



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü



**FARMASÖTİK KULLANIM AMAÇLI  
MEMELİ HÜCRE PROSESLERİNDE  
DOĞAL ÜRÜN KULLANIM POTANSİYELİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Elifsu POLATLI

**Yüksek Lisans Tezi**

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir  
2020



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü

**FARMASÖTİK KULLANIM AMAÇLI  
MEMELİ HÜCRE PROSESLERİNDE  
DOĞAL ÜRÜN KULLANIM POTANSİYELİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Elifsu POLATLI

Danışman: Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir  
2020



Elifsu POLATLI tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Farmasötik Kullanım Amaçlı Memeli Hücre Proseslerinde Doğal Ürün Kullanım Potansiyelinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 21 Ocak tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:****İmza****Jüri Başkanı : Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY .....****Raportör Üye: Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR .....****Üye : Doç. Dr. Ayten NALBANT .....**



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Farmasötik Kullanım Amaçlı Memeli Hücre Proseslerinde Doğal Ürün Kullanım Potansiyelinin Araştırılması” 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.

.... / .... / 20..

İmzası

Elifsu POLATLI





**ÖZET**  
**FARMASÖTİK KULLANIM AMAÇLI MEMELİ HÜCRE**  
**PROSESLERİNDE DOĞAL ÜRÜN KULLANIM**  
**POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

POLATLI, Elifsu

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY

Ocak 2020, 94 sayfa

Serum hayvan hücre kültüründe büyüme ortamının başlıca bileşenlerindedir. Fakat endüstriyel anlamda hayvan hücrelerinin kullanıldığı biyofarmasötik üretiminde üretim ortamında serumun kullanılmasından kaçınılmaktadır. Bunun sebebi ise ayırma saflaştırma basamaklarında serum kullanımının ek işlemler gerektirmesi ve üretim maliyetini arttırmasıdır. Bu tez çalışmasında doğal molekül eklenen serumsuz ortamdaki (SFM) hücrelerin büyüme kinetiklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla SFM'e adapte edilen Her2/Neu proteini eksprese eden 4T1.2-Her2/Neu hücreleri ve SFM'e adapte TNF- $\alpha$ 'ya spesifik monoklonal antikor (Mab) salgılayan recCHO hücreleri ile çalışılmıştır. Çalışma kapsamında SFM'e proliferasyonu indükleyici ve yara iyileştirici özellikleri bulunan farklı doğal moleküllerin (oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, gallik asit, kateşin) eklenerek ile büyüme kinetiklerine etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla piyasada yaygın olarak kullanılan Serox ve Excell SFM büyüme ortamları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan moleküllerin farklı konsantrasyonlarının 4T1.2-Her2/Neu hücreleri üzerine proliferatif etkileri MTT hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. Bu test sonucunda büyüme ortamına eklenecek oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin gallik asit ve kateşinin moleküllerinin konsantrasyonları sırası ile 0.195  $\mu\text{g/ml}$ , 0.391  $\mu\text{g/ml}$ , 0.391  $\mu\text{g/ml}$ , 0.098  $\mu\text{g/ml}$ , 0.098  $\mu\text{g/ml}$ , 0.098 $\mu\text{g/ml}$ , 0.098 $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir. Daha sonra %10 serum içeren ortamda kültüre alınan 4T1.2-Her2/Neu hücreleri SFM'e adapte edilmiştir. Moleküllerin MTT testi ile belirlenen konsantrasyonları büyüme ortamlarına eklenerek  $1 \times 10^5$  hücre/ml başlangıç hücre sayısındaki hücrelerde 24 saatte bir tripan mavisi ile canlı-ölü hücre sayımı yapılarak petrilere büyüme kinetiği belirlenmiştir. Elde

edilen veriler ışığında potansiyeli en yüksek molekül oleuropein olarak belirlenmiştir. Bu molekülü içeren ve içermeyen Excell ortamında 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin 2 L'lik spinner flask içerisinde 1L çalışma hacminde 15 günlük kesikli kültürdeki büyüme kinetiği belirlenmiştir. Oleuropeinin aynı konsantrasyonu Serox ortamına eklenerek recCHO hücrelerinin 1L'lik çalışma hacminde spinner flaskta kesikli kültürü kurulduktan sonra büyüme kinetikleri belirlenerek sonuçlar 4T1.2-Her2/Neu hücreleri ile karşılaştırılmıştır. Spinner flask içerisinde 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin oleuropein içermeyen ve içeren Excell ortamı içerisindeki ikilenme süreleri sırasıyla 20.1 saat ve 28.7 saat olarak bulunurken recCHO hücrelerinin oleuropein içermeyen ve içeren Serox SFM ortamı içerisindeki ikilenme süreleri sırası ile 23.2 saat ve 16.5 saat olarak belirlenmiştir.

Yapılan bu çalışmada 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin SFM'de düşük canlılık ve hücre klampları oluşturma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. Bu şartlarda bahsedilen bu hücrelerin ölçek büyütme uygun olmadıkları belirlenmiştir. recCHO hücreleri için 0.195 µg/ml'lik oleuropein konsantrasyonunun oleuropein içermeyen Serox SFM ortamına göre daha yüksek hücre konsantrasyonu ve büyüme hızı sağladığı sonucuna varılmıştır. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin yüzeylerinde eksprese olan Her2 proteinin bu moleküllerin eklenmesi ile stabil şekilde ekspresyonun devam ettiği flow sitometri ile belirlenmiştir. recCHO hücrelerinin ise oleuropein içeren Serox SFM ortamında daha hızlı büyümelerine karşın daha düşük TNF-α spesifik Mab üretimleri yapılan ELISA ile belirlenmiştir.

Sonuçta farklı konsantrasyonda oleuropein ve diğer aday moleküllerle ileri çalışmaların yapılması bu moleküllerin potansiyel olarak SFM formülasyonlarında kullanılması için gelecek vaad etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** 4T1.2-Her2/Neu, Her2, recCHO, TNF-α, SFM

**ABSTRACT**  
**INVESTIGATION OF POTENTIAL NATURAL PRODUCTS**  
**USE IN MAMMALIAN CELL PROCESSES FOR**  
**PHARMACEUTICAL APPLICATION**

POLATLI, Elifsu

MSc in Bioeng.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY

January 2020, 94 pages

Serum is one of the main components of the growth medium in animal cell culture. However, in biopharmaceutical production where animal cells are used in the industrial scale, the use of serum is avoided in the production environment. The reason for this is that the use of serum in the separation purification steps requires additional processes and increases the production cost. In this thesis, it is aimed to investigate the growth kinetics of cells in serum-free medium (SFM) with added natural molecule. For this purpose, 4T1.2-Her2/Neu cells expressing Her2/Neu protein were adapted to SFM and TNF- $\alpha$  specific monoclonal antibody (Mab) secreting recCHO cells were studied. Within the scope of the study, the effects of different natural molecules (oleuropein, resveratrol, tangeretine, neohesperidine, nobiletine, gallic acid, catechin) that have proliferation-inducing and wound-healing properties were determined in growth kinetics. For this purpose, Serox and Excell SFM growth environments, which are widely used in the market, were used. Proliferative effects of different concentrations of molecules used in the study on 4T1.2-Her2/Neu cells were determined by MTT cell viability test. As a result of this test, the concentrations of oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin gallic acid and catechin 0.195  $\mu\text{g/ml}$ , 0.391  $\mu\text{g/ml}$ , 0.391  $\mu\text{g/ml}$ , 0.098  $\mu\text{g/ml}$ , 0.098  $\mu\text{g/ml}$ , 0.098  $\mu\text{g/ml}$ , 0.098 $\mu\text{g/ml}$  respectively. Then, 4T1.2-Her2/Neu cells, which were cultured in an environment containing 10% serum, were adapted to SFM. Growth kinetics in petri dishes were determined by counting live-dead cells with trypan blue every 24 hours in  $1 \times 10^5$  cells/ml starting cell count by adding concentrations of molecules determined by MTT test to growth media. In the light of the obtained data, the molecule with the highest potential is determined as oleuropein. The growth kinetics of 4T1.2-

Her2/Neu cells in a 2 L spinner flask with a working volume of 15 days in a batch culture was determined in Excell medium with and without this molecule. After adding the same concentration of oleuropein to the Serox medium, the growth kinetics of the recCHO cells in a 1L working volume were established in the spinner flask and the results were compared with 4T1.2-Her2/Neu cells. In Spinner flask, 4T1.2-Her2/Neu cells doubling time were found 20.1 hours and 28.7 hours respectively in the Excell medium and Excell+Oleuropein, whereas recCHO cells had 23.1 hours and 16.5 hours in Serox SFM medium and Serox+Oleuropein respectively.

In this study, it was determined that 4T1.2-Her2/Neu cells tend to form low viability and cell clumps in SFM. It has been determined that these cells mentioned in these conditions are not suitable for scaling up. It was concluded that 0.195 µg/ml oleuropein concentration for recCHO cells provides higher cell concentration and growth rate than Serox SFM medium without oleuropein. Her2 protein, expressed on the surfaces of 4T1.2-Her2/Neu cells, was determined by flow cytometry, in which the expression continued stably by the addition of these molecules. Although recCHO cells grow faster in Serox SFM medium containing oleuropein, lower TNF- $\alpha$  specific Mab productions were determined by ELISA.

As a result, further studies with different concentrations of oleuropein and other candidate molecules are promising for the potential use of these molecules in SFM formulations.

**Keywords:** 4T1.2-Her2 / Neu, Her2, recCHO, TNF- $\alpha$ , serum

## ÖNSÖZ

Hücre kültürü ortamlarında kullanılan serumun üretimde alt akımda ek işlemler gerektirmesi ve üretim maliyetini arttırmasından yola çıkarak bu tez çalışmasında üretime eklenebilecek çeşitli doğal biyoaktif moleküllerin hücre proliferasyonuna etkisi araştırılmıştır.

Bu süreçte yara iyileştirme ve proliferasyonu indükleme özellik gösteren oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, gallik asit ve kateşin moleküllerinin 4T1.2-Her2/Neu hücreleri üzerine proliferatif etkileri incelenmiştir. Daha sonra oleuropein molekülü içeren Excell ortamı ile 1 L'lik çalışma hacmindeki spinner flask içerisinde 15 gün boyunca kültüre edilmiştir ve büyüme kinetikleri belirlenmiştir. recCHO hücrelerinin de bu anlamda incelenmesi için aynı konsantrasyonda oleuropein molekülü içeren ve içermeyen Serox SFM ortamında 20 günlük kültür süresindeki büyüme kinetikleri belirlenmiş ve iki hücreye ait sonuçlar karşılaştırılmıştır.

İZMİR

.../.../20...

Elifsu POLATLI



**İÇİNDEKİLER**Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT .....	ix
ÖNSÖZ .....	xi
İÇİNDEKİLER .....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
TABLOLAR DİZİNİ .....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Hücre Kültürü .....	3
2.1.1. Hücre Kültürü Ortamları .....	4
2.2. SFM.....	11
2.2.1. Seruma Alternatif Kullanılan Bileşenler .....	14
2.2.2. Piyasadaki SFM'ler .....	14
2.2.3. Biyofarmasötik Üretimi .....	17
2.3. Her2/Neu Proteini ve Farmasötik Önemi .....	25
2.4. TNF- $\alpha$ .....	27

**İÇİNDEKİLER (devam)**

2.4.1.	Anti-TNF- $\alpha$ Antikorları ve Farmasötik Açıdan Önemi .....	29
3.	Materyal, Metot .....	30
3.1.	Materyal.....	30
3.1.1.	Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler .....	30
3.1.2.	Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücreler .....	31
3.1.3.	Cihazlar .....	31
3.2.	Metot .....	32
3.2.1.	4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Kültürü ve Devamlılığı.....	32
3.2.2.	Moleküllerin 4T1.2-Her2/Neu Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi .....	34
3.2.3.	4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin SFM'e Adapte Edilmesi .....	34
3.2.4.	4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Petrilerde Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi.....	35
3.2.5.	4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Petrilerde Eksprese Ettiği Her2/Neu Proteininin Ekspresyonunun Analizi .....	36
3.2.6.	Spinner Flaskta 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Kesikli Kültürü ile Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi .....	37
3.2.7.	Spinner Flaskta 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Her2/Neu Proteininin Ekspresyonunun Analizi .....	37
3.2.8.	recCHO Hücrelerinin Kültürü ve Devamlılığı.....	37



**İÇİNDEKİLER (devam)**

3.2.9. Spinner Flaskta recCHO Hücrelerinin Kesikli Kültürü ile Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi .....	39
3.2.10. Spinner Flaskta recCHO Hücrelerinin Ürettikleri TNF- $\alpha$ Spesifik Mab Miktarının Belirlenmesi .....	39
3.2.11. Spinner Flaskta recCHO Hücrelerinin Glikoz Tüketiminin Belirlenmesi .....	40
3.2.12. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz.....	40
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>41</b>
4.1. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Kültürü ve Devamlılığı .....	41
4.2. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Mikoplazma Kontrolü ve Her2/Neu Proteininin Hücre Yüzeyinde Görüntülenmesi .....	41
4.3. Moleküllerin 4T1.2-Her2/Neu Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi.....	42
4.4. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin SFM'e Adapte Edilmesi .....	46
4.5. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Petrilerde Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi.....	46
4.6. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Her2/Neu Protein Ekspresyonunun Analizi .....	50
4.7. Spinner Flaskta 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Kesikli Kültürü ile Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi .....	52
4.8. Spinner Flaskta 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Her2/Neu Proteininin Ekspresyonunun Analizi .....	54
4.9. recCHO Hücrelerinin Kültürü .....	56

**İÇİNDEKİLER (devam)**

4.10.	recCHO Hücrelerinin Mikoplazma Kontrolü .....	56
4.11.	Spinner Flaskta recCHO Hücrelerinin Kesikli Kültürü ile Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi.....	57
4.12.	Spinner Flaskta recCHO Hücrelerinin Ürettiği TNF- $\alpha$ Spesifik Mab Miktarının Belirlenmesi .....	59
4.13.	Spinner Flaskta recCHO Hücrelerinin Glikoz Tüketiminin Belirlenmesi.....	59
5.	TARTIŞMA.....	60
6.	SONUÇLAR.....	68
7.	ÖNERİLER.....	70
8.	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	71
	TEŞEKKÜR.....	86
	ÖZGEÇMİŞ .....	87

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Piyasadaki SFM'lerin market payları (Persistence Market Research, 2018).....	15
Şekil 2.2.Oleuropeinin molekül yapısı (PubChem, 2019) .....	21
Şekil 2.3.Resveratrolün molekül yapısı (PubChem, 2019).....	22
Şekil 2.4.Tangeretinin molekül yapısı (PubChem, 2019).....	22
Şekil 2.5. Neohesperidinin moleküler yapısı (PubChem, 2019).....	23
Şekil 2.6.Nobiletinin moleküler yapısı (PubChem, 2019) .....	24
Şekil 2.7.Kateşinin moleküler yapısı (PubChem, 2019).....	24
Şekil 2.8.Gallik asitin moleküler yapısı (PubChem, 2019).....	25
Şekil 3.1. Hücrelerin günlük sayımlarının yapıldığı hemositometre lamı ...	36
Şekil 3.2. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin 34.8 mm'lik petrielerde büyüme kinetiğinin belirlenmesi, A: kabin içerisinde deney kurulumu, B: petrilerin inkübatör içerisinde görünümü .....	36
Şekil 4.1. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin %10 serumlu DMEM-F/12 ortamında ters faz mikroskoptaki 10X büyütme ile görünümü .....	41
Şekil 4.2. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin floresan mikroskobu altında 63X büyütme ile DAPI boyaması sonrası görüntüleri .....	42
Şekil 4.3.Hücrelerin floresan mikroskobu altında GFP işaretli Her2/Neu proteininin 63X büyütme altında görüntüleri.....	42

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.4. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin  $3 \times 10^4$  h/ml başlangıç hücre sayısında 96 gözlü pleyte ekilerek farklı konsantrasyonlarda doğal moleküllerin (oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, kateşin ve gallik asit) eklenmesi ile elde edilen % hücre canlılık grafikleri, A: 24 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği, B: 48 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği, C: 72 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği (\*p<.05; \*\*p<.01; \*\*\*p<.001)..... 43

Şekil 4.5.4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin  $5 \times 10^4$  h/ml başlangıç hücre sayısında 96 gözlü pleyte ekilerek farklı konsantrasyonlarda doğal moleküllerin (oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, kateşin ve gallik asit) eklenmesi ile elde edilen % hücre canlılık grafikleri, A: 24 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği, B: 48 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği, C: 72 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği (\*p<.05; \*\*p<.01; \*\*\*p<.001)..... 44

Şekil 4.6. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin  $8 \times 10^4$  h/ml başlangıç hücre sayısında 96 gözlü pleyte ekilerek farklı konsantrasyonlarda doğal moleküllerin (oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, kateşin ve gallik asit) eklenmesi ile elde edilen % hücre canlılık grafikleri, A: 24 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği, B: 48 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği, C: 72 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği (\*p<.05; \*\*p<.01; \*\*\*p<.001)..... 45

Şekil 4.7. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin farklı serum içeren büyüme ortamında mikroskop altında görüntüleri, A: %5 serum içeren ortamda, B: %2.5 serum içeren ortamda, C: %1.25 serum içeren ortamda, D: %0.6 serum içeren ortamda, E: %0 serum içeren ortamda hücrelerin mikroskop altındaki görüntüleri, F: %0 serum içeren ortamda hücrelerin mikroskop altındaki daha yoğun kültür içerisinde görüntüleri ..... 46

Şekil 4.8. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin %10 FBS içeren DMEM-F/12 ortamında petrilerdeki büyüme eğrisi ..... 47

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- Şekil 4.9. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin Excell ortamlarına oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, gallik asit ve kateşin eklenerek petrilere oluşturulan büyüme eğrileri..... 47
- Şekil 4.10. 4T1.2-Her2/Neu hücreleri için petrilere elde edilen zamana bağlı hücre canlılık grafikleri ..... 49
- Şekil 4.11. Her2/Neu proteini ekspres etmeyen 4T1.2 ve ekspres eden 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin flow sitometride analizi, A: 4T1.2 hücrelerinin popülasyon görüntüsü, B: 4T1.2 hücrelerinin FL-1 kanalındaki ışımaya görüntüsü, C: 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin popülasyon görüntüsü, D: 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin FL-1 kanalındaki Her2/Neu proteini ışımaya görüntüsü..... 50
- Şekil 4.12. 34.8 mm'lik petrilere molekül eklenmeyen Excell ortamı ve oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, gallik asit ve kateşinin (sırasıyla 0.195 µg/ml, 0.391 µg/ml, 0.391 µg/ml, 0.098 µg/ml, 0.098 µg/ml, 0.098µg/ml, 0.098 µg/ml konsantrasyonda) eklenmesiyle 4T1.2-Her2/Neu hücrelerine ait Her2/Neu proteininin günlük olarak popülasyondaki % ekspresyon oranı ..... 51
- Şekil 4.13. 34.8 mm'lik Petrilere molekül eklenmeyen Excell ortamı ve oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, gallik asit ve kateşinin (sırasıyla 0.195 µg/ml, 0.391 µg/ml, 0.391 µg/ml, 0.098 µg/ml, 0.098 µg/ml, 0.098 µg/ml, 0.098 µg/ml konsantrasyonda) eklenmesiyle Her2/Neu hücrelerine ait Her2/Neu proteininin günlük ekspresyon şiddeti 51
- Şekil 4.14. A: Spinner flaskta 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Kesikli Kültürü, B: Boş spinner flask görüntüleri ..... 52
- Şekil 4.15. A: Excell ortamının 0.gündeki pH değeri, B: 15 günlük spinner flask batch kültür süresinin sonunda ortamın pH değeri..... 52
- Şekil 4.16. 1 L'lik çalışma hacminde spinner flaskta Excell ve 0.195 µg/ml konsantrasyonda oleuropein içeren Excell büyüme ortamında 4T1.2-Her2/Neu hücrelerine ait büyüme eğrisi. .... 53

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- Şekil 4.17. Spinner flaskta 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin zamana bağlı % canlılık grafiği..... 54
- Şekil 4.18. Spinner flaskta oleuropein içeren ve içermeyen Excell ortamındaki 4T1.2-Her2/Neu hücrelerine ait Her2/Neu proteininin günlük olarak popülasyondaki % ekspresyon oranı..... 55
- Şekil 4.19. Spinner flaskta oleuropein içeren ve içermeyen Excell ortamındaki 4T1.2-Her2/Neu hücrelerine ait Her2/Neu proteininin günlük ekspresyon şiddeti..... 55
- Şekil 4.20. İverted mikroskopta 10X büyütme ile recCHO hücrelerinin 75 cm<sup>2</sup> T-flask içerisinde görünümü..... 56
- Şekil 4.21. recCHO hücrelerinin floresan mikroskobu altında 63X büyütme ile DAPI boyaması gerçekleştirilmiş görüntüleri..... 57
- Şekil 4.22. recCHO hücrelerine ait 0.195 µg/ml oleuropein içeren ve içermeyen Serox SFM ortamlarında reaktör koşullarındaki büyüme eğrisi 57
- Şekil 4.23. recCHO hücrelerine ait 0.195 µg/ml oleuropein içeren ve içermeyen Serox SFM ortamlarında reaktör koşullarındaki 20 günlük % canlılık grafiği..... 58
- Şekil 4.24. Spinner flaskta recCHO hücrelerinin oleuropein içeren ve içermeyen Serox SFM ortamındaki 0, 1, 3, 5, 10, 14, ve 20. günlere ait alınan örneklerde yapılan ELISA sonucu olarak elde edilen TNF-α spesifik Mab miktarı..... 59
- Şekil 4.25. Spinner flaskta recCHO hücrelerinin oleuropein içeren ve içermeyen SEROX SFM ortamındaki 0., 1., 3., 5., 10., 14., ve 20. günlere ait alınan örneklerde ölçülen glikoz konsatrasyonu sonucu olarak elde edilen glikoz tüketim eğrisi..... 60
- Şekil 4.26. Spinner flaskta recCHO hücrelerinin kesikli kültürüne ait 20. gündeki ortam pH değeri..... 60

## TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Hayvan hücre kültüründe kullanılan besin ortamların sınıflandırılması (Yao and Asayama, 2017).....	4
Tablo 2.2. Serumun içerdiği bileşenler (Brunner, 2010).....	8
Tablo 2.3.Hücre Kültürü İçin Geliştirilen Bazı SFM'ler ve Güncel Satış Fiyatları .....	16
Tablo 4.1.4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin petrillerdeki Excell ortamlarına oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, gallik asit ve kateşin eklenerek oluşturulan büyüme ortamlarındaki spesifik büyüme hızı ve ikilenme süreleri .....	48
Tablo 4.2. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin spinner flaskta Excell ortamı ve 0.195 µg/ml konsantrasyonda oleuropein, eklenerek oluşturulan Excell ortamındaki spesifik büyüme hızı ve ikilenme süreleri .....	53
Tablo 4.3. recCHO hücrelerinin oleuropein içeren ve içermeyen ortamlardaki spesifik büyüme hızı ve ikilenme süreleri .....	58





**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
€	<i>Euro</i>
\$	<i>Dolar</i>
$\mu$	Spesifik büyüme hızı
td	İkilenme süresi

**Kısaltmalar**

HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
FBS	Fetal sığır serumu
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
recCHO	Rekombinant Çin Hamster Yumurtalık hücreleri
SFM	Serum içermeyen ortam
OLE	Zeytin Yaprağı Ekstraktı
mRNA	mesajcıRNA
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü
TNF- $\alpha$	Tümör nekrozis faktör-alfa
Mab:	Monoklonal Antikor
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

DMSO	Dimetil sülfoksit
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
dk	Dakika
mm	Milimetre
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid]
$\mu\text{g}$	Mikrogram
L	Litre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
$\text{cm}^2$	Santimetrekare
$\text{CO}_2$	Karbondioksit
Na	Sodyum
Ca	Kalsiyum
Mg	Magnezyum
K	Potasyum
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
CSF	Serebral spinal sıvı
$\text{PO}_4^-$	Fosfat

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

Cl <sup>-</sup>	Klorür
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat
pH	Hidrojen gücü
ABD.	Amerika Birleşik Devletleri
Ar-Ge	Araştırma Geliştirme
TAA	Tümörle İlişkili Spesifik Antijen



## 1. GİRİŞ

Hücre kültürü sistemlerinde üretilen viral aşılar ve biyobenzerler günümüzde SFM'lerin en yaygın kullanıldığı biyoteknolojik endüstriyel alanlardır (Bioplan, 2018). SFM pazarında, CHO hücre kültürü ortamı hakimdir. CHO hücreleri, en yaygın olarak, memeli konakçıda rekombinant terapötiklerin endüstriyel üretimi için kullanılır ve dünyada en yaygın kullanılan memeli hücreleridir. Bu hücreler stabil ve doğru glikolizasyonu sağlayabilir ve bu nedenle doğal proteinin *in vitro* olarak daha hassas bir şekilde sunulmasını sağlarlar (Xie and Wang, 1994a).

SFM pazarı, farklı hastalıkların tedavisi için kullanılan biyolojik ürün sayılarının artmasından dolayı artan biyofarmasötik üretimin potansiyelinden kaynaklanmaktadır (Globenewswire, 2018). Serum, son ürünün kalitesini olumsuz etkileyebilen saflığının istenen düzeye getirilmesi için ek işlemler gerektiren kompleks bileşenler içermektedir. Ayırma saflaştırma basamaklarının optimizasyonu ile istenen kalitede biyofarmasötik üretimi için firmalar SFM kullanmaktadır (Persistence Market Research, 2018).

Proteinlerin hedef haline getirilmesi veya kullanımları ile farklı kanser aşılarının oluşturulmasında büyük ölçekte üretimleri önemli yer kaplar. Bu amaçla farmasötik proteinlerin büyük ölçekte üretimlerinde, üretim ortamında bulunan serumun kompleks yapısı gereği uzaklaştırılması veya kullanımından kaçınılması gerekmektedir (Zhang ve Robinson 2005). Özellikle hücre kültürü sistemlerinde üretilen viral aşılar ve biyobenzerler günümüzde SFM'lerin en yaygın kullanıldığı biyoteknolojik endüstriyel alanlardır. Ülkemizde de önemi günden güne artan ve gelişmekte olan bu endüstriyel üretim alanlarında düşük maliyetli yüksek verimlilikte SFM ortamlarına ihtiyaç vardır (Persistence Market Research, 2018). Büyük ölçekte proliferasyonu arttırarak verimliliği artırma amacıyla serum ikamesi olarak kullanılacak ucuz doğal bir molekülün SFM'de kullanım potansiyeli, üretimi daha düşük maliyetli yapabilmeye imkân sağlayabilmektedir.

ErbB2, c-erbB2 veya HER2/Neu olarak da bilinen insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'nin yüksek oranda ekspresyonu temel olarak HER2 gen amplifikasyonuna bağlanır ve HER2 sinyal ağının yapısal aktivasyonu ile sonuçlanır. HER2'nin mutasyonu veya aşırı ekspresyonu, metastazın yanı sıra direkt olarak tümör oluşumuna yol açabilir. Bununla birlikte, HER2 sıklıkla meme kanseri, mide kanseri, yumurtalık kanseri ve prostat kanserinde normal hücreye

oranla yüksek düzeyde eksprese edilir (Tai et al., 2010) ve meme kanserlerinin yaklaşık %20-30'unda gözlenir. Yüksek ekspresyon kanser hücrelerinin agresif şekilde çoğalması ve hasta sağ kalımının düşük olması ile ilişkilidir (Slamon et al., 1987; Pegram and Slamon, 2000).

Tümörgenezdeki rolünün keşfedilmesinden hemen sonra HER2, kanser tedavisi için hedef alınmıştır. HER2 dimerizasyonunun inhibisyonu, karsinogeneze neden olabilecek PI3K ve MAPK yolları da dahil olmak üzere birçok hücre içi sinyal kaskadının aktivasyonunu önler (Franklin, et al., 2004; Agus, et al., 2005; Nahta, et al, 2006). Bu amaçla ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan HER2 inhibisyonunu hedef alan Mab'lar bulunmaktadır. Bu Mab'lara, trastuzumab (Herceptin), pertuzumab (Perjeta) ve trastuzumab emtansin (Kadcyla) örnek olarak verilebilir. Trastuzumab, FDA tarafından meme kanseri için 1998'de onaylanan ilk tedavi hedefidir (Ceran et al., 2012; Carter et al., 1992).

Çeşitli immünoinflamatuvar hastalıkları olan hastaların tedavisi, özellikle enflamatuar sitokinleri ve sitokin reseptörlerini hedefleyen genetik olarak tasarlanmış antikörlerin kullanımından önemli ölçüde fayda sağlamıştır (Willrich et al., 2014). Tümör nekrozis faktör (TNF), önemli bir konak savunma molekülüdür (Fong et al., 1989). TNF- $\alpha$  ise, cilt lezyonlarında ve püstüler lezyonlu hastaların serumunda, psoriatik artritli hastaların sinovyal sıvısında artan ekspresyonu nedeniyle en çok çalışılan sitokindir. Bunun yanında spesifik inhibitörlerinin terapötik etkinliği de bulunmaktadır (Brotas et al., 2012).

Anti-TNF- $\alpha$  ajanları, çeşitli bağışıklık aracılı enflamatuar hastalıklarda uygulamaya yönelik çalışmalar nedeniyle önemli ve potansiyel ilaç grubuna dahil edilir. Halen kullanılan anti-TNF-biyofarmasötikler arasında kimerik insan/fare Mab, infliksimab (Remicade), insan Mab'ları, adalimumab (Humira) ve golimumab (Simponi), mAb/Fab fragmanı, certolizumab pegol (Cimzia) bulunur. Hepsi hücrel TNF reseptörlerine TNF bağlanması yoluyla başlatılan etkileri inhibe ederler. Etkiler çok sayıda hastada yüksektir ve anti-TNF-biyofarmasötikleri artık birçok ülkede en yüksek tıbbi harcamalardan birini oluşturmaktadır (Bendtzen, 2015). Buna bağlı olarak anti-TNF- $\alpha$  ajanlarının biyobenzerlerine ait pazar payları önem kazanmaktadır. Bu nedenle, biyofarmasötik endüstrisinde daha yüksek etkinliğe sahip daha ucuz mAb üretimi sağlayan yeni stratejiler geliştirmeye hala ihtiyaç vardır (İz et al., 2018).

Yapılan bu tez çalışması kapsamında biyofarmasötik anlamda önem arz eden iki proteinin (Her2/Neu proteini ve Anti-TNF- $\alpha$  Mab) elde edilmesinde kullanılabilecek rekombinant hücre hatlarının (4T1.2-Her2/Neu ve recCHO) doğal molekül içeren ortamlardaki büyüme kinetikleri incelenmiştir. Bu amaçla 4T1.2-Her2/Neu hücresi üzerinde küçük ölçekte etkilerinin incelendiği moleküllerden en iyi sonucu veren molekül oleuropein ile 1 L'lik çalışma hacminde spinner flaskta büyüme eğrisi her iki hücre hattı için de bakılmıştır ve endüstriye yönelik potansiyel kullanımı araştırılmıştır. Bu anlamda çalışmanın SFM üretimine doğal b,yoakt,f moleküllerin eklenmesine yönelik çalışmalara öncülük etmesi beklenmektedir.



## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Hücre Kültürü**

Hücre kültürü teknolojisinin kullanılmaya başlanmasından itibaren toplum üzerine getirdiği pek çok avantajı mevcuttur. Biyoloji alanında yapılan çalışmalarda ilerlemede hücre kültürü teknolojisinin etkisi oldukça büyüktür (Keehan et al., 1990). Yeni ilaçların etkinliği ve toksisitesinin değerlendirilmesi, aşı üretimi de dahil olmak üzere çeşitli alanlarda hücre kültürü temelli biyofarmasötik kullanım amaçlı protein üretimine yönelik teknolojiler geliştirilmiştir (Yao ve Asayama, 2017).

Kültür ortamı hücre kültürü teknolojisindeki en önemli faktördür. Hücrenin hayatta kalmasını ve çoğalmasını aynı zamanda hücresel fonksiyonları destekler. Hücre kültürü ortamının içeriği; araştırma sonuçlarını, biyofarmasötik üretim hızını ve tedavi sonuçlarını doğrudan etkilediği anlamına gelmektedir. Bu nedenle, hücre kültürleriyle çalışan araştırmacıların amaçlarına uygun bir ortam seçmeleri en önemli süreçtir (Freshney, 2005; Yao ve Asayama, 2017).

