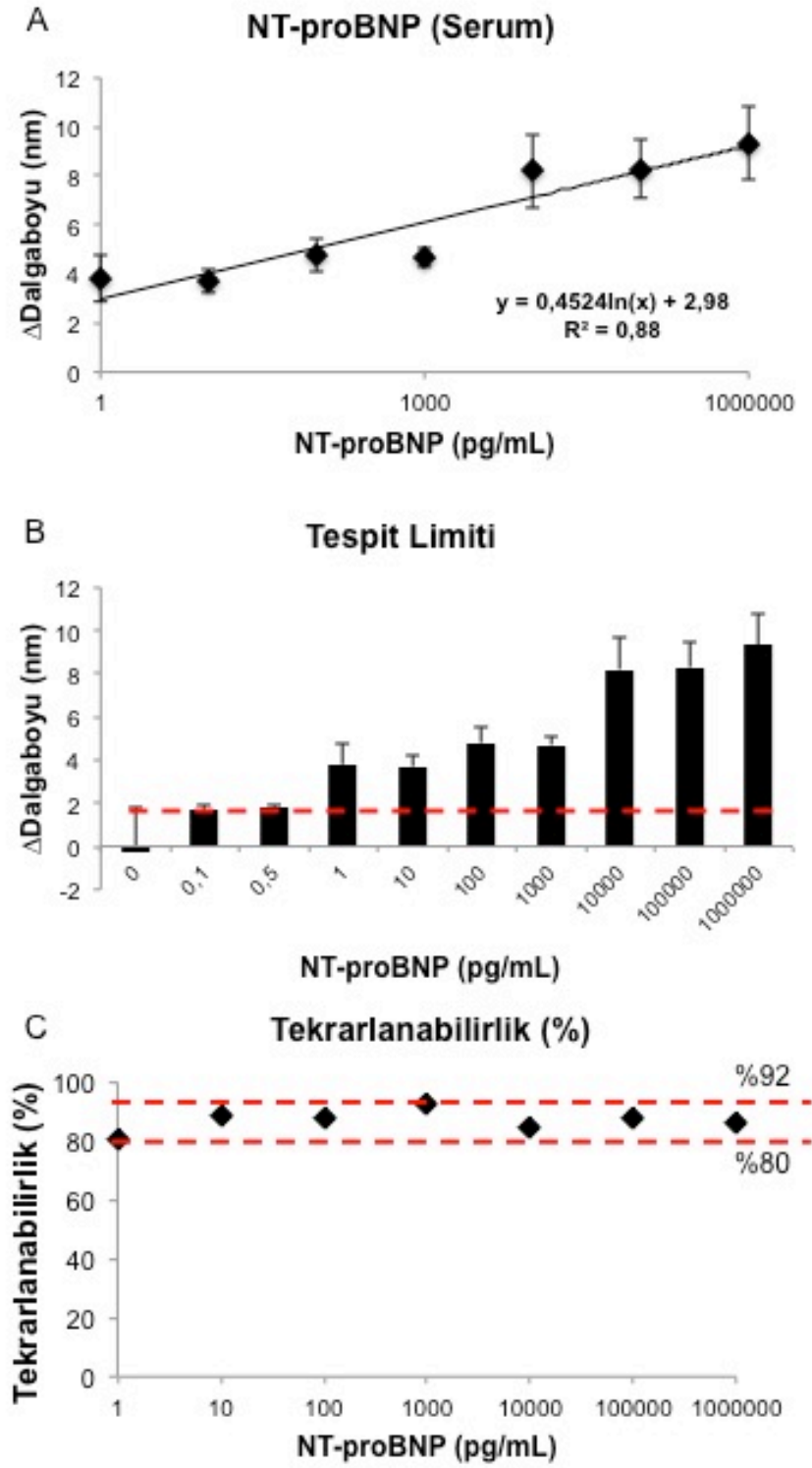
4.4.2.2 NT-proBNP Tespiti

İnşaa edilen LSPR yüzeylerin üzerine hazırlanan NT-proBNP proteini farklı konsantrasyonlarda (1 µg/mL – 100 fg/mL) hazırlandı ve 100 µL/göz olacak şekilde yüzeylere uygulandı. 4 °C’de 1 saatlik inkübasyonun ardından gözler 300 µL/göz PBS (3 kez) ile yıkandı ve spektrofotometre de 350 nm – 800 nm aralığında absorbans taraması yapıldı. Her 1 nm için absorbans düşüş (*extinction intensity*) verisi kayıt edildi. Kaydedilen veri, geliştirilen MATLAB kodu kullanılarak noktasal veriden bir eğriye dönüştürüldü ve bu eğrinin tepe noktası ve bu noktaya karşılık gelen dalgaboyu kaydedildi. Elde edilen tepe noktası değeri, önceki basamakta alınan anti-NT-proBNP mAb tepe noktası verisinden çıkarılarak sonuçlar elde edildi.

NT-proBNP tespiti; PBS ve serum içinde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki hFABP proteini (100 fg/mL – 1 µg/mL) ile gerçekleştirildi. PBS ile yapılan uygulamanın sonuçları Şekil 4.34’de, serum ile yapılan çalışmaların sonuçları ise Şekil 4.35’te verildi.



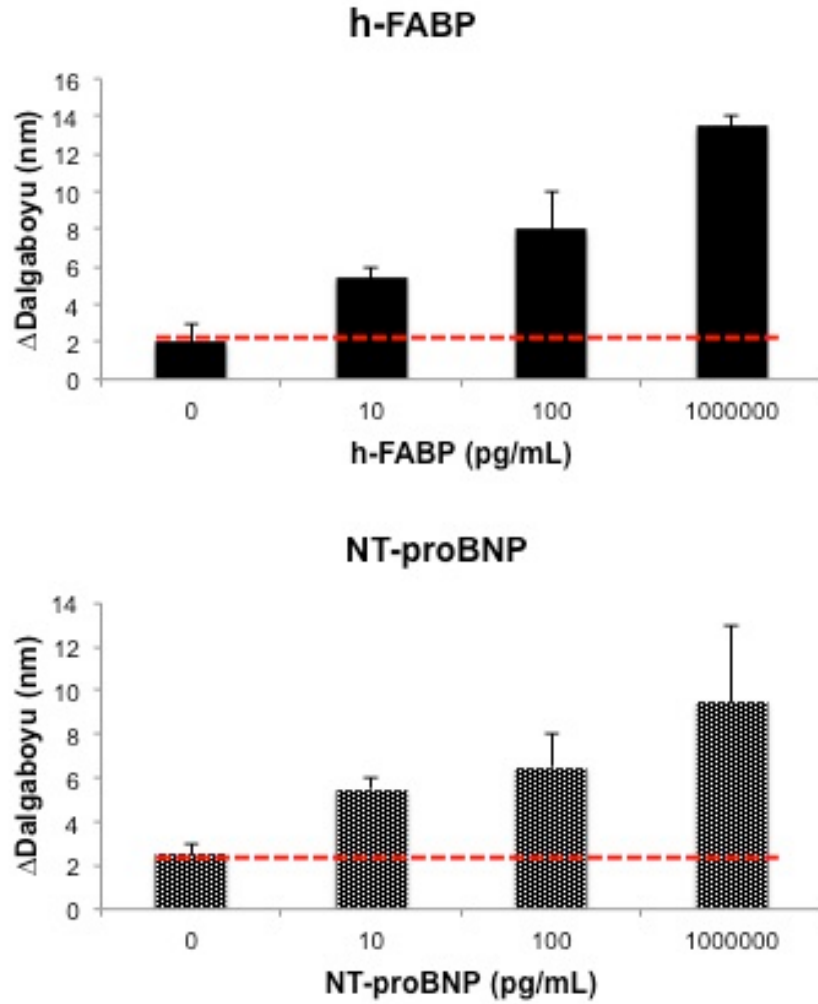
Şekil 4.34 LSPR yüzeylerde PBS içinde hazırlanmış NT-proBNP (0, 100 fg/mL – 1 µg/mL) tespiti, A. NT-proBNP konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi kalibrasyon eğrisi, B. LSPR yüzeylerde NT-proBNP tespit limiti, C. Yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.



Şekil 4.35 LSPR yüzeylerde insan serumu içinde hazırlanmış NT-proBNP (0, 100 fg/mL – 1 µg/mL) tespiti, A. NT-proBNP konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi kalibrasyon eğrisi, B. LSPR yüzeylerde NT-proBNP tespit limiti, C. Yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.

4.4.3 LSPR Temelli Mikroakışkan Çiplerin Denenmesi

Tasarlanan LSPR temelli mikroakışkan çipler ile farklı konsantrasyonlarda hFABP ve NT-proBNP içeren PBS ile tespit çalışmaları tamamlandı ve kurulan taşınabilir spektrofotometre düzeneği ile analiz edildi. Geliştirilen tek kullanımlık mikroakışkan çipler ile oluşturulan taşınabilir sistem için prototip oluşturulmasının yanında bu prototiplerden elde edilen sonuçlara göre çiplerin tespit limitleri 10 pg/mL olarak belirlendi. Tek kullanımlık çipler ile birden fazla sayıda biyobelirteçin tespitinin mümkün olabileceği gösterildi. Bu sayede düşük maliyetli, analizi kolay, taşınabilir sistemler kullanılabilecektir.



Şekil 4.36 Taşınabilir spektrofotometre sistemi ile değerlendirilmiş LSPR temelli mikroakışkan çiplere ait sonuçlar.

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Kalp krizi ve yetmezliği tek bir biyobelirteç ile tanı koymanın mümkün olmayacağı iki rahatsızlıktır. Literatürde gerçekleştirilen çalışmalar genellikle tek bir biyobelirteç üzerinden yapılmış ya da klinik olarak belirli bir bölgede değerlendirildiği için sadece bir şehrin, bölgenin ya da ülkenin ortalama değerleri üzerinden yorumlandığı için uluslararası bir değerlendirmenin yapılmasına imkan vermemiştir.

Kalp krizini takip eden kalp kası hücrelerinin ölümü ile kan akışına karışan moleküllerden troponin altın standart olarak kabul edilmesine rağmen krizden 6 saat sonra kandaki en yüksek seviyesine ulaşmaktadır. Tespiti ise hassasiyeti düşük kolay kullanıma sahip testler ya da yüksek hassasiyetli, kompleks ve kullanımı uzmanlık gerektiren cihazlar ile yapılmaktadır. Özellikle periferde bulunan, cihaz parkı yeterli düzeyde olmayan hastane ve poliklinikler için böyle cihazların elde edilmesi ve işletilmesi kısa vadede mümkün değildir. Kalp yetmezliği ise her yaştan her bireyde gözlenebilen, kişinin yaşı, ırkı, yaşam stili, sahip olduğu diğer rahatsızlıklar ve bu rahatsızlıklar dolayısıyla kullandığı ilaçlara bağlı olarak farklı düzeyde ortaya çıkan bir durumdur. Bir çok farklı değişkenden etkilenebildiği için tanısında da tek bir biyobelirtecın kullanılması bir çok farklı ihtimalin gözden kaçmasına sebep olabilmektedir. Bu nedenlerden ötürü çoklu biyobelirteç taramalarının önemi her geçen gün daha iyi anlaşılırken bu biyobelirteçlerin minimum miktarda örnekte (serum, kan, plazma) kısa sürede tespit edilmesi hem birey hem de sağlık çalışanları açısından önemlidir.

Monoklonal antikor teknolojisi Köhler ve Milstein'in ilk yayınlarından bu yana bir çok farklı alana yüksek hassasiyet ile hizmet eden bir sistem olmuştur. Tanı, tedavi, saflaştırma, hedefleme gibi çalışmalarda; *in vivo* yada *in vitro*'da kullanılan antikorlar önemli tespitlerin yapılmasını sağlamışlardır. Çalışmada elde edilen 6 adet anti-hFABP monoklonal antikorı üreten klondan iki tanesi ile 6 adet anti-NTproBNP monoklonal antikorı üreten klonlardan bir tanesi, yüksek antikor titreleri nedeniyle seçilerek kullanılmıştır. Anti-hFABP monoklonal antikorı ürettiği belirlenen 1F114F63PG11 ve 1F114F63PH8 klonlarının karakterizasyon çalışmaları sonrasında IgM alt sınıfı antikor ürettikleri belirlenirken anti-

NTproBNP monoklonal antikoru ürettiği belirlenen 2G7C3A35D12 klonun ise IgA tipi monoklonal antikor ürettiği gösterildi. 1F114F63PH8 klonunun metabolik aktivitesinin daha yüksek olduğu, daha hızlı üreyerek 1F114F63PG11 klonuna göre daha fazla antikor ürettiği belirlendiğinden tanı kiti üretimi için gerekli olan antikorlar bu klon ile üretilmiştir. Ayrıca 1F114F63PH8 klonu serumsuz kültürlerle adapte etmeye çalışılarak birim hacimdeki canlı hücre sayısının 4-5 katına çıkarılabileceği dolayısıyla da biyoreaktör üretimlerinde daha fazla antikor üretilabileceği gösterildi. 1 L hacimde yapılan kesikli ve yine 1 L ile başlayan kesikli beslemeli işletme modunda yapılan üretimler ile klonun dinamik kültürlerdeki davranışları da incelendi. Fakat hayvan hücre biyoproseslerinin en büyük dezavantajı olan havalandırma ve karıştırma kısıtları sebebiyle biyoreaktör üretimleri 8. günlerinde sonlandırıldı. Statik kültürlerde ise hücreler 16. günde dahi canlılıklarını sürdürdüler.

1F114F63PH8 klonu tarafından üretilen IgM sınıfı antikorun saflaştırılması için laboratuvar ölçekli bir afinite kolonu kullanılarak antikorlar saflaştırıldı. Elde edilen antikorlar alt sınıfı dolayısıyla tanı kitlerinde AuNP'ler ile işaretlenmek yerine membrana immobilize edilerek yakalama ajanı olarak kullanıldı. LFIA test sisteminin oluşturulması için ticari bir antikor ise AuNP'ler ile konjuge edilerek test kitleri geliştirildi. PBS içinde hazırlanan hFABP çözeltisi ile performans denemesi yapıldı ve 100 ng/mL konsantrasyondaki hFABP tespit edilebildi.

IgA alt sınıfı antikor ürettiği belirlenen 2G7C3A35D12 klonunun üreme kinetikleri çıkarıldı. IgA sınıfı antikorların saflaştırılabileceği ticari sistemlere ulaşım konusunda yaşanan sıkıntılardan ötürü hücre kültürü üst sıvısı konsantre edildikten sonra tanı kitlerinin üretiminde kullanıldı. Nitroselüloz membrana immobilize edilen konsantre kültür sıvısı ile elde edilen tanı kitleri ile yapılan performans denemelerinde ise 1000 ng/mL konsantrasyondaki NT-proBNP tespiti gerçekleştirildi.