### 2.1.1. Hücre Kültürü Ortamları

Klasik hücre kültürü ortamı, amino asitlerden, vitaminlerden, inorganik tuzlardan ve glikoz gibi enerji için karbon kaynağından oluşur. Bu formülasyonlar, hayvan serumu gibi bir protein kaynağının eklenmesi ile zenginleştirilir. Klasik ortam formülasyonları, kanser hücre hatları için tasarlanmış olup daha farklı hücreler için gereksinimler değişeceğinden mevcut formülasyonlar da değişiklik göstermektedir (Price, 2017).

Hücre kültürü ortamları basitçe doğal ve yapay ortamlar olarak sınıflandırılabilir (Price, 2017; Yao and Asayama, 2017). Günümüzde yapay ortamlar, eklenen takviyelerin tipine bağlı olarak birkaç gruba ayrılabilir; örneğin, serum içeren ortam, serum içermeyen ortam (SFM), protein içermeyen ortam ve kimyasal olarak tanımlanmış ortam (Tablo 1).

**Tablo 2.1.** Hayvan hücre kültüründe kullanılan besin ortamların sınıflandırılması (Yao and Asayama, 2017)

Kategori	Tanım	Çeşit	Örnek
Doğal Ortam	Plazma, serum ve embriyo ekstraktı gibi doğal biyolojik maddelerden oluşur.	Koagülantlar	Heparinize kan, serum ve fibrinojenden ayrılmış plazma
		Doku Ekstraktları	Tavuk embriyoları, karaciğer ve dalak ve kemik iliği ekstraktları, serum ve fibrinojen özleri
		Biyolojik Sıvılar	Plazma, serum, lenf, amniyotik sıvı ve plevral sıvı



Yapay Ortam	Bazal bir ortam ve serum, büyüme faktörleri, hormonlar gibi takviyelerden oluşur.	Serum İçeren Ortamlar	İnsan, sığır, at veya diğer serumları takviye olarak kullanılır.
		Serumsuz Ortamlar	Sığır serum albümini gibi ham protein fraksiyonları veya $\alpha/\beta$ globulin takviye olarak kullanılır
		Xeno-free Ortamlar	İnsan serum albümini gibi insan kaynaklı bileşenler, takviye olarak kullanılır, ancak hayvan bileşenleri takviye olarak kullanılmaz.
		Protein-free Ortamlar	Peptid fraksiyonları (protein hidrolizatları) gibi tanımlanmamış bileşenler, tamamlayıcı maddeler olarak kullanılır.
		Kimyasal Olarak Tanımlanmış Ortamlar	Ham protein fraksiyonları, hidrolizatlar ve doku özütleri gibi tanımlanmamış bileşenlerin takviye olarak kullanımı uygun değildir, ancak rekombinant proteinler gibi yüksek oranda saflaştırılmış bileşenler kullanılabilir.

### 2.1.1.1. Hücre Kültürü Ortamının Bileşenleri

Klasik hücre kültürü ortam içeriği, aminoasitlerde n, vitaminlerden, inorganik tuzlardan ve glikoz gibi enerji veren karbon kaynağından oluşur. Hücre büyümesini ve çoğalmasını arttırmak için, birçok hayvan hücre kültür

ortamlarına farklı bileşenler eklenerek veya bunlar değiştirilerek geliştirilmektedir (Freshney, 2005).

#### 2.1.1.1.1. Su

Su hücre kültürü ortamının en temel bileşenidir. Ortam bileşenlerinin çözülmesinde kullanılan suyun bileşimi ve sterilizasyonu önem taşımaktadır. Ayrıca içerdiği çeşitli kimyasallar hücreler üzerinde istenmeyen etkilere sebep olacağından çeşitli filtrasyon sistemleri kullanılmaktadır. Kültüre alınan hücreler SFM'de çoğalabiliyorsa sudaki toksinlere karşı çok daha hassas olacakları da göz önüne alınmalıdır (Price, 2017).

#### 2.1.1.1.2. Tampon Çözeltileri

Ozmotik basıncın ve pH'nın istenen fizyolojik aralıkta tutulmasında rol oynamaktadır. Fizyolojik çözeltilerdeki dört ana katyon; sodyum ( $\text{Na}^+$ ), potasyum ( $\text{K}^+$ ), kalsiyum ( $\text{Ca}^{++}$ ) ve magnezyumdur ( $\text{Mg}^{++}$ ). Bu dördü hücre membranının ve besin taşınımının korunması için önemlidir (Price, 2017).

Tuz çözeltilisindeki ana anyonlar fosfat ( $\text{PO}_4^-$ ), klorür ( $\text{Cl}^-$ ) ve bikarbonattır ( $\text{HCO}_3^-$ ). Bu anyonlar, memeli hücreleri için 7.2 ila 7.6 arasında optimum pH aralığını muhafaza etmek için tampon sistemlerinin bir parçası olarak kilit rol oynarlar. Asitlere ve bunların eşlenik bazlarına ek olarak, serumda bulunan serbest amino asitler ve doğal tamponlar da iyi tamponlama kapasitesine sahiptir (Yang and Xiong, 2012).

### **2.1.1.1.3. Enerji Kaynakları**

Kültür ortamındaki iki ana enerji kaynağı glikoz ve glutamindir. Glikoz, nükleositler, amino şekerler ve bazı amino asitler için karbon kaynağı görevi görür. ATP üretmek için glikoz katabolize edilir. Çoğu normal hücre için, enerjinin yaklaşık yarısı glikozdan ve L-glutamin'den gelir. L-glutamin ile ilgili sorun, zaman ve sıcaklığa bağlı olarak amonyağa ve pirolidon karboksilik aside parçalanmasıdır. Bozunma hızı,  $25^\circ\text{C}$  ve daha yüksek sıcaklıklarda daha hızlı gerçekleşir. Glutamin içeren ortamın  $37^\circ\text{C}$ 'de uzun süre tutulması, glutamini ve dolayısıyla ortamı tahrip eder (Price, 2017).

### **2.1.1.1.4. L-amino Asitler**

Amino asitler esansiyel (canlı hayvanlarda azot dengesini sağlamak için gerekli) ve esansiyel olmayan (öncüllerden hücreler tarafından sentezlenebilen) olarak ayrılmaktadır (Eagle, 1955). Kültürdeki hücreler için temel amino asitler L-arginin, L-histidin, L-izolösin, L-lösin, L-lisin, L-metiyonin, L-fenilalanin, L-treonin, L-triptofan, L-valin, L-sistein, L-tirozin ve L-glutamin'dir. Esansiyel olmayan amino asitler L-alanin, L-asparagin, L-aspartik asit, L-glutamik asit, L-glisin, L-prolin ve L-serindir (Yang and Xiong, 2012; Pasioka and Morgan, 1959).

### **2.1.1.1.5. Vitaminler**

Klasik ortam, Eagle'ın temel vitaminlerini içerir. EMEM vitaminleri, koenzimlerin bileşenleri olan B-kompleks vitaminleri folik asit, niasinamid, piridoksal, pantotenat, riboflavin ve tiamin, ayrıca lipit sentezi için substrat olan

kolin ve inositolden oluşur. Çok düşük yoğunlukta büyüyen hücreler için, B12 vitamini bulunmalıdır (Matsuya ve Yamane, 1986). Nöronal hücreler biyotine ihtiyaç duyar. SFM'de, antioksidan vitaminler sıklıkla formülasyona eklenir. L-askorbik asit 2-fosfatın magnezyum tuzu, daha iyi kararlılığı nedeniyle çok daha iyi bir seçimdir (Hata ve Senoo, 1989). B vitaminlerinin birçoğu ışığa karşı çok hassastır (riboflavin, folik asit, folinik asit ve B12), bunların ve bu vitaminleri içeren besiyerinin ışığın bozulmasından korunmasına özen gösterilmelidir (Yang and Xiong, 2012).

### **2.1.1.1.6. İnorganik İyonlar ve İz Elementler**

Tuz çözeltisinde bulunan katyonlara ek olarak ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  ve  $\text{K}^+$ ) demir, manganez, çinko, selenyum ve bakırın, serum yokluğunda uygun konsantrasyonda kullanıldığında hücre büyümesi için önemli olduğu gösterilmiştir (Price, 2017; Cinatl, 1969; Sternberg et al., 1964).

### **2.1.1.1.7. Serum**

Hayvan serumu hücre çoğalmasını sağlayan sayısız faktörü içerir. Hormonlar, bağlanma faktörleri, membran geçirgenliği düzenleyicileri, lipitler, enzimler, mikro besinler, iz elementler, tamponlar, serbest radikal temizleyicileri, proteolitik enzimler mitojenik büyüme faktörleri sayılabilir. Aynı zamanda süspanse çoğalan hücrelerin kayma hasarlarından korunmasına yardımcı olmak için besiyerinin viskozitesini artırabilir (Price, 2017; Arora, 2013; Freshney, 2005). İnsan serumu, at serumu bazı spesifik hücreler için kullanılır. En yaygın kullanılan hayvan serumu takviyesi ise fetal sığır serumu (FBS)'dur (Yang vd, 2016; Yao ve Asayama, 2017). FBS genellikle büyüme faktörleri bakımından zengindir. Bu nedenle, kültürde çoğalması zor olan hücreler ve hücrelerin klonlanmasında kullanımı uygundur (Yao ve Asayama, 2017).

#### **Serumun Fonksiyonları**

- ❖ Serum proteinlere bağlanır ve çözelti içindeki temel besindir.
- ❖ Serum hücre büyümesini ve fonksiyonunu stimüle etmede önemli rol oynayan hormonları ve büyüme faktörlerini içerir.
- ❖ Hücrelerin bağlanmasına yardımcı olur.
- ❖ Serum yayılma faktörü olarak işlev görür.
- ❖ Albümin taşıma faktörü gibi bağlayıcı protein olarak işlev

görür.

- ❖ Serum hormonların, vitaminlerin, minerallerin, lipidlerin ve daha birçok biyolojik maddenin taşınmasında yardımcı olur.
- ❖ Mekanik hasarı ve viskozitenin neden olduğu hasarı en aza indirir.
- ❖ Serum doğal tamponlama maddesi olarak işlev görür ve kültür ortamının pH'sının korunmasına yardımcı olur (Brunner, 2010)

Tablo 2.2. Serumun içerdiği bileşenler (Brunner, 2010)

<b>Serum Proteinleri</b>	Albümin Globulinler (örneğin, İmmunglobulinler, IgG) $\alpha$ 1-Antitripsin (Proteaz İnhibitörü) $\alpha$ 2-Makroglobulin (Proteaz İnhibitörü)
<b>Transport proteinleri</b>	Transferin Transcortin $\alpha$ 1-Lipoprotein $\beta$ 1-Lipoprotein
<b>Bağlanma ve yayılma faktörleri</b>	Fibronektin Laminin Serum Spreading Faktörü
<b>Enzimler</b>	Laktat dehidrogenaz Alkalın fosfataz $\gamma$ -Glutamil Transferaz Alanin Aminotransferaz (ALT / GPT) Aspartat Aminotransferaz (AST / GOT)
<b>Hormonlar</b>	İnsülin Glukagon Kortikosteroidler Vazopressin Tiroid hormonları Paratiroid Hormonu Büyüme hormonu Hipofiz Glandotropik Faktörler Prostaglandinler

<b>Büyüme faktörleri ve sitokinler</b>	Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) Sinir Büyüme Faktörü (NGF) Endotel Hücresi Büyüme Faktörü (ECGF) Trombosit kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF'ler) İnterlökinler İnterferonlar Transforming Büyüme Faktörleri (TGF'ler)
<b>Yağ asitleri ve lipitler</b>	Serbest ve Protein Bağlı Yağ Asitleri Trigliserid Fosfolipitler Kolesterol Etanolamin Fosfatidiletanolamin
<b>Vitamin ve iz elementler</b>	Retinol / Retinoik Asit (Vitamin A) Eser elementler B Vitamini Grubu: Tiamin Riboflavi Piridoksin / Pyridoxalphosphate Kobalamin Folik asit Niacinamide / Nikotinik Asit Panthotenik Asit Biyotin Askorbik Asit (C Vitamini) $\alpha$ -Tokoferol (E Vitamini) Selenyum, Demir, Çinko ve Cu, Co, Cr, I, F, Mn, Mo, V, Ni, Sn
<b>Karbonhidratlar</b>	Glikoz Galaktoz Fruktoz Mannoz Riboz Glikolitik Metabolitler
<b>Protein dışı Nitrojenler</b>	Üre Pürinler / Primidinler Poliaminler Kreatinin Amino asitler

Serum içerikli ortam doğal olarak ortam kompozisyonunu belirsiz hale getiren ve konsantrasyonları partiden partiye değişebilen çeşitli serum kaynaklı maddeler içerir. Bu durum kültür sonuçlarını daha az tekrarlanabilir kılar ve mikrobiyal kontaminasyon riski oluşturur. Bununla birlikte, serum içeren ortam, çeşitli hücre tipleri için etkili bir şekilde kullanılabilir, çünkü serum, hayvan hücrelerinin hayatta kalması ve büyümesi için gerekli olan birçok aktif madde içerir (Brunner et al., 2010).

### Serumun Dezavantajları

- ❖ Yüksek maliyet,
- ❖ Standardizasyonunda yaşanan sorunlar, lot lar arasında değişkenlik,
- ❖ Hücre kültürlerinde istenmeyen etkilerin gelişmesi, hücre büyüme fonksiyonlarının stimülasyon veya inhibisyonu,
- ❖ Kontaminantlar içerebilmesi; Mikoplazma, endotoksin vb.
- ❖ Endüstriyel üretimlerde ayırma saflaştırma yani alt akım işlemlerinde ürünün saflaştırılmasında sorunlara neden olmaktadır, verimi düşürmektedir.

Geleneksel ortamda memeli hücrelerinin kültürü için en önemli takviye olan serum, esansiyel besinler, hormonlar, peptitler, büyüme faktörleri gibi elementleri sağlamlasının yanında, yüksek maliyet, parti değişkenliği, ürün saflaştırmasındaki alt akım işlemlerinde zorluklar ve kültürasyon sırasında virüslerin ortadan kaldırılması gerekliliği gibi birçok dezavantaja sahiptir (Freshney, 2000). Aynı zamanda son rakamlar, dünya genelinde yılda yaklaşık 800.000 litre FBS'nin üretildiğini ve bu sayıların hala artmakta olduğunu gösteren 2.000.000 sığır fetüsüne tekabül etmektedir (van der Valk et al., 2018).

#### 2.1.1.1.7.1. Serum Pazarı

FBS kompozisyonu dış etkenlerden etkilemektedir. Örneğin kuraklık veya taşkın iklim değişikliği gibi hava koşulları FBS içeriğini değiştirmektedir (Brindley et al., 2012). Sırasıyla FBS'nin küresel üretim ve mevcudiyetinin ve bunun yanı sıra dünya çapındaki talebin kesin hacimleri halen bilinmemektedir; bu durum FBS'nin kötüye kullanımı, yanlış etiketleme ve kuralsızlaştırma için fırsatlar yaratabilir. 1994 yılında dünya çapında yaklaşık 30.000 L “Yeni Zelanda” serumunun satıldığı bildirildi. Bununla birlikte, Yeni Zelanda'da yılda sadece 15.000 L yüksek kaliteli FBS elde edilmiştir (Hodgson, 1995). 2013 baharında, küresel bir tedarikçiden alınan FBS'nin sığır serum albümin, su ve büyümeyi teşvik edici katkı maddeleri ile harmanlandığı ortaya çıkarak standartlara uygun olmadığı ortaya çıkmıştır. Bir FDA soruşturması, toplam hacmi yaklaşık 280.000 L olan 143 parti FBS'nin (2008'den 2013'e kadar) etkilendiğini göstermiştir. Bu olayın, binlerce hücre kültürü deneyinin sonuçları üzerinde önemli bir etkisi

olabilir. Ayrıca, hücre kültürü bazlı biyoteknoloji ürünlerinin, teşhisinin ve aşularının kalitesi ve verimi de etkilenmiş olabilir (Gstraunthaler et al., 2014).

Serum pazarındaki bu kargaşanın çok belirgin bir sonucu olarak, FBS fiyatları 2015 yılında 500 ml başına 80 € 'dan 500 ml başına 1.200 €' ya fırladı. Bu son olaylar nedeniyle, FBS'nin coğrafi kökeni, kaynağı ve izlenebilirliği bir sorun haline geldi (Siegel ve Foster, 2013; Versteegen, 2016; ISIA, 2016). Bu nedenle, etik ve bilimsel yönlerin yanı sıra, hatalı kompozisyon riski ve dengesiz fiyatlar riski, genel olarak serum kullanımından ve özellikle de FBS kullanımından uzaklaşmak için daha fazla neden verir (van der Valk et al., 2018).

## 2.2. SFM

Serumsuz, hayvansal veya insan proteinlerinden arındırılmış ortamların geliştirilmesi, tedavi-terapi ve aşılama için üretilen biyolojik ürünlerin güvenliğinin artırılmasında büyük öneme sahiptir. Bu yönde hayvan hücre teknolojisi için serum veya hayvansal kaynaklı maddelerin kullanımıyla ilgili en büyük dezavantaj, kontaminasyona yol açabilecek yabancı maddelerin nihai ürüne bulaşabilme riskidir (Merten, 2002).

Serum içeren besin ortamının bileşiminin tam olarak bilinmemesi, içeriğindeki büyüme faktörü ve hormon gibi bileşenlerin partiden partiye değişebilmesi, içerdiği inhibitörlerin yüksek olmasından kaynaklı üretimlerde sınırlamaları mevcuttur. Tanımsız hayvan kaynaklı bileşenler tekrarlanabilirliği, tutarlı üretimi zorlaştırır. Bu değişim, kalite kontrol başarısızlığına ve biyofarmasötik firmaların büyük finansal kayıplarına sebep olur (McGillicuddy et al., 2018).

Buna karşın SFM fizyolojik tutarlılığı korur ve virüslerle kontaminasyon tehlikesi yaratmaz ayrıca, çoğalmanın ve farklılaşmanın düzenlenmesini sağlar. Serum, büyümeyi teşvik eden faktörleri ve büyümeyi engelleyen faktörleri içermesine rağmen içeriğinde her birinin ne kadarının mevcut olduğunu düzenlemek mümkün değildir (ATCC, 2019).

Hayvan serumlarının ithalatına ilişkin düzenleyici kurallar ve yasalar ilk zamanlarda belirlenmemiş ve çoğu zaman kontamine ürünlerin dağıtımına yol açmıştır. Bu sürecin sonunda beklenmedik ajanların potansiyel kontaminasyonundan dolayı biyofarmasötik üretim prosesiyle ilgili düzenlemeler

daha katı hale gelmiştir. SFM'ler serum içeren ortamlara göre kontaminasyon riskini minimize ederler (Zhang ve Robinson 2005). Fakat serumun yerini alacak bileşenlerin belirlenmesinde hayvan serumunun tam karakterizasyonu, çok sayıda protein ve metabolit içermesinden kaynaklı mevcut teknoloji ile hala tam olarak yapılamamaktadır (McGillicuddy et al., 2018).

Serum ve hayvansal kaynaklı ürünlerin besin ortamından çıkarılması saflaştırma zorluklarını ve işleme ilgili safsızlıkları azalttığı için alt akım işlemlerini de önemli ölçüde kolaylaştırmıştır. Sonuç olarak SFM'lerin geliştirilmesi ile, saflaştırma performansını arttırdığı gibi bilinmeyenler giderildiğinde fizyolojik cevapların da daha kontrollü olduğu görülmüştür (Carlini et al., 2007; Decaria et al., 2009). SFM'in başlangıcından bu yana büyük gelişmeler olmasına rağmen, hücre metabolizmasını değiştirmeden hücreleri uzun vadeli süreçler için destekleyebilen ölçeklenebilir bir SFM ortamı geliştirilmesine odaklanarak bu alanda daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca etik nedenlerden ötürü hayvansal kaynaklı ürünlerin hücre kültürü ortamından kesinlikle gerekli olmadıkça çıkarılmasının gerekliliği de açıktır (McGillicuddy et al., 2018).

#### SFM'nin Avantajları

- ❖ Kimyasal olarak tanımlanmış ve kontrollü *in vitro* kültür koşulları
- ❖ Kültür ortamı kompozisyonunda değişkenliğin azalması
- ❖ Mikrobiyal kontaminasyon riski azalır (mikoplazma, virüsler, prionlar)
- ❖ Hücre kültürü ürünlerinin izolasyonunda avantajlar (alt akım işlemleri)
- ❖ Etik açıdan fetüslerin ve hayvanların kullanımını azaltmak veya tamamen önlemek

#### SFM'nin Dezavantajları

- SFM'de hücre proliferasyonu çok yavaştır
- SFM'de kullanılan reaktiflerin saflığı
- Kullanılabilirlik
- Fizyolojik Değişkenlik



- Raf ömrü ve Tutarlılık
- Kalite kontrol
- Özgüllüğü
- Standardizasyon ve maliyetler (Mani, 2019)

Tüm bu dezavantajlarına rağmen sürekli geliştirilme çalışmaları devam eden SFM'ler özellikle rekombinant protein üreten hücre hatlarının çoğaltılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Mani, 2019).

SFM'nin ilk yaygın kullanımı, primer nöronal kültürler için kullanılmış olup normalde serumdaki yaklaşık %8'e kıyasla %0,001'den az protein içeren serebral spinal sıvıya (CSF) daha yakın olacak şekilde geliştirilmiştir (Busher, 1990). Bu teknoloji şimdi kardiyak miyositleri (Das et al., 2004; Natarajan et al., 2006, 2011), hipokampal nöronları (Varghese et al., 2009), motor nöronları içerecek şekilde genişletilmiştir (Das et al., 2003). Bununla birlikte, kimyasal olarak tanımlanmış SFM'ler, her hücre dizisi veya primer kültür için henüz geliştirilmemiştir (Bjare, 1992; Even et al., 2006; Gstraunthaler, 2003; Brunner et al., 2010). Hücrelerin büyüdüğü yüzey ve hazırlıkları gibi ek faktörler de hücre fenotipleri ve tekrarlanabilirliklerini etkileyebilir. Bu gerçekler nedeniyle, kimyasal olarak tanımlanmış evrensel bir SFM ne yazık ki mevcut değildir. Bununla birlikte, faktörlerin etkileşiminin anlaşılmasıyla, birkaç hücre tipi için serumsuz bir ortama sahip modeller geliştirilmiştir (Esch et al., 2016).

SFM pazarı, ortam türü, son kullanıcı ve bölge bazında bölümlere ayrılmaktadır. Dünyada yaygın olarak SFM kullanılan pazar alanları (Persistence Market Research, 2018);

- ❖ Protein ekspresyon ortamı
- ❖ Kök hücre ortamı
- ❖ Hibridoma ortamı
- ❖ Primer hücre kültürü ortamı
- ❖ Böcek hücresi ortamı
- ❖ İmmünoloji çalışma ortamları

## ❖ CHO kültür ortamı

SFM pazarı, farklı hastalıkların tedavisi için kullanılan biyolojik ürün sayılarının artmasından dolayı artan biyofarmasötik üretimin potansiyelinden kaynaklanmaktadır. Kronik hastalıkların görülme sıklığının artması ve daha iyi tedavi edilebilmesi, öngörülen süre içerisinde biyofarmasötik ve terapötik uygulama segmentini güçlendirmektedir. Farklı yaşam bilimleri sektörlerinde yeni teknolojilerin benimsenmesi ve yenilikçi yaklaşımların artması, biyoteknoloji ve ilaç şirketleri segmentinin büyümesini tetiklemektedir (Globenewswire, 2018). Serum, nihai çıktıyı kalitatif veya kantitatif olarak engelleyebilen ve istenmeyen komponentler içermektedir. Bu sebeple çeşitli biyofarmasötik firmalar SFM'yi kullanmayı tercih etmektedir. Bununla birlikte SFM alt akım prosesinin kolaylaştırmaya yardımcı olmaktadır (Persistence Market Research, 2018).

### 2.2.1. Seruma Alternatif Kullanılan Bileşenler

Serum takviyesi uygun olmadığında veya istenmediğinde serum için birkaç alternatif mevcuttur. Bunlar arasında serum özütleri, doku özütleri veya hidrolizatları, büyüme faktörleri, hormonlar, albümin ve transferrin gibi taşıyıcı proteinler, lipitler, metaller, vitaminler, poliaminler ve indirgeyiciler örnek olarak verilebilir. Bu takviyelerin çok fazla sayıda kombinasyonu mevcuttur ve genellikle birbirleriyle etkileşime girerler (Yao and Asayama, 2017). Yakın zamanda, bitkisel serum (Pazos et al., 2004) adı verilen bitki özlerinden protein fraksiyonları ve insan trombosit lizatları (Rauch et al., 2008, 2009) kültürde epitel hücrelerini büyütmek ve muhafaza etmek için başarıyla kullanılmıştır. Bu komplekslerde göz önüne alınması gereken sorun, sürekli bir kullanılabilirlik ve güvenilir bir ticari tedarik sağlamaktır. Bu anlamda örneğin mitojenik aktivitedeki CGR1003 molekülü içeren Prolifix olarak adlandırılan bitkisel serum alternatifi sürekli ve istenen standartlarda tedarik edilemediği için artık pazarlanmamaktadır (Pazos et al., 2004; van der Valk et al., 2004).

### 2.2.2. Piyasadaki SFM'ler

SFM pazarında, biyofarmasötik firmalarının hücre kültürü büyümesi için daha fazla tercih etmesi nedeniyle CHO hücre kültürü ortamı hakimdir. CHO hücreleri, en yaygın olarak, memeli konakçıda rekombinant terapötiklerin endüstriyel üretimi için kullanılır; bu nedenle, SFM'nin pazar değerleri payına hakimdir. Kök hücre ortamı, farklı tedavilerde kök hücre kullanımının hızla

artması nedeniyle SFM pazarında en hızlı büyüyen segmenttir. SFM pazarındaki kök hücre ortamının, kök hücrelerin kullanımını ile ilgili geniş araştırmalara dayanan tahmin süresi boyunca %7.9 oranında genişlemesi beklenmektedir (Persistence Market Research, 2018).



Şekil 2.1 Piyasadaki SFM'lerin market payları (Persistence Market Research, 2018)

Tablo 2.3.Hücre Kültürü İçin Geliştirilen Bazı SFM'ler ve Güncel Satış Fiyatları

Ürün İsmi	Firma	Miktar	Fiyat \$	Kaynak
<b>PowerCHO™ Advance Chemically Defined</b>	Lonza	1L	94.11	<a href="https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/Catalogue/Products/Culture-Media-and-Reagents/c/3">https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/Catalogue/Products/Culture-Media-and-Reagents/c/3</a>
<b>EX-CELL® Advanced CHO Fed-batch Medium</b>	Sigma Aldrich	1L	251.00	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/safc/bioprocess/cho-performance.html">https://www.sigmaaldrich.com/safc/bioprocess/cho-performance.html</a>
<b>BRFF-BMZERO™</b>	Athena Enzyme Systems	500ml	55.00	<a href="https://athenaes.com/index.html">https://athenaes.com/index.html</a>
<b>CADMEC Growth Medium wo FBS</b>	Cell Applications	500ml	175.00	<a href="https://www.cellapplications.com/human-serum-free-xeno-free-starvation-and-defined-media">https://www.cellapplications.com/human-serum-free-xeno-free-starvation-and-defined-media</a>
<b>Complete Serum-Free Medium Kit With RocketFuel™ (SF-4Z0-500)</b>	Cell Systems	500ml	227.00	<a href="https://cell-systems.com/products/complete-serum-free-medium-kit-with-rocketfuel-sf-4z0-500?variant=38395062667">https://cell-systems.com/products/complete-serum-free-medium-kit-with-rocketfuel-sf-4z0-500?variant=38395062667</a>
<b>HyClone SFM4CHO liquid media without L-glutamine</b>	GE Healthcare Life Sciences	1L	63.57	<a href="https://www.gelifesciences.com/en/us/shop/cell-culture-and-fermentation/media-and-feeds/specialty-media/hyclone-sfm4cho-cell-culture-media-p-05958#/order">https://www.gelifesciences.com/en/us/shop/cell-culture-and-fermentation/media-and-feeds/specialty-media/hyclone-sfm4cho-cell-culture-media-p-05958#/order</a>
<b>FibroLife® Fibroblast Serum Free Medium Complete Kit</b>	Life Line cell Technologies	500ml	114.15	<a href="https://www.lifelinecelltech.com/shop/culture-media/fibroblast-culture-media/fibroblast-cell-culture-medium-serum-free-1l-0001/">https://www.lifelinecelltech.com/shop/culture-media/fibroblast-culture-media/fibroblast-cell-culture-medium-serum-free-1l-0001/</a>
<b>QBSF-55 Serum Free Medium</b>	Quality Biological	500ml	94.75	<a href="https://qualitybiological.com/product/qbsf-55_serum_free_medium_for_hybridomas_and_monoclonal_antibody_production_500ml/">https://qualitybiological.com/product/qbsf-55_serum_free_medium_for_hybridomas_and_monoclonal_antibody_production_500ml/</a>
<b>QBSF-58 Serum Free Medium</b>	Quality Biological	500ml	276.87	<a href="https://qualitybiological.com/product/qbsf-58_serum_free_medium_500ml/">https://qualitybiological.com/product/qbsf-58_serum_free_medium_500ml/</a>

Beklenen terapötik kullanım için antikor üretiminin arttırılması, serumsuz pazar büyümesini arttıran hibridoma ortamının kullanımını arttırmaktadır. Monoklonal antikorlar, farklı hastalıkların önlenmesi, teşhisi ve tedavisi için kullanılabildiğinden, hibridoma ortamı, SFM pazarının büyümesini arttıran ticari üretim için etkili bir yoldur. Primer hücreler, hücre kültüründe sınırlı bir ömre sahiptir. Hücre kültürünün

amacıyla SFM'de kullanmak için optimum seviyeye sitokin ve büyüme faktörü ilavesi gerekmektedir. Primer hücre kültürü çoğunlukla, fizyolojik ve terapötik olarak değişmeden kalmakta, bu da primer hücre kültürünün SFM pazarında benimsenmesini geliştirmektedir (Persistence Market Research, 2018).

### 2.2.3. Biyofarmasötik Üretimi

Özellikle hücre kültürü sistemlerinde üretilen viral aşular ve biyobenzerler günümüzde SFM'lerin en yaygın kullanıldığı biyoteknolojik endüstriyel alanlardır (Bioplan, 2018). CHO hücreleri, büyük ölçekli rekombinant protein üretimi için dünyada en yaygın kullanılan memeli hücreleridir. Bu hücreler stabil ve doğru glikolizasyonu sağlayabilir ve bu nedenle doğal proteinin *in vitro* olarak daha hassas bir şekilde sunulmasını sağlarlar. CHO hücreleri, farklı karmaşık biyolojik makro moleküllerin ideal konakçılarıdır. Verimliliği artırmak, besin taleplerini karşılamak ve hücre kültüründe toksik üretimi en aza indirmek için hücre kültürü ortamının optimizasyonu bu süreçte kritik bir rol oynamaktadır (Xie and Wang, 1994a; Xie and Wang, 1994b; Zhou et al., 1995).

Bu nedenle, endüstride kullanılan CHO hücreleri için Ar-Ge çalışmaları sonucu birkaç ticari SFM geliştirilmiştir ve piyasada mevcuttur. Ancak, bunların kompozisyonları özeldir ve fiyatları pahalı olduğu için pek kullanılmaz. Bunun nedeni, farklı CHO hücre hatları farklı besin gereksinimlerine sahip olması ve tüm hücre hatları için geçerli evrensel SFM'lerin mevcut olmamasıdır. Bu nedenle, hücre büyümesini en üst düzeye çıkarmak için her bir bireysel hücre dizisine spesifik SFM geliştirilmesine her zaman ihtiyaç duyulmaktadır.

SFM pazarındaki CHO hücre kültürü ortamının 2019'da 22.3 milyon \$ olması beklenmektedir. Ayrıca endüstriyel ilaç firmalarının artan sayıda SFM satın alma sözleşmeleri yapması üretici konumundaki firmaların SFM pazarını daha da genişleteceği öngörülmektedir. Biyolojik ilaç şirketleri tarafından Ar-Ge harcamalarının artmasıyla birlikte de yeni biyolojik ürünlerin geliştirilmesi SFM pazarının gelir üretimini de arttırması beklenmektedir. 2016 yılında, ABD'nde bulunan biyofarmasötik şirketleri, yalnızca A.B.D.'ndeki yatırımların çoğuyla Ar-Ge'ye 90 milyar \$ fazla yatırım yapmıştır (Persistence Market Research, 2018).