Çalışmada kullanılan IgM ve IgA sınıfı antikorlar tanı kitlerinin üretiminde kullanıldı. Anti-hFABP ve anti-NT-proBNP proteinlerine karşı antikor üreten ve karakterize edilmeyen klonların (4 adet anti-hFABP ve 5 adet anti-NT-proBNP antikoru üreten klonlar) da karakterize edilerek çalışma süresince elde edilmiş

hibridomaların profillerinin belirlenmesi çalışmanın devamı için önemli olacaktır. Klonların ürettiği mAb'ların IgG sınıfında olması, literatürde daha fazla tanımlanmış prosedürün kullanılarak karşılaştırmaya bağlı çalışmaların gerçekleştirilmesini sağlayacaktır. Borrebaeck tarafından yapılan çalışmalarda da görüldüğü üzere, *in vitro* immünizasyon işleminin sonucu olarak elde edilen hibridomaların büyük çoğunluğu IgM antikoru üretmektedir (Borrebaeck et al., 1986, 1987, 1989). IgG sınıfı antikorlara IgM sınıfından IgG'ye geçişi sağlayacak sitokinler olan IL-10 ve IFN- γ ortama eklenmesine rağmen kullanılan sitokin konsantrasyonlarının optimize edilerek daha az oran da IgM sınıfı antikoru üreten hibridomanın elde edilebileceği düşünülmektedir. 1F114F63PH8 klonu 1F114F63PG11 klonundan daha hızlı üretmekte ve daha fazla mAb üretmektedir. Biyoreaktörlerin dinamik şartlarında yapılan üretimlerde statik kültürlerle nazaran daha az konsantrasyonda mAb elde edilmiş olsa da işlem hacmi 500 kat (2 mL – 1 L) arttığından elde edilen mAb miktarı çok daha fazladır. Statik kültürlerdeki yarı kesikli işletim modu ile biyoreaktördeki kesikli beslemeli işletme modu kesikli sistemler ile karşılaştırıldığında daha fazla hücre sayısı, daha uzun süreli canlılık ve daha fazla mAb eldesini sağladı. Kullanılabilecek sürekli işletim modundaki kültürler ile elde edilecek mAb miktarı daha da arttırılabilir.

LFIA tanı kitlerinin elde edilmesi için üretilen mAb'lar NC membranlara immobilize edilirken ticari olarak elde edilen mAb'lar altın nanopartiküller ile işaretlenmiş ve konjugat membranı oluşturuldu. Üretilen tanı kitleri ticari olarak elde edilebilen tanı kitlerinden tespit limiti olarak daha düşük değerlere sahiptir. Çünkü kullanılan antikorların IgM ve IgA sınıfına ait olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) sistemlerinin kullanıldığı tespit platformlarının hassasiyetinin yüksek olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu sebeple ticari olarak temin edilen anti-hFABP ve anti-NT-proBNP monoklonal antikorları kullanılarak LSPR yüzeyler inşa edilmiştir. Bu yüzeyler öncelikle 96 gözlü mikropleytlerde hazırlandı ve hem PBS'te hem de insan serumunda hazırlanan protein solüsyonları bu yüzeylerde inkübe edildi. Alınan sonuçlara göre hFABP; PBS içinde 1 pg/mL, serum içinde ise 10 pg/mL, NT-proBNP ise PBS içinde 100 pg/mL, serumda ise 1 pg/mL konsantrasyonlarda tespit edildi.

Hazırlanan mikroakışkan LSPR çipleri ile yapılan denemelerde ise PBS içinde hazırlanan protein konsantrasyonlarının 10 pg/mL seviyelerinde dahi anlamlı sonuçlar verdiği gösterildi.

LSPR çipleri üzerinde elde edilen nanoplazmonik yüzeyler hassas kitlerin elde edilmesini sağladı. Bu çiplerden veri toplanması ise taşınabilir spektrofotometre sistemi ile (Şekil 3.11) gerçekleştirildi.

Hem LFIA hemde LSPR temelli mikroakışkan sistemler düşük maliyetli, kullanımı kolay, tek basamaklı, hızlı sonuç veren sistemler olarak tasarlandı. LFIA sistemlerindeki düşük hassasiyet LSPR temelli mikroakışkan sistem ile ortadan kaldırılırken, bu sistemler için kullanılması gereken spektrofotometre taşınabilir bir halde oluşturularak merkezden uzak yerleşim birimlerinde dahi kullanılabilir bir hale getirilmiştir.

LFIA tanı kitleri ile hFABP tespiti için ‘H-FABP’e karşı geliştirilen monoklonal antikorlar’ başlıklı, 20.03.2014 başvuru tarihli ve 2014/03258 başvuru kodu ile Türk Patent Ofisi’ne bir patent başvurusunda bulunuldu.

Çalışmanın bir sonraki aşaması, kalp krizinde ve yetmezliğinde alınan sonuçların anlamını arttıracak diğer biyobelirteçlerin sisteme dahil edilmesi ile kapsamlı test kitlerinin oluşturulması ve bu test kitlerinin bir spektrofotometre yerine bir eklenti ile spektrofotometreye dönüşebilen cep telefonu kameraları ile analiz edilebilen platformların geliştirilerek ‘tanı’ işlemini yer ve zaman ayırt etmeksizin her yerde yapılabilmesinin sağlanması olacaktır.

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca sadece bir danışman olarak değil, arkadaş ve aile büyüğü olarak ihtiyacım olduğunda bana bilgi ve aidiyet duygusunu tattıran Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN'a, her zaman yanımda olan Prof. Dr. Murat ELİBOL'a, katkılarından ötürü Yrd.Doç.Dr. Kağan KILINÇ'a ve bu çalışmaların yapılmasına imkan sağlayan Prof. Dr. Fazilet VARDAR SUKAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Biyomühendislik Bölümümüzde ve EgeReact ekibinde bana ve çalışmalarına katkı sağlayan tüm akademisyen, öğretim görevlisi, araştırma görevlisi büyüklerime ve arkadaşlarıma, ihtiyacım olduğunda desteklerini esirgemeyen Ar.Gör.Dr. Emek ASLAN'a, Ar.Gör.Dr. Işık ÇOBAN'a, Yrd.Doç.Dr. İsmal Hakkı AKGÜN'e, Hilal Betül AKKALE'ye, Ar.Gör. Şeyma ÇOĞAN TAŞDEMİR'e, yüksek lisans öğrencileri Merve ÇALIŞKAN'a, Ilgın KIMIZ'a ve Öznur ÖZASLAN'a, HPLC analizleri için Ar.Gör.Dr. Tuğba KESKİN GÜNDÖĞDU'ya ve Prof.Dr. Nuri AZBAR'a, SDS-PAGE ve protein miktar analizleri için Ar.Gör.Dr. Bilge Debeleç BÜTÜNER ve Prof.Dr. Kemal Sami KORMAZ'a, LSPR ve mikroakışkan sistemler konusunda bana kattıklarından ötürü Dr. Fatih İNCİ ve Doç. Dr. Utkan DEMİRCİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi ve tezimle bağlantılı çalışmalarını maddi olarak destekleyen Türklab Tıbbi Malzemeler San. Tic. A.Ş. ve SK Teknoloji Ar&Ge Ltd. Şti.'ye, T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı SANTEZ Birimi'ne, TÜBİTAK BİDEB 2214-A, TÜBİTAK BİDEB 2241-A Proje Koordinatörlükleri'ne, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Fonu'na, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Araştırma Fonu'na ve Yüksek Öğretim Kurumu Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı'na teşekkür ederim.

Destekleri ve hayatımdaki yeri paha biçilmez İmran ÖZER'e ve aileme teşekkür ederim.

Mehmet Özgün ÖZEN

İzmir – 2015

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abcam, " Sandwich ELISA", www.abcam.com, (03.05.2015).
- Abdulhalim, I., Zourob, M., Lakhtakia, A.**, 2008, Surface Plasmon Resonance for Biosensing: A Mini-Review, *Electromagnetics*, 28, 214-228pp.
- Adams, J., Abendschein, D.R., Jaffe, A.S.**, 1993, Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s?, *Circulation* 88, 750–763pp.
- Alhashemi, J.A.**, 2006, Diagnostic accuracy of a bedside qualitative immunochromatographic test for acute myocardial infarction, *American Journal of Emergency Medicine*, 24, 149-155pp.
- Alyassin, M.A., Moon, S., Keles, H.O., Manzur, F., Lin, R.L., Hæggstrom, E., Kuritzkes, D.R., Demirci, U.**, 2009, Rapid automated cell quantification on HIV microfluidic devices, *Journal Article Lab Chip*, 9, 3364-3369pp.
- Akcael-Aslankaraoğlu, E., Gümüşderelioğlu, M., Gürhan, S.İ.**, 2003, Hybridoma cells immobilized on nonwoven polyester fabric discs: Proliferation and monoclonal antibody production in stationary culture, *Journal of Biomaterials Applications*, 18, 137-141pp.
- Akshaya, S.A., Anesh, R.K., Brinda, R., Deepika, G., Gandharvin, K., Gayatri, D.K., Lakshmi, S., Nanditha, S., Narayani, N., Priyadharshini, R., Rohini, M.N., Rosa, R., Shruthi, S.R., Shruti, B., Sophi, R. and Ravi**, 2008, From in vivo Murine to in vitro Human Lymphocyte Immunizations - The changing face of Hybridoma Technology, *M. Advanced Biotech*, 26-34pp.
- Anderson, C.L. and Grey, H.M.**, 1973, Receptors for aggregated IgG on mouse thymocytes. Their presence on thymocytes, thymus derived, and bone marrow-derived lymphocytes, *Journal of Experimental Medicine*, 139, 1175pp.
- Apple, F.S. and Collinson, P.O.**, 2012, Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays, *Clinical Chemistry*, 58, 54–61pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bailey, J. E. and Ollis, D. F.**, 1986, Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd edn, McGraw-Hill, Jurong, Singapore, 600-610pp.
- Bilgehan, H.**, 2008, Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Barış Yayınları, Fakülteler Kitapevi, İzmir.
- Bischoff, R., Eisert, R.M., Schedel, I., Vienken, J. and Zimmermann, U.**, 1982, Human hybridoma cells produced by electrofusion, *FEBS Letters*, 147, 1, 64-67pp.
- Brolo, A. G.**, 2012, Plasmonics for future biosensors, *Nature Photonics*, 6, 709–713pp.
- Bodor, G.S., Porter, S., Landt, Y., Ladenson, J.H.**, 1992, Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction, *Clinical Chemistry*, 38, 2203–2214pp.
- Bonenberger, J. and Doumanas, M.**, 2006, Overcoming sensitivity limitations of lateral-flow immunoassays with a novel labeling technique, *IVD Technology*, May issue, 41–46pp.
- Borrebaeck, C.A.K.**, 1986, In vitro immunization for production of murine and human monoclonal antibodies: present status. *TIBTECH*, 147-153
- Borrebaeck, C.A.K., and Iler, S.A.**, 1986, *In vitro* immunization. Effect of growth and differentiation factors on antigen-specific B cell activation and production of monoclonal antibodies to autologous antigens and weak immunogens, *Journal of Immunology*, 136, 10, 3710-3715pp.
- Borrebaeck, C.A.K.**, 1987, Development of in vitro immunization in murine and human hybridoma technology, *Journal of Pharmacological and Biomedical Analysis*, 5, 8, 783-792pp.
- Borrebaeck, C.A.K.**, 1989, Strategy for producing human monoclonal antibodies using in vitro activated B cells, *Journal of Immunological Methods*, 123, 157-165pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Borrebaeck, C.A.K. and Hagen, I.**, 1989, Electromanuplation in Hybridoma Technology: A Laboratory Manual. Macmillan: Stockton Press.
- Boss, B.D.**, 1986, An improved in vitro immunization procedure for the production of monoclonal antibodies, *Methods Enzymology*, 121, 27-33pp.
- Buchner, S., Jungbauer, C., Birner, C., Debl, K., Riegger, G.A., Luchner, A.**, 2009, Comparison of the cardiac markers B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, *Biomarkers in Medicine*, 3, 465–481pp.
- Buchner, S., Debl, K., Barlage, S., Griese, D., Fredersorf, S., Jeron, A., Luchner, A.**, 2010, Dynamic changes in N-terminal pro-brain natriuretic peptide in acute coronary syndroms treated with percutaneous coronary intervention: A marker of ischemic burden, reperfusion and outcome, *Clinical Chemistry Laboratory Medicine*, 48, 875–881pp.
- Butler, J.L., Lane, H.C., Fauci, A.S.**, 1983, Delineation of optimum conditions for producing mouse-human heterohybridomas from human peripheral blood B cells of immunized subjects, *Journal of Immunology*, 130, 165-168pp.
- Carrel, A.**, 1912, On the permanent life of tissues outside the organism, *Journal of Experimental Medicine*, 15, 516–528pp.
- Chames, P., Regenmortel, M. V., Weiss, E. and Baty, D.**, 2009, Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future, *British Journal of Pharmacology*, 157, 220–233pp.
- Chan, C.P., Sum, K.W., Cheung, K.Y., Glatz, J.F., Sanderson, J.E., Hempel, A., Lehmann, M., Renneberg, I., Renneberg, R.**, 2003, Development of a quantitative lateral flow assay for rapid detection of fatty acid binding protein. *Journal of Immunological Methods*, 36, 1987–2004pp.
- Chan, C.P.Y., Wan, T.S.M., Watkins, K.L., Pelsers, M.M.A.L., Van der Voort, D., Tang, F.P.W.**, 2005, Rapid analysis of fatty acid binding proteins with immunosensors and immunotests for monitoring of tissue injury, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2566–2280pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chan D. and Ng, L.L.**, 2010, Biomarkers in acute myocardial infarction. *BMC Medicine*, 8, 34, 1-11pp.
- Chin, C. D., Linder, V., Sia, S. K.**, 2007, Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities, *Lab Chip*, 7, 1, 41-57pp.
- Chu, L. and Robinson, D.K.**, 2001, Current Opinion in Biotechnology, 12, 180–187pp
- Collins, W.P.**, 1986, *Alternative Immunoassays*, UK: John Wiley and Sons, 13-37pp.
- Cummins, B., Auckland, M.L., Cummins, P.**, 1987, Cardiac specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acutemyocardial infarction, *American Heart Journal*, 113, 1333–1344pp.
- Dreamstime, "Immunoglobulin Isotypes, www.dreamstime.com, 16.05.2015).
- D'Eril, G.M., Tagnochetti, T., Nauti, A., Klersy, C., Papalia, A., Vadacca, G.**, 2003, Biological variation of N-terminal pro-Brain Natriuretic Peptide in healthy individuals, *Clinical Chemistry*, 49, 1554–1555pp.
- Eberhard, K., Gruler, R., Eberhard, M. and Haberstroh, K.**, 2007, Developing rapid POC Systems, Part 1: Devices and applications for lateral flow immunodiagnosics, *IVD Technology*, July/August issue, 47pp.
- Edwards, K. A. and Baeumner, A. J.**, 2006, Analysis in Liposomes, *J. Talanta*, 68, 5, 1421-1431pp.
- Eggers, K.M., Oldgren, J., Nordenskjöld, A., Lindahl, B.**, 2004, Diagnostic value of serial measurement of cardiac markers in patients with chest pain: Limited value of adding myoglobin to troponin I for exclusion of myocardial infarction, *American Heart Journal*, 148, 574–581pp.
- Eggers, K.M., Venge, P., Lindahl, B.**, 2012, High-sensitive cardiac troponin T outperforms novel diagnostic biomarkers in patients with acute chest pain, *Clinica Chimica Acta*, 413, 1135–1140pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erlikh, A.D., Katrukha, A.G., Trifonov, I.R.,** 2005, Prognostic significance of heart fatty acid binding protein in patients with non-ST elevation acute coronary syndrome: Results of follow up for 12 months, *Kardiologia*, 45, 13–21pp.