Ülkemizde de önemi günden güne artan ve gelişmekte olan bu endüstriyel üretim alanlarında düşük maliyetli yüksek verimlilikte SFM ortamlarına ihtiyaç vardır. Biyofarmasötik ilaç endüstrisi sürekli gelişmektedir. Biyofarmasötikler için dünya pazarı 250 milyar \$'ın üzerinde ve hızla büyümeye devam etmektedir. Rekombinant protein terapötiklerinde dünya pazarı, 150 milyar \$ değerine ulaşmıştır. Yeni endikasyonlar için yeni ürünler, pazar büyümesini teşvik etmekte ve özellikle uluslararası olmak üzere pazarların genişlemesi, genel pazar büyümesini desteklemeye devam etmektedir (Bioplan, 2018).

Biyofarmasötik endüstrisinin sürekli genişlemesi, hücre kültürü ortamı için üretim ve tedarik zinciri tutarlılığı konusunda artan bir talep yaratmaktadır. Mevcut piyasa eğilimleri, tedarik edilen medyanın büyük ölçekte toz formatında olduğunu göstermektedir. Ancak kullanıma hazır sıvı ortamlar, altyapı yatırımlarına büyük sermaye yatırmak istemeyen daha küçük ölçekli şirketler tarafından kullanılması muhtemel oldukları için pazar payını korumaktadır. Sıvı formülasyonları işlemek için gerekli tesisler toz odaklı ortamdaki ortamdaki daha az karmaşıktır (McGillicuddy et al., 2018).

Kültürlenmiş hücrelerin protein üretimini arttırmak, biyo-imalat endüstrisinde ortak bir amaçtır. Bu genellikle hücre çoğalmasını ve protein üretimini dengelemek için serumsuz koşullarda hücre hatlarının optimizasyonu ile gerçekleştirilir. SFM, belirli prensiplere dayanarak optimize edilmiştir. Orijinal SFM 1960'larda Ham tarafından yapılmıştır. Hücrelerin büyümesi için gereken aminoasitleri, vitaminleri ve tuzları eklemeye dayanıyordu. Aynı kavram, günümüzde genellikle temel ortam olarak kullanılmaktadır, ancak teknoloji geliştikçe, analiz yöntemleri de gelişmektedir (Elhofy, 2016).

### **2.2.3.1. Biyofarmasötik Üretiminde recCHO Hücrelerinin Kullanımı ve Önemi**

İnsan dokusunun plazminojen aktivatörünün (Genentech firması tarafından) 1986'da rekombinant memeli hücrelerinden ilk terapötik protein olarak onaylanması ile başlayan endüstride memeli hücrelerinin kullanımı zamanla biyofarmasötik üretimler için vazgeçilmez olmalarını tetikledi. Bu anlamda mikrobiyal, böcek, transgenik hayvan ve bitkiler gibi çeşitli alternatif ekspresyon sistemleri mevcut olmasına rağmen, memeli hücreleri, terapötik proteinlerin ticari üretimi için büyük ve önemli yer tutmaktadır (Kim et al., 2012). Bebek hamster böbrek hücreleri (BHK), fare miyelom türevli NS0, insan embriyonik böbrek (HEK-293) hücreleri ve insan retina türevli PerC6 hücreleri gibi diğer birçok memeli hücre hattının mevcudiyetine rağmen, üretilen tüm rekombinant terapötik proteinlerin yaklaşık %70'inin üretimi CHO hücrelerinde yapılmaktadır (Jayapal et al., 2007).

HEK-293 ve CHO hücreleri, süspanse veya monolayer kültürler olarak muhafaza edilebilir. Ancak ölçek büyütme ve kullanım kolaylığı açısından süspanse kültür özellikle tercih edilir. Her iki hücre hattı da ökaryotik proteinlerde yüksek seviyede üretime ve post translasyonel modifikasyonları gerçekleştirme

özelliklerine sahiptir. Bu iki hücre hattının da süspanse kültürlerinin ikilenme süresi 24 saatten daha kısa bir sürede gerçekleşir ve kültür koşullarına bağlı olarak  $5 \times 10^6$  hücre/ml konsantrasyondan daha yüksek hücre yoğunluğuna ulaşabilmektedirler (Hunter et al., 2018).

CHO hücrelerinin bu anlamda yaygın kullanımını genel olarak dört ana sebep altında toplanabilir. Bunlardan ilki CHO hücrelerinin son yirmi yıl boyunca güvenli konakçılar olduğu kanıtlandığı için, üretimi yapılan terapötik proteinlerin FDA gibi düzenleyici kurumlar tarafından onaylanması daha kolaydır. İkincisi, protein üretimi için memeli hücrelerinin kullanılmasının dezavantajlarından biri olan düşük verimlilik, CHO hücrelerinde gen amplifikasyonu ile aşılabılır. CHO hücrelerinde, dihidrofolat redüktaz (DHFR) esaslı veya glutamin sentetaz (GS) esaslı gen amplifikasyonu gibi güçlü gen amplifikasyon sistemleri mevcuttur. Üçüncüsü, CHO hücreleri verimli post-translasyonel modifikasyon kapasitesine sahiptir ve insanlarda hem uyumlu hem de biyoaktif olan glikoformlu rekombinant proteinler üretirler. Son olarak, CHO hücreleri, biyoreaktörlerde büyük ölçekli kültürler için tercih edilen bir özellik olan serumsuz süspanسیون koşullarında üremeye kolayca adapte edilebilir. Halen, 10.000 L ölçeğin üzerindeki karıştırmalı tank biyoreaktörleri, terapötik antikor üreten rekombinant CHO (recCHO) hücrelerinin serumsuz kültürleri için kolaylıkla kullanılmaktadır (Kim et al., 2012; Hunter et al., 2018).

### **2.2.3.2. Endüstriyel Üretim Amaçlı Yüksek Verimlilikteki Serumsuz Besin Ortamı Geliştirilmesi**

SFM, hormon karışımı, büyüme faktörleri, bağlanma faktörleri ve bağlayıcı protein karışımı ile oluşturulan bazal ortamdan oluşur. Bu karışımlar ticari olarak temin edilebilir ve serum ikameleri olarak kullanılabilir (Keen ve Rapson, 1995). Bitkisel kaynaklı protein hidrolizatlarının, serum ve hayvan kaynaklı bileşenlerin yerini tutabilecekleri literatürde yer almaktadır (Pazos et al., 2004). Ancak, hidrolizatlar doğası gereği karmaşıktır ve tam olarak tanımlanmamıştır. Kültür ortamının oluşturulmasındaki yeni adımlardan biri, sadece hayvansal kaynaklı bileşenlerden arındırılmış değil, aynı zamanda kimyasal olarak tanımlanmış, yani her bir bileşenin miktarının bilindiği anlamına gelen bir kültür ortamı geliştirmek olmuştur. Gelişmiş bir tanımlanmış kültür ortamının geliştirilmesi ise önemli zorlukları beraberinde getirir. Çünkü kültür ortamındaki bileşenler, hücre metabolik yollar ile sık sık etkileşime girer. Ayrıca, besin gereksinimleri hücrenin kullanıldığı sisteme göre değişiklik gösterir. Protein ekspresyonu ile

ilgileniliyorsa, rekombinant proteinleri eksprese eden yüksek yoğunluklu protein eksprese eden kültürlerin büyümesini destekleyici uygun bileşenleri içermelidir, buna karşın klonal hücre hattının geliştirilmesi için ise, hücrelerin büyümesini çok düşük yoğunluklarda teşvik etmelidir (Hunter et al., 2019).

### **2.2.3.3. Doğal Biyoaktif Moleküllerin SFM Takviyesi Olarak Kullanım Potansiyeli**

Serum ikamesi olarak kullanılabilir ucuz doğal bir molekülün SFM’de kullanım potansiyeli, üretimi daha düşük maliyetli yapabilmeye imkân sağlayabilmektedir. Bitkilerden elde edilen doğal ürünler eski zamanlardan beri yaygın olarak yaraların tedavisinde kullanılmaktadır. Bitki ekstraktlarının kolayca erişilebilir ve nispeten güvenli olması nedeniyle, deri patolojilerini önlemek ve bunlarla mücadele etmek için doğal bileşiklerin kullanılmasına giderek artan bir ilgi vardır (Korkina et al., 2012; Dev et al., 2019; Gaspar-Pintilieşcu et al., 2019).

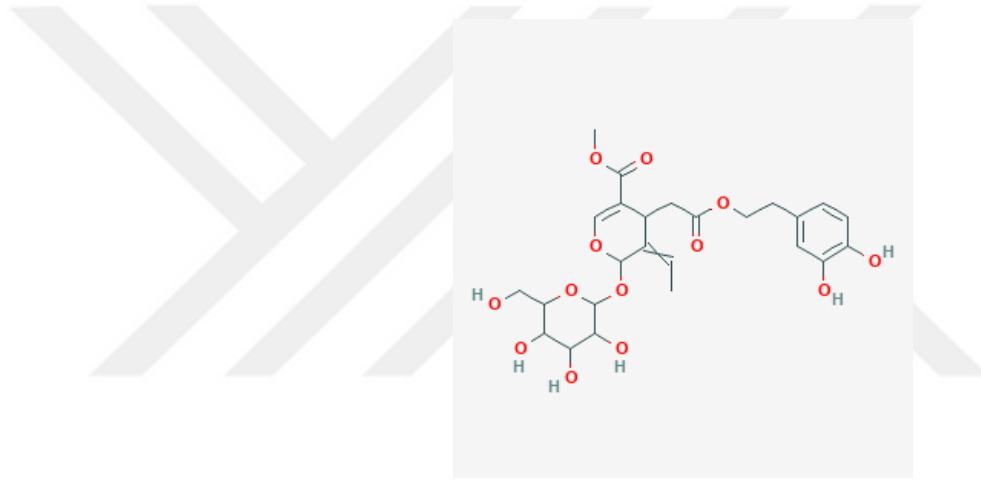
Yara iyileştirici özelliği olan bazı biyoaktif moleküllerin hücrelerdeki mitojenik aktiviteyi artırması sebebiyle üretim ortamına eklenerek proliferasyonu artırma özellikleri bulunmaktadır (Yang et al., 2015).

#### **2.2.3.3.1. Oleuropein**

Zeytin yaprağı, terapötik aktif bileşikler için önde gelen kaynaklardan biridir. Çeşitli çalışmalarda zeytin yaprağı ekstraktının (OLE) oleuropeositler, flavonlar, flavonoller ve fenollerden oluştuğu sonucuna varılmıştır (Altıok et al., 2008; Benavente-Garcia et al., 2000). Bu polifenolik yapı, serbest radikalleri temizlemek için en etkili doğal bileşiklerden biridir. Çalışmalar, koroner ve nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi oksidatif strese bağlı tıbbi konularda potansiyel bir terapötik olabileceğini göstermektedir (Lee and Lee, 2010). Ekstrede en bol bulunan fenolik bileşik ise zeytin ağacı olarak bilinen *Olea europea*’nın da ana bileşeni olan oleuropeindir (Ötleş ve Özyurt, 2012). Oleuropein bileşiği ilk kez 1908 yılında Bourquelot ve Vintilesco tarafından keşfedilmiş ve bu bileşiğin yapısı ise 1960 yılında tanımlanmıştır (Fernández et al., 1997). Antioksidan, anti-enflamatuar, antikanser, antimikrobiyal, antiviral, nöroprotektif etkileri bulunmaktadır (Omar, 2010). Ekstrakt, uzun süreli antibiyotik kullanımı nedeniyle fırsatçı enfeksiyonlara karşı yara iyileşmesinde kullanılabilir; *Klebsiella*, *Pseudomonas* ve *Escherichia coli* (Markin et al., 2003; Bayçın et al., 2007) gibi özellikle dirençli türlere karşı antimikrobiyal



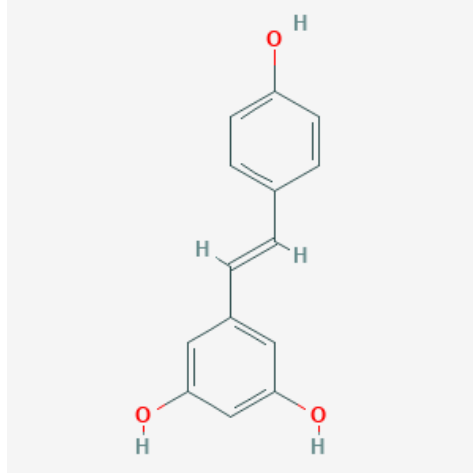
aktivite gösterebilmektedir. OLE'nin ham formda ve ekzojen stres altında *in vitro* yara iyileşmesi modelinin bir özelliği olan hücre göçü üzerinde etkisini göstermeyi amaçlayan bir çalışmada sitotoksik olmayan OLE konsantrasyonlarının, hücre göçünü teşvik ederek yara iyileşmesine katkı sağladığı ortaya koyulmuştur. Eksojen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> altında gerçekleştirilen yara analizi, düşük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve ham OLE konsantrasyonlarının (1 µg/ml) kombinasyonunun hücre göçünü ve yaranın kapanmasını desteklediği gösterilmiştir. Bu amaçla çalışmanın kullandığı OLE fraksiyonunun konsantrasyonları 1, 10 ve 50 µg/ml'dir. 1 ve 10 µg/ml OLE konsantrasyonları yaranın tamamen kapanmasını sağlamıştır (Erdoğan et al., 2017). Yara iyileşmesinde OLE kullanılarak yapılan pansumanın diyabetik ve diyabetik olmayan yaralarda klasik yara pansumanına göre daha etkili olduğu da belirtilmektedir (Samancıoğlu et al., 2016).



Şekil 2.2.Oleuropeinin molekül yapısı (PubChem, 2019)

### 2.2.3.3.2. Resveratrol

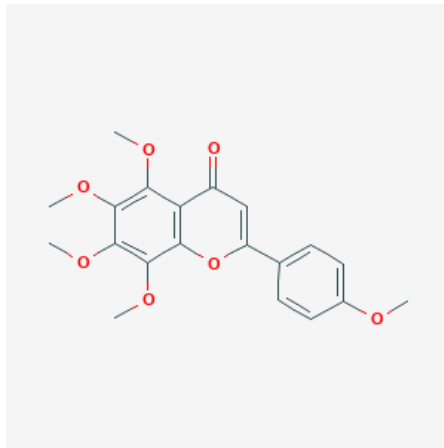
Üzüm, yerkıstığı, kakao, çilek ve kırmızı şarapta bulunan doğal bir polifenol olan resveratrol meme kanseri başlangıcını önleyebilen, kemo-önleyici bileşik olarak bilinmektedir (Corre et al., 2005). Her ne kadar HER2 aşırı ekspresyonu agresif meme kanseri alt tiplerinin bir işareti olarak kabul edilse de vahşi tip HER2 ile birlikte eksprese edilen  $\Delta 16$ HER2 ek varyantının (ekson-16 eksik) büyük bir katkısının olduğuna da işaret edilmektedir. Resveratrolün bu anlamda etkisinin incelendiği bir çalışma gerçekleştirmiş ve resveratrolün hem primer tümörlerde hem de metastazlarda  $\Delta 16$ HER2 protein seviyelerini arttırarak HER2 karsinogenezini teşvik ettiği belirlenmiştir (Andreani et al., 2017). Bu molekülün bu amaçla Her2 eksprese eden 4T1.2-Her2/Neu hücrelerine etkisi incelenmiştir.



Şekil 2.3.Resveratrolün molekül yapısı (PubChem, 2019)

### 2.2.3.3.3. Tangeretin

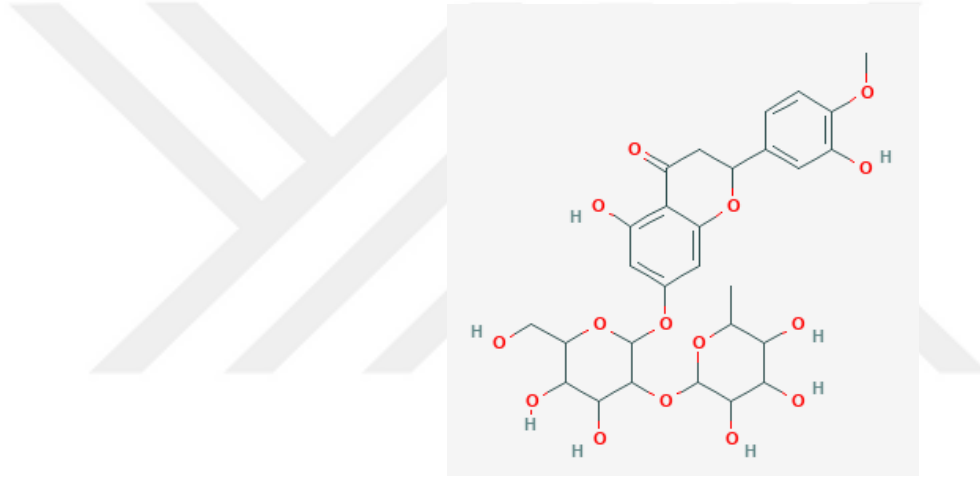
Narenciye kabuğundaki doğal bir polimetoksiflavon olan tangeretin çeşitli antikanser özellikleri sergilediği bilinmektedir. PC3 hücrelerinin tangeretin ile muamele edildiği bir çalışmada PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunun reseptörlerinin azalması ile sonuçlandırıldığı ve PC3 hücrelerinde epitelyal-mazenkimal transisyonunun yeniden düzenlenmesine neden olduğu sonucuna varılmıştır (Zhu et al., 2017). Bunun yanında narenciye kabuğu ekstraktının yara iyileşmesine pozitif etkisinin olduğu çalışmalar bulunmaktadır (Ahmad et al., 2018).



Şekil 2.4.Tangeretin molekül yapısı (PubChem, 2019)

#### 2.2.3.3.4. Neohesperidin

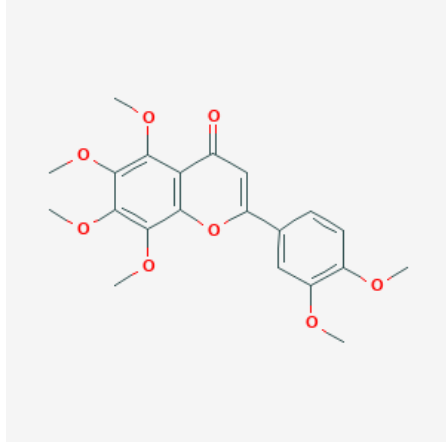
Hesperidin, çeşitli narenciye türlerinde bol miktarda bulunan flavonoiddir (Emim et al., 1994; Kawaguchi et al., 1997) ve anti-diyabetik, anti-enflamatuar, anti-mikrobiyal, analjezik, antifungal, hepatoprotektif, antioksidan, antialerjik, anti-kanser gibi birçok biyolojik fonksiyona sahiptir (Li et al., 2018). Aynı zamanda güçlü yara iyileşme aktivitesine sahiptir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada kutanöz yara iyileşmesinde hesperidinin kronik diyabetik ayak ülserlerinde yara iyileşmesini artırmak için VEGF-c, Ang-1/Tie-2, TGF- $\beta$  ve Smad-2/3 mRNA ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla anjiyogenez ve vaskülojenezi hızlandırdığı belirtilmiştir (Li et al., 2018).



Şekil 2.5. Neohesperidin'in moleküler yapısı (PubChem, 2019)

#### 2.2.3.3.5. Nobiletin

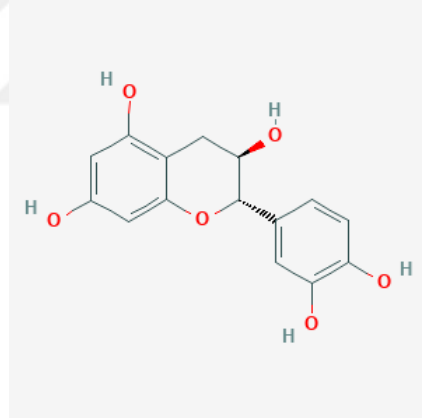
Nobiletin, narenciye cinsinde mevcut olan ve kabuklarında bolca bulunan flavondur (Li et al., 2014). Nobiletin *in vivo* biyotransformasyona uğradığı ve farklı biyoaktivite ve farmakolojik özellikleri olan metabolitler ürettiği bulunmuştur (Koga et al., 2011, Li et al., 2007). Metabolik olarak pek çok yararlı etkileri bulunan nobiletinin, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabette etkili olduğu, antikanser ve antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir (Li et al., 2014). Ayrıca *in vivo* çalışmalarda transgenik farelerin hafızalarına yararlı etkiye sahip olduğu (Onozuka, 2008), *in vitro* çalışmalarda ise SH-SY5Y hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye bağlı apoptotik ölümleri inhibe ettiği çalışmalar da mevcuttur (Akao et al., 2008).



Şekil 2.6.Nobiletinin moleküler yapısı (PubChem, 2019)

#### 2.2.3.3.6. Kateşin

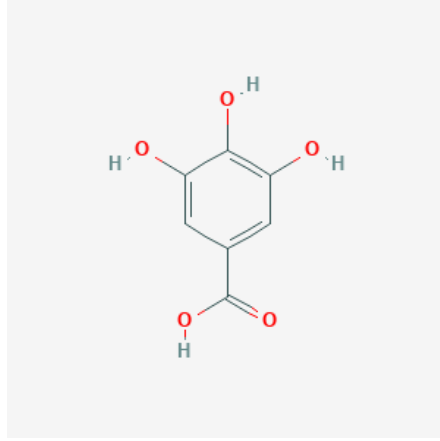
Kullanılması planlanan diğer bir bileşik olan kateşinin de anti-enflamatuar ve ciltte yara iyileşmesi etkilerini içeren güçlü bir antioksidan olduğu bilinmektedir (Kim et al., 2013).



Şekil 2.7.Kateşinin moleküler yapısı (PubChem, 2019)

#### 2.2.3.3.7. Gallik asit

Gallik asit (GA), mazı, sumak, güvercinağacı, çay yaprağı gibi çeşitli bitkilerde bulunan bir fenolik asit olan 3,4,5-trihidroksibenzoik asittir (Ng et al., 2004; Ma et al., 2003). Bu amaçla GA'nın çeşitli koşullarda hücre göçü üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada kronik yaralar için iyileştirici bir potansiyele sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Yang et al., 2016).



Şekil 2.8.Gallik asitin moleküler yapısı (PubChem, 2019)

### 2.3. Her2/Neu Proteini ve Farmasötik Önemi

Reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler), bir dizi alt sinyal yollarını aktive ederek hücre çoğalması, farklılaşma, metabolizma ve hayatta kalma (Yarden and Shilo, 2007; Lemmon and Schlessinger, 2010) dahil olmak üzere önemli biyolojik işlemleri düzenler. RTK'nin aktivasyonu, büyüme faktörlerinin ve hormonların bağlanması sonrasında oligomerizasyon ve trans otoposforilasyon ile başlar, daha sonra kompleks substrat protein fosforilasyonu (Chen and Hung, 2015; Schlessinger, 1988) ile alt sinyal yolları başlatılır.

RTK'lerden ERBB ailesi 4 üyeden oluşur. EGFR (aynı zamanda ERBB1 / HER1 olarak da bilinen epidermal büyüme faktörü reseptörü), ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3) ve ERBB4 (HER4) olarak isimlendirilirler. Bu reseptörler hücre dışında bir ligand bağlanma alanı içeren sitoplazmik membrana bağlı proteinlerdir. Korunmuş EGF motifi içeren belirli ligandlar herhangi bir ligandla doğrudan bağlanmayan HER2 hariç, ERBB reseptörlerine bağlanabilir (Citri and Yarden, 2006; Schneider and Wolf, 2009). Bu ligandlara “neu differentiation” veya “heregulin” adı verilir (Ross and Fletcher, 1999). Ligand bağlanmasının ardından, çeşitli kombinasyonlardaki ERBB reseptörleri arasındaki homo ve heterodimerik etkileşimler, hücre içi tirozin kinaz alanı üzerinde otoposforilasyona neden olur. Proliferasyon, farklılaşma, mobilite, apoptoz, sağkalım, göç, yapışma, metastaz ve anjiyogenez gibi yolları düzenleyen; PI3K / AKT, Ras / MEK / ERK, PLC / PKC ve JAK / STAT gibi bir dizi alt sinyal yolunu tetikler (Yarden and Sliwkowski, 2001).

c-erbB-2 geni ilk kez etil-nitrosoüre ile indüklenerek oluşturulan, sıçan nöroblastomalarında transforming onkogen olarak tarif edildiği için “neu” diye adlandırılmıştır (Evans et al., 1994). c-erbB-2 (HER- /Neu) geni, büyüme faktör reseptörleri ile yakın ilişkili, dört kişilik RTK ailesinin elemanıdır ve reseptör tirozin kinaz ailesinden 185-kilodalton ağırlığındaki transmembran proteinini kodlar (McCann et al., 1991).

ErbB2, c-erbB2 veya HER2/Neu olarak da bilinen İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (HER2), diğer HER üyeleri ile heterodimer oluşturmak için tercih edilmektedir. HER2'nin dahil olduğu heterodimerizasyon, HER ailesi tarafından oluşturulan tüm dimerler arasında en güçlü sinyal iletim yoludur (Rubin and Yarden, 2001).

HER2'nin aşırı ekspresyonu temel olarak HER2 gen amplifikasyonuna bağlanır ve HER2 sinyal ağının yapısal aktivasyonu ile sonuçlanır. HER2'nin mutasyonu veya aşırı ekspresyonu, metastazın yanı sıra direkt olarak tümör oluşumuna yol açabilir. Bununla birlikte, HER2 sıklıkla meme kanseri, mide kanseri, yumurtalık kanseri ve prostat kanserinde aşırı ifade edilir (Tai et al., 2010) ve meme kanserlerinin yaklaşık %20-30'unda gözlenir (Slamon et al., 1987; Pegram and Slamon, 2000).

Tümörgenezdeki rolünün keşfedilmesinden hemen sonra HER2, kanser tedavisi için hedef alınmıştır. HER2 reseptörünün kanser tedavisi için önemli bir terapötik hedef haline gelmesinin birkaç nedeni vardır. İlk olarak, upregüle edilmiş HER2 seviyesi, tümör oluşumuna neden olur ve HER2 gen ekspresyonunun seviyesi, kanser hücrelerinde normal yetişkin hücrelerde olduğundan çok daha yüksektir. İkinci olarak, HER2 aşırı ekspresyonu hem primer tümörlerde hem de metastazlı organlarda bulunur (Niehans et al., 1993). Dahası, HER2, HER sinyal yollarının aktivasyonundaki diğer HER reseptörleri için tercih edilen dimerizasyon ortağıdır ve HER2 içeren heterodimerler, tüm HER kompleksleri arasında yüksek mitojenik potansiyele sahiptir. HER2 dimerizasyonunun inhibisyonu, karsinogeneze neden olabilecek PI3K ve MAPK yolları da dahil olmak üzere birçok hücre içi sinyal kaskadının aktivasyonunu önler (Franklin, et al., 2004; Agus, et al., 2005; Nahta, et al., 2006). Bu amaçla ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış veya meme kanseri için klinik denemelerde bulunan HER2 hedefli tedaviler arasında Mab'lar, örneğin trastuzumab (Herceptin), pertuzumab (Perjeta) ve trastuzumab emtansin

(Kadcyla) bulunur. Trastuzumab (Herceptin), FDA tarafından meme kanseri için 1998'de onaylanan ilk tedavi hedefidir (Carter et al., 1992).

Her2 proteininin farmasötik önemine bakılacak olursa kanser aşılardan biri olan NeuVax karşımıza çıkmaktadır. NeuVax tümörle ilişkili spesifik antijenleri (TAA'lara) bağışıklık sistemine tanıtmak için kullanılmaktadır. Bu amaçla NeuVax, HER2'den türetilmiş peptidleri veya proteinin küçük parçalarını içerir. NeuVax bir hastanın vücuduna enjekte edildiğinde, bağışıklık sistemi bu peptidleri bir antijen olarak tanır. HER2 antijenini eksprese eden tümör hücrelerini tanımlamak ve yok etmek için tasarlanmış bir tür bağışık yanıt oluşumu sağlar (Immuno-oncology news, 2013).

Her2 proteininin farmasötik kullanımına bir başka örnek vermek gerekirse, enzime bağlı immünosorbent analizi (ELISA) biyolojik numunelerdeki antikorları, antijenleri, proteinleri ve glikoproteinleri ölçmek için yaygın olarak kullanılan immünolojik bir tahlildir. ELISA tahlilleri genellikle 96 gözlü pleytlerde yapılır. Antijen-antikor bağlanması sağlanarak kolorimetrik ölçüm gerçekleştirilir. Bu amaçla pleytler antijen veya antikorla kaplanarak analizi yapılacak örneklerin eklenmesi ile reaksiyonun gerçekleşmesi gözlenir. Anti-her2 analizi amacıyla kullanılan ELISA pleytleri, antijen-antikor bağlanmasının gerçekleşmesi amacıyla Her2 proteini ile kaplıdır (Alpha diagnostic, 2019).

#### 2.4. TNF- $\alpha$

Sitokinler antijenlere, mikroorganizmalara veya diğer uyaranlara cevap olarak üretilen küçük polipeptitlerdir (8-80 kD). Bağışıklık ve enflamatuar reaksiyonları düzenleyebilir, endokrin ve sinir sistemleri ile etkileşime girebilirler. Önceden biçimlendirilmediklerinden veya depolanmadıklarından, gen transkripsiyonuyla başlatılan sentezden sonra hücresel aktivasyonun bir sonucu olarak sınırlı olaylarda salınırlar. Sitokinlerin eylemleri çoğu zaman pleiotropiktir. Pleiotropizm, bir sitokinin farklı hücre tipleri üzerinde hareket etme yeteneğini ifade eder. TNF- $\alpha$ , vücudun hemen hemen tüm hücrelerinde bulunan, reseptörlere bağlanabilir (Brotas et al., 2012; Steinhoff and Luger, 2005).

Tüm sitokin reseptörleri, bir veya daha fazla transmembran proteininden oluşur. Hücre dışı kısım sitokinlere bağlanır ve intrasitoplazmik kısım sinyal yollarını başlatır. Çoğu hücre sitokinler için reseptör eksprese eder ve spesifik bir reseptöre bağlanması yüksek afinite gösterir buna bağlı olarak lenfositlerin Th1,

Th2 veya Th17 hücrelerine farklılaşmasını, hücre çoğalması veya apoptoz gibi çeşitli biyolojik etkilerini tetikleyebilmektedir (Abbas and Lichtman, 2005).

TNF, vücudun önemli bir konak savunma molekülüdür. TNF, dakikalar içinde herhangi bir yaralanma veya stres sonrası kanda görülen ilk sitokindir. IL-1 veya IL-6 gibi diğer pro-enflamatuar araçlar çok daha sonra ortaya çıkar ve IL-1 veya IL-6'nın çoğunun TNF'nin önceki salımına bağlı olduğuna dair kanıtlar vardır (Fong et al., 1989).

TNF- $\alpha$ , cilt lezyonlarında ve püstüler lezyonlu hastaların serumunda, psoriatik artritli hastaların sinovyal sıvısında artan ekspresyonu nedeniyle en çok çalışılan sitokindir. Bunun yanında spesifik inhibitörlerinin terapötik etkinliği de bulunmaktadır (füzyon proteinleri, monoklonal antikolar) (Brotas et al., 2012).

Bu sitokin on dokuzuncu yüzyılda dolaylı olarak keşfedilmiştir. 1983 yılında William Coley adlı bir cerrah bazı kanser hastalarının bakteriyel bir enfeksiyon geliştirdiklerinde tümör nekrozu ve kanaması olduğunu fark ettikten sonra kanser için bir tedavi bulmayı umarak, bakteriyel kültür süpernatantlarını hastalara enjekte etmiştir. Tümör gerilemesine rağmen, hastalar toksinlerin neden olduğu ciddi yan etkilere maruz kalmıştır. Ayrı olarak, 1892'de Richard Pfeiffer, gram negatif mikroorganizmaların toksik kaynağını izole etmeye çalışmıştır (Weaver et al., 2010).