- Eustis, S., El-Sayed, M. A.,** 2006, Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shape, *Chem. Soc. Rev.*, 35, 209-224pp.
- Fan, X. D., White, I. M., Shopova, S. I., Zhu, H. Y., Suter, J. D., Sun, Y. Z.,** 2008, Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review, *Analytical Chim. Acta*, 8, 620- 631.
- Faulk, W.P. and Taylor, G.M.,** 1971, An immunocolloid method for the electron micro- scope, *Immunochemistry*, 8, 1081-1088pp.
- Fazekas de St Groth, S., Scheidegger, D.,** 1980, Production of monoclonal antibodies; strategy and tactics, *Journal of Immunological Methods*, 35, 1-21pp.
- FiberCell Systems, "Hollow fiber cell culture bioreactor", www.fibercellsystems.com, (02.06.2015).
- Finter, N.B.,** Animal cell culture: the problems and rewards, Production of Biologicals from Animal Cells in Culture Edited by Spier, R.E., Griffiths, J.B., Meignier, B., Oxford: Butterworth- Heinemann, 1991, 3–12pp.
- Freshney, R.I.,** 2005, Culture of Animal Cells, 5th Edition., Wiley-Liss, U.S.A.
- Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J., Chesebro, J.,** 1992, The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes, *North England Journal of Medicine*, 326, 310–318pp.
- Gao, Y., Gan, Q., Xin, Z., Cheng, X., Bartoli, F. J.,** 2011, Plasmonic Mach–Zehnder Interferometer for Ultrasensitive On-Chip Biosensing, *ACS Nano*, 5, 9836-9845pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gaze, D.C. and Collinson, P.O.**, 2008, Multiple molecular forms of circulating cardiac troponin: analytical and clinical significance, *Annals of Clinical Biochemistry*, 45, 349–355pp.
- Gefter, M.L., Margulies, D.H., Scharff, M.D.**, 1977, A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells, *Somatic Cell Genetic*, 3, 2, 231–236pp.
- GE Healthcare Life Sciences, "Wave Bioreactors", www.gelifesciences.com (10.06. 2015).
- Giannitsis, E., Steen, H., Kurz, K., Ivandic, B., Simon, A.C., Futterer, S.**, 2008, Cardiac magnetic resonance imaging study for the quantification of infarct size comparing directly serial versus single time point measurement of cardiac troponin, *The Journal of American College of Cardiology*, 51, 307–314pp.
- Gilbert, P., Mundel, P., Minuth, W.W.**, 1990, Production of monoclonal antibodies against principal cells of the renal collecting duct by in vitro immunization with unsolubilized antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 38, 12, 1919-1925pp.
- Glatz, J.F.C., Kleine, A.H., van Nieuwenhoven, F.A.**, 1994, Fatty acid binding protein as a plasma marker for the estimation of myocardial infarct size in humans, *British Heart Journal*, 71, 135–140pp.
- Glaz, J.F. and van der Vusse, G.J.**, 1996, Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance, *Progress in Lipid Research*, 35, 243–282pp.
- Gorny, M.K., Gianakakos, V., Sharpe, S., Zolla-Pazner, S.**, 1989, Generation of human monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus, *Proceedings of National Academy of Science*, 86, 1624-1628pp.
- Gurkan, U.A., Tasoglu, S., Akkaynak, D., Avci, O., Unluisler, S., Canikyan, S., MacCallum, N., Demirci, U.**, 2012, Smart Interface Materials Integrated with Microfluidics for On-Demand Local Capture and Release of Cells, *Advanced Healthcare Materials*, 1, 5, 661-668pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Guo, Y., Oo, M.K.K., Reddy, K., Fan, X.,** 2011, Ultrasensitive optofluidic surface-enhanced Raman scattering detection with flow-through multihole capillaries, *ACS Nano*, 6, 381-392pp.
- Haes, A.J. and Duyne, R.P.,** 2004, Preliminary studies and potential applications of localized surface plasmon resonance spectroscopy in medical diagnostics, *Expert Rev Mol Diagn.*, 2004, 4, 4, 527-537pp.
- Han, M., Gao, X., Su, J.Z., Nie, S.,** 2001, Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding biomolecules, *Nature Biotechnology*, 19, 631–635pp.
- Harrison, R.G.,** 1907, Observations on the living developing nerve fiber, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 4, 140–143pp.
- Heeschen, C., Hamm, C.W., Mitrovic, V., Lantelme. N., White, H.D.,** N-terminal pro-Btype natriuretic peptide levels for dynamic risk stratification of patients with acute coronary syndromes, *Circulation*, 110, 3206–3212pp.
- Hesse, F., Ebel, M., Konisch, N., Sterlinski, R., Kessler, W. and Wagner, R.,** 2003, Comparison of a Production Process in a Membrane-Aerated Stirred Tank and up to 1000-L Airlift Bioreactors Using BHK-21 Cells and Chemically Defined Protein-Free Medium, *Biotechnol. Prog.* 19, 833–843pp.
- Ho, M.K. and Mass, C.,** 1992, Process of in vitro immunizations of human splenocytes against tumor associated antigens, *United States Patent*, Apr 21, 5, 106, 746.
- Ichikawa, A., Katakura, Y., Teruya, K., Hashizume, S. and Shirahata, S.,** 1999, In vitro immunization of human peripheral blood lymphocytes: establishment of B cell lines secreting IgM specific for cholera toxin B subunit from lymphocytes stimulated with IL-2 and IL-4. *Cytotechnology*, 31, 131–139.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Inci F., Tokel, O., Wang, S., Gurkan, U.A., Tasoglu, S., Kuritzkes, D.R., Demirci, U.**, 2013, Nanoplasmonic Quantitative Detection of Intact Viruses from Unprocessed Whole Blood, *ACS Nano.*, 7, 6, 4733-4745pp.
- Jenkins, N.**, 1999, Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Humana Press, New Jersey, ABD.
- Januzzi, J.L., Camargo, C.A., Anwarudin, S.**, 2005, The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study, *American Journal of Cardiology*, 95, 948–954pp.
- Jernberg, T., Johanson, P., Held, C., Svennblad, B., Lindbäck, J., Wallentin, L.**, 2011, Association between adoption of evidence-based treatment and survival for patients with ST-elevation myocardial infarction, *Journal of American Medical Association*, 305, 1677–1684pp.
- Jernberg, T., Stridesberg, M., Venge, P., Lindahl, B.**, 2002, N-terminal pro brain natriuretic peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST segment elevation, *Journal of American College of Cardiology*, 40, 437–445pp.
- Johnson, E., Miribel, L., Arnaud, P., Tsang, K.Y.**, 1986/1987, Purification of IgM monoclonal antibody from murine ascitic fluid by a two-step column chromatography procedure, *Immunology Letters*, 14, 159-165pp.
- Kalantarov, G.F., Rudchenko, S.A., Lobel, L., Trakhta, I.**, 2002, Development of a fusion partner cell line for efficient production of human monoclonal antibodies from peripheral blood lymphocytes, *Human Antibodies*, 11, 85-96pp.
- Karmen, A., Wroblewski, F., LaDue, J.S.**, 1954, Transaminase activity in human blood, *Journal of Clinical Investigations*, 34, 126–133pp.
- Katus, H.A., Remppis, A., Neumann, F.J., Scheffold, T., Diedrich, K.W., Vinar, G.**, 1991, The diagnostic efficiency of troponin T measurement in acute myocardial infarction, *Circulation*, 83, 901–912pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Katus, H.A., Looser, S., Hallermayer, K., Remppis, A., Scheffold, T., Borgya, A.,** 1992, Development and in vitro characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T, *Clinical Chemistry*, 38, 386–393pp.