Monositler ve makrofajlar, TNF- $\alpha$  üreten başlıca hücrelerdir ancak diğer immün hücrelerden NK hücreleri, bazofiller, eozinofiller, nötrofiller T ve B lenfositler ayrıca gliyal hücreler, nöronlar, osteoblastlar, melanositler, düz kas hücreleri ve spermatojenik ve tümör hücreleri de sentezleme yeteneğine sahiptir (Vassalli, 1992; Bazzoni and Beutler, 1996).

Bu polipeptit, enfeksiyon, travma ve enflamasyonun yanı sıra konakçı savunma ve doku homeostazında aracıdır. TNF- $\alpha$

- Hücre büyümesini, farklılaşmasını ve metabolizmasını modüle eder,
- Karaciğer lipogenezinin uyarılmasını engelleyerek ve lipolizi uyararak kaşeksiye yol açar,
- Dejenere hücrelerin, neoplastik hücrelerin veya virüs bulaşmış hücrelerin apoptozunu başlatır,



- Enflamasyonu oluşturur (Tracey et al., 1989).

TNF- $\alpha$  'nın temel fizyolojik fonksiyonu, endotel hücrelerinde adezyon moleküllerini artırarak, damar yüzeyini daha yapışık hale getirerek, lökosit alımını enfeksiyon bölgelerine uyarmaktır. Bu sekansın tamamı, mikroorganizmalara lokal cevap için kritiktir (Schottelius et al., 2004).

TNF- $\alpha$  gen polimorfizmi ve bazı eksojen uyarılar, hastalıkların başlangıcı ile bağıntılı olabilir. Septik şokta, TNF- $\alpha$ 'nın serum konsantrasyonu, gram-negatif bakteri enfeksiyonunun şiddetinin bir işareti olabilir, çünkü bakteriyel lipopolisakkarit (LPS veya endotoksin) salınımı için en güçlü uyarıcıdır (Tracey et al., 1986).

TNF- $\alpha$  ayrıca pıhtılaşma inhibitörü olan trombomodülünü inhibe eder ve yaygın damar içi pıhtılaşmaya katkıda bulunur (Schottelius et al., 2004).

TNF- $\alpha$  ayrıca artmış vazoaaktif bağırsak peptid reseptörlerine yol açar. Bu, enflamatuvar sitokinlerin ve keratinosit proliferasyonunun artmasını teşvik eder. Ayrıca nitrik oksit üretimini artırarak vasküler endotel kaynaklı büyüme faktörünün (VEGF) oluşumunu uyarır (Sirsjö et al., 1996).

#### **2.4.1. Anti-TNF- $\alpha$ Antikorları ve Farmasötik Açıdan Önemi**

Çeşitli immünoinflamatuvar hastalıkları olan hastaların tedavisi, özellikle enflamatuvar sitokinleri ve sitokin reseptörlerini hedefleyen genetik olarak tasarlanmış antikorların kullanımından önemli ölçüde fayda sağlamıştır. İlk örnek, insan sitokini, tümör nekroz faktörü- $\alpha$ 'yı (TNF) spesifik olarak antagonize eden antikor yapılarının kullanılması olmuştur. Çoğu durumda, bu biyofarmasötikler, romatoid artrit (RA) ve ankilozan spondilit, Crohn hastalığı (CD) ve ülseratif kolit, sedef hastalığı, süpüratif hidradenit, diyabetik maküler ödem ve yaşa bağlı gözde maküler dejenerasyon gibi hastalıkların durumunu önemli ölçüde iyileştirir (Willrich et al., 2014).

Halen kullanılan anti-TNF-antikorları arasında kimerik insan/fare Mab, infliksimab (Remicade®), insan Mab'ları, adalimumab (Humira®) ve golimumab (Simponi®), Mab/Fab fragmanı, certolizumab pegol (Cimzia®) bulunur. Hepsi hücrel TNF reseptörlerine TNF bağlanması yoluyla başlatılan etkileri inhibe ederler. Etkiler çok sayıda hastada etkili olmuştur ve anti-TNF biyofarmasötikleri

artık birçok ülkede en ağır tıbbi harcamalardan birini oluşturmaktadır (Bendtzen, 2015).

Anti-TNF- $\alpha$  ajanları, çeşitli bağışıklık aracılı enflamatuar hastalıklarda uygulamaya yönelik çalışmalar nedeniyle önemli ve umut verici ilaç grubuna dahil edilir. Buna bağlı olarak anti-TNF- $\alpha$  ajanlarının biyobenzerlerine ait pazar payları önem kazanmaktadır. Bu nedenle, biyofarmasötik endüstrisinde daha yüksek etkinliğe sahip daha ucuz Mab üretimi sağlayan yeni stratejiler geliştirmeye hala ihtiyaç vardır (İz et al., 2018).

Yapılan bu çalışma kapsamında endüstriyel ölçekte proliferasyonu artırıcı serum ikamesi olarak kullanılabilir eldesi ucuz doğal bir molekül, üretimi daha düşük maliyetli yapabilmeye imkân sağlayabilmektedir. Protein üretimi için büyüme ortamında protein yapısındaki serumun olması alt akım işlemlerinde zorluk getireceği için bu sorunların üstesinden gelmek amaçlanmaktadır. Yapılan literatür taramaları sonucunda yüzeyinde bu proteini eksprese eden hücreler ve doğal biyoaktif moleküllerin formülasyona eklenmesi ile büyüme kinetiklerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan moleküller ucuz ve yüksek miktarlarda elde edilmekte ve ortama düşük konsantrasyonlarda eklenerek etki göstermeleri açısından bu konudaki çalışmalara öncü niteliği taşımaktadır.

### **3. Materyal, Metot**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler**

DMEM-F/12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (ThermoFisher Scientific, ABD), EX-CELL Advanced CHO Fed-batch Medium (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD), Serox SFM (Serox GmbH, Almanya), Fetal Sığır Serum (FBS) (Gibco, ABD), Penisilin-streptomisin Pen/Strep (Serox GmbH, Almanya), L-glutamin (Serox GmbH, Almanya), %99 saflıkta azot gazı (EgeVet, Türkiye), 25cm<sup>2</sup>-75cm<sup>2</sup>-175cm<sup>2</sup> T-flask (ThermoFisher Scientific, ABD), Tripsin-EDTA (%0.25) (Gibco, ABD), L-glutamin (200mM) (ThermoFisher Scientific, ABD), PBS (10X) (ThermoFisher Scientific, ABD), DMSO (ThermoFisher Scientific, ABD), HRP Goat Anti-human IgG (konjugat

solüsyonu) (ThermoFisher Scientific, ABD), TNF- $\alpha$  (Diacclone, Fransa), Tripan mavisi (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD), Triton X-100 (VWR, ABD), MTT (Merck, Darmstadt, Almanya), hemositometre (Marienfeld, GmbH, Almanya), Prof. Dr. İhsan Çalış tarafından temin edilen Oleuropein (Near East University), Biyolog Fatih Karabey tarafından temin edilen “Resveratrol, Tangeretin, Neohesperidin, Nobiletin, Gallik asit, Kateşin”, Tek kullanımlık plastik malzeme (15 ve 50 ml’lik santrifüj tüpü, pipet, petri, 96 gözlü pleyt, kriyotüp (Kırgen, USA))

### 3.1.2. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücreler

Prof. Dr. Micheal Kershaw tarafından 4T1.2-Her2/Neu lentiviral vektör ile oluşturulmuş (yeşil floresan protein (GFP) Her2/Neu proteini ifade eden fare meme kanseri hücre hattı) (Kanser İmmunoloji Programı, Peter MacCallum Kanser Merkezi, Victoria, Avustralya), TNF- $\alpha$ ’ya spesifik Mab üreten rekombinant CHO hücre hattı (recCHO) Dr. Duygu Ayyıldız Tamış tarafından temin edilmiştir.

### 3.1.3. Cihazlar

Sınıf 2 laminar akışlı biyogüvenlik kabini (ThermoFisher Scientific, ABD), Heracell 240 CO<sub>2</sub> inkübatör (ThermoFisher Scientific, ABD), ES-20 Orbital Shaker İnkübatör (Biosan, Türkiye), BD Accuri C5 Flow Sitometri (BD Biosciences, ABD), Su banyosu (LKTC-L Controller, Türkiye), Vorteks Karıştırıcı (ThermoFisher Scientific, ABD), NF 800 Santrifüj (Nüve, Türkiye), -86 °C Dondurucu (ThermoFisher Scientific, ABD), Derin Dondurucu (Uğur, Türkiye), +4 °C Buzdolabı (Arçelik, Türkiye), ELISA okuyucu (Versamax Microplate Reader, ABD), 2L Spinner flask (Pfeiffer, GmbH, Almanya), Manyetik karıştırıcı (Pfeiffer Cell Control, GmbH, Almanya), Ters faz mikroskop (Zeiss, ABD), soğutmalı mikrosantrifüj (Mikro 200R) (Hettich, GmbH, Almanya), Işık mikroskobu (Olympus, Hamburg, Almanya), Leica DM4000 B LED Floresan mikroskobu (Wetzlar, Almanya), Accu-Chek Performa Nano glukometre (Roche, Basel, İsviçre)

## **3.2. Metot**

### **3.2.1. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Kültürü ve Devamlılığı**

#### **3.2.1.1. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Üretim Ortamı ve Koşulları**

Bu çalışmada hücre yüzeyinde Her2/Neu proteinini yeşil floresan protein işaretli (GFP) şekilde eksprese eden fare meme kanseri hücre hattı olan 4T1.2-Her2/Neu hücreleri kullanılmıştır. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin stasyonere kültürde üretimi için DMEM-F/12 besin ortamı kullanılmıştır. Hücreler %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren kültür ortamı içerisinde başlangıç hücre sayısı  $3 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde  $75 \text{ cm}^2$  T-flask kültür kaplarında  $37^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış %95 nemli atmosferde %5  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücre canlılığının devamı için hücreler kültür kaplarında 2-3 günde bir başlangıç hücre sayısı  $3 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde pasajlanmıştır (Özeverel, 2018).

#### **3.2.1.2. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Hücrelerin Çözdürülmesi**

Çözdürülecek olan kriyotüp azot tankından çıkarılıp hızlıca  $37^\circ\text{C}$ 'lik su banyosunda %75'i çözünecek şekilde çözdürülmüştür. Laminer hava akışlı kabinde 3 ml besin ortamı pipete çekilerek kriyotüp içeriği ile birlikte 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve pipet ile homojenize edilmiştir. Santrifüj tüpündeki hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülerek hücre pelleti üzerine 10 ml'lik besin ortamı eklenmiş ve hücreler ile homojenize edildikten sonra tüp içeriği  $75 \text{ cm}^2$  T-flaska alınarak  $37^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış %95 nemli atmosferde %5  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde inkübe edilmiştir.

#### **3.2.1.3. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Pasajlanması**

Kültür kabındaki hücrelerin ters faz mikroskop altındaki yoğunluğuna bakıldıktan sonra %80 üzerinde yoğunluğa ulaşan kültür pasajlanmak üzere kabine alınmıştır. Kültür kabındaki hücrelerden kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. 1 ml Tripsin-EDTA pipete çekilerek kültür kabına eklenmiş ve büyüme ortamının yıkaması için tüm yüzey yıkanmıştır. Daha sonra kültür kabındaki Tripsin-EDTA uzaklaştırılmıştır. 1 ml tripsin-EDTA tekrar çekilerek kültür kabına eklenmiş ve tüm yüzey yıkandıktan sonra yaklaşık 5 dk  $37^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış nemli atmosferde %5  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlemlendikten sonra büyüme ortamından yaklaşık 3 ml alınarak kültür kabına

konulmuş ve tripsin enziminin inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin tutunduğu yüzeyin yıkanması ve pipetleme amacıyla hücre içeren tripsin ve büyüme ortamı karışımı pipetlenerek yüzey yıkaması sağlanmıştır. Başlangıç hücre sayısı  $3 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde 1:4 veya 1:5 oranında pasajlanarak kültür kabına taze ortam eklemesi gerçekleştirilmiştir (Özverel, 2018).

#### **3.2.1.4. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Dondurularak Saklanması**

Hücrelerin pasaj numarasının olabildiğince düşük tutulması ve gereken denemelerin aynı pasaj sayısına sahip hücrelerle kurulması amacıyla uygun dondurma ortamı ile (%10 DMSO, %90 FBS) kriyotüplere 1 ml hacme sahip olacak şekilde ana stok ve çalışma bankası stokları oluşturulmuştur. Bu amaçla hücreler tripsinizasyon işlemine tabi tutulduktan sonra santrifüj tüpüne toplanarak 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj gerçekleştirildikten sonra süpernatant dökülmüş ve hücre pelleti üzerine uygun miktarda hazırlanmış dondurma ortamı koyularak 1 ml olacak şekilde kriyotüplere hücreler dağıtılmıştır. Kriyotüpler  $-86^{\circ}\text{C}$ 'ye 24 saatliğine kaldırılmış ve 24. saatin sonunda sıvı azot tanklarına kaldırılmıştır (Ayyıldız-Tamiş, 2010).

#### **3.2.1.5. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Mikoplazma Kontrolü ve Her2/Neu Proteininin Hücre Yüzeyinde Görüntülenmesi**

Çalışmada kullanılan 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin süreç boyunca mikoplazma kontaminasyonu gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü DAPI boyama yöntemiyle sağlanmıştır. Bu amaçla hücrelerin tutunacağı yüzeyi oluşturacak lameller %70'lik alkole batırılmış ve petrielerde kabin içerisinde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamel hücrelerin ekim yapılacağı  $34.8 \text{ mm}^2$ 'lik petri içerisine yerleştirilmiştir. T-flask içerisinde çoğalmakta olan hücreler toplanarak santrifüj tüpüne aktarılmış ve hücre yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla bir miktar örnek alınarak hücreler sayılmıştır. Bu esnada santrifüj tüpündeki hücreler 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve aynı miktar ortam hücre pelleti üzerine eklenerek pipetleme sağlanmıştır. Sayım sonucuna göre  $2-3 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde  $34.8 \text{ mm}^2$ 'lik petriye hücreler aktarılmış ve 24 saat  $37^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış nemli atmosferde %5  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyonu tamamlanan hücreler inkübatörden alınmış ve petri içindeki ortam pipetle çekilerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra petri içerisine 1 ml PBS eklenmiş ve yüzey besin ortamının uzaklaştırılması amacıyla yıkanmıştır. Eklenen PBS

pipetle çekilmiş ve petriye %100 metanol eklenmiştir ardından petri 30 dk boyunca  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra ortamdan metanol uzaklaştırılmış ve 1 ml PBS ile 1 kez yıkama gerçekleştirilmiştir. Yıkama tamamlandıktan sonra hücreler üzerine 1 ml %0.2'lik Triton X eklenerek 5 dk karıştırmalı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra ortamdan %0.2'lik Triton X uzaklaştırılarak 1 ml PBS ile hücreler yıkanmıştır. Daha sonra hücreler üzerine 1 ml %70 etanol eklenmiş ve 1 dk bekleme sağlanmıştır. %70'lik etanol uzaklaştırılmış ve 1 ml %100'lik etanol eklenmiştir. Lameller bu aşamada petri içerisinden alınmış ve peçete üzerinde hücrelerin bulunduğu bölge üste gelecek şekilde kurumaya bırakılmıştır.  $0.1 \mu\text{g/ml}$  konsantrasyona sahip DAPI boyasından  $10 \mu\text{l}$  alınarak lam üzerine damlatılmıştır ve kuruyan lamel hücrelerin bulunduğu yüzey arada kalacak şekilde lam üzerine kapatılmıştır. En az 45 dakika  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildikten sonra hücreler floresan mikroskopunda görüntülenmiştir. Hücreler GFP işaretli oldukları için Her2/Neu proteininin görüntülenmesi için herhangi bir basamak uygulanmamıştır.

### **3.2.2. Moleküllerin 4T1.2-Her2/Neu Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi**

Kullanılacak olan doğal moleküllerin (oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, gallik asit ve kateşin) farklı konsantrasyonlarda proliferasyona etkilerinin incelenmesi amacıyla MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla başlangıç hücre sayısı  $\text{ml}^{-1}$ 'de  $3 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  ve  $8 \times 10^5$  olacak şekilde 96 gözlü pleytlere hücreler  $100 \mu\text{l}$  hacimde ekilmiş ve ekimden 24 saat sonra moleküller farklı konsantrasyonlarda (25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39, 0.195, 0.097 ve  $0.049 \mu\text{g/ml}$ ) hücreler üzerine eklenerek 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda  $25 \mu\text{g/ml}$  konsantrasyondaki MTT maddesi büyüme ortamına  $20 \mu\text{l}$  eklenerek 4 saat inkübe edilmiş ve ortam uzaklaştırılarak oluşan formazan kristalleri  $150 \mu\text{l}$  DMSO'da çözülmüştür. Daha sonra  $570 \text{ nm}$ 'de ( $620 \text{ nm}$  referans filtrede) spektrofotometrede ölçüm gerçekleştirilmiştir (Mosmann, 1983; Nalbantsoy vd., 2016).

### **3.2.3. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin SFM'e Adapte Edilmesi**

4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin SFM'e adaptasyonu amacıyla  $25 \text{ cm}^2$  T-flask içerisinde kültüre alınan hücrelerin besin ortamının serum içeriği %10'dan başlayarak 2 pasajda bir yarı yarıya azaltılmıştır. Bu amaçla hücrelerin kültüre

alındıkları DMEM-F/12 besin ortamı (%10 FBS, %0.1 penisilin/streptomisin) ile 1:1 oranında serum içermeyen Excell ortamı (%1 L-glutamin, %0.1 penisilin/streptomisin) kullanılmış ve son hacim 5 ml olacak şekilde 37°C'ye ayarlanmış nemli atmosferde CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Serum içeriği %0.3'e ulaştıktan 2 pasaj sonra hücreler serum içermeyen tamamı Excell büyüme ortamında kültüre alınmaya başlanmıştır. Bu noktada SFM'e adapte edilen 4T1.2-Her2/Neu hücreleri dondurma ortamı %90 FBS, %10 DMSO olacak şekilde dondurularak kaldırılmıştır. İlk 24 saatte -86°C'de daha sonra sıvı azota aktarılarak deneme süresince kullanılmak üzere stoklanmıştır.

### 3.2.4. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Petrilerde Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi

Hücreler 1x10<sup>5</sup> hücre/ml başlangıç hücre sayısında 34.8 mm'lik petrilere 2 ml hacminde ekilmiş ve her güne iki tekrarlı olacak şekilde petriye bu işlem uygulanmıştır. Kültür ortamı olarak EX-CELL (%1 L-glutamin, %0.1 penisilin/streptomisin) kullanılmış ve her grup için her güne 2 tekrarlı petri olacak şekilde kültüre edilmiştir. Madde içermeyen Excell ortamı kontrol olarak kullanılmış aynı zamanda DMEM/F-12'de kültürlen 4T1.2-Her2 hücreleri de bu amaçla normal şartlardaki ikilenme süresinin ölçülmesi amacıyla ekilmiştir. Moleküllerin MTT ile belirlenen konsantrasyonları Excell kültür ortamına eklenmiştir. Bu amaçla oleuropein 0.195 µg/ml, resveratrol 0.391 µg/ml, tangeretin 0.391 µg/ml, neohesperidin, nobiletin, kateşin ve gallik asitin ise konsantrasyonları 0.098 µg/ml olacak şekilde kültür ortamlarına eklenmiştir. Deney setinin kurulmasıyla birlikte o gün alınan örnek 0. gün kabul edilerek her 24 saatte bir hücreler petrilere santrifüj tüpüne toplanmış ve sayım için gereken miktar örnek alınmıştır. 15 günlük kültür boyunca her gün aynı saatte Neubaur hemositometre lamı kullanılarak hücrelerin boya alıp almama özelliğine göre tripan mavisi yöntemi ile hücre sayımı yapılmıştır. Bu amaçla kültür ortamından sayım için alınan örneğin 1:5'ine denk gelecek miktarda ortama tripan mavisi eklenerek sayım gerçekleştirilmiştir. Zamana bağlı canlı hücre sayısının grafikleri çizilerek logaritmik büyüme fazındaki canlı hücre sayısı kullanılmış ve spesifik büyüme hızları ve ikilenme süreleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır (Daukste et al., 2012; Ayyıldız-Tamis et al., 2012; Nalbantsoy et al., 2011):

$$\mu = \frac{\ln(x_2) - \ln(x_1)}{\Delta t} \quad td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$\mu$ : spesifik büyüme hızı

$x_1$ : t1 anındaki hücre yoğunluğu (hücre/ml)

$x_2$ : t2 anındaki hücre yoğunluğu (hücre/ml)

$\Delta t$ : t2 ve t1 arasındaki zaman farkı

$t_d$ : ikilenme süresi



Şekil 3.1. Hücrelerin günlük sayımlarının yapıldığı hemositometre lamı



Şekil 3.2. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin 34.8 mm'lik petrilerde büyüme kinetiğinin belirlenmesi, A: kabin içerisinde deney kurulumu, B: petrilerin inkübatör içerisinde görünümü

### 3.2.5. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Petrilerde Eksprese Ettiği Her2/Neu Proteininin Ekspresyonunun Analizi

Sayım amacıyla petrilerden toplanan ve santrifüj tüpüne alınan hücreler 1000 rpm'de 5 dk olacak şekilde santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti üzerine 1 ml PBS eklenerek yıkama gerçekleştirilmiş ve yıkama işlemi 2 kez tekrar edilmiştir. Yıkaması tamamlanan hücrelere flow sitometri cihazında okuma gerçekleştirmek amacıyla 500  $\mu$ l PBS



eklenmiş ve Her2/Neu ekspresyonu mevcudiyeti ve düzeyi GFP'e bağlı FL1 kanalındaki analizlerce belirlenmiştir.

### **3.2.6. Spinner Flaskta 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Kesikli Kültürü ile Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi**

2 L'lik spinner flasklar 121°C'de 30 dk boyunca otoklavda steril hale getirilmiştir. Reaktöre inokulasyonun sağlanması amacıyla hücreler 3 adet 175 cm<sup>2</sup> ve 1 adet 75 cm<sup>2</sup> T-flasklarda çoğaltıldıktan sonra 1x10<sup>5</sup> hücre/ml başlangıç hücre sayısına sahip olacak şekilde 1 L'lik reaktör ortamında (Excell, %1 L-glutamin, %0.1 penisilin/streptomisin) 0.195 µg/ml oleuropein içeren ve içermeyen iki farklı formülasyonda 37°C'de 50 rpm karıştırma hızında 15 gün inkübe edilmiştir. Ekimin yapıldığı saat 0 kabul edilerek o andan itibaren 24 saatte bir reaktör ortamından sayım ve protein ekspresyon analizlerinin yapılabilmesi amacıyla 1.5 ml hacminde örnek alınmıştır. 3.2.4.'te belirtilen şekilde sayımlar gerçekleştirilmiştir. 15. günün sonunda ortamdan 1 ml ependorfa alınarak pH kağıdı ile ortamın son pH değeri ölçülmüştür.

### **3.2.7. Spinner Flaskta 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Her2/Neu Proteininin Ekspresyonunun Analizi**

Sayım için örnek alındıktan sonra ortamdaki hücrelerde Her2/Neu proteininin ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla hücreler 2 ml'lik ependorflara alınmıştır. 3.2.5.'e göre flow sitometrede analiz gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.8. recCHO Hücrelerinin Kültürü ve Devamlılığı**

#### **3.2.8.1. recCHO Hücrelerinin Üretim Ortamı ve Koşulları**

recCHO hücrelerinin stasyonere kültürde üretimi için Serox SFM ortamında hücreler %1 L-glutamin ve hücrelerin genetik stabilitesini koruması için 50 µM MSX eklenerek kültüre edilmiştir. Kültür ortamı içerisinde başlangıç hücre sayısı 3x10<sup>5</sup> hücre/ml olacak şekilde 75 cm<sup>2</sup> T-flask kültür kaplarında 37°C'ye ayarlanmış nemli atmosferde %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücre canlılığının devamı için hücreler kültür kaplarında 2-3 günde bir başlangıç hücre sayısı 3x10<sup>5</sup> hücre/ml olacak şekilde pasajlanmıştır.

### 3.2.8.2. recCHO Hücrelerinin Hücrelerin Çözdürülmesi

Çözdürülecek olan kriyotüp azot tankından çıkarılıp hızlıca 37°C'lik su banyosunda %75'i çözünecek şekilde çözdürülmüştür. Laminer hava akışlı kabinde 3 ml besin ortamı pipete çekilerek kriyotüp içeriği ile birlikte 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılıp pipet ile homojenize edilmiştir. Santrifüj tüpündeki hücreler 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülmüş ve hücre pelleti üzerine 10 ml'lik besin ortamı eklenerek homojenize edildikten sonra tüp içeriği 75 cm<sup>2</sup> T-flaska alınarak 37°C'ye ayarlanmış nemli atmosferde %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edilmiştir.

### 3.2.8.3. recCHO Hücrelerinin Pasajlanması

Kültür kabındaki hücrelerin ters faz mikroskop altındaki yoğunluğuna bakıldıktan sonra %80 üzerinde yoğunluğa ulaşan kültür pasajlanmak üzere kabine alınmıştır. Kültür içeriğinden pipet ile örnek alınarak hücreler hemositometre lamı ile sayıldıktan sonra, ml'deki hücre sayısına bağlı olarak başlangıç hücre sayısı  $3 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde 1:4 veya 1:5 oranında kültür içeriği flask içerisinde bırakılmıştır. Bırakılan miktara uygun olarak kültür son hacmi 10-13 ml arasında tutulacak şekilde taze besin ortamı eklenmiştir.

### 3.2.8.4. recCHO Hücrelerinin Dondurularak Saklanması

Hücrelerin pasaj numarasının olabildiğince düşük tutulması ve gereken denemelerin aynı pasaj sayısına sahip hücrelerle kurulması amacıyla uygun dondurma ortamı ile (%10 DMSO, %90 FBS) kriyotüplere 1 ml hacme sahip olacak şekilde ana stok ve çalışma bankası stokları oluşturulmuştur. Bu amaçla hücreler kültür ortamından alındıktan sonra santrifüj tüpüne toplanıp 1200 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj gerçekleştirildikten sonra süpernatant dökülerek hücre pelleti üzerine uygun miktarda hazırlanmış dondurma ortamı koyulmuş ve kriyotüp içerisinde 1 ml hacim olacak şekilde dondurma ortamında bulunan hücreler dağıtılmıştır. Daha sonra kriyotüpler -86 °C'ye 24 saatliğine kaldırılmış ve 24. saatin sonunda sıvı azot tanklarına aktarılmıştır.

### 3.2.8.5. recCHO Hücrelerinin Mikoplazma Kontrolü

Çalışmada kullanılan recCHO hücrelerinin süreç boyunca mikoplazma kontaminasyonu gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü DAPI boyaması ile 3.2.1.5.'te belirtilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.9. Spinner Flaskta recCHO Hücrelerinin Kesikli Kültürü ile Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi

2 L'lik spinner flasklar 121°C'de 30 dk boyunca otoklavda steril hale getirilmiştir. Reaktöre inokulasyonun sağlanması amacıyla hücreler 1 adet 175 cm<sup>2</sup> ve 1 adet 75 cm<sup>2</sup> T-flasklarda çoğaltıldıktan sonra 1x10<sup>5</sup> hücre/ml başlangıç hücre sayısına sahip olacak şekilde 1L'lik reaktör ortamına (%1 L-glutamin ve 50 µM MSX içeren Serox SFM (kontrol) ve 0.195 µg/ml oleuropein, %1 L-glutamin, 50µM MSX içeren Serox SFM) inokule edilmiş ve 37°C'de 50 rpm karıştırma hızında 20 gün kesikli kültürde inkübe edilmiştir. Ekimin yapıldığı saat 0 kabul edilerek o andan itibaren 24 saatte bir reaktör ortamından sayım, glikoz tüketimi ve ortama salgılanan Mab miktarının belirlenmesi için 1 ml'lik büyüme ortamı örneği alınmıştır. 20 günlük kültür boyunca Neubeaur hemositometresi kullanılarak hücrelerin boya alıp almama özelliğine göre tripan mavisi yöntemi ile canlı-ölü hücre sayımı yapılmıştır. 20. günün sonunda ortamdaki 1 ml ependorfa alınarak pH kağıdı ile ortamın son pH değeri ölçülmüştür.

### 3.2.10. Spinner Flaskta recCHO Hücrelerinin Ürettikleri TNF-α Spesifik Mab Miktarının Belirlenmesi

ELISA pleytinin kaplanması amacıyla 0.05 M karbonat bikarbonat tamponu hazırlanmış ve bu çözelti içerisinde 100 pg/ml konsantrasyonda TNF-α çözülerek kaplama çözeltisi hazırlanmıştır. Bu tampondan her bir göze 100 µl eklenmiş ve pleytin üzeri kapatılarak +4°C'de bir gece bekletilmiştir. Daha sonra 1X PBS içerisine %0.05 Tween 20 eklenerek yıkama solüsyonu (T-PBS) hazırlanmıştır. Bir gece bekletilen ELISA pleytinin içerdiği kaplama çözeltisi döküldükten sonra 3 kere T-PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. En son yıkamada T-PBS döküldükten sonra her bir örnek (0, 1, 3, 5, 10, 14 ve 20. gün ortam örnekleri) 100 µl/göz olacak şekilde eklenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra T-PBS ile 3 kere 100 µl/göz olacak şekilde yıkama gerçekleştirilmiştir ve gözlere 1:2000 dilüe edilen konjugat solüsyonu (HRP işaretli anti-IgG) 100 µl olacak şekilde eklenerek 1 saat oda sıcaklığında

inkübe edilmiştir. Daha sonra 100 µl/göz olacak şekilde T-PBS ile 3 kere yıkanmıştır. Yıkanan gözlere 100 µl substrat solüsyonu eklenmiş ve 40 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında göz başına 50 µl 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenip 450 nm'de ELISA okuyucuda okutulmuştur. Okutma sonrası absorbanslardan karşılık geldikleri konsantrasyonları Dr. Duygu Ayyıldız Tamiş'in doktora tezinde belirlenen grafik kullanılarak hesaplanmıştır.

### **3.2.11. Spinner Flaskta recCHO Hücrelerinin Glikoz Tüketiminin Belirlenmesi**

Günlük olarak alınan reaktör örneklerinin süpernatantlarından ELISA için ayrılan örneklerdeki (0, 1, 3, 5, 10, 14 ve 20. gün) glikoz tüketimine glukometre ile bakılmıştır. Bu amaçla örneklerdeki glukoz miktarı striplere eklenerek glukometre ile ölçülmüş sonuçlar g/L olarak hesaplanmıştır.

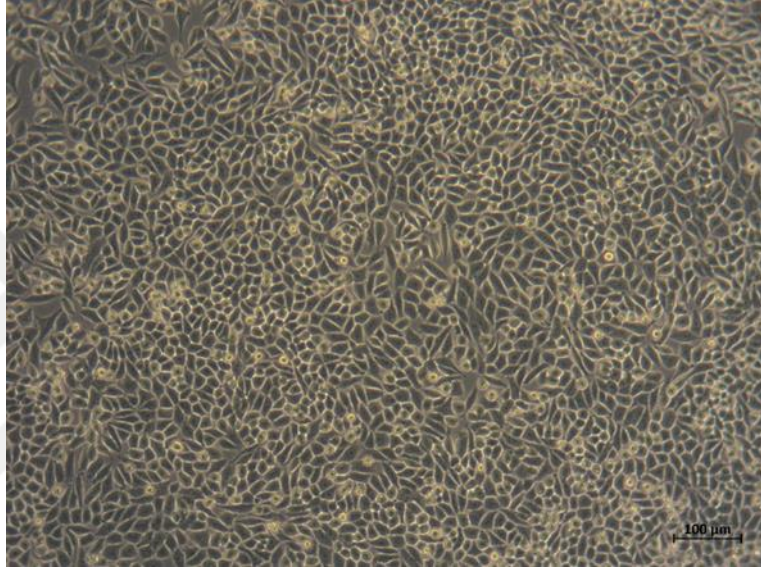
### **3.2.12. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz**

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (S.D.) olarak ifade edilmiş ve SPSS ile normalliği incelenmiştir. Farkın istatistiksel anlamlılığı One Way ANOVA ve ardından Dunnett Çoklu Karşılaştırma Testi ve Student t testi ile yapılmıştır. 0.05 veya daha küçük P değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Kültürü ve Devamlılığı

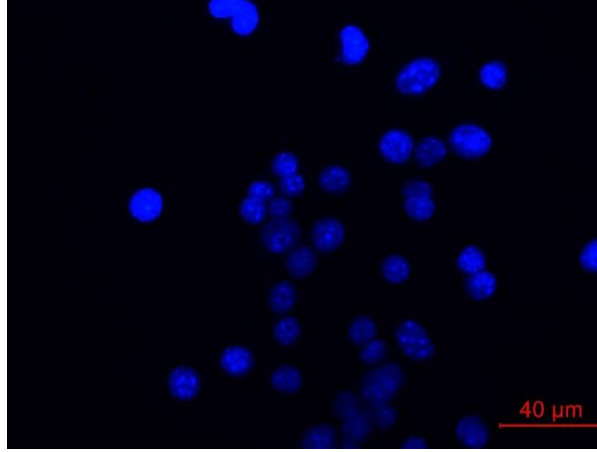
4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin stasyonere kültürde üretimi için DMEM-F/12 besin ortamı kullanılmıştır. Hücreler %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren kültür ortamı içerisinde başlangıç hücre sayısı  $3 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde  $75 \text{ cm}^2$  T-flask kültür kaplarında  $37^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış nemli atmosferde %5  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde inkübe edilmiştir.