- Katz, L.C., Burkhalter, A., Dreyer, W.J.,** 1984, Flourescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for in vivo an in vitro studies of visual cortex, *Nature Search Journal*, 310, 498-500pp.
- Katz, L.C., Larouici, D.M.,** 1990, Green Flourescent Latex microspheres: A new retrograde tracer, *Neuroscience Journal*, 34, 2, 511-520pp.
- Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., Schatz, G. C.,** 2003, The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, 3, 668–677pp.
- Key, G., Schreiber, A., Feldbrugge, R., McNeil, C.J., Jorgensen, P., Pelsers, M.M.A.L.,** 1999, Multicenter evaluation of an amperometric immunosensor for plasma fatty acidbinding protein: an early marker for acute myocardial infarction. *Clinical Biochemistry*, 32, 229-231pp.
- Kilic, T., Oner, G., Ural, E., Yumuk, Z., Sahin, T., Bildirici, U.,** 2009, Comparison of the long-term prognostic value of Cystatin C to other indicators of renal function, markers of inflammation and systolic dysfunction among patients with acute coronary syndrome, *Atherosclerosis*, 207, 552–558pp.
- Kioukia, N., Nienow, A. W., Emery, A. N., Al Rubeai, M.,** 1992, The impact of fluid dynamics on the biological performance of free suspension animal cell culture: further studies, *Trans. Inst. Chem. Eng.* 70C, 143–148pp.
- Köhler, G. and Milstein, C.,** 1975, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256, 495 – 497pp.
- Köhler, G. and Milstein, C.,** 1976, Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, *Europian Journal of Immunology*, 6, 7, 511–519pp.
- Kuhner, " Orbital Shaken Bioreactor", www.kuhner.com (12.06.2015).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kwan, G., Isakson, S.R., Beede, J., Clopton, P., Maisel, A.S., Fitzgerald, R.L.,** 2007, Short term serial sampling of natriuretic peptides in patients presenting with chest pain, *Journal of American College of Cardiology*, 2049, 1186–1192pp.
- Laterza, O.F., Price, C.P., Scott, M.G.,** 2002, Cystatin C: An improved estimator of glomerular filtration rate, *Clinical Chemistry*, 48, 699–707pp.
- Liddell, J.E. and Cryer, A.,** 1993, A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley and Sons, New York.
- Lin, S., Yokoyama, H., Rac, V.E., Brooks, S.C.,** 2012, Novel biomarkers in diagnosing cardiac ischemia in the emergency department: A systematic review, *Resuscitation*, 83, 684–691pp.
- Lindahl, B.,** 2013, Acute coronary syndrome – the present and future role of biomarkers, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51, 9, 1699–1706pp.
- Litman, D.J., Hanlon, T.M., Ullman, E.F.,** 1980, Enzyme channeling immunoassay: a new homogeneous enzyme immunoassay technique, *Analytical Biochemistry*, 106, 46, 223–229pp.
- Liu, H.F., Ma, J., Winter, C., Bayer, R.,** 2010, Recovery and purification process development for monoclonal antibody production, *mAbs*, 2, 5, 480–499pp.
- Liu, L.C.,** 2001, Hong Development of a shaking bioreactor system for animal cell cultures, *Biochemical Engineering Journal*, 7, 121–125pp.
- Lott, J.A., Stang, J.M.,** 1980, Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis and differential diagnosis of myocardial ischemia and necrosis, *Clinical Chemistry*, 26, 1241–1250pp.
- Mayer, K.M. and Hafner, J.H.,** 2011, Localized Surface Plasmon Resonance Sensors, *Chem. Rev.*, 111, 3828–3836pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McCann, C.J., Glover, B.M. Menown, I.B., Moore, M.J., McEneny, J., Owens, C.G.,** 2008, Novel biomarkers in early diagnosis of acute myocardial infarction compared with cardiac troponin, *The European Heart Journal*, 29, 2843–2850pp.
- McCullough, P.A., Nowak, R.M., McCord, J.,** 2002, B-type natriuretic peptide and clinical judgement in emergency diagnosis of heart failure: Analysis from Breathing Not Properly (BNP) multinational study, *Circulation*, 106, 416–422pp.
- Monat, C., Domachuk, P., Eggleton, B. J.,** 2007, Integrated optofluidics: A new river of light, *Nature Photonics*, 1, 106-119pp.
- Morrow, D.A., Cannon, C.P., Jesse, R.L., Newby, K., Ravkilde, J., Storrow, A.B.,** 2007, National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines. Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes, *Circulation*, 115, 356–375pp.
- Mousavi, N., Czarnecki, A., Kumar, K., Fallah-Rad, N., Lytwyn, M., Han, S-Y.,** 2009, Relation of biomarkers and cardiac magnetic resonance imaging after marathon running, *American Journal Cardiology*, 103, 1467–1472pp.
- Muller, N., Girard, P., Hacker, D.L., Jordan, M., Wurm, F.M.,** 2005, Orbital shaker technology for the cultivation of mammalian cells in suspension, *Biotechnol. Bioeng.*, 89, 400–406pp.
- Myersa, F.B. and Lee, L.P.,** 2008, Innovations in optical microfluidic technologies for point-of-care diagnostics, *Lab Chip*, 8, 2015-2031pp.
- Nalbantsoy, A., Karaboz, I. and Deliloglu-Gurhan, I.,** 2010, Production of Monoclonal Antibody Against Salmonella H: g,m Flagellar Antigen and Potential Diagnostic Application, *Hybridoma*, 29, 5, 419-423pp.
- Nelson, P.N., Reynolds G.M., Waldron, E.E., Ward, E., Giannopoulos, K., Murray, P.G.,** 2000, Demystified Monoclonal antibodies, *Clinical Pathology: Molecular Pathology*, 53, 111-117pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nevens, J.R., Mallia, A.K., Wendt, M.W., Smith, P.K.,** 1992, Affinity chromatographic purification of immunoglobulin M antibodies utilizing immobilized mannan binding protein. *Journal of Chromatography*, 591, 247-256pp.
- Niedbala, R., Feindt, H., Kardos, K., Vail, T., Burton, J., Bielska, B., Li, S., Milunic, D., Bourdelle, P., Vallejo, R.,** 2001, Detection of analytes by immunoassay using up- converting phosphor technology, *Analytical Biochemistry*, 293, 22–30pp.
- Nilson, H.K.B., Lögdberg, L., Kastern, W., Björck, L., Akerström, B.,** 1993, Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain, *Journal of Immunological Methods*, 164, 33-40pp.
- Nizeki, T., Takeishi, Y., Arimoto, T., Nozak, N., Hirono, O., Watanabe, T.,** 2008, Persistently increased serum concentration of heart-type fatty acid-binding protein predicts adverse clinical outcomes in patients with chronic heart failure, *Circulation Journal*, 72, 109–114pp.
- Norgaard, B.L., Terkelsen, C.J., Riiskjaer, M., Holmvang, L., Grip, L., Heickendorff, L.,** 2008, Risk prediction in acute coronary syndrome from serial in-hospital measurements of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, *Acute Card Care*, 10, 159–166pp.
- Oh, S. K., Nienow, A. W., Al Rubeai, M., Emery, A. N.,** 1992, Further studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated reactor with and without continuous sparging, *Journal of Biotechnology*, 22, 245–270pp.
- Ohnishi, K., Chiba, J., Goto, Y., Tokunaga, T.,** 1987, Improvement in the basic technology of electrofusion for generation of antibody producing hybridomas, *Journal of Immunological Methods*, 100, 181-189pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ohkaru, Y., Asayama, K., Ishii, H., Nishimura, S., Sunahara, N., Tanaka, T.,** 1995, Development of a sandwich enzyme linked immunosorbent assay for the determination of human heart type fatty acid protein in plasma and urine using two different monoclonal antibodies specific for human heart fatty acid binding protein, *Journal of Immunological Methods*, 178, 99–111pp.
- Okamoto, F., Sohmiya, K., Ohkaru, Y., Kawamura, K.,** 2000, Human heart-type cytoplasmic fatty acid binding protein (H-FABP) for the diagnosis of acute myocardial infarction. Clinical evaluation of H-FABP in comparison with myoglobin and creatine kinase isoenzyme MB. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38, 231–238pp.
- Ozturk, S.S., Hu, W.S.,** 2006, Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, CRC Press Taylor & Francis Group.
- Pelsers, M.M.A.L., Hermens, W.T., Glatz, J.F.C.,** 2005, Fatty acid binding proteins as plasma markers of tissue injury, *Clinica Chimica Acta*, 352, 15–35pp.
- Peters, J.H. and Baumgarten H.,** 1992, Monoclonal Antibodies, *Springer Laboratory*, 978-3-642-74534-8.
- Pontecorvo, G.,** 1975, Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment, *Somatic Cell Genetic*, 1, 397-400pp.
- Ramasamy, I.,** 2011, Biochemical markers in acute coronary syndrome, *Clinica Chimica Acta*, 412, 1279–1296pp.
- Reading, C.L.,** 1986, In vitro immunization for the production of antigen-specific lymphocyte hybridomas, *Methods Enzymology*, 121, 19-27.
- Rogers, W.J., Frederick, P.D., Stoeck, E., Canto, J.G., Ornato, J.P., Gibson, C.M.,** 2008, Trends in presenting characteristics and hospital mortality among patients with ST elevation and non-ST elevation myocardial infarction in the National Registry of Myocardial Infarction from 1990 to 2006, *American Heart Journal*, 156, 1026–1034pp.
- Rongen, H.A.H., Bult, A., Bennekou, W.P.,** 1997, Liposomes and Immunoassay, *J. Immunological Methods*, 204, 105-133pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rosenthal, S.J.**, 2001, Bar coding biomolecules with fluorescent nanocrystals, *Nature Biotechnology*, 19, 621–622pp.
- Sacks, D.B.**, 1999, Acute coronary syndrome: troponin I and T, *Vascular Medicine*, 4, 253–256pp.
- Saenger, A.K., Jaffe, A.S.**, 2008, Requiem for a heavyweight. The demise of creatine kinase MB, *Circulation*, 118, 2200–2220pp.
- Sartorius, "CultiBag[®] ORB", www.sartorius.com (12.06.2015).
- Scheirer, W.**, 1988, Animal cell immobilization. In: Durant, G., Bobichon, L., Florent, J., Eds. 8th International Biotechnology Symposium. Paris: Avignon, 216–227pp.
- Schneider, M., El Alaoui, M., von Stockar, U. and Marison, I.W.**, 1997, Batch cultures of a hybridoma cell line performed with in situ ammonia removal. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 268-276.
- Schmidt, M., Jacobsen, J., Lash, T., Bøtker, H., Sørensen, H.**, 2012, 25 year trends in first time hospitalisation for acute myocardial infarction, subsequent short and long term mortality, and the prognostic impact of sex and comorbidity: a Danish nationwide cohort study, *British Medical Journal*, 344-356pp.
- Scirica, B.**, 2010, Acute coronary syndrome: emerging tools for diagnosis and risk assessment, *Journal of American College of Cardiology*, 55, 1403–1415pp.
- Shibuya, N., Berry, J.E., Goldstein, I.J.**, 1988, One-Step Purification of Murine IgM and Human α -2-Macroglobulin by Affinity Chromatography on Immobilized Snowdrop Bulb Lectin, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267, 2, 676-680pp.
- Sinclair, A.**, 2001, Biomanufacturing capacity: Current and future requirements, *Journal of Commercial Biotechnology*, 8, 1, 43–50pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Souvannavong, V., Brown, S., Adam, A.,** 1990, Muramyl Dipeptide (MDP) Synergizes with Interleukin 2 and Interleukin 4 to Stimulate, Respectively, the Differentiation and Proliferation of B Cells. *Cellular Immunology* 126,106-116.
- Spier, R.E. and Griffiths, J.B.,** 1990, Animal Cell Biotechnology. Vol. 4. New York: Academic Press, 149–166pp.
- Spier, R.E. and Kadouri, A.,** 1997, The evolution of processes for the commercial exploitation of anchorage-dependent animal cells, *Enzyme Microbial Technology*, 21, 2–8pp.
- Srisawasdi, P., Vanavanan, S., Charoenpanichkit, C., Kroll, M.H.,** 2010, The effect of renal function on BNP, NT-proBNP and their ratio, *American Journal of Clinical Pathology*, 133, 14–23pp.
- Stoll, T.S., Chappaz, A., von Stockar, U. and Marison, I.W.,** 1997, Effects of culture conditions on the production and quality of monoclonal IgA. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 203-211.
- Stern, M. and Herrmann, R.,** 2005, Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise, *Critical Reviews of Oncological Hematology*, 54, 11-29pp.
- Stettler, M., Zhang, X., Hacker, D.L., De Jesus, M., Wurm, F.M.,** 2007, Novel orbital shake bioreactors for transient production of CHO derived IgGs, *Biotechnol Prog.*, 23, 6, 1340-1346pp.
- Qavi, A. J., Washburn, A. L., Byeon, J. Y., Bailey, R. C.,** 2009, Label-Free Technologies for Quantitative Multiparameter Biological Analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 121-132pp.
- Takazawa, Y., Tokashiki, M., Murakami, H., Yamada, K. and Omura, H.,** 1988, High-Density Culture of Mouse-Human Hybridoma in Serum-Free Defined Medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 168-172.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Simoons, M.L., Chaitman, B.R., White, H.D.**, 2012, Third universal definition of myocardial infarction, *European Heart Journal*, 33, 2551–2567pp.
- Timoteo, A.T., Toste, A., Ramos, R., Miranda, F., Ferreira, M.L., Oliveira, J.A.**, 2009, Does admission NT-proBNP increase the prognostic accuracy of GRACE risk score in the prediction of short term mortality after acute coronary syndromes, *Acute Cardiology Care*, 11, 236–242pp.
- Tiselius, A., and Kabat, E.A.**, 1939, An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations, *Journal of Experimental Medicine*, 69,1, 119–131pp.
- Tissot, S., Farhat, M., Hacker, D., Anderlei, T., Kühner, M., Comninellis, C., Wurm F.M.**, 2010, Determination of a scale-up factor from mixing time studies in orbitally shaken bioreactors, *Biochemical Engineering Journal*, 52, 2-3, 181-186pp.
- Tokel, O., Inci, F., Demirci, U.**, 2014, Advances in Plasmonic Technologies for Point of Care Applications, *Chem. Rev.*, 2014, 114, 5728–5752pp.
- Vamos, E.P., Millett, C., Parsons, C., Aylin, P., Majeed, A., Bottle, A.**, 2009, Nationwide study on trends in hospital admissions for major cardiovascular events and procedures among people with and without diabetes in England, 2004–2009, *Diabetes Care*, 35, 265–272pp.
- Van Kimmenade, R.R.J., Januzzi, J.L., Bakker, J.A., Houben, A.J., Rennenberg, R., Kroon, A.A.**, 2009, Renal clearance of B-type natriuretic peptide and amino terminal pro-Btype natriuretic peptide, *Journal of American College of Cardiology*, 53, 884–890pp.
- Venge, P., Johnston, N., Lindahl, B., James, S.**, 2009, Normal plasma levels of cardiac troponin I measured by the high-sensitivity cardiac troponin I access prototype assay and the impact on the diagnosis of myocardial ischemia, *Journal of American College of Cardiology*, 54, 1165–1172pp.
- Vienken, J. and Zimmermann, U.**, 1985, An improved electrofusion technique for production of mouse hybridoma cells, *FEBS*, 182, 2, 278-280pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Viswanathan, K., Kilcullen, N., Morrell, C., Thistlewaite, S.J., Sivanathan, M.U., Hassan, T.B.,** 2010, Heart type acid binding protein predicts long-term mortality and reinfarction in consecutive patients with suspected acute coronary syndrome who are troponin negative, *Journal of American College of Cardiology*, 55, 2590–2598pp.