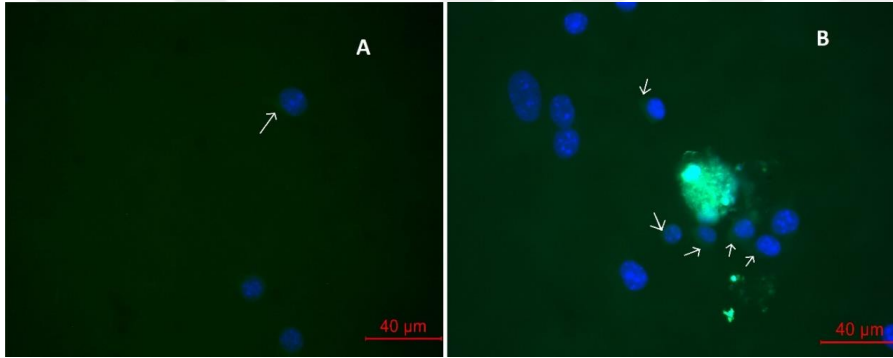
Şekil 4.1. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin %10 serumlu DMEM-F/12 ortamında ters faz mikroskoptaki 10X büyütme ile görünümü

### 4.2. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Mikoplazma Kontrolü ve Her2/Neu Proteininin Hücre Yüzeyinde Görüntülenmesi

4T1.2-Her2/Neu hücreleri süreç boyunca DAPI ile boyanmıştır. Her2/Neu proteininin hücre yüzeyinde görüntülenmesi amacıyla GFP işaretli oldukları için DAPI boyaması sonrasında  $405 \text{ nm}$ 'de görüntülenen nükleus görüntüleri sonrası GFP görüntülenmesi  $510 \text{ nm}$ 'de gerçekleştirilmiştir.



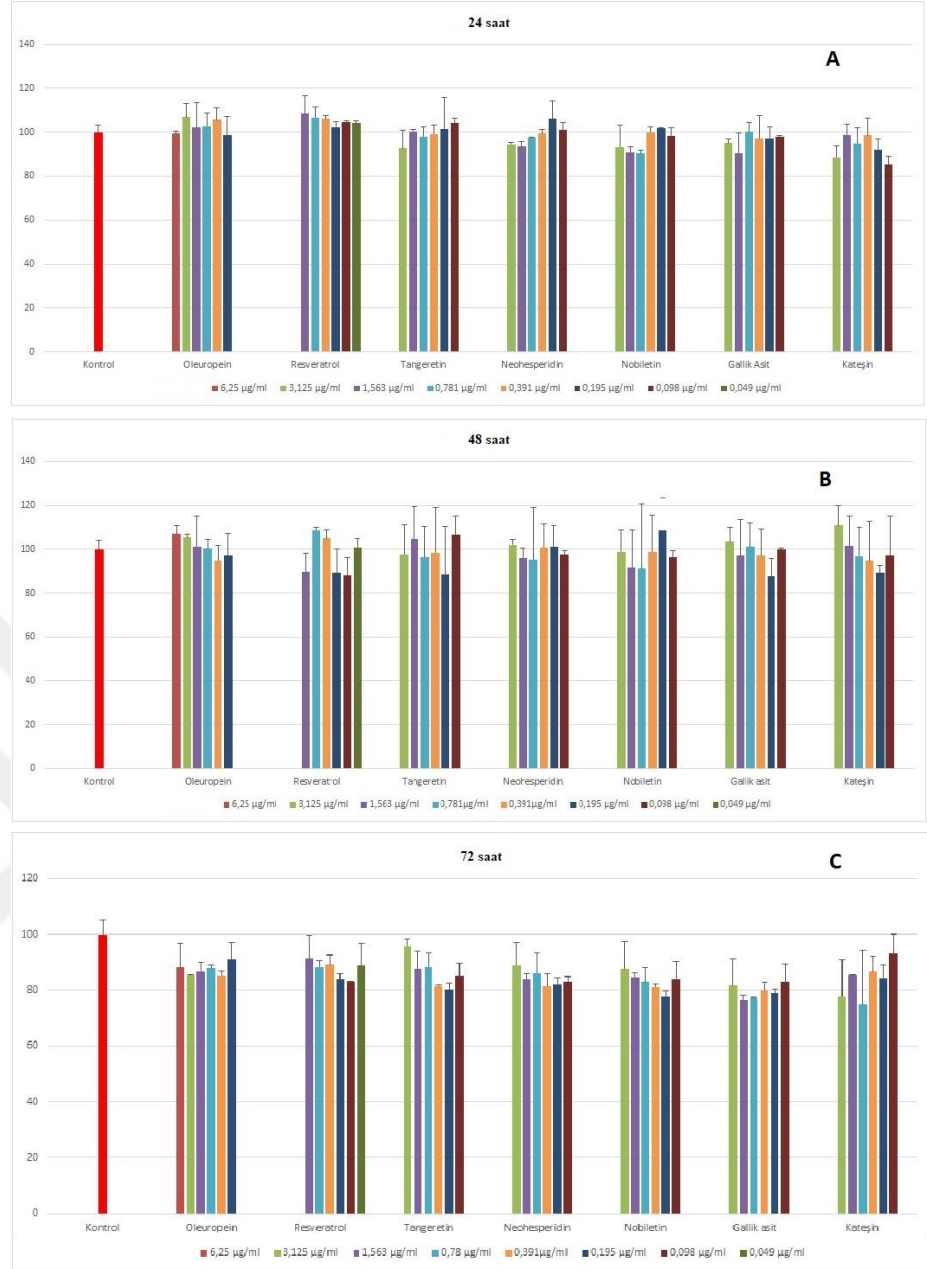
Şekil 4.2. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin floresan mikroskobu altında 63X büyütme ile DAPI boyaması sonrası görüntüleri



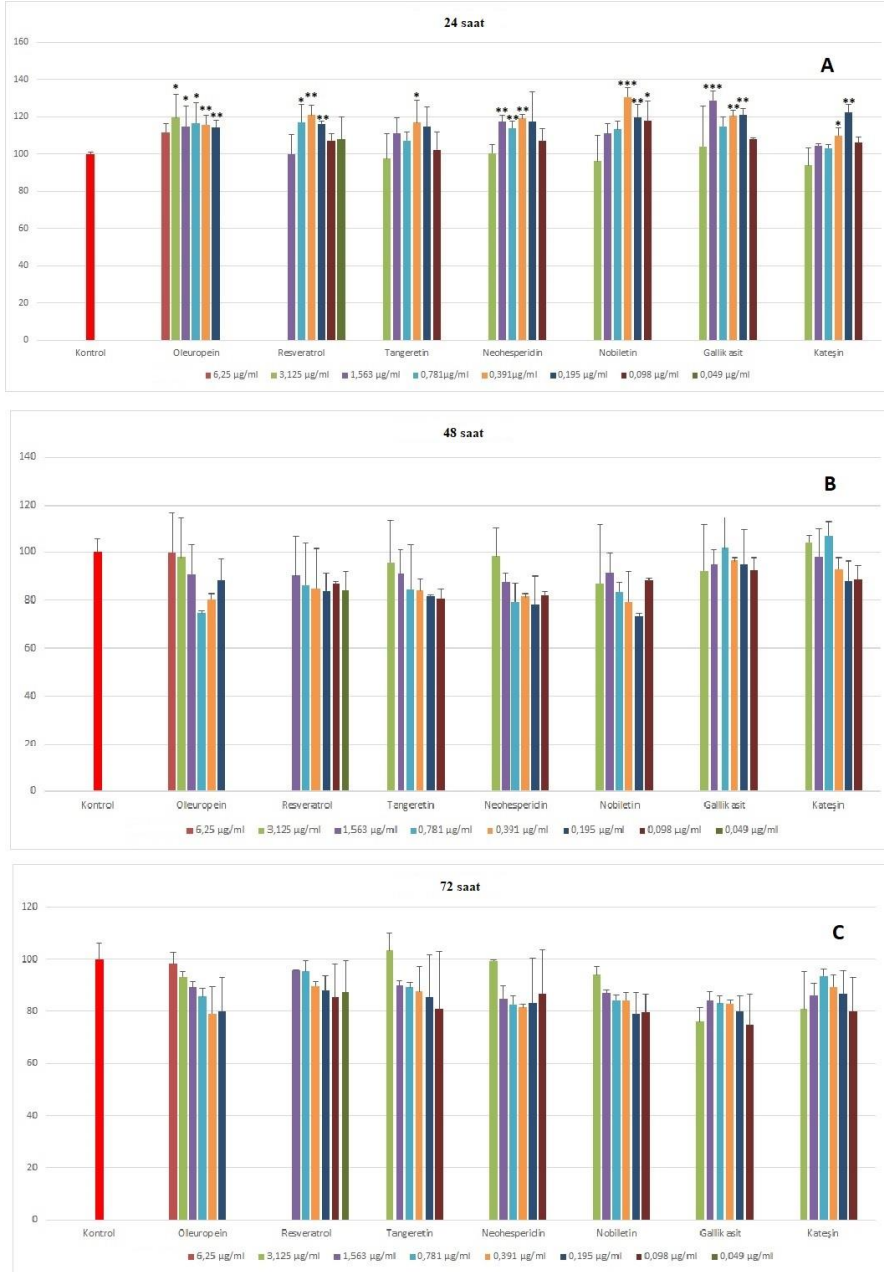
Şekil 4.3. Hücrelerin floresan mikroskobu altında GFP işaretli Her2/Neu proteininin 63X büyütme altında görüntüleri

### 4.3. Moleküllerin 4T1.2-Her2/Neu Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

Stabil olarak yüzeyinde Her2/Neu proteini eksprese eden 4T1.2-Her2/Neu hücreleri üzerine oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, kateşin, gallik asit farklı konsantrasyonlarda hücreler üzerine eklenerek proliferasyonlarına MTT testi ile bakılmıştır. Bu amaçla hücreler başlangıç hücre sayıları  $3 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  ve  $8 \times 10^4$  hücre/ml olacak şekilde 100  $\mu$ l hacimde 96 gözlü pleytlere ekilmiştir. Hücreler üzerine oleuropeinin 6 farklı konsantrasyonu (6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.391, 0.195  $\mu$ g/ml), resveratrolün 6 farklı konsantrasyonu (1.563, 0.781, 0.391, 0.195, 0.098, 0.049  $\mu$ g/ml), tangeretin, neohesperidin, nobiletin, kateşin ve gallik asitin ise 6 farklı konsantrasyonu (3.125, 1.563, 0.781, 0.391, 0.195, 0.098  $\mu$ g/ml) eklenmiştir. Bu maddelerin belirtilen konsantrasyonlarının etkilerine 24, 48 ve 72. saatlerde bakılmıştır.

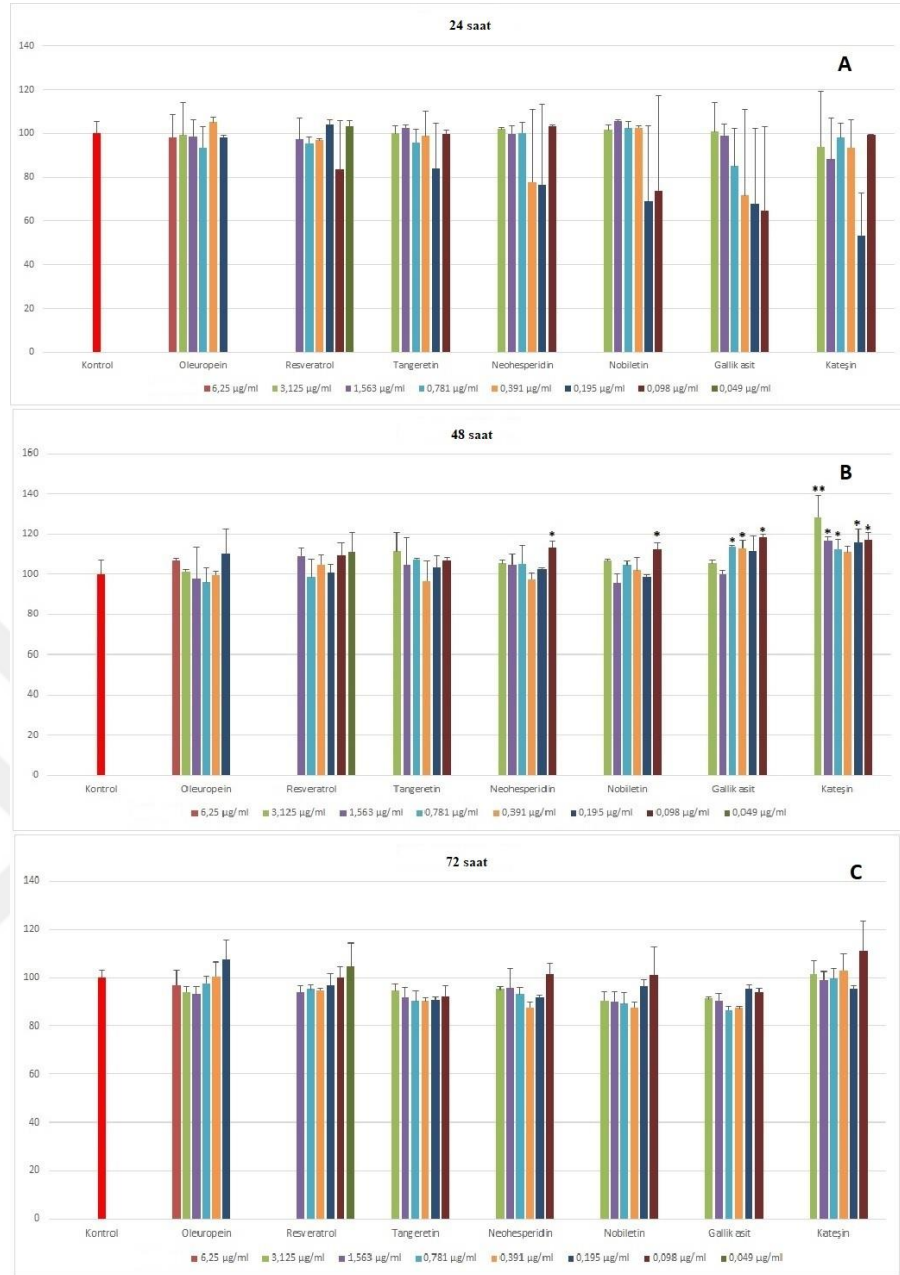


Şekil 4.4. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin  $3 \times 10^4$  h/ml başlangıç hücre sayısında 96 gözlü pleyte ekilerek farklı konsantrasyonlarda doğal moleküllerin (oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, kateşin ve gallik asit) eklenmesi ile elde edilen % hücre canlılık grafikleri, A: 24 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği, B: 48 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği, C: 72 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği (\* $p < .05$ ; \*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .001$ ).



Şekil 4.5.4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin  $5 \times 10^4$  h/ml başlangıç hücre sayısında 96 gözlü pleyte ekilerek farklı konsantrasyonlarda doğal moleküllerin (oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, kateşin ve gallik asit) eklenmesi ile elde edilen % hücre canlılık grafikleri, A: 24 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği, B: 48 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği, C: 72 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği (\* $p < .05$ ; \*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .001$ ).





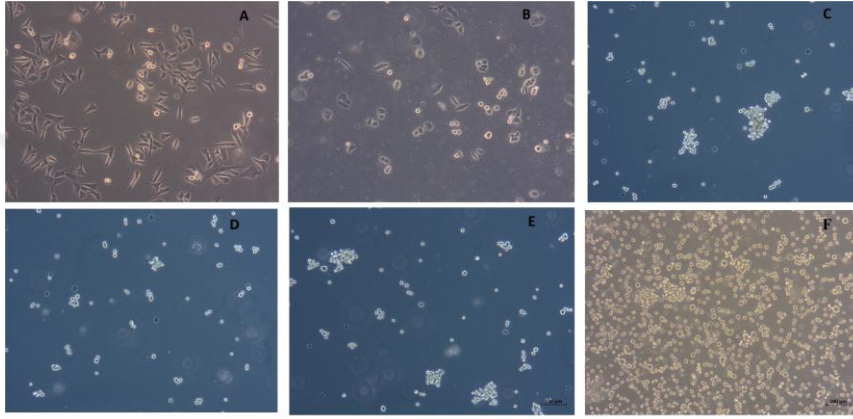
Şekil 4.6. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin  $8 \times 10^4$  h/ml başlangıç hücre sayısında 96 gözlü pleyte ekilerek farklı konsantrasyonlarda doğal moleküllerin (oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, kateşin ve gallik asit) eklenmesi ile elde edilen % hücre canlılık grafikleri, A: 24 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği, B: 48 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği, C: 72 saatlik inkübasyon sonundaki proliferasyon grafiği (\* $p < .05$ ; \*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .001$ ).

Elde edilen verilere göre  $3 \times 10^4$  h/ml başlangıç hücre sayısında moleküllerin hücreler üzerine herhangi anlamlı proliferatif etkisine rastlanmamıştır. Buna karşın  $5 \times 10^4$  h/ml başlangıç hücre sayısında ilk 24 saatte  $8 \times 10^4$  h/ml başlangıç hücre sayısında ise 48. saatte anlamlı proliferatif etkiler gözlenmiştir. Bu sonuçlara

göre petrilere oluşturulacak büyüme eğrisi için bu moleküllerin kullanılacak konsantrasyonları oleuropein için 0.195 µg/ml, resveratrol ve tangeretin için 0.391 µg/ml, neohesperidin, nobiletin, kateşin ve gallik asit için ise 0.098 µg/ml olarak belirlenmiştir.

#### 4.4. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin SFM'e Adapte Edilmesi

4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin SFM'e adaptasyonu amacıyla serum içeriği %10'dan başlayarak yarı yarıya azaltılmıştır.

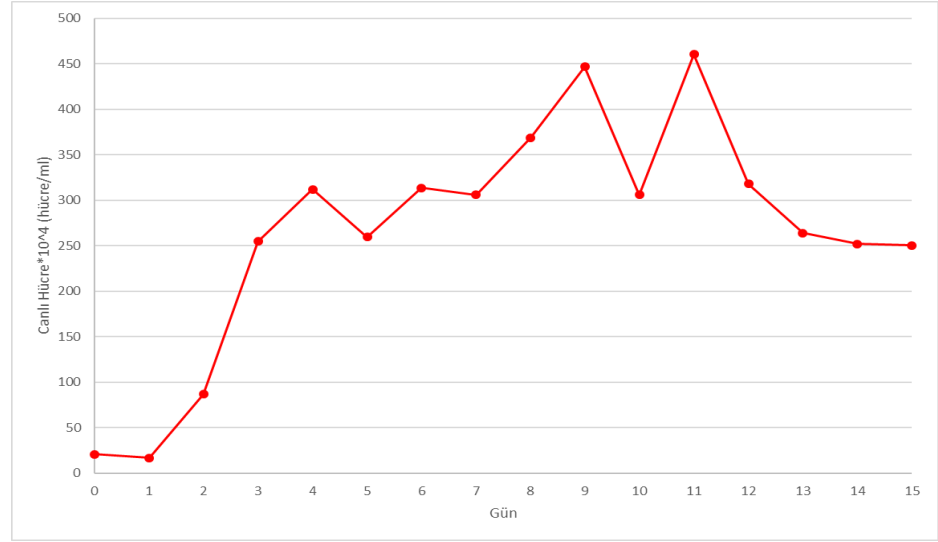


Şekil 4.7. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin farklı serum içeren büyüme ortamında mikroskop altında görüntüleri, A: %5 serum içeren ortamda, B: %2.5 serum içeren ortamda, C: %1.25 serum içeren ortamda, D: %0.6 serum içeren ortamda, E: %0 serum içeren ortamda hücrelerin mikroskop altındaki görüntüleri, F: %0 serum içeren ortamda hücrelerin mikroskop altındaki daha yoğun kültür içerisinde görüntüleri

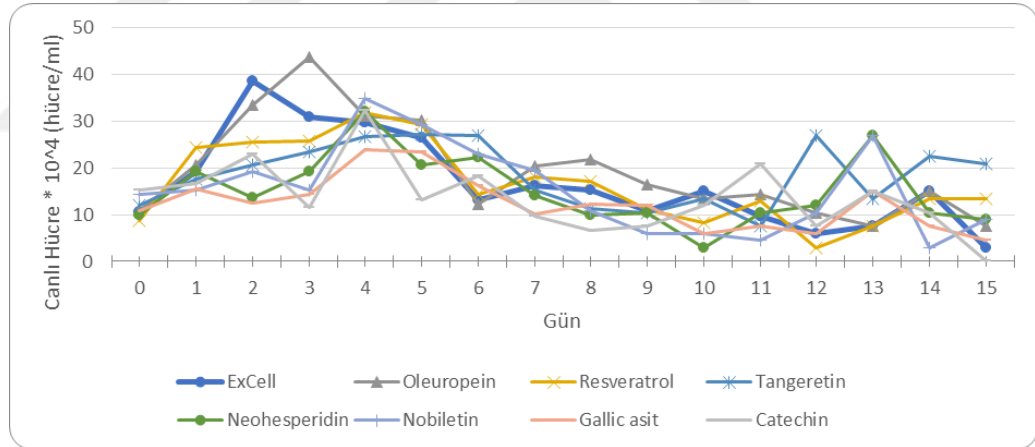
Serum oranının azaltılması ile hücrelerde klamp oluşumu gözlenmiş, T-flask yüzeyine tutunma oranları azalmıştır.

#### 4.5. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Petrilere Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi

Hücreler  $1 \times 10^5$  hücre/ml başlangıç hücre sayısında petrilere ekilmiş ve %10 FBS içeren DMEM-F/12 ortamında, molekül ve serum içermeyen Excell ortamında ve oleuropein 0.195 µg/ml, resveratrol 0.391 µg/ml, tangeretin 0.391 µg/ml, neohesperidin, nobiletin, kateşin ve gallik asitin ise konsantrasyonlarını 0.098 µg/ml içerecek şekilde kültür ortamlarına eklenerek her gün aynı saatte hemositometre ile sayım yapılmıştır.

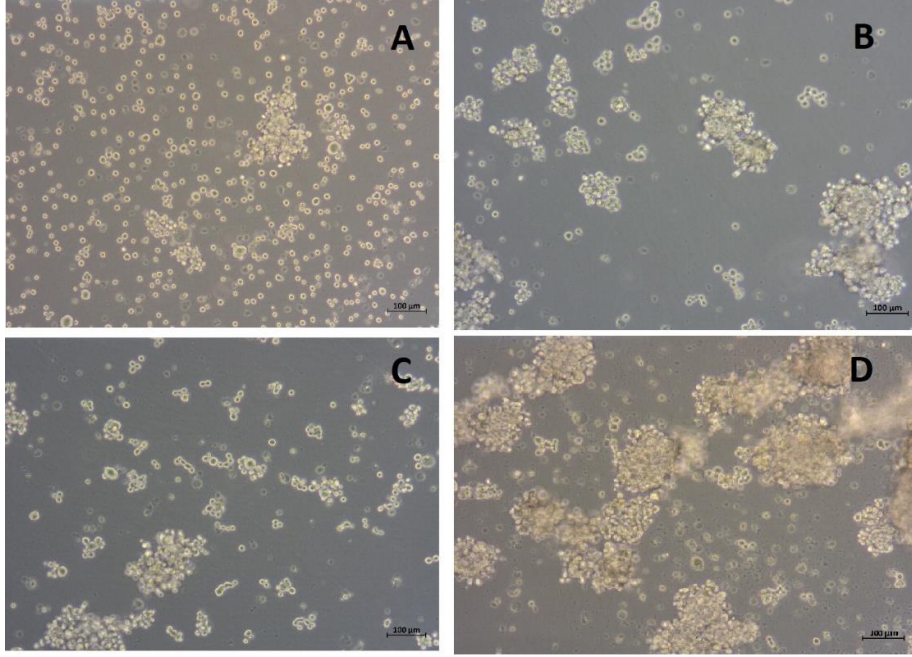


Şekil 4.8. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin %10 FBS içeren DMEM-F/12 ortamında petrillerdeki büyüme eğrisi



Şekil 4.9. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin Excell ortamlarına oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, gallik asit ve kateşin eklenerek petrilde oluşturulan büyüme eğrileri

Elde edilen büyüme eğrilerine göre serumlu ortamda 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin maksimum hücre konsantrasyonu serumsuz ortamdan 10 kat daha yoğun olarak elde edilmiştir. Moleküllerin eklenmesi ile kontrol Excell ortamından daha yüksek hücre konsantrasyonuna oleuropein ile ulaşılmıştır. Diğer moleküller bu anlamda daha düşük sonuç vermiştir.



Şekil 4.10. 34.8 mm'lik petrielerde 4T1.2-Her2 hücrelerinin Excell (Kontrol ortamında) ters faz mikroskopta 10X büyütme ile ilk 3 gününe ait görüntüleri, A: 0. Gün, B: 1.gün, C: 2.gün, D: 3.gün

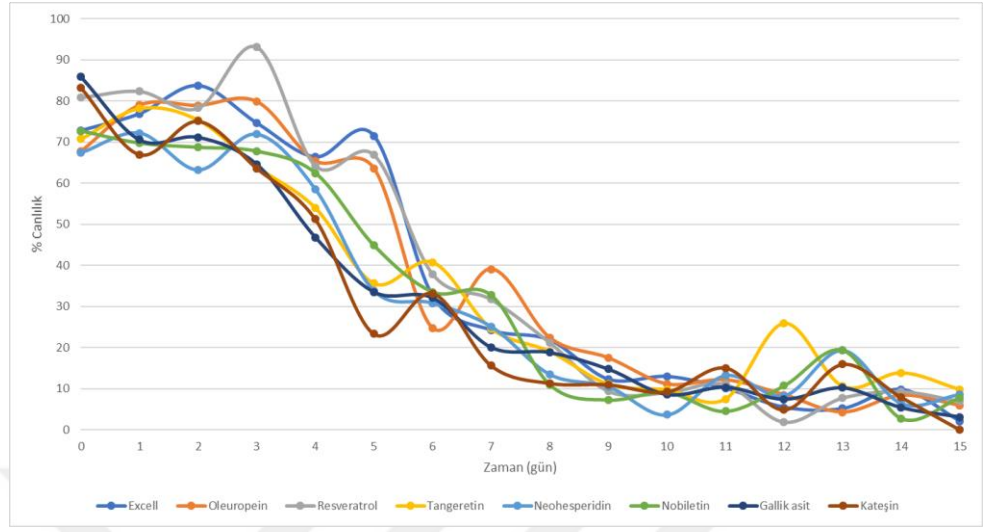
Petrilerdeki hücrelerin mikroskop altındaki morfolojilerine bakıldığında 1.günle birlikte zamanla hücre klamplarında artış gözlenmiştir.

Tablo 4.1.4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin petrilerdeki Excell ortamlarına oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, gallik asit ve kateşin eklenerek oluşturulan büyüme ortamlarındaki spesifik büyüme hızı ve ikilenme süreleri

	ExCell	Oleuropein	Resveratrol	Tangeretin	Neohesperidin	Nobiletin	Gallik asit	Kateşin
Spesifik büyüme hızı ( $\mu$ ) (saat <sup>-1</sup> )	0.025	0.021	0.0109	0.0079	0.0098	0.0074	0.0063	0.0047
İkilenme süresi ( $t_d$ ) (saat)	25.8	35.5	63.7	87.8	70.5	94.3	109.7	146.6

Molekül eklenmemiş Excell ortamına ait spesifik büyüme hızı ve ikilenme süresi sırası ile 0.025 saat<sup>-1</sup> ve 25.8 saat olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara en yakın değeri veren molekül ise 0.021 saat<sup>-1</sup> ve 35.5 saat ile oleuropein olarak elde edilmiştir. 1 L çalışma hacmindeki spinner flasklarda kurulacak çalışmada ise molekül içermeyen Excell ortamının yanında oleuropeinin bu konsantrasyonu ile kullanımına karar verilmiştir. Petrilerden elde edilen değerler ışığında en düşük

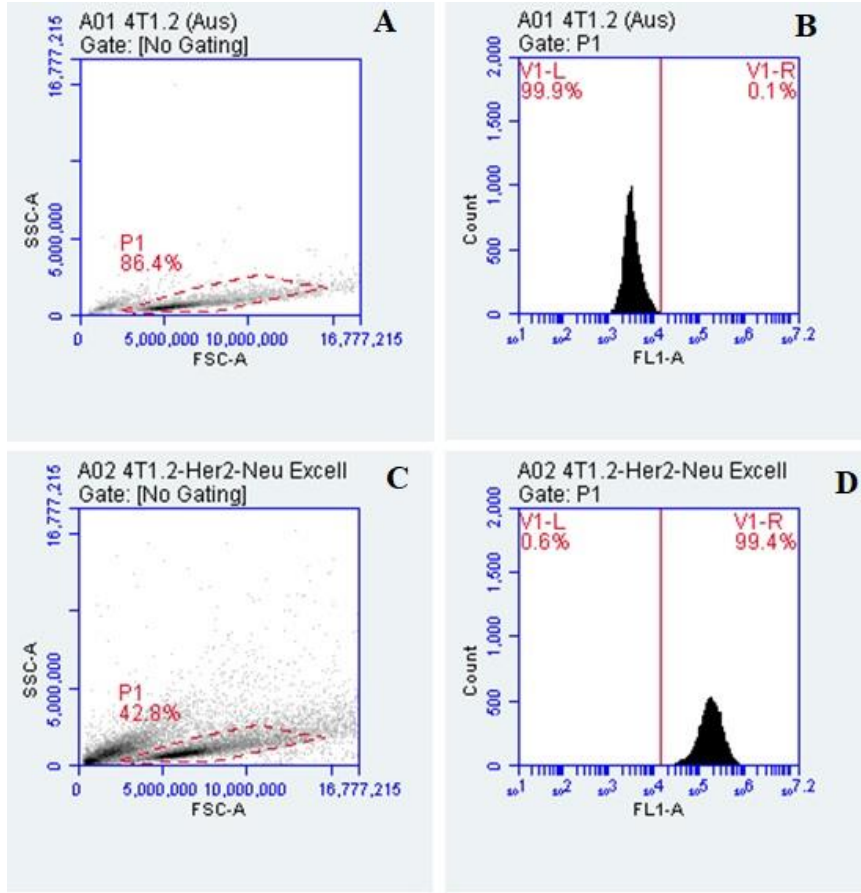
sonuç ise  $0.0047 \text{ saat}^{-1}$ 'lik spesifik büyüme hızı ve 146.6 saatlik ikilenme süresi ile kateşine aittir.



Şekil 4.10. 4T1.2-Her2/Neu hücreleri için petrilerden elde edilen zamana bağlı hücre canlılık grafikleri

Hücrelerin petrilerdeki canlılıkları birbirlerine benzer şekilde elde edilmiştir. Kültürün 15.gününde petrilerdeki canlılıklar %10 ve altında gözlenmiştir.