- Volkman, D.J., Lane, H.C., Fauci, A.S.,** 1981, Antigen induced in vitro antibody production in humans: A model for B cell activation and immuno regulation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 4, 2528-2531pp.
- Wang, S., Esfahani, M., Gurkan, U.A., Inci, F., Kuritzkes, D.R., Demirci, U.,** 2012, Efficient on-chip isolation of HIV subtypes, *Lab Chip.*, 12, 8, 1508–1515pp.
- Wang, S., Sarenac, D., Chen, M. H., Huang, S.-H., Giguel, F. F., Kuritzkes, D. R., Demirci, U.,** 2012, Simple filter microchip for rapid separation of plasma and viruses from whole blood, *Int. J. Nanomed.*, 7, 5019- 5028pp.
- Warnock, J.N., and Al-Rubeai, M.,** 2006, Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 45, 1–12pp.
- Wasserman, R.L., Budens, R., Thaxton, S.E.,** 1986, In vitro stimulation prior to fusion generates antigen-binding human - human hybridomas, *Journal of Immunological Methods*, 93, 275-283pp.
- Whitesides, G. M.,** 2006, Overview The origins and the future of microfluidics, *Nature*, 442, 368-374pp.
- Weber, M., Bazzino, O., Estrada, J.L.N., Fuselli, J.J., Botto, F., de Arenaza D.P.,** 2008, N-terminal B-type natriuretic peptide assessment provides incremental prognostic information in patients with acute coronary syndromes and normal troponin T values on admission, *Journal of American College Cardiology*, 51, 1188–1195pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Werner, S., Eibl, R., Lettenbauer, C., Röhl, M., Eibl, D., De Jesus, M., Zhang, X., Stettler, M., Tissot, S., Bürki, C., Broccard, G., Kühner, M., Tanner, R., Baldi, L., Hacker, D., Wurm, F.M.,** 2010, Innovative, non-stirred bioreactors in scales from milliliters up to 1000 liters for suspension cultures of cells using disposable bags and containers, *Chimia (Aarau)*, 64, 11, 819-823pp.
- Wild, D.,** 2013, The Immunoassay Handbook: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques, 4th edition, Elsevier, Amsterdam, 89-107pp.
- Wilhelmsen, L., Welin, L., Svärdsudd, K., Wedel, H., Eriksson, H., Hansson, P.O.,** 2008, Secular changes in cardiovascular risk factors and attack rate of myocardial infarction among men aged 50 in Gothenburg, Sweden. Accurate prediction using risk models, *Journal of Internal Medicine*, 263, 636–643pp.
- Willems, K.A. and Van Duyne, R.P.,** 2007, Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing, *Annu Rev Phys Chem*, 58, 267-297pp.
- Wilson, S.R., Sabatine, M.S., Braunwald, E., Sloan, S., Murphy, S.A., Morrow, D.A.,** 2009, Detection of myocardial injury in patients with unstable angina using a novel nanoparticle cardiac troponin I assay: observations from the PROTECT-TIMI 30 Trial, *American Heart Journal*, 158, 386–391pp.
- Wodzig, K.W., Pelsers, M.M., van der Vusse, G.J., Roos, W., Glatz, J.F.,** 1997, One step enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma fatty acid binding protein, *Annals of Clinical Biochemistry*, 34, 263–268pp.
- Wong, R. and Tse, H.,** 2009, Lateral Flow Immunoassay, Humana Press, New York, 38-44pp.
- Xie, L. and Wang, D.I.C.,** 1996, High cell density and high monoclonal antibody production through medium design and rational control in bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 51, 725–729.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xie, L.**, 1997, Stoichiometric Medium Design and Nutritional Control in Fed-Batch Cultivation of Animal Cells. Ph.D. thesis, MIT, Cambridge, MA, USA.
- Yager, P., Edwards, T., Fu, E., Helton, K., Nelson, K., Tam, M. R., Weigl, M.**, 2006, Microfluidic diagnostic technologies for global public health, *Nature*, 442, 412-426pp.
- Yamashita, M., Katakura¹, Y., Shim, S.Y., Matsumoto, S., Tamura, T., Morihara, K., Aiba, Y., Teruya, K., Tsuchiya, T., & Shirahata, S.**, 2002, Different individual immune responses elicited by in vitro immunization. *Cytotechnology*, 40, 161–165.
- Yanik, A. A., Huang, M., Kamohara, O., Artar, A., Geisbert, T. W., Connor, J. H., Altug, H.**, 2010, An Optofluidic Nanoplasmonic Biosensor for Direct Detection of Live Viruses from Biological Media, *Nano Letters*, 10, 4962-4969 pp.
- Yanyan, W., Meng, W., Jingbo, L., Wei Z., Quangfu, X., Shuiming, G.**, 2010, Development of a rapid quantitative detection of NT-proBNP based on superparamagnetic nanoparticles as labels in the lateral flow immunoassay *Heart*, 96, A210-A211.
- Zhang, L., Shen, H. and Zhang, Y.**, 2004, Fed-batch culture of hybridoma cells in serum-free medium using an optimized feeding strategy. *J Chem Technol Biotechnol*, 79, 171–181.
- Zhang, X., Stettler, M., Reif, O., Kocourek, A., De Jesus, M., Hacker, D.L., Wurm, F.M.**, 2008, Shaken helical track bioreactors: providing oxygen to high-density cultures of mammalian cells at volumes up to 1000 L by surface aeration with air, *New Biotechnol.* 25, 68–75pp.
- Zhang, X., Bürki, C., Stettler, M., De Sanctis, D., Perrone, D., Discacciati, M., Parolini, N., DeJesus, M., Hacker, D., Quarteroni, A., Wurm, F.M.**, 2009, Efficient oxygen transfer by surface aeration in shaken cylindrical containers for mammalian cell cultivation at volumetric scales up to 1000 L, *Biochemical Engineering Journal*, 45, 1, 41-47pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhu, M., Rabinowitz, J.L., Green, N.S., Kobrin, B.J. and Scharff, M.D.**, 1995, A well-differentiated B-cell line is permissive for somatic mutation of a transfected immunoglobulin heavy-chain gene. *PNAS*, 92, 2810-2814.
- Zijlmans, H.J.M.A.A., Bonnet, J., Burton, J., Kardos, K., Vail, T., Niedbala, R.S., Tanke, H.J.**, 1999, Detection of cell and tissue surface antigens using up-converting phosphors: a new reporter technology, *Analytical Biochemistry*, 267, 30–36pp.
- Zimmerman, U.**, 1982, Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena, *Biochemical Biophysics Acta*, 694, 227-277pp.
- Zimmermann, U.**, 1986, Electrical breakdown, electropermeabilisation and electrofusion, *Reviews of Physiological Biochemical Pharmacology*, 105, 175pp.
- Zola, H.**, 2000, Monoclonal Antibodies: A manual of Techniques. CRC Pres, Inc, Florida.
- Zuk, F.F., Ginsberg, V.K., Houts, T., Rabbie, J., Merrick, H., Ullman, E., Fischer, M.M., Sizto, C.C., Stixo, S.N., Litman, D.J.**, 1985, Enzyme immunochromatography a quantitative immunoassay requiring no instrumentation, *Clinical Chemistry*, 31, 7, 1144–1150pp.

ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Ozgun OZEN 1984 yılında Dursunbeyli, BALIKESİR’de doğmuştur. Orta öğrenimini Balıkesir Sırrı Yırcalı Anadolu Lisesi’nde tamamlamıştır. Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü’nden 2006 yılında mezun olmuştur. Yüksek lisansını Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda “*Doku Mühendisliği ile Yapay Damar Dokusu Üretimi*” konulu tezi ile 2009 yılında tamamlamıştır. 2009 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda doktora programına başlamıştır. 2008-2010 yılları arasında Türklab Tıbbi Malzemeler Sanayii Ticaret AŞ’de Ar-Ge mühendisi olarak çalışmıştır. 2011 yılında Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı’nı kazanarak Gümüşhane Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü’ne Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır. 2012 yılında misafir araştırmacı olarak Wageningen Üniversitesi, Biyoproses Mühendisliği Bölümü’nde (Hollanda) üç ay süre ile, 2015 yılında Stanford Üniversitesi Canary Kanseri Erken Tanı Merkezi’nde (ABD) 8 ay süre ile araştırma çalışmalarına katılmıştır.