#### 4.6. 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Her2/Neu Protein Ekspresyonunun Analizi

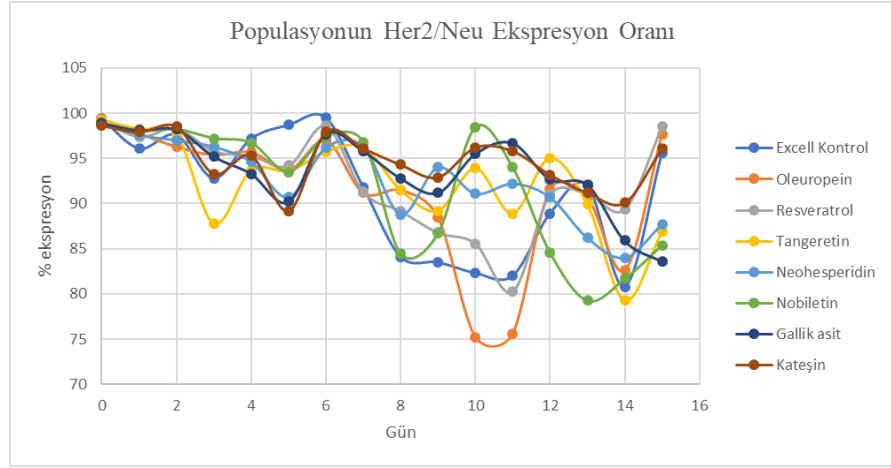


Şekil 4.11. Her2/Neu proteini eksprese etmeyen 4T1.2 ve eksprese eden 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin flow sitometride analizi, A: 4T1.2 hücrelerinin popülasyon görüntüsü, B: 4T1.2 hücrelerinin FL-1 kanalındaki ışımaya görüntüsü, C: 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin popülasyon görüntüsü, D: 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin FL-1 kanalındaki Her2/Neu proteini ışımaya görüntüsü.

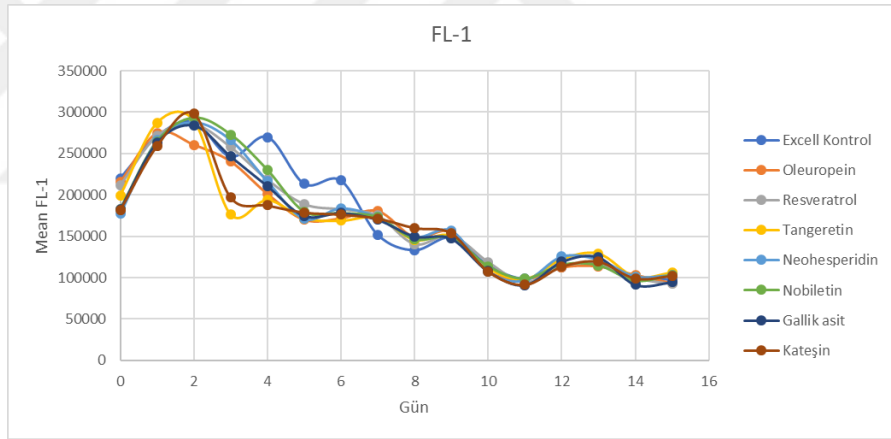
4T1.2-Her2/Neu hücrelerinde Her2/Neu proteininin ekspresyonu flow sitometride Her2/Neu eksprese etmeyen 4T1.2 hücreleri ile kontrol edilmiştir ve hücre popülasyonunun %99.4 oranında Her2/Neu proteini eksprese ettiği belirlenmiştir.

Petriden endorflara toplanan ve sayım için istenen miktar ayrılan hücreler PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra 500 µl'lik PBS içerisinde homojenize edilmiş ve flow sitometri cihazında okutulan popülasyondaki eksprese eden % hücre miktarına ve FL1 kanalına ait ortalama değerlere göre grafikler oluşturulmuştur.





Şekil 4.12. 34.8 mm'lik petrilere molekül eklenmeyen Excell ortamı ve oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, gallik asit ve kateşinin (sırasıyla 0.195 µg/ml, 0.391 µg/ml, 0.391 µg/ml, 0.098 µg/ml, 0.098 µg/ml, 0.098µg/ml, 0.098 µg/ml konsantrasyonda) eklenmesiyle 4T1.2-Her2/Neu hücrelerine ait Her2/Neu proteininin günlük olarak populasyondaki % ekspresyon oranı



Şekil 4.13. 34.8 mm'lik Petrilere molekül eklenmeyen Excell ortamı ve oleuropein, resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin, gallik asit ve kateşinin (sırasıyla 0.195 µg/ml, 0.391 µg/ml, 0.391 µg/ml, 0.098 µg/ml, 0.098 µg/ml, 0.098 µg/ml, 0.098 µg/ml konsantrasyonda) eklenmesiyle Her2/Neu hücrelerine ait Her2/Neu proteininin günlük ekspresyon şiddeti

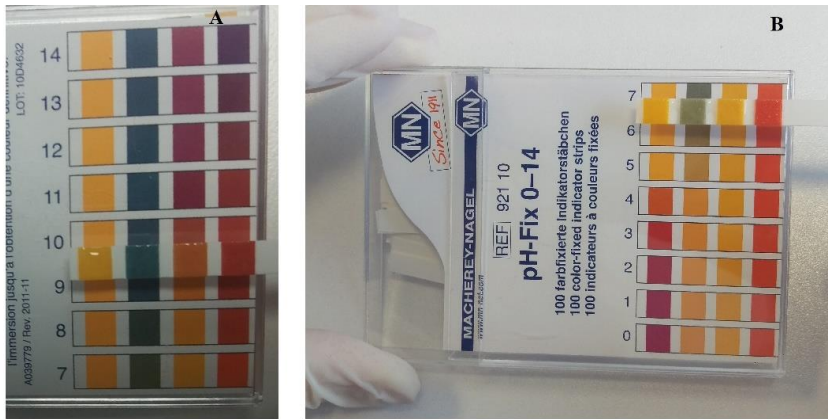
Petrilerde büyüme gösteren 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin populasyon %'si olarak eksprese ettiği protein oranı hücre klamp oluşumu sebebi ile dalgalanma göstermiş, floresan yoğunluğuna bakıldığında mean FL-1 değerleri ise canlı hücre sayısı ile paralel şekilde azalmıştır. Molekül içeren ortamlar ve kontrol ortamındaki hücrelerde protein ekspresyonu açısından fark görülmemiş, hücrelerin stabil şekilde Her2/Neu proteinini eksprese ettikleri sonucuna ulaşılmıştır.

#### 4.7. Spinner Flaskta 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Kesikli Kültürü ile Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi

0.195 µg/ml konsantrasyonda oleuropeinin eklendiği ve kontrol olarak eklenmediği Excell ortamı kullanılarak  $1 \times 10^5$  hücre/ml başlangıç hücre sayısına sahip olacak şekilde 1 L'lik reaktör ortamı (Excell ortamına eklenen %1 L-glutamin, %0.1 penisilin/streptomisin ve 0.195µg/ml konsantrasyonda oleuropein) oluşturulmuş ve 37°C'de 50 rpm karıştırma hızında 15 gün kültüre alınmıştır.



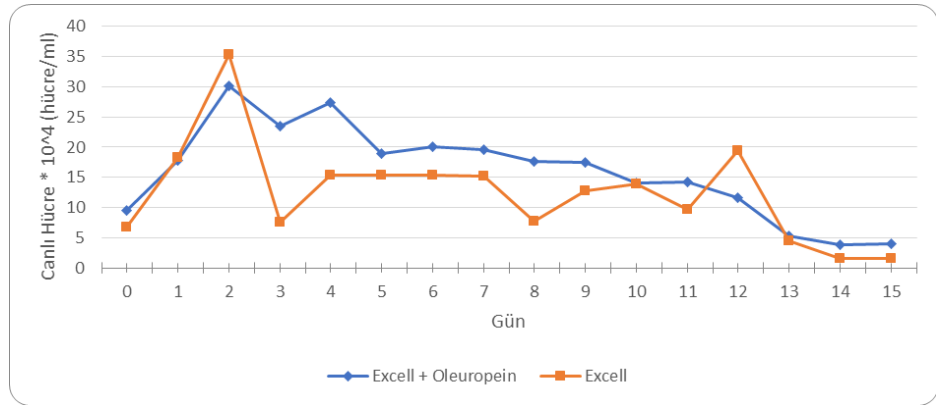
Şekil 4.14. A: Spinner flaskta 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Kesikli Kültürü, B: Boş spinner flask görüntüleri



Şekil 4.15. A: Excell ortamının 0.gündeki pH değeri, B: 15 günlük spinner flask batch kültür süresinin sonunda ortamın pH değeri



Hücrelerin büyüme gösterdikleri kültür ortamının son pH değeri hücre metabolit birikimi sebebi ile düşmüş ve 6-7 arasında belirlenmiştir.



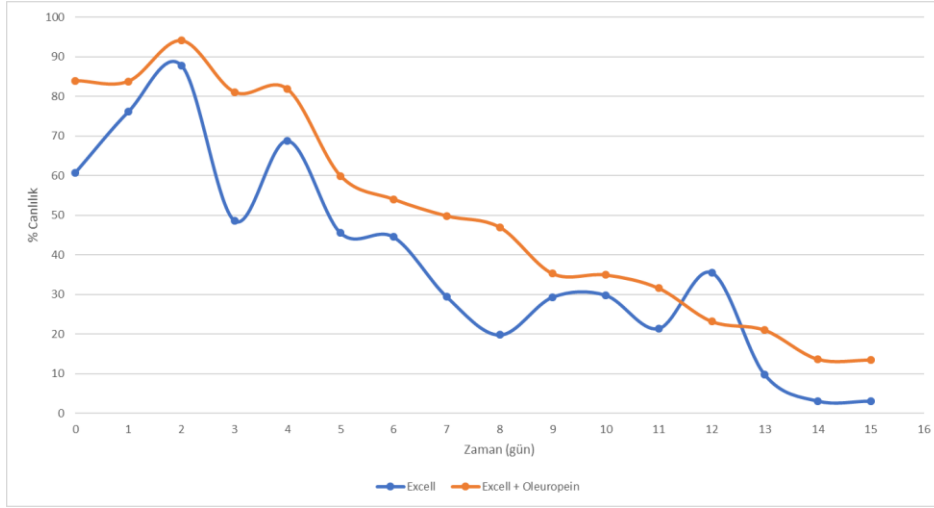
Şekil 4.16. 1 L'lik çalışma hacminde spinner flaskta Excell ve 0.195 µg/ml konsantrasyonda oleuropein içeren Excell büyüme ortamında 4T1.2-Her2/Neu hücrelerine ait büyüme eğrisi.

4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin spinner flaskta inokulasyondan sonraki ilk 48 saatlik süreçte lag fazı gözlenmemiş hücreler hızlı şekilde log fazında büyüme göstermişlerdir. Ayrıca 2. günden sonra stasyoneryonun gözlenemediği hücrelerin 2 gün içerisinde hızlı şekilde ölüm fazına girdikleri sonucuna ulaşılmıştır. Kültürün 15. gününün sonunda canlılıklar %5'in altına düşmüştür. Log faz boyunca oleuropein içeren ortamda hücreler kontrol ortamına yakın hücre konsantrasyonuna ulaşmışlardır.

Tablo 4.2. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin spinner flaskta Excell ortamı ve 0.195 µg/ml konsantrasyonda oleuropein, eklenerek oluşturulan Excell ortamındaki spesifik büyüme hızı ve ikilenme süreleri

	Excell	Excell + Oleuropein
Spesifik büyüme hızı ( $\mu$ ) (saat <sup>-1</sup> )	0.033	0.025
İkilenme süresi ( $t_d$ ) (saat)	20.1	28.7

Excell kontrol ortamı ve oleuropein içeren ortamdaki hücre kinetikleri birbirine yakın sonuçlar vermiştir.

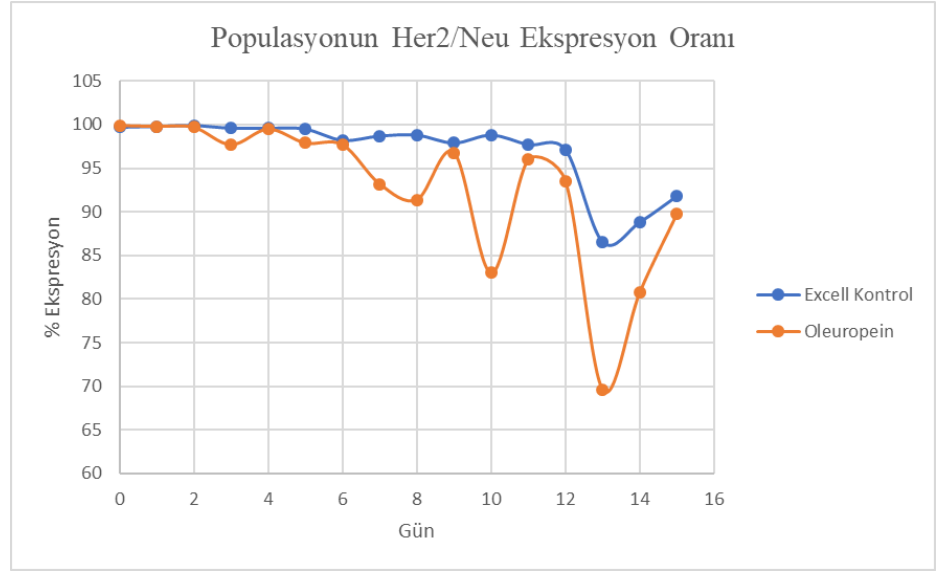


Şekil 4.17. Spinner flaskta 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin zamana bağlı % canlılık grafiği

Hücrelerin canlılıkları 15.günün sonunda kontrol ortamında %10'un altında, oleuropeinli ortamda ise %10'un bir miktar üzerinde elde edilerek yakın sonuçlar vermiştir. Hücrelerin klamp oluşturarak büyümeleri % canlılıklarda dalgalanmaya sebep olmuştur.

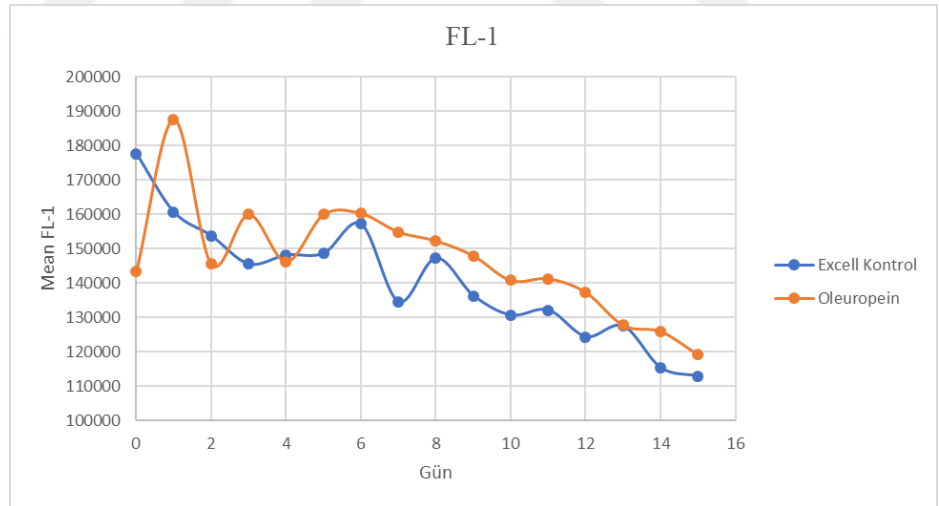
#### 4.8. Spinner Flaskta 4T1.2-Her2/Neu Hücrelerinin Her2/Neu Proteininin Ekspresyonunun Analizi

Reaktörden alınan 1 ml'lik örnekler ependorfa aktarılmıştır. 1000 rpm de 5 dk soğutmalı mikrosantrifüjde santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj sonrası hücreler üzerine 1 ml PBS eklenmiş ve tekrar santrifüj edilmiştir. Bu yıkama işlemi iki kez gerçekleştirildikten sonra süpernatantı uzaklaştırılan hücre pelleti üzerine 500 µl PBS eklenerek flow sitometri cihazında Her2/Neu ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir.



Şekil 4.18. Spinner flaskta oleuropein içeren ve içermeyen Excell ortamındaki 4T1.2-Her2/Neu hücrelerine ait Her2/Neu proteininin günlük olarak populasyondaki % ekspresyon oranı

Populasyonun % protein ekspresyon oranı stabil şekilde %65'in üzerinde olarak belirlenmiştir. Elde edilen dalgalanmalar ise hücrelerde oluşan klamplara bağlı olarak cihazın okuma sürecindeki farklılıklara bağlıdır.

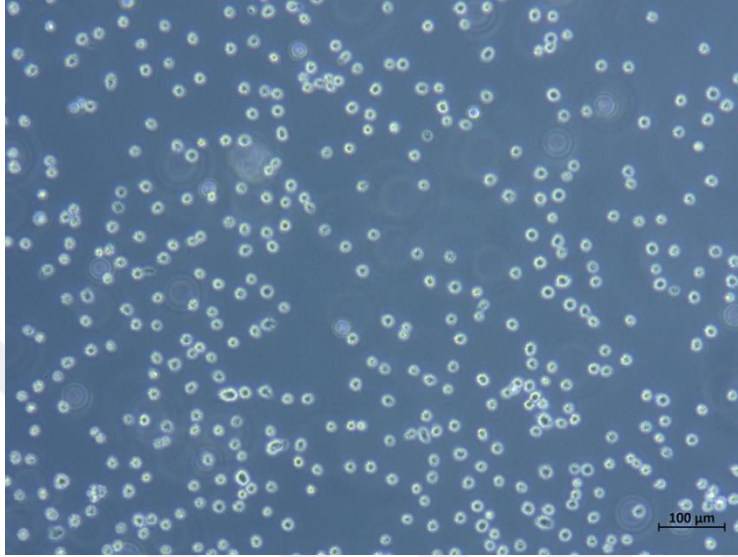


Şekil 4.19. Spinner flaskta oleuropein içeren ve içermeyen Excell ortamındaki 4T1.2-Her2/Neu hücrelerine ait Her2/Neu proteininin günlük ekspresyon şiddeti

Hücrelerin eksprese ettiği Her2/Neu protein şiddeti hücre canlılığı ile paralel şekilde zamana bağlı olarak azalma göstermiştir.

#### 4.9. recCHO Hücrelerinin Kültürü

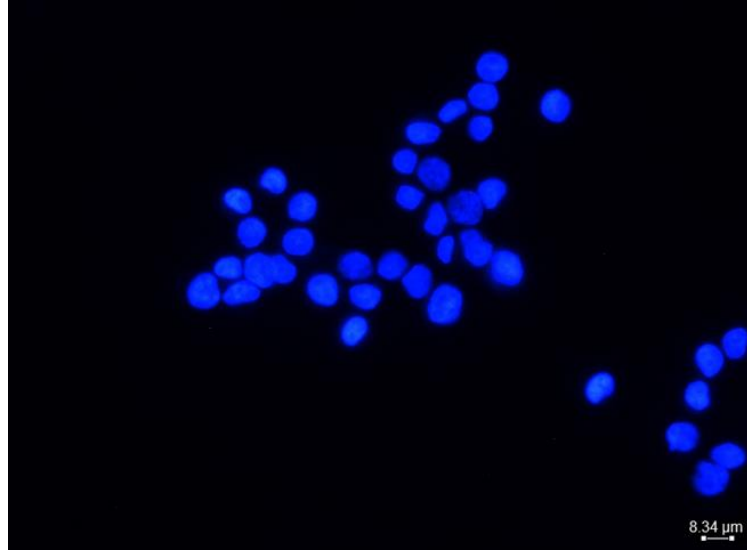
recCHO hücrelerinin devamlılığı Serox SFM ortamında 75 cm<sup>2</sup> T-flask içerisinde sağlandı. Reaktör inokulasyonu öncesi 175 cm<sup>2</sup>'lik T-flaska aktarılarak inokulum miktarına çoğaltıldı.



Şekil 4.20. İverted mikroskopta 10X büyütme ile recCHO hücrelerinin 75 cm<sup>2</sup> T-flask içerisinde görünümü

#### 4.10. recCHO Hücrelerinin Mikoplazma Kontrolü

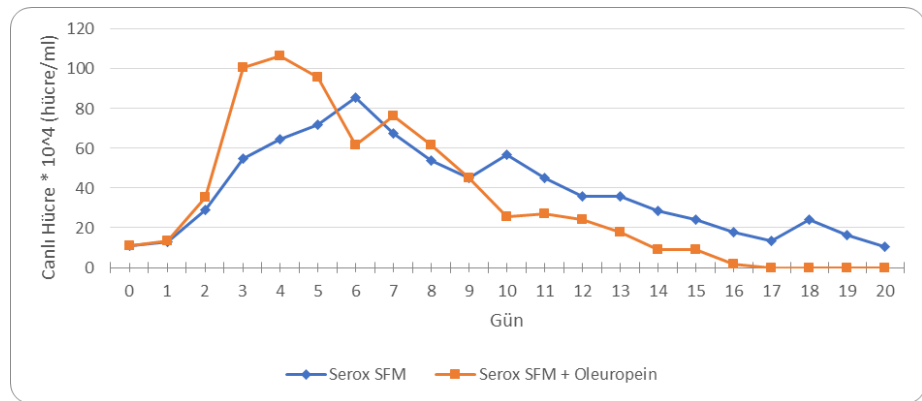
Çalışma süresince recCHO hücrelerinin mikoplazma açısından kontamine olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bu amaçla hücreler petriler içerisinde lamellere tutundurularak fiksasyonları gerçekleştirilmiştir. Normalde süspanse olan recCHO hücrelerinin tutunabilmeleri için lamel içerisindeki ortamlarına %10 serum ilave edilmiş ve 24 saatin sonunda DAPI boyaması gerçekleştirildikten sonra floresan mikroskobunda incelenmişlerdir.



Şekil 4.21. recCHO hücrelerinin floresan mikroskobu altında 63X büyütme ile DAPI boyaması gerçekleştirilmiş görüntüleri

#### 4.11. Spinner Flaskta recCHO Hücrelerinin Kesikli Kültürü ile Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi

4T1.2-Her/Neu hücrelerinden elde edilen sonuçlar ışığında recCHO hücreleri aynı koşullarda  $1 \times 10^5$  hücre/ml başlangıç hücre sayısında 1 L hacminde spinner flaskta 50 rpm karıştırma hızında kültüre edilmiş ve  $0.195 \mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda oleuropein içeren Serox SFM ve içermeyen Serox SFM ortamlarındaki hücrelerin 50 rpm karşılaştırma hızında büyüme eğrileri oluşturulmuştur ve buradan yola çıkılarak spesifik büyüme hızları ve ikilenme süreleri hesaplanmıştır.



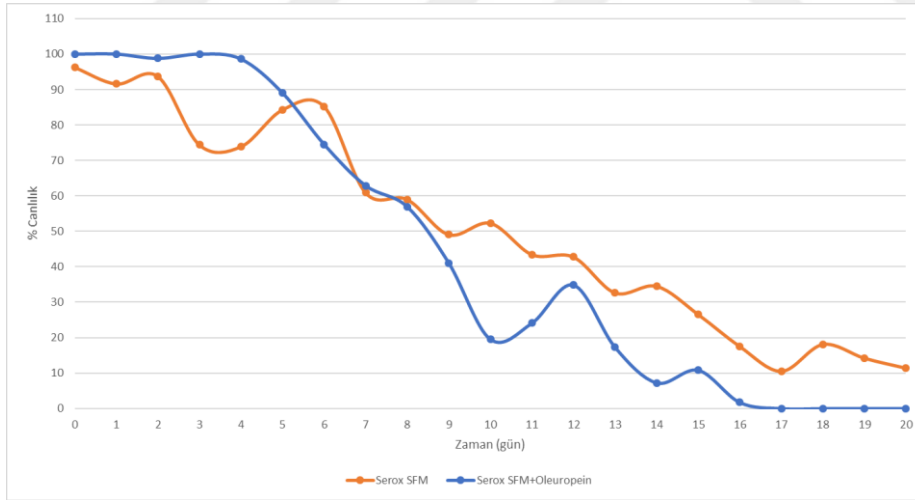
Şekil 4.22. recCHO hücrelerine ait  $0.195 \mu\text{g/ml}$  oleuropein içeren ve içermeyen Serox SFM ortamlarında reaktör koşullarındaki büyüme eğrisi

Oleuropein içermeyen Serox SFM ortamında recCHO hücreleri 6. güne kadar çoğalmaya devam etmiş, oleuropein içeren ortamda ise 3. güne kadar maksimum hücre konsantrasyonuna ulaşmış ve stasyone faza girdiği belirlenmiştir. İnokulasyondan sonraki ilk 24 saat lag fazı oluşturmaktadır. Log faz boyunca oleuropein içeren ortamdaki maksimum hücre konsantrasyonu kontrole göre daha yüksek olarak elde edilmiştir.

Tablo 4.3. recCHO hücrelerinin oleuropein içeren ve içermeyen ortamlardaki spesifik büyüme hızı ve ikilenme süreleri

	Serox SFM	Serox SFM + Oleuropein
Spesifik büyüme hızı ( $\mu$ ) (saat <sup>-1</sup> )	0.03	0.0421
İkilenme süresi ( $t_d$ ) (saat)	23.2	16.5

recCHO hücrelerinin büyüme kinetiklerine göre oleuropein içeren ortamda daha yüksek spesifik büyüme hızına sahip olduğu ikilenme süresinin ise kısaldığı sonucuna varılmıştır.

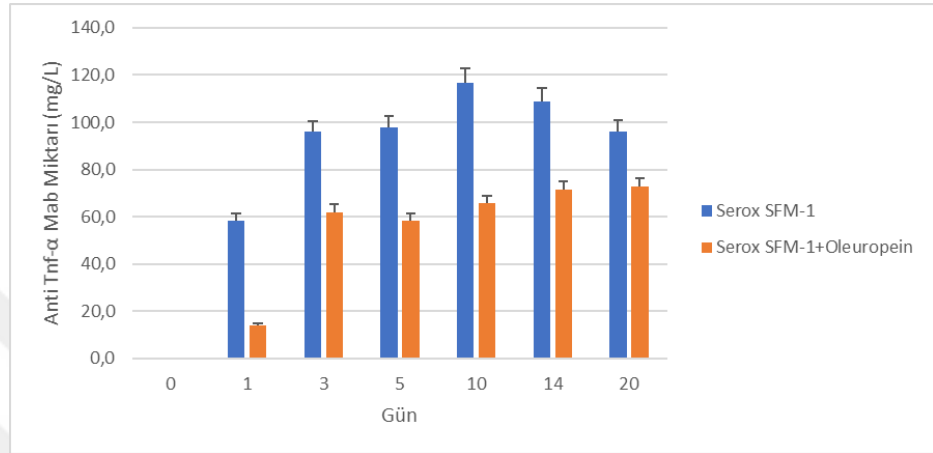


Şekil 4.23. recCHO hücrelerine ait 0.195  $\mu\text{g/ml}$  oleuropein içeren ve içermeyen Serox SFM ortamlarında reaktör koşullarındaki 20 günlük % canlılık grafiği

Kontrol ortamındaki hücre canlılığı 20. günde dahi korunurken, oleuropein içeren ortamdaki hücrelerin 16. günden itibaren canlılıklarını yitirdiği belirlenmiştir.

#### 4.12. Spinner Flaskta recCHO Hücrelerinin Ürettiği TNF- $\alpha$ Spesifik Mab Miktarının Belirlenmesi

Sayım için reaktörden alınan örnekler santrifüj edildikten sonra hücre pelletinden ayrılmış ve 0, 1, 3, 5, 10, 14 ve 20. günlere ait ELISA gerçeleştirilmiştir.

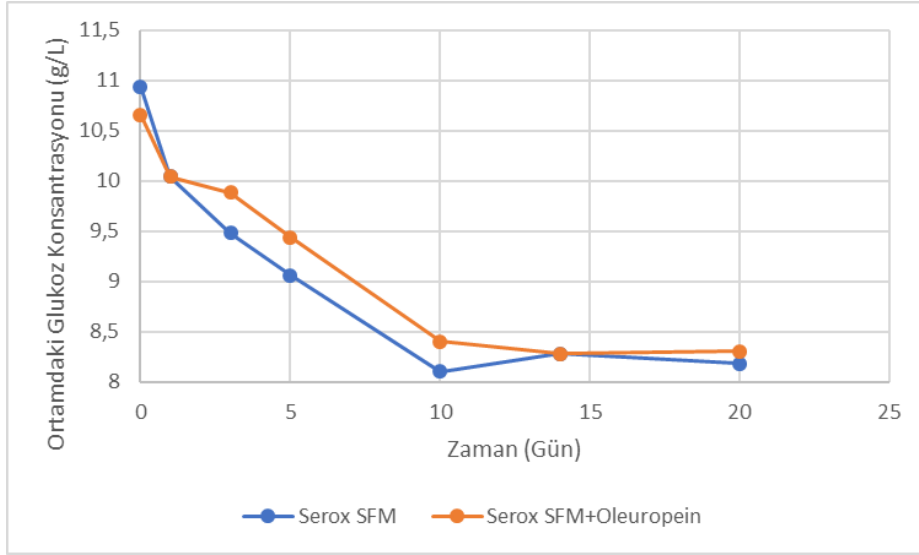


Şekil 4.24. Spinner flaskta recCHO hücrelerinin oleuropein içeren ve içermeyen Serox SFM ortamındaki 0, 1, 3, 5, 10, 14, ve 20. günlere ait alınan örneklerde yapılan ELISA sonucu olarak elde edilen TNF- $\alpha$  spesifik Mab miktarı

recCHO hücrelerinin ortama salgıladıkları TNF- $\alpha$ 'ya spesifik Mab miktarları oleuropein içeren ortamda Serox SFM'e göre daha düşük olarak elde edilmiştir. Oleuropein içeren Serox SFM ortamındaki ürün miktarı 3. günden sonra yüksek oranda artış göstermezken, kontrol Serox SFM ortamında 10. Güne kadar artış göstermiş ve daha sonra zamanla azalmıştır.

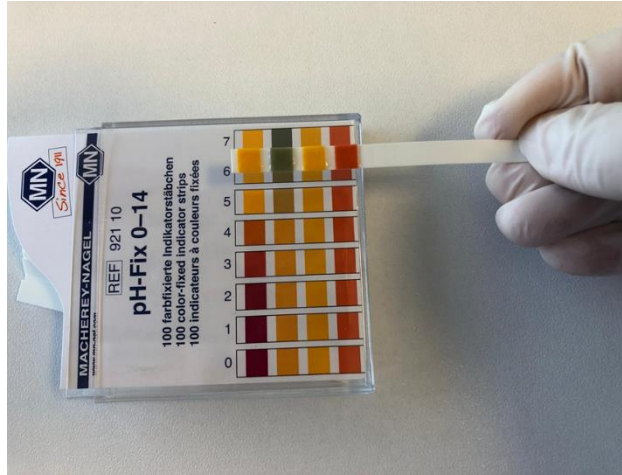
#### 4.13. Spinner Flaskta recCHO Hücrelerinin Glikoz Tüketiminin Belirlenmesi

Sayım için alınan reaktör örneklerinden 0, 1, 3, 5, 10, 14 ve 20. günlere ait süpernatantlarda glukometre ile glikoz konsantrasyonu ölçümü gerçeleştirilmiştir.



Şekil 4.25. Spinner flaskta recCHO hücrelerinin oleuropein içeren ve içermeyen SEROX SFM ortamındaki 0., 1., 3., 5., 10., 14., ve 20. günlere ait alınan örneklerde ölçülen glikoz konsantrasyonu sonucu olarak elde edilen glikoz tüketim eğrisi

Oleuropein içeren ve içermeyen ortamdaki recCHO hücrelerinin glukoz tüketimlerinde fark görülmemiştir. Kültürün 10. gününden sonra tüketim oldukça az gerçekleşmiş ve ortamdaki glukoz konsantrasyonu 20. günde 8 g/L'nin üzerinde belirlenmiştir.



Şekil 4.26. Spinner flaskta recCHO hücrelerinin kesikli kültürüne ait 20. gündeki ortam pH değeri

## 5. TARTIŞMA

Yapılan bu tez çalışmasında SFM ortamlarında biyoaktif molekül varlığında biyofarmasötik üretim amaçlı hücre sistemlerinin büyüme kinetikleri



incelenmiştir. Kültür sistemi kesikli üretim sistemi olacak şekilde kurulmuştur. Bu anlamda moleküllerin farklı başlangıç hücre sayılarına etkilerinin incelenmesi ve uygun dozun belirlenmesi için hücre proliferasyonu (MTT) testi oluşturulmuştur. Daha sonra MTT ile belirlenen konsantrasyonlardaki moleküller petrilere hücre büyüme ortamına eklenmiştir. 15 günlük süre boyunca her gün aynı saatte canlı-ölü hücre sayımları yapılmıştır. Aynı çalışma 1 L çalışma hacmindeki spinner flaskta da gerçekleşmiş ve canlı ve ölü hücre sayısındaki değişimlere göre büyüme eğrileri karşılaştırılmıştır.

Yapılan bu çalışma ile 4T1.2-Her2/Neu hücre hattı SFM'e adapte edilmiş olup hücre canlılığı ve devamlılığı da başarılı şekilde sağlanmıştır. Bu hücreler normal şartlarda %10 serum içeren ortamda yüzey bağımlı şekilde çoğalma gösterirken serum oranının azalması ile yüzeye tutunmaları azalmış ve ortamda tutunmayan hücreler tutunan hücreler ile birlikte morfolojik olarak farklı şekillerde karışık popülasyon gözlenmiştir.

Biyoreaktör ölçekleri birkaç yüz litreden 20.000 L'ye kadar çıkabilmektedir. Bu ölçeklerin kullanıldığı biyofarmasötik üretimleri ise ilerleyen teknoloji ile birlikte artan endüstriyel paya sahiptir. Bu ölçeklere ulaşmada her basamak için istenen inokulum miktarının elde edilebilmesi için bir dizi hücre ekim basamakları (seed train) gereklidir (Kern et al., 2016). Verimli bir üretim sağlamak için, ölçek büyütme basamaklarının süre ve sayıları minimumda tutulmalıdır. Aynı zamanda, üretim ölçeğinde yüksek canlılığı, ürün titresini ve büyüme oranını korumak için hücreler için iyi yetiştirme koşulları sağlanmalı ve optimize edilmelidir. Bu adımların optimizasyonu ile ilgili çalışmalar; işlem modlarını, hücre hatlarının araştırılmasını, inokulasyon ve kriyoprezervasyonla ilgili çalışmaları ve yeni ortam geliştirmeyi kapsamaktadır (Alahari 2009; Pohlscheidt et al., 2013; Seth et al., 2013). İnokulum için gerçekleştirilen bu basamakların ilk aşaması laboratuvar ölçeğindeki çalışmalardır (Abu-Absi, 2013).

Kesikli kültürler herhangi bir substratın, başlangıç aşamasından sonraki süreçte eklenmeden hücrelerin büyümesi ile karakterize edilir. Kültür süresince hücreler tipik olarak görülen fazlardan (lag fazı, log fazı, stasyonier faz ve ölüm fazı) geçerler. Hücre çoğalmasının zamanla azalması ve ölümün tetiklenmesi ortamda bulunan substratın azalması ve metabolitlerin artmasına bağlı olarak oluşturdukları inhibisyonla kaynaklanmaktadır ve hücre ölümleri genellikle apoptoz ile indüklenir. Biyoreaktör hacmine göre kültür süresince köpük önleyici ajanlar, pH'yı dengelemek için asit veya baz eklenmesi, havalandırma için hava

veya oksijen ile besleme sağlanabilir. Bu kültürler genellikle  $1-2 \times 10^5$  hücre/ml başlangıç hücre sayısında başlatılır ve yaklaşık 1-2 hafta sürer. Ürünün biyoreaktör ortamından alınmasından sonra biyoreaktörler temizlenir ve yeni bir kültür için hazır hale getirilir (Rubeai, 2015). Yapılan çalışmada başlangıç hücre sayısının optimizasyonunu sağlamak amacıyla petriyer içerisinde farklı başlangıç hücre sayılarında ( $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  ve  $5 \times 10^5$  hücre/ml) ön denemeler oluşturulmuş ve bu optimum başlangıç hücre sayısının  $1 \times 10^5$  hücre/ml olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca bakılarak optimizasyonda elde edilen bu sayının literatürü desteklediği söylenebilir (Rubeai, 2015). Başlangıç hücre sayısının belirlenmesinde göz önüne alınan bir diğer faktör MTT testinde denenen başlangıç hücre sayısına bağlı moleküllerin etkileridir. Bu anlamda  $3 \times 10^4$  hücre/ml başlangıç hücre sayısında herhangi bir değişim olmadığı gözlenirken,  $5 \times 10^4$  hücre/ml yoğunluğunun ilk 24 saatinde anlamlı bir proliferatif etki,  $8 \times 10^4$  hücre/ml'de ise 48. saatte anlamlı bir proliferatif etki gözlenmiştir. Yapılması planlanan kesikli kültürün 15 günlük olacağı düşünüldüğünde bu sürede görülen etkilerin devamlılığının 72. saatte de olmadığına bakılarak MTT testi sonuçlarının bu anlamda istenen farkı göstermediği belirlenmiştir.

MTT testi sonuçlarının molekül konsantrasyonlarına bağlı farkları incelendiğinde kurulması planlanan büyüme eğrisinde kullanılacak  $1 \times 10^5$  hücre/ml'lik başlangıç hücre sayısına  $8 \times 10^4$  hücre/ml miktarının daha yakın olmasından dolayı ayrıca 48. saat gibi daha uzun süreçte böyle bir farkın elde edilmesinden dolayı neohesperidin, nobiletin, gallik asit ve kateşinin  $0.098 \mu\text{g/ml}$ 'de oluşturduğu anlamlı proliferatif etkiye bağlı olarak petriyerde gerçekleştirilecek büyüme eğrisinde bu moleküller için belirtilen bu konsantrasyonların kullanılmasına karar verilmiştir. Bu koşullarda oleuropein, resveratrol ve tangeretinde anlamlı fark gözlenmediği için başlangıç hücre sayısı  $5 \times 10^4$  hücre/ml'nin 24. saat sonuçlarına bakılmıştır. Oleuropeinin ilk 24 saatinde gözlenen  $0.195 \mu\text{g/ml}$ 'deki etki aynı zamanda resveratrol ve tangeretinin  $0,391 \mu\text{g/ml}$ 'deki etkilerine bakılarak petriyerde uygulanacak madde konsantrasyonları belirlenmiştir.

Monoklonal antikorlar (mAbs) gibi biyofarmasötiklerin büyük ölçekli üretimi hem güvenlik hem de ekonomik nedenlerle genellikle serumsuz ortamın kullanılmasını gerektirir. Bununla birlikte, serum çoğu memeli hücresinin büyüme ortamının önemli bir takviyesi olduğundan, serumsuz ortamda üretim çok zaman alıcı bir hücre adaptasyon sürecini gerektirir (Costa et al., 2011). Serum içeren ortamda çoğalma gösteren hücrelerin SFM'e adaptasyonunda kabaca iki temel

yaklaşımından bahsedilebilir. Bunlar doğrudan adaptasyon ve kademeli adaptasyon olarak adlandırılır. Doğrudan adaptasyonda hücrelerin bulunduğu ortam direkt olarak SFM ile değiştirilir. Kademeli adaptasyonda ise hücreler azalan oranlarda serum içeren besin ortamlarında çoğaltılarak en son aşamada tamamen SFM'e geçirilirler. Kademeli adaptasyon doğrudan adaptasyona göre daha ılımlı koşullar yaratarak süreci daha sağlıklı tamamlar. Hücrelerin SFM'e adaptasyonunda canlılıklarının %90'dan yüksek olması, logaritmik fazda olmaları ve adaptasyon sırasında inokulum miktarlarının yüksek olması önemlidir. Hücrelerin bu süreçte normalde olduklarından çok daha hassas oldukları göz önüne alınmalıdır. Genel olarak, SFM'deki hücreler aşırı pH, sıcaklık, ozmolarite, mekanik kuvvetler ve enzim uygulamalarına karşı daha duyarlıdır. Aynı zamanda antibiyotik kullanımı da daha düşük seviye tutulmalı veya kullanımı tercih edilmemelidir. Bunun nedeni, serum proteinlerinin belirli miktarda antibiyotiği bağlama eğiliminde olmasıdır; bu serum proteinleri olmadan antibiyotik seviyesi bazı hücreler için toksik olabilir. Hücrelerin bir araya gelmesi (klamplar oluşturması) genellikle SFM'e adaptasyon sırasında meydana gelebilmektedir. Hücrelerin bu durumda nazikçe mekanik olarak ayrılması sağlanabilir. Bunun yanında SFM'e adaptasyon sırasında ve sonrasında hücresel morfolojide küçük değişiklikler de görülebilmektedir. Eğer ikilenme sürelerinde ve canlılıklarında yüksek oranda düşme yoksa, morfolojideki küçük değişiklikler normal karşılanabilir (ThermoFisher Scientific, 2019). Endüstriyel ölçekte serumlu ortamın getirdiği dezavantajlar sebebi ile 4T1.2-Her2/Neu hücreleri SFM'e sıralı adaptasyon yöntemi ile adapte edilmiştir. Bu amaçla hücreler pasajlanırken serumsuz Excell besin ortamının %10 serum içeren DMEM-F/12 ile yarı yarıya karıştırılması ile her 2 pasajda bir serum oranının yarı yarıya azalması sağlanmıştır. Bu süreçte literatürü destekler nitelikte hücrelerde bir araya gelme eğilimi gözlenmiş ve monolayer olan normal kültür morfolojisi tutunmayan hücreler ile süspanse-monolayer kültür şeklinde devam etmiştir (ThermoFisher Scientific, 2019; Ceccherini-Nelli and Matteoli, 2012). Süreç boyunca hücrelerin nazikçe pipetlenerek birbirinden ayrılması denenmiş fakat bu durum etkin şekilde sağlanamamıştır. Kültürde mikroskop altında hücresel morfolojide gözlenen değişimler de literatürü destekler niteliktedir. Serumlu ortamda %95'in üzerinde olan canlılık serumun azalması ile giderek düşmüş ve SFM ortamında canlılık %70-85 arasında değişiklik göstermiştir. SFM'de recCHO hücrelerinin canlılıkları %95 ve üzerinde iken 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin %70'lere düşmüştür. Hücrelerin bir araya gelme eğilimleri ortam bileşenlerine homojen şekilde ulaşmalarını engeller nitelik taşımaktadır. Bu yönden canlılığın düşük olmasındaki nedenlerden biri olarak gösterilebilir (Ceccherini-Nelli and Matteoli,

2012). Ayrıca 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinde antibiyotikli ortam kullanımı da canlılığın düşmesinin sebeplerinden biri olarak gösterilebilir. SFM'e adaptasyon genel anlamda değerlendirildiğinde 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin morfolojik açıdan popülasyonun heterojen yapıda olmasından dolayı SFM'de devamlılığını sağlamasına rağmen süspansiyon üretime uygun olmadığı, mikrotaşırı sistemlere ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir.

Petrilerde oluşturulan büyüme eğrilerine bakılacak olunursa ortama herhangi bir molekülün ilave edilmesi ile kontrolden daha yüksek bir üreme hızına ulaşılmadığı söylenebilir. Kontrol Excell ortamındaki 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin ikilenme süresi 25.8 saat olarak hesaplanırken kontrole en yakın ikilenme süresi oleuropeinde belirlenmiş ve 35.5 saat olarak hesaplanmıştır. Serum içeren kendi ortamındaki 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin petri içerisindeki ulaşılan maksimum hücre sayısı ml'de  $4.5 \times 10^6$  hücre olarak SFM'dekilerden yaklaşık 10 kat daha yoğundur. Velcade 26S proteazomunun seçici ve geri dönüşümlü bir inhibitördür ve ileri multipl miyelomlu hastaların tedavisi için onaylanmıştır. Velcade'nin 4T1 meme kanseri hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin incelendiği bir çalışmada 4T1 hücrelerine ait ikilenme süresi 22.9 saat olarak belirlenmiştir (Yerlikaya ve Erin, 2008). Kanser hücrelerinin metabolik ve çevresel strese yanıt olarak glikoz ve glutamin metabolizmasındaki farklılıkların belirlenmesinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise 4T1 hücrelerinin ikilenme süresi 13.6 saat olarak belirlenmiştir (Simões et al., 2015). Bu tez çalışmasında petrilerde %10 serum içeren DMEM/F-12 ortamında yapılan büyüme eğrisinin sonucu olarak hesaplanan ikilenme süresi 4T1.2-Her2/Neu hücreleri için 17 saat olarak bulunmuştur ve bu sonuç literatürü destekler niteliktedir. Serumlu ortamda ikilenme süresinin SFM'e göre yaklaşık iki kat daha hızlı olması, hücrelerin erişebildikleri maksimum sayının serumlu ortamda yaklaşık 10 kat daha yoğun olması ve log fazının da serumlu ortamda 4 gün gibi bir süreç tutarken SFM'de 2 gün gibi kısa olması 4T1.2-Her2 hücrelerinin SFM'e adapte edilmek için uygun olmadıkları sonucunu desteklemektedir.

Bunun yanında petrilerde oleuropein içeren ortamdaki 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin 3. günde çoğalmaya devam ettikleri ve kontrolden daha yüksek hücre sayısına ulaşmış olmaları varılan sonuçlardan biridir. Hücrelerin petrilerdeki Her2/Neu protein ekspresyonlarındaki değişimler gruplar arasında anlamlı derecede fark oluşturmamış genel anlamda hücreler stabil şekilde proteini yüzeylerinde eksprese etmişlerdir. Kültür süresinin sonuna doğru canlı hücre oranının da azalması ile protein ekspresyonunda azalma meydana gelmiştir.

Popülasyondaki ekspresyon süreç boyunca %80'in üzerinde görülmüştür fakat FL-1 kanalından alınan sinyalin şiddeti incelendiğinde 2. günden sonra görülen azalma büyüme eğrisindeki canlı hücre sayısındaki azalmayla paralellik göstermekte ve birbirlerini doğruladıkları söylenebilmektedir. Bu anlamda canlı hücre sayısının azalması ile protein ekspresyon şiddetinde azalmanın meydana gelmesi birbirini destekler niteliktedir.

Petrilerde elde edilen bu veriler doğrultusunda statik kültür ortamından 1L çalışma hacmindeki spinner flasklarda 15 günlük kesikli kültür oluşturulmuş ve oleuropein, kullanılan moleküller içerisinde ölçek büyümede denenecek molekül olarak belirlenmiştir. Bu anlamda 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin Excell kontrol ortamında ve 0.195 µg/ml oleuropein içeren Excell ortamında spinner flask içerisindeki büyüme eğrisi oluşturulmuştur. recCHO hücreleri de spinner flasklarda Serox SFM kontrol ortamında ve 0.195 µg/ml oleuropein içeren ortamda spinner flask içerisinde 20 günlük kesikli kültürde incelenmiştir. 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin petrilere kontrol ortamında ilk 2 günde yaklaşık  $4 \times 10^5$  hücre/ml'ye ulaştıkları bu durumun spinner flask içerisinde ise yine ilk günde  $3.5 \times 10^5$  hücre/ml'ye ulaşarak benzer özellik gösterdiği söylenebilir. Oleuropein içeren ortamda ise petri içerisinde 3 güne kadar  $4 \times 10^5$  hücre/ml'nin üzerine çıkan hücre sayısı spinner flask içerisinde daha düşük performans göstererek 2 günlük büyümenin sonunda 3. günde hücre sayısında hızlı bir düşüş olduğu görülmektedir. Hücre sayıları ve canlılık grafikleri yalnızca boya alıp almama yöntemi ile hemositometrede sayım yapılarak elde edilmiş verilerdir ve hücrelerin klamp oluşturarak büyüme eğilimleri bu süreçte zorluklar ve sayımlar arasında varyanslar yarattığı da göz önünde bulundurulmalıdır.

Biyofarmasötikler esas olarak memeli hücre kültürü tarafından üretilir. Terapötik proteinlere olan talebin artması nedeniyle, daha yüksek verimlilik elde etmek için farklı tekniklerin arayışları devam etmektedir. Bu amaca yönelik olarak, konak hücre mühendisliği dahil farklı yaklaşımlar (Fujita et al., 1996; Kuystermans et al., 2007) kullanılarak hücre çoğalması kontrol edilmektedir (Terada et al., 1996). Günümüzde CHO hücreleri, kısmen proteinlerin kararlı ve doğru glikozilasyonunu sağlayabildikleri için endüstride terapötik proteinler üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer memeli hücreleri ve mikroorganizmaların yanı sıra CHO hücreleri, yüksek hücre sayılarına ve sonuç olarak yüksek üretkenliğe yol açan proliferatif kapasiteye sahiptir. Bununla birlikte, genel olarak, hücre yoğunluğu yeterli seviyelere ulaştıktan sonra bile hücreler çoğalmaya devam eder. Bu aşırı proliferasyon, kültür ortamını

ağırlaştırır, bu da besinlerin etkisiz tüketimine, amonyak ve laktik asit gibi yan ürünlerin birikmesine yol açarak daha kısa kültür periyotları ve daha düşük üretkenlik sağlar. Bu nedenle, hücre yoğunluğu yeterli seviyelere ulaştıktan sonra, proliferasyonun yavaşlaması kültür süresini uzatır ve verimliliği arttırabilir (Takahashi et al., 1994; Chusainow et al., 2009).

Bu çalışmada ortama TNF- $\alpha$ 'ya spesifik Mab üreten recCHO hücrelerinin 1L'lik çalışma hacmindeki spinner flask içerisinde büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Kültür kesikli olarak gerçekleştirilmiş ve kontrol ortamı olarak Serox SFM ayrıca 4T1.2-Her2/Neu hücreleri üzerinde kontrole yakın sonuç veren oleuropein molekülü Serox SFM ortamına aynı miktarda (0.195  $\mu\text{g/ml}$ ) eklenerek hücre büyümeleri üzerindeki fark incelenmiştir. Hücrelerin oleuropein içeren ortamda kontrole göre çok daha yüksek hücre miktarına ulaştığı ve daha kısa sürede ikilenme süresine sahip oldukları sonucuna varılmıştır. Bu anlamda kontrol ortamının ikilenme süresi 23.2 saat iken oleuropein içeren ortamdaki değeri 16.5 saat olarak bulunmuştur. Bu anlamda oleuropein recCHO hücreleri için ortama eklenebilecek bir alternatif olma yönünde potansiyele sahiptir. Bunun yanında kültür canlılığına bakıldığında oleuropein içeren ortamdaki hücrelerin 16.günden itibaren %0 canlılığa sahip olduğu, kontrol ortamının ise 20. günde dahi canlılığını %10 oranında koruduğu görülmektedir. Bu sonuçlar literatürdeki hızlı büyüme ve yüksek hücre konsantrasyonlarına ulaşmanın kültür süresini kısaltacağı yönündeki bilgileri destekleyici nitelik taşımaktadır (Takahashi et al., 1994). Sigma Aldrich (2012) tarafından CHO hücreleri ile alakalı yayınlanan bilgiler ışığında bu hücrelerin ikilenme süreleri yaklaşık olarak 20 saat şeklinde belirtilmektedir. Hücrelerin alındığı Creative Biolab tarafından sunulan bilgiler bu tez çalışmasında kullanılan recCHO hücrelerinin ikilenme sürelerinin 17-20 saat arasında olduklarını ve aynı yerden alınan hücreler ile yapılan bir çalışmada ise (İz et al., 2018) ürettikleri Mab miktarının 200 mg/L'nin üzerinde oldukları ve yönündedir. Aynı zamanda ulaşılan yaklaşık hücre yoğunluğu  $1 \times 10^6$  hücre/ml'nin üzerinde olarak belirtilmekte ve farklı üretim koşulları uygulanarak  $7-8 \times 10^6$  hücre/ml'ye ulaşılabildiği belirtilmiştir (Creative Biolab, 2010). Literatürde yapılan bir çalışmada ise (Miki and Takagi, 2015) CHO hücrelerinin kültür süresinin 7. gününde  $1.2 \times 10^6$  hücre/ml'ye ulaştıkları belirtilmektedir. Bu çalışmada elde edilen verilere göre ise recCHO hücrelerinin kontrol ortamında  $8 \times 10^5$  hücre/ml'ye ulaştıkları, oleuropein içeren ortamda ise  $1 \times 10^6$  hücre/ml yoğunluğuna ulaştıkları belirlenmiştir. Bu yönden kontrol ortamındaki maksimum hücre sayısı literatüre göre düşük olarak elde edilmiştir. Bunun sebepleri olarak kültür koşullarındaki farklılıklar ve kullanılan ortamın farklı SFM'ler olmaları

örnek olarak gösterilebilir. Yapılan aynı çalışmada farklı ürün üreten bu recCHO hücrelerinin ürettikleri ürün konsantrasyonları 7. günde 200 mg/L'ye ulaşırken bizim yapmış olduğumuz veriler ışığında 10. günde maksimum Mab konsantrasyonuna ulaşıldığı ve ulaşılan bu miktarın 120 mg/L'ye yakın olduğudur. Bu sonuç ise literatüre göre benzerlik göstermekte ve recCHO hücrelerinden alınan ürün konsantrasyonlarında benzer miktarlarda ürün alınabildiğini destekler niteliktedir (İz et al., 2018). Oleuropein içeren ortamdaki hücrelerin ürettiği ürün konsantrasyonu incelendiğinde Serox SFM ortamından daha düşük seyrederek 80 mg/L'yi geçmediği belirlenmiştir. Bu durum da yüksek hücre sayısının her zaman yüksek ürün konsantrasyonu anlamına gelmeyeceği bilgisi ile tutarlıdır (Takahashi et al., 1994). Tüketilen glikoz miktarı bu anlamda hücre ortamından alınan örneklerde bakılmış ve recCHO hücrelerinin kontrol ve oleuropeinli ortamda benzer şekilde glikoz tükettikleri sonucuna varılmıştır.

Spinner flask içerisinde 4T1.2-Her2/Neu ve recCHO hücrelerinin birbirleri arasındaki farklarına bakmak gerekirse oleuropein molekülünün recCHO hücreleri üzerindeki proliferatif etkisinin daha yüksek olduğu söylenebilir. recCHO hücrelerinin kültürde ulaştıkları hücre miktarına bakılacak olunursa 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin 2 katından daha yüksek bir sayıya ulaştıkları görülebilir.

Sonuç olarak yapılan bu tez çalışması kapsamında bitkisel kaynaklardan elde edilen farklı moleküllerin hücre kültürü ortamlarına eklenmesinin potansiyele sahip olduğu söylenebilir. Bu yönde oleuropein molekülünün recCHO hücreleri üzerine daha farklı şartlarda araştırma yapılmasının kapıları açılmış olmaktadır. Bunun yanında 4T1.2-Her2 hücrelerinin SFM'e adapte edilebilmeleri önemli bir adımken canlılıklarını korumalarına karşın ml'de  $3 \times 10^5$  hücre sayısının üstüne çıkamadıkları ve heterojen kültüre sahip olduklarından dolayı endüstriye yönelik kullanımları bu şartlarda uygun görünmemektedir. Mikrotaşyıcı kullanılarak yarı-kesikli, yarı-sürekli veya sürekli üretim sistemlerinde kullanımı araştırılabilir.

## 6. SONUÇLAR

- Yapılan MTT sonuçlarına göre  $5 \times 10^4$  hücre/ml başlangıç hücre sayısında moleküllerin farklı konsntrasyonlarının hücre proliferasyonuna ilk 24 saatte anlamlı fark gösterdiği,  $8 \times 10^4$  hücre/ml başlangıç hücre sayısının ise 48. saatte bu farkı oluşturduğu,  $3 \times 10^4$  hücre/ml başlangıç hücre sayısının ise bu yönde bir fark yaratmadığı söylenebilir.

- 34.8mm'lik petrilere yapılan büyüme kinetiği analizlerinde 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin kontrol büyüme ortamında (Excell) ikilenme süresi 25.8 saat olarak en yüksek bulunmuş, kontrole en yakın değerleri veren molekül ise 35.5 saatlik ikilenme süresiyle oleuropeindir.

- Moleküllerin ortama eklenmesiyle elde edilen en düşük sonuç kateşine aittir ve ikilenme süresi 146.6 saat olarak bulunmuştur.

- Diğer moleküllerden resveratrol, tangeretin, neohesperidin, nobiletin ve gallik asitin ikilenme süreleri sırasıyla 63.7, 87.8, 70.5, 94.3 ve 109.7 saat olarak bulunmuştur.

- Petrilere 15 günlük kültür süresince hücrelerin eksprese ettiği Her2/Neu proteinini stabil olarak eksprese etmeye devam ettiği ve popülasyonda %80 ekspresyonun genel anlamda düşmediği gözlenmektedir.

- Bu moleküllerden oleuropein içeren ve içermeyen Excell ortamının 50 rpm karıştırma hızında spinner flask içerisinde 4T1.2-Her2/Neu hücreleri üzerine büyüme kinetikleri incelenmiş ve kontrolün ikilenme süresi 20.1 saat olarak bulunmuş, oleuropein içeren ortamdaki hücrelere ait ikilenme süresi ise 28.7 saat olarak bulunmuştur.

- Spinner flask içerisindeki ve petrileredeki hücre canlılıkları %60-90 arasında değişiklik göstermektedir.

- Spinner flask ve petrilere gerçekleştirilen 15 günlük kültür süresince 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin eksprese ettiği Her2/Neu proteinini



stabil olarak eksprese etmeye devam ettiği ve popülasyonda bu ekspresyonun %80'in altına düşmediği gözlenmektedir.

- Yapılan çalışma sonuçlarına göre recCHO hücreleri ile de denemesi gerçekleştirilen ve reaktör ortamında oleuropeinin etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışma ile recCHO hücrelerinin oleuropein içermeyen SEROX SFM ortamında 23.2 saatlik ikilenme süresine sahip olduğu bunun yanında oleuropein içeren SEROX SFM ortamında ise bu değerlerin 16.5 saat ile kontrolden daha yüksek bir ikilenme süresine sahip olduğu belirlenmiştir.

- TNF- $\alpha$ 'ya spesifik Mab üreten recCHO hücrelerinin ürettiği ürün bazında oleuropeinin etkisinin araştırılması amacıyla yapılan ELISA sonuçlarına göre oleuropein içeren büyüme ortamında ürün miktarının daha düşük olduğu söylenebilmektedir.

- recCHO hücrelerinin glikoz tüketimleri ilk 10 gün yüksekken 10. günden sonra tüketim hızları düşmüştür ve oleuropein içeren ve içermeyen Serox ortamlarında hücrelerin glikoz tüketimleri açısından fark gözlenmemiştir.

## 7. ÖNERİLER

Ortamda süspanse haldeki 4T1.2-Her2/Neu hücrelerinin birbirine tutunarak klamplar oluşturduğu ve bu anlamda her hücrenin ortamdaki bileşenlere homojen ulaşamadığı göz önüne alınmalıdır. Bu durum SFM'deki hücre canlılığının da daha düşük olmasına yol açmıştır. Bu şartlar altında spinner flasklarda düşük hücre yoğunluğu gözlenerek bu ortamda ölçek büyütme uygun olmadıkları söylenebilir. Bunun aşılması amacıyla büyüme ortamı formülasyonu geliştirilebilir, mikrotarıyıcı kullanılabilir.

Yapılan bu tez çalışmasında reaktör ortam koşulları sabit tutulmuş süreç içerisinde herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. Statik kültür şartlarının spinner flask içerisinde olmamasından kaynaklı oluşan farklı kayma gerilimi stresinin önüne geçilmesi veya azaltılması için farklı karıştırma stratejileri denenebilir. Bu karıştırma hızı optimizasyonu erlenler içerisinde küçük ölçeklerde sağlanabilir. Daha büyük ölçekte biyoreaktörlerde farklı parametrelerin kontrol edildiği biyoreaktör sistemlerinde hücrelerin davranışları araştırılabilir.

Yapılan çalışma kesikli kültürde sağlanmıştır. Bu anlamda farklı üretim stratejilerinde; yarı kesikli, yarı sürekli ve sürekli kültür sistemlerindeki davranışları araştırılarak hücre cevapları karşılaştırılabilir.

Ölçek büyütme sağlandıktan sonra farklı üretim koşullarında hücrelerin ve ürettikleri proteinlerin verimlilikleri karşılaştırılarak endüstriye daha faydalı olacak veriler elde edilebilir.

Bütün prosesin optimizasyonu amacıyla alt akım işlemleri göz önüne alınmalıdır. Bu amaçla üretim koşulları optimize edildikten sonra alt akım işlemlerinde farklı koşullar optimize edilmelidir.

Ortam formülasyonuna eklenmeyen potansiyeli yüksek diğer moleküllerin SFM eklenen moleküller farklı hücre hatları için özellikle endüstride yaygın kullanılan recCHO hücreleri için bakılabilir. Bu anlamda yapılan ön denemeler oldukça iyi performans göstermiş ve yapılacak ileri çalışmalara kapı açmıştır.

## 8. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abu-Absi, S., Xu, S., Graham, H., Dalal, N., Boyer, M., Dave, K.,** 2013, Cell Culture Process Operations For Recombinant Protein Production. In Mammalian Cell Cultures For Biologics Manufacturing, Springer, Berlin, Heidelberg, 35-68p
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S.,** 2014, Cellular And Molecular Immunology, E-book, Elsevier Health Sciences, 199p
- Agus, D.B., Gordon, M.S., Taylor, C., Natale, R.B., Karlan, B., Mendelson, D.S., Kelsey, S. M.,** 2005, Phase I clinical study of pertuzumab, a novel HER dimerization inhibitor, in patients with advanced cancer, *Journal of clinical oncology*, 23(11): 2534-2543 pp.
- Ahmad, A.A., Al Khalifa, I.I., Abudayeh, Z.H.,** 2018, The Role of Pomelo Peel Extract for Experimentally Induced Wound in Diabetic Rats, *Pharmacognosy Journal*, 10(5)
- Akao, Y., Ohguchi, K., Iinuma, M., Nozawa, Y.,** 2008, Interactive effects of polymethoxy flavones from Citrus on cell growth inhibition in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(6):2803-2810 pp.
- Al-Rubeai, M.,** 2015, Animal Cell Culture, Springer
- Alahari, A.,** 2009, Implementing cost reduction strategies for HuMab manufacturing processes. *BioProcess Int*, 7(2)
- Alpha Diagnostic,** “Anti Her2 ELISA”, <https://www.4adi.com/render.cz?method=searchProducts&categoryId=&keywords=anti-her2%20elisa> (Erişim tarihi: 22 Ocak 2019)
- Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, O., Ülkü, S.,** 2008, Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin, *Separation and Purification Technology*, 62(2):342-348 pp.
- Andreani, C., Bartolacci, C., Wijnant, K., Crinelli, R., Bianchi, M., Magnani, M., Marchini, C.,** 2017, Resveratrol fuels HER2 and ER $\alpha$ -positive breast cancer behaving as proteasome inhibitor. *Aging*, Albany NY, 9(2) 508 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Ayyıldız-Tamiş, D.**, 2010, Biyoreaktörde Pilot Ölçekli Monoklonal Antikor Üretimi, Doktora Tezi, Ege Fen Bilimleri Enstitüsü, 138s.
- Ayyıldız-Tamis, D., Nalbantsoy, A., Elibol, M., Deliloglu-Gurhan, S.I.**, 2012, Cultivation and comparison of BHK-21 anchorage semidependent cell line in different production systems, *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi*, 37(3).
- ATCC**, “Advantages to serum-free media”, [http://www.lgcstandards-atcc.org/Global/FAQs/1/D/Advantages%20to%20serum-free%20media-421.aspx?geo\\_country=tr](http://www.lgcstandards-atcc.org/Global/FAQs/1/D/Advantages%20to%20serum-free%20media-421.aspx?geo_country=tr) (Erişim tarihi: 15 Ocak 2019)
- Bayçın, D., Altıok, E., Ülkü S., Bayraktar, O.**, 2007, Adsorption of olive leaf (*Olea europaea* L.) antioxidants on silk fibroin, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(4):1227-1236 pp.
- Bazzoni F, Beutler B.**, 1996, The tumor necrosis factor ligand and receptor families, *N Engl J Med*. 334:1717-25 p.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J.A.**, 2000, Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves, *Food Chemistry*, 68(4): 457-462 p.
- Bendtzen, K.**, 2015, Immunogenicity of anti-TNF- $\alpha$  biotherapies. I. Individualized medicine based on immunopharmacological evidence, *Frontiers in immunology*, 6, 152 p.
- Bioplan, 2018.** “Report and Survey of Biopharmaceutical Manufacturing Capacity and Production”, [http://bioplanassociates.com/wp-content/uploads/2018/07/15thAnnualBiomfgReport\\_TABLEOFCONTENTS-LR.pdf](http://bioplanassociates.com/wp-content/uploads/2018/07/15thAnnualBiomfgReport_TABLEOFCONTENTS-LR.pdf) (Erişim tarihi: 1 Kasım 2019)
- Bjare, U.**, 1992, Serum-free cell culture, *Pharmacol Ther*, 53, 355-74 p.
- Brindley, D.A., Davie, N.L., Culme-Seymour, E.J.**, 2012, Peak serum: Implications of serum supply for cell therapy manufacturing, *Regen Med* 7, 7-13 p.

#### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Brotas, A.M., Cunha, J.M.T., Lago, E.H.J., Machado, C.C.N., Carneiro, S.C.D.S.,** 2012, Tumor necrosis factor-alpha and the cytokine network in psoriasis, *Anais brasileiros de dermatologia*, 87(5): 673-683 p.
- Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöfl, H., Pfaller, W., Gstraunthaler, G.,** 2010, “Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database”, *Alternatives to Animal Experimentation*, 53-62 p.
- Busher, J.T.,** 1990, Serum albumin and globulin. In Walker H. K., Hall W. D. and Hurst J. W. (eds.), *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, 3rd ed., Boston, Butterworths, 497-499
- Carlini, P., Ferranti, P., Polizio, F., Ciriolo, M.R., Rotilio, G.,** 2007, Purification and characterization of alpha-fetoprotein from the human hepatoblastoma HepG2 cell line in serum-free medium, *Biometals*, 20:869–878 p.
- Carter, P., Presta, L.E.N., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Shepard, H.M.,** 1992, Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(10): 4285-4289 p.
- Ceccherini-Nelli, L., Matteoli, B. (Eds.),** 2012, *Biomedical Tissue Culture*. BoD–Books on Demand.
- Ceran, C., Cokol, M., Cingoz, S., Tasan, I., Ozturk, M., Yagci, T.,** 2012, Novel anti-HER2 monoclonal antibodies: synergy and antagonism with tumor necrosis factor- $\alpha$ , *BMC Cancer*, 12(1): 450 p.
- Chen, M.K., Hung, M.C.,** 2015, Proteolytic cleavage, trafficking, and functions of nuclear receptor tyrosine kinases, *The FEBS Journal*, 282(19): 3693-3721 p.
- Chusainow J., Yang Y.S., Yao J.H., Toh P.C., Asvadi P., Wong N.S., Yap M.G.,** 2009, A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer?, *Biotechnol Bioeng.*, 102:1182–1196 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Cinatl, J.**, 1969, Inorganic-organic multimolecular complexes of salt solutions, culture media and biological fluids and their possible significance for the origin of life. *J Theor Biol.*;23:1-10 p.
- Citri, A. and Yarden, Y.**, 2006, EGF–ERBB signalling: towards the systems level, *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(7): 505 p.
- Costa, A.R., Rodrigues, M.E., Henriques, M., Oliveira, R., Azeredo, J.**, 2011, Strategies for adaptation of mAb-producing CHO cells to serum-free medium. In *BMC proceedings*, 5(8):112 p.
- Creative Biolabs**, “CHO Cell Lines”, [https://www.gmp-creativebiolabs.com/cho-cell-lines\\_65.htm](https://www.gmp-creativebiolabs.com/cho-cell-lines_65.htm) (Erişim tarihi: 23 Kasım 2019)
- Daukste, L., Basse, B., Baguley, B.C., Wall, D.J.**, 2012, Mathematical determination of cell population doubling times for multiple cell lines, *Bulletin of mathematical biology*, 74(10), 2510-2534 p.
- Das, M., Molnar, P., Devaraj, H.**, 2003, Electrophysiological and morphological characterization of rat embryonic motoneurons in a defined system, *Biotechnol Prog.*, 19: 1756-1761 p.
- Das, M., Molnar, P., Gregory, C.**, 2004, Long-term culture of embryonic rat cardiomyocytes on an organosilane surface in a serum-free medium. *Biomaterials*, 25: 5643-5647 p.
- Decaria, P., Smith, A., Whitford, W.**, 2009, Many considerations in selecting bioproduction culture media, *BioProc Int*, 7:44–51 p.
- Dev, S.K., Choudhury, P.K., Srivastava, R., Sharma, M.**, 2019, Antimicrobial, anti-inflammatory and wound healing activity of polyherbal formulation, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111: 555-567 p.
- Eagle, H.**, 1955, The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (strain HeLa) in tissue culture, *J Exptl Med.*, 102:37–48 p.

- Elhofy, A.**, 2016, Novel Cell-Ess® supplement used as a feed or as an initial boost to CHO serum free media results in a significant increase in protein yield and production, *Computational and structural biotechnology journal*, 14: 319-324.
- Emim, J.A.D.S., Oliveira, A.B., Lapa, A.J.**, 1994, Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice, *Journal of pharmacy and Pharmacology*, 46(2): 118-122 p.
- Erdoğan, İ., Bayraktar, O., Uslu, M.E., Tuncel, Ö.**, 2018, Wound Healing Effects of Various Fractions of Olive Leaf Extract (OLE) on Mouse Fibroblasts, *Romanian Biotechnological Letters*, 23(6): 14217-14228 p.
- Esch, M.B., Ueno, H., Applegate, D.R. and Shuler, M.L.**, 2016, Modular, pumpless body-on-a-chip platform for the co-culture of GI tract epithelium and 3D primary liver tissue, *Lab Chip*, 16: 2719-2729 p.
- Evans, T.R.J., Rowlands, M.G., Law, M., Coombes, R.C.**, 1994, Intratumoral oestron sulphatase activity as a prognostic marker in human breast carcinoma, *British journal of cancer*, 69(3): 555 p.
- Even, M.S., Sandusky, C.B., Barnard, N.D.**, 2006, Serum-free hybridoma culture: Ethical, scientific and safety considerations, *Trends Biotechnol.*, 24: 105-108 p.
- Fernández, A.G., Adams, M.R., Fernandez-Diez, M.J.**, 1997, Table olives: production and processing. Springer Science & Business Media.
- Fong, Y., Tracey, K.J., Moldawer, L.L.**, 1989, Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia, *J. Exp. Med.* 170:1627 p.
- Franklin, M.C., Carey, K.D., Vajdos, F.F., Leahy, D.J., De Vos, A.M., Sliwkowski, M.X.**, 2004, Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex, *Cancer cell*, 5(4): 317-328 p.
- Freshney, R.I.**, 2005, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (5th). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Publication.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Fujita, T., Terada, S., Ueda, H., Suzuki, E.**, 1996, Overexpression of bcl-2 improved survival of COS-1 cells and enhanced transient protein production, *J Ferment Bioeng.*, 82:589–591 p.
- Gaspar-Pintilieșcu, A., Stanciuc, A.M., Craciunescu, O.**, 2019, Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: A review, *International journal of biological macromolecules*, 138:854-865 p.
- Globenewswire**, “Global Cell Culture Media Market Will Reach USD 1,394 Million by 2026: Zion Market Research According to the report, global cell culture media market was valued at around USD 676 million in the year...”, <https://markets.businessinsider.com/news/stocks/global-cell-culture-media-market-will-reach-usd-1-394-million-by-2026-zion-market-research-according-to-the-report-global-cell-culture-media-market-was-valued-at-around-usd-676-million-in-the-year-1022222499> (Erişim tarihi: 23 Ekim 2019)
- Gstraunthaler, G.**, 2003, Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture, *ALTEX*, 20: 275-81 p.
- Gstraunthaler, G., Lindl, T. van der Valk, J.**, 2014, A severe case of fraudulent blending of fetal bovine serum strengthens the case for serum-free cell and tissue culture applications, *Altern Lab Anim* 42: 207-209 p.
- Hata, R., Senoo, H.**, 1989, L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissue-like substance by skin fibroblasts, *J Cell Physiol*, 138:8–16 p.
- Hodgson, J.**, 1995, To treat or not to treat: That is the question for serum, *Biotechnology* 13: 333-343 p.
- Hunter, M., Yuan, P., Vavilala, D., Fox, M.**, 2019, Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells, *Current protocols in protein science*, 95(1), 77 p.
- Immuno-oncology news**, “Neuwax”, <https://immuno-oncologynews.com/neuwax-nelipepimut-s/> (Erişim tarihi: 22 Ocak 2019)

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**



- ISIA**, 2016. “ISIA traceability certification”, <http://www.serumindustry.org/traceability.htm> (Erişim tarihi: 11 Kasım 2019)
- Iz, S.G., Inevi, M.A., Metiner, P.S., Tamis, D.A., Kisbet, N.**, 2018, A biodesign approach to obtain high yields of biosimilars by anti-apoptotic cell engineering: A case study to increase the production yield of anti-TNF alpha producing recombinant CHO cells, *Applied biochemistry and biotechnology*, 184(1): 303-322 p.
- Kawaguchi, K., Mizuno, T., Aida, K., Uchino, K.**, 1997, Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and Pseudomonas. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(1): 102-104 p.
- Keehan W.M., Barnes, D., Reid, L., Stanbridge, E., Murakami, H., Sato, G.**, 1990, Frontiers in mammalian cells culture. *In Vitro Cell Dev Biol.* 26:9–23 p.
- Keen, M.J. and Rapson, N.T.**, 1995, Development of a serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line, *Cytotechnology*, 17(3): 153–163 p.
- Kim, J., Cho, E.B., Lee, K.Y.**, 2013, Development of Hydrogel Containing Catechin for Wound Dressing, *Polymer Korea*, 37(4): 462-469 p.
- Kim, J.Y., Kim, Y. G., Lee, G. M.**, 2012, CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential, *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3), 917-930 p.
- Koga, N., Ohta, C., Kato, Y., Haraguchi, K., Endo, T., Ogawa, K., Yano, M.**, 2011, In vitro metabolism of nobiletin, a polymethoxy-flavonoid, by human liver microsomes and cytochrome P450, *Xenobiotica*, 41(11): 927-933 p.
- Korkina, L., De Luca, C., Pastore, S.**, 2012, Plant polyphenols and human skin: friends or foes, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259(1): 77-86 p.

#### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kuystermans, D., Krampe, B., Swiderek, H., Al-Rubeai, M.**, 2007, Using cell engineering and omic tools for the improvement of cell culture processes, *Cytotechnology*, 53(1-3):3-22 p.

- Jayapal, K.P., Wlaschin, K.F., Hu, W.S., Yap, M.G.,** 2007, Recombinant protein therapeutics from CHO cells—20 years and counting, *Chem Eng Prog.*, 103:40–47 p.
- Le Corre, L., Chalabi, N., Delort, L., Bignon, Y.J., Bernard-Gallon, D.J.** 2005, Resveratrol and breast cancer chemoprevention: molecular mechanisms, *Molecular nutrition & food research*, 49(5): 462-471 p.
- Lee, O.H., Lee, B.Y.,** 2010, Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract, *Bioresource technology*, 101(10): 3751-3754.
- Lemmon, M.A., Schlessinger, J.,** 2010, Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell*, 141(7): 1117-1134 p.
- Li, S., Wang, H., Guo, L., Zhao, H., Ho, C.T.,** 2014, Chemistry and bioactivity of nobiletin and its metabolites, *Journal of Functional Foods*, 6, 2-10 p.
- Li, S., Sang, S., Pan, M.H., Lai, C.S., Lo, C.Y., Yang, C.S., Ho, C.T.,** 2007, Anti-inflammatory property of the urinary metabolites of nobiletin in mouse, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(18): 5177-5181 p.
- Li, W., Kandhare, A.D., Mukherjee, A.A., Bodhankar, S.L.,** 2018, Hesperidin, a plant flavonoid accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats: Role of TGF- $\beta$ /Smads and Ang-1/Tie-2 signaling pathways, *EXCLI journal*, 17: 399-419 p.
- Ma, J., Luo X.D., Protiva, P., Yang, H., Ma, C., Basile, M.J., Weinstein, I. B., Kennelly, E.J.** 2003, Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla), *J. Nat. Prod.*, 66:983–986 p.
- Mani, V.M.,** “Animal Cell Science & Technology“, [https://www.academia.edu/9881622/Culture\\_media\\_serum\\_serum\\_free\\_media\\_cell\\_cytotoxicity\\_and\\_viability](https://www.academia.edu/9881622/Culture_media_serum_serum_free_media_cell_cytotoxicity_and_viability) (Erişim tarihi: 25 Ekim 2019)

#### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Markin, D., Duek, L., Berdicevsky, I.,** 2003, *In vitro* antimicrobial activity of olive leaves. Antimikrobielle Wirksamkeit von Olivenblättern *in vitro*. *Mycoses*, 46(3-4): 132-136 p.

- Matsuya, Y., Yamane, I.**, 1986, Population-dependent requirements of vitamin B12 and metabolically related substances of several mouse cell types in serum-free, albumin-fortified medium, *Cell Struct Funct* 11:9–19 p.
- Mc Keehan, W.L., Barnes, D., Reid, L., Stanbridge, E., Murakami, H., Sato, G.H.**, 1990, Frontiers in mammalian cells culture, *In vitro cellular & developmental biology*, 26(1): 9-23 p.
- McCann, A.H., Dervan, P.A., O'Regan, M., Codd, M.B., Gullick, W.J., Tobin, B.M., Carney, D.N.**, 1991, Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer, *Cancer research*, 51(12): 3296-3303.
- McGillicuddy, N., Floris, P., Albrecht, S., Bones, J.**, 2018, Examining the sources of variability in cell culture media used for biopharmaceutical production, *Biotechnology letters*, 40(1), 5-21 p.
- Merten, O.W.**, 2002, Development of serum-free media for cell growth and production of viruses/viral vaccines--safety issues of animal products used in serum-free media, *Developments in biologicals*, 111, 233-257 p.
- Miki, H., Takagi, M.**, 2015, Design of serum-free medium for suspension culture of CHO cells on the basis of general commercial media, *Cytotechnology*, 67(4), 689-697 p.
- Mosmann, T.**, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays., *J Immunol Methods*, 65(1-2):55-63 p.
- Nalbantsoy, A., Bora, K., Deliloglu-Gurhan, I.**, 2011., Metabolic activity and monoclonal antibody production of Salmonella Enteritidis O and H antigen specific hybridoma cells in static culture, *Hybridoma*, 30(2), 189-193 p.

#### **KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Nalbantsoy, A., Karış, M., Karakara, L., Akgül, Y.**, 2016, Antioxidant, cytotoxic and iNOS activity of *Liquidambar orientalis* Mill. resin extracts., *Turkish Journal of Biochemistry*, 41(3): 198-205

- Nahta, R., Yu, D., Hung, M.C., Hortobagyi, G.N., Esteva, F.J.**, 2006, Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 3(5), 269 p.
- Natarajan, A., Molnar, P., Sieverdes, K.**, 2006, Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity, *Toxicol in Vitro*, 20: 375-381 p.
- Natarajan, A., Stancescu, M., Dhir, V.**, 2011, Patterned cardiomyocytes on microelectrode arrays as a functional, high information content drug screening platform, *Biomaterials*, 32, 4267-4274 p.
- Ng, T.B., He, J.S., Niu, S.M., Zhao, L., Pi Z.F., Shao, W., Liu, F.A.**, 2004, Gallic acid derivative and polysaccharides with antioxidative activity from rose (*Rosa rugosa*) flowers, *J. Pharm. Pharmacol.*, 56:537–545 p.
- Niehans, G.A., Singleton, T.P., Dykoski, D., Kiang, D.T.**, 1993, Stability of HER-2/neu expression over time and at multiple metastatic sites, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 85(15): 1230-1235 p.
- Omar, S.H.**, 2010, Oleuropein in olive and its pharmacological effects, *Scientia pharmaceutica*, 78(2): 133-154 p.
- Onozuka, H., Nakajima, A., Matsuzaki, K., Shin, R.W., Ogino, K., Saigusa, D., Yamakuni, T.**, 2008, Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and A $\beta$  pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(3): 739-744 p.
- Ötleş, S., Özyurt, V.H.**, 2012, Oleuropein ve önemi, *Zeytin Bilimi*, (1): 59-71 p.
- Özverel, C.S.**, 2018, Meme Kanserine Karşı HER2/Neu Antijeni Ve Saponin Adjuvanı İçeren Aşı Kombinasyonunun Geliştirilmesi

#### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Pasieka, A., Morgan, J.**, 1959, Glutamine metabolism of normal and malignant cells cultivated in synthetic media. *Nature.*;183:1201-2 p.

**Pazos, P., Boveri, M., Gennari, A., Casado, J., Fernandez, F., Prieto, P.,** 2004, Culturing cells without serum: Lessons learnt using molecules of plant origin, *ALTEX*, 21(2), 67–72 p.

**Pohlscheidt, M., Jacobs, M., Wolf, S., Thiele, J., Jockwer, A., Gabelsberger, J., Jenzsch, M., Tebbe, H., Burg, J.,** 2013, Optimizing capacity utilization by large scale 3000 L perfusion in seed train bioreactors, *Biotechnol Progress*, 29:222–229 p.

**Pegram, M., and Slamon, D.,** 2000, Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy. In *Seminars in oncology* (Vol. 27, No. 5 Suppl 9, pp. 13-19).

**Persistence Market Research,** “Serum free market share”, <https://www.persistencemarketresearch.com/market-research/serum-free-media-market.asp> (Erişim tarihi: 15 Ekim 2019)

**Price, P.J.,** 2017, Best practices for media selection for mammalian cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 53(8): 673-681 p.

**PubChem,** **2019.** “Neohesperidin“, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Neohesperidin#section=2D-Structure> (Erişim tarihi: 22 Ekim 2019)

**PubChem,** **2019.** “Oleuropein“, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oleuropein#section=2D-Structure> (Erişim tarihi: 22 Ekim 2019)

**PubChem,** **2019.** “Catechin“, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Catechin#section=2D-Structure> (Erişim tarihi: 22 Ekim 2019)

**PubChem,** **2019.** “Gallic Acid“, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic-acid> (Erişim tarihi: 22 Ekim 2019)

#### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

**PubChem,** **2019.** “Resveratrol“, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resveratrol#section=2D-Structure> (Erişim tarihi: 22 Ekim 2019)

**PubChem,** **2019.** “Tangeretin”,  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tangeretin#section=2D-Structure>  
 (Erişim tarihi: 22 Ekim 2019)

**PubChem,** **2019.** “Nobiletin”,  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nobiletin#section=Structures>  
 (Erişim tarihi: 22 Ekim 2019)

**Price, P.J.,** 2017, Best practices for media selection for mammalian cells, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 53(8): 673-681 p.

**Rauch, C., Feifel, E., Schöfl, H.,** 2008, Alternatives to the use of fetal bovine serum: Platelet lysates as serum replacement in cell and tissue culture, *ALTEX 25 (Suppl. I)*, 54-55 p.

**Rauch, C., Feifel, E., Spötl, H.P.,** 2009, Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Platelet Lysates as a Serum Substitute in Cell Culture Media, *ALTEX 26 (Spec. Issue)*, 119 p.

**Ross, J.S., and Fletcher, J.A.** 1999, HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer, *American journal of clinical pathology*, 112(1): 53-67 p.

**Rubin, I., and Yarden, Y.,** 2001, The basic biology of HER2, *Annals of oncology*, 12(1): 3-8 p.

**Samancıoğlu, S., Esen, A., Ercan, G., Mansoub, N.H., Vatansever, S., İnce İ.,** 2016, A new dressing material in diabetic wounds: Wound healing activity of oleuropein-rich olive leaf extract in diabetic rats, *Gaziantep Med J*, 22(1): 14-21 p.

**Schlessinger, J.,** 1988, Signal transduction by allosteric receptor oligomerization, *Trends in biochemical sciences*, 13(11): 443-447 p.

**Schneider, M.R., Wolf, E.,** 2009, The epidermal growth factor receptor ligands at a glance, *Journal of cellular physiology*, 218(3): 460-466 p.

#### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

**Schottelius, A.J., Moldawer, L.L., Dinarello, C.A., Asadullah, K., Sterry, W., Edwards, C.K.,** 2004, 3rd. Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis, *Exp Dermatol.*, 13:193-222 p.

- Seth, G., Hamilton, R.W., Stapp, T.R., Zheng, L., Meier, A., Petty, K., Leung, S., Chary, S.,** 2013, Development of a new bioprocess scheme using frozen seed train intermediates to initiate CHO cell culture manufacturing campaigns, *Biotechnol Bioeng.*, 110:1376–1385 p.
- Siegel, W. and Foster, L.,** 2013, Fetal bovine serum: The impact of geography, *BioProcessing*, 12: 28-30 p.
- Sigma Aldrich, 2012.** “Extended, High Density Growth of CHO-K1 Cells in EX-CELL® 302 Serum-Free Medium”, [https://www.google.com.tr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=2ahUKEwiK59L0sMnmAhXKxcQBHXrZDegQFjABegQIDBAE&url=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcontent%2Fdam%2Fsigmaaldrich%2Fdocs%2FSigma%2FGeneral\\_Information%2F%2Fr003.pdf&usg=AOvVaw0TepBb29mlJ\\_z63CYnY\\_eL](https://www.google.com.tr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=2ahUKEwiK59L0sMnmAhXKxcQBHXrZDegQFjABegQIDBAE&url=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcontent%2Fdam%2Fsigmaaldrich%2Fdocs%2FSigma%2FGeneral_Information%2F%2Fr003.pdf&usg=AOvVaw0TepBb29mlJ_z63CYnY_eL) (Erişim tarihi: 1 Kasım 2019)
- Simões, R.V., Serganova, I.S., Kruchevsky, N., Leftin, A., Shestov, A.A., Thaler, H.T., Ackerstaff, E.,** 2015, Metabolic plasticity of metastatic breast cancer cells: adaptation to changes in the microenvironment, *Neoplasia*, 17(8): 671-684 p.
- Sirsjö, A., Karlsson, M., Gidlöf, A., Rollman, O., Törmä, H.,** 1996, Increased expression of inducible nitric oxide synthase in psoriatic skin and cytokine-stimulated cultured keratinocytes, *Br J Dermatol.*, 134:643-8 p.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L.,** 1987, Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785):177-182 p.
- Steinhoff, M., and Luger, T.A.,** 2005, The skin cytokine network. In: Bos JD, editor. Skin Immune System. Cutaneous Immunology and Clinical Immunodermatology. 3rd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press;. 349-72 p.

#### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Sternberg, J., Benoit, J., Mercier, A., Paquette, J.,** 1964, Role Of Some Trace Elements (Zinc And Cobalt) In The Growth Of B.C.G. *Rev Can Biol.*;23:353-65 p.
- Tai, W., Mahato, R., Cheng, K.,** 2010, The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery, *Journal of controlled release*, 146(3): 264-275 p.

- Takahashi, K., Terada, S., Ueda, H., Makishima, F., Suzuki, E.**, 1994, Growth rate suppression of cultured mammalian cells enhances protein productivity, *Cytotechnology*, 15:57–64 p.
- Terada, S., Suzuki, E., Ueda, H., Makishima, F.**, 1996, Cytokines involving gp130 in signal transduction suppressed growth of a mouse hybridoma cell line and enhanced its antibody production, *Cytokine.*, 8:889–894 p.
- ThermoFisher Scientific, 2019.** “Adaptation of Cell Cultures to a Serum-Free Medium”, <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/protocols/cell-culture/serum-protocol/adaptation-of-cell-cultures-to-a-serum-free-medium.html> (Erişim tarihi: 20 Mart 2019)
- Tracey, K.J., Beutler, B., Lowry, S.F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I.W.**, 1986, Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin, *Science*, 234:470-4 p.
- Tracey, K.J., Vlassara, H., Cerami, A.**, 1989, Cachectin/tumour necrosis factor, *Lancet*, 1:1122-6 p.
- van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W. G., Fu, J., Pistollato, F.**, 2018, Fetal bovine serum (FBS): past–present–future, *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 35(1), 99-118 p.
- van der Valk, J., Mellor, D., Brands, R.**, 2004, The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture, *Toxicol., in Vitro* 18, 1-12 p.
- Varghese, K., Das, M., Bhargava, N.**, 2009, Regeneration and characterization of adult mouse hippocampal neurons in a defined *in vitro* system, *J Neurosci Methods*, 177: 51-59 p.

#### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Vassalli, P.**, 1992, The pathophysiology of tumor necrosis factors, *Annu Rev Immunol.*, 10:411-52 p.
- Versteegen, R.**, 2016, Serum: What, when, and where?, *BioProcessing*, 15:18-21 p.



- Weaver, A.L., Kavanaugh, A., Beutler, B.A., Burmester, G.R., O'Dell, J.R.**, “The evolution of biologic DMARD therapy in rheumatoid arthritis management”, <http://www.medscape.com/viewprogram/2109> (Erişim tarihi: 3 Şubat 2019)
- Willrich, M.A., Murray, D.L., Snyder, M.R.**, 2014, Tumor necrosis factor inhibitors: clinical utility in autoimmune diseases, *Transl Res.*, 165(2):270–82 p.
- Xie, L. and Wang, D.I.C.**, 1994a, Stoichiometric analysis of animal cell growth and its application in medium design, *Biotechnology and Bioengineering*, 43(11):1164–1174 p.
- Xie, L. and Wang, D.I.C.**, 1994b, Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies, *Biotechnology and Bioengineering*, 43(11):1175–1189 p.
- Yang, D., Moh, S., Son, D., You, S., Kinyua, A., Ko, C., Kim, K.**, 2016, Gallic acid promotes wound healing in normal and hyperglucidic conditions, *Molecules*, 21(7): 899 p..
- Yang, S., Ma, K., Geng, Z., Sun, X., Fu, X.**, 2015, Oriented cell division: new roles in guiding skin wound repair and regeneration, *Bioscience reports*, 35(6) p.
- Yang, Z. and Xiong, H.R.**, 2012, Culture conditions and types of growth media for mammalian cells, *Biomedical Tissue Culture*, 1: 3-18 p.
- Yao, T., Asayama, Y.**, 2017, Animal-cell culture media: history, characteristics, and current issues, *Reproductive medicine and biology*, 16(2): 99-117 p.
- Yarden, Y. and Shilo, B.Z.**, 2007, SnapShot: EGFR signaling pathway, *Cell*, 131(5): 1018 p.

#### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X.**, 2001, Untangling the ErbB signalling network, *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(2): 127 p.
- Yerlikaya, A. and Erin, N.**, 2008, Differential sensitivity of breast cancer and melanoma cells to proteasome inhibitor Velcade, *International journal of molecular medicine*, 22(6): 817-823 p.
- Zhang, J.Y., Robinson, D.**, 2005, Development of animal-free, protein-free and chemically-defined media for NSO cell culture, *Cytotechnology*, 48:59–74 p.

- Zhou, W., Rehm, J., Hu, W.S.,** 1995, High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding, *Biotechnology and Bioengineering*, 46(6):579–587 p.
- Zhu, W.B., Xiao, N., Liu, X.J.,** 2017, Dietary flavonoid tangeretin induces reprogramming of epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer cells by targeting the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway, *Oncology letters*, 15(1), 433-440 p.



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecinde bana her zaman destek olan danışman hocam Doç. Dr. Ayşe Nalbantsoy'a,

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca bana bana kanser moleküler biyolojisi laboratuvarının kapılarını daima açan sayın Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz'a,

Floresan görüntülemelerinde bana destek ve yardımcı olan Elif İşel ve Aadil Javed'e,

Laboratuvarda tüm çalışma sürecim boyunca beni yalnız bırakmayan, gerektiğinde fikir alışverişlerinde bulunduğum çok sevgili laboratuvar arkadaşlarım Büşra Çakır ve Gözde Kasaplıgil'e,

Laboratuvardaki çalışmalarında yardımlarını aldığım laboratuvar arkadaşlarım Fulya İŖen'e, Batuhan Orman'a ve Seray Gr'e,

Tezin gerekleŖtirilmesindeki yardımlarından dolayı Serox firmasına,

Tezde kullanılan 4T1.2-Her2 hücresini sağladığı için Prof. Dr. Micheal Kershaw'a ve recCHO hücresini sağladığı için Dr. Duygu Ayyıldız Tamış'e,

Yüksek Lisans sürecimde bana destek olan erkek arkadaŖım Civan Ali AteŖ'e,

En önemlisi tüm hayatım boyunca benden maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olduklarını bildiğim ve hissettiğim sevgili annem Didem Tapan, babam Mehmet Polatlı, anneannem Kadriye Yrkoğlu'na ve kardeŖlerim Görkem Tapan, Sabiha Su Polatlı, Eda Polatlı ile Fatih Tapan ve zlem Polatlı'ya teŖekkrlerimi en içten dileklerle sunarım.

.... / .... / 2020

İmza

Elifsu POLATLI

## ZGEMİŖ

**Elifsu POLATLI**

E-mail: elifsu.polatli@gmail.com

### EğİTİM

**2017-2020**

Ege Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyomühendislik Bölümü  
Yüksek Lisans

**2014-2018**

Ege Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi  
Biyomühendislik Bölümü  
Lisans (ift Anadal Programı)

**2013-2017**

Ege Üniversitesi

Mühendislik Fakültesi  
Gıda Mühendisliği Bölümü  
Lisans

**2016 Temmuz-Eylül** Oklahoma State University (Oklahoma State Üniversitesi)

Atık Ekmeklerden Biyoetanol Üretimi

Staj

**2013**

Bornova Anadolu Lisesi

Lise eğitimi

## DİLLER

- Türkçe
- İngilizce

## KONGRELER ve SERTİFİKALAR

- ▶ **1.Temel Onkoloji Sempozyumu-1st Oncology Symposium**, Dokuz Eylül Üniversitesi 9-11 Mayıs 2018, İzmir
- ▶ **Therapeutic mAb Engineering and Production Workshop**, 11 Kasım 2017, İzmir
- ▶ **Biyoteknolojik İlaçlarda Üretim ve Uygulamalar- Production and Applications in Biotechnological Drugs**, Farmasötik Biyoteknoloji Derneği, 3-4 Kasım 2017, İzmir
- ▶ **Gastroenterolojide Uygulamalı Temel Hücre Kültürü- Applied Cell Culture in Gastroenterology**, 5 Ekim 2018, Ege Üniversitesi Muhittin Erel Amfisi, İzmir/Bornova, Türkiye
- ▶ **3. Kök Hücre Bölge Toplantıları-3rd Stem Cell Meetings**, 31 Ekim 2018, Ege Üniversitesi Muhittin Erel Amfisi, İzmir/Bornova, Türkiye
- ▶ **Akan Hücre Ölçer Çalıştayı-Flow cytometer Workshop**, 13 Kasım 2018, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, İzmir/Bornova, Türkiye

- ▶ **TS EN ISO 9001:2015**, TMMOB Kimya Mühendisleri Odası, 23 Mart 2018, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, İzmir/Bornova, Türkiye
- ▶ **Malzeme Güvenlik Bilgi Formu Bilgilendirme Semineri**, TMMOB Kimya Mühendisleri Odası, 23 Mart 2018, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, İzmir/Bornova, Türkiye
- ▶ **Proteomics and Biomarker Discovery: General concepts & Special Course on 'Preparing Future Faculty for Teaching'**, 27 Mayıs 2019, Ege-MATAL, İzmir
- ▶ **2<sup>nd</sup> International Cancer and Ion Channels Congress**, 22-24 Eylül 2019, Wyndham Grand Özdilek, İzmir
- ▶ **LAB-ON-A-CHIP**, 2<sup>nd</sup> International Cancer and Ion Channels Congress, 22 Eylül 2019, Wyndham Grand Özdilek, İzmir

## YAYINLAR

1. GÜNER, A., **Polatlı, E.**, Akkan, T., BEKTAŞ, H., & Albay, C. (2019). Anticancer and antiangiogenesis activities of novel synthesized 2-substituted benzimidazoles molecules. Turkish Journal of Chemistry, 43(5), 1270-1289.

## POSTERLER

- ❖ Kasaplıgil, G., **Polatlı, E.**, Çakır, B., Nalbantsoy, A., "Evaluation of Co-Stimulatory Molecule Expressions of PMA and LPS Stimulated THP-1 Cells", International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress, Bursa/Türkiye, 2019
- ❖ Çakır, B., Sarıyar, E., **Polatlı, E.**, Özverel, C.S., Nalbantsoy, A., "Fare Meme Kanseri Hücrelerinde (4T1) İmmün Kontrol Noktası PD-L1 İnhibisyonunun Apoptoza Etkisinin Araştırılması", İmmunoloji Moleküler Sempozyumu, Özdere/İzmir, Türkiye, 2018