



**DİFTERİ TOKSİNİNE KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Eda ÇİNAR AVAR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EKİM 2014

Eda ÇİNAR AVAR tarafından hazırlanan “DİFTERİ TOKSİNİNE KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Başkan : Prof. Dr. Ü. Şebnem HARPUT

Farmakognozi Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye : Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 21/ 10 / 2014

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Eda ÇİNAR AVAR

21 / 10 / 2014

DİFTERİ TOKSİNİNE KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

(Yüksek Lisans Tezi)

Eda ÇİNAR AVAR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ekim 2014

ÖZET

Difteri, *Corynebacterium diphtheriae* bakterisi tarafından üretilen toksin ile oluşan bir üst solunum yolu hastalığıdır. Dünya Sağlık Örgütü' nün 2013 yılına ait verilerine bakıldığında; difteri hastalığının hala dünyanın birçok bölgesinde meydana geldiği görülmektedir. Ülkemizde bu hastalığın görülme oranı azalmış olsa da; yetişkin popülasyonda duyarlılığın yüksek olması, aşılama hedeflerine ülkenin her yerinde istenilen oranlarda ulaşamaması ve koruma amaçlı olarak kullanılan aşuların yurt dışından ithal edilmesi gibi nedenler, difteri hastalığını potansiyel bir sorun olarak karşımıza çıkarmaktadır. Difterinin klinik olarak tanısı kültür yöntemiyle yapılmakta ve bu da belirli bir zamanı kapsamaktadır. Bu durumda erken tanı ve tedavi hastalığın kontrolü için oldukça önemlidir. Monoklonal antikor temelli tanı kitleri oldukça hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir. Bu çalışmada difteri toksinine karşı monoklonal antikor üretilmesi ve üretilen antikorun karakterizasyon çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; antijen olarak kullanılan difteri toksoidi, belirli dozlarda ve belirli zaman aralıklarıyla 6-8 haftalık Balb/C türü farelere intraperitoneal yolla enjekte edildi. Farelerin antikor titreleri dolaylı ELISA yöntemiyle test edildi ve en iyi immün yanıtı veren fare seçilerek füzyona alındı. Polietilen glikol (PEG) varlığında, füzyona alınan farenin dalak hücreleri ve F0 myeloma hücreleri kullanılarak füzyon gerçekleştirildi. Spesifik antikor üreten hibridoma hücreleri (2F5, 5A5, 5A6) dolaylı ELISA ile belirlendikten sonra bu hücreler *in vitro* olarak (buldukları besi ortamında) çoğaltıldı. En yüksek antikor yanıtı veren 5A5 klonu için ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon kromatografi metotları ile saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen monoklonal antikorun immünglobulin tipinin IgG1 ve hafif zincirinin ise κ (kappa) olduğu belirlendi. Western blot analiziyle 5A5 monoklonal antikorunun, toksinin hem A hem de B fragmentine karşı oluştuğu belirlendi. *In vitro* nötralizasyon testi ile ultrafiltratın flokülasyon sınırı 40 Lf/ml, 25 nolu fraksiyonun ise 5 Lf/ml olarak bulundu.

Bilim Kodu : 201.1.020

Anahtar Kelimeler : Difteri, monoklonal antikor, ELISA, saflaştırma

Sayfa Adedi : 127

Danışman : Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY
AGAINST TO DIPHTHERIA TOXIN

(M. Sc. Thesis)

Eda ÇİNAR AVAR

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

October 2014

ABSTRACT

Diphtheria, which is caused by diphtheria toxin from *Corynebacterium diphtheria* is an upper respiratory tract disease. Looking at the World Health Organization (WHO) data in 2013, it is observed that diphtheria still occurs in many parts of the world. Even though the incidence of this disease has decreased in our country, the reasons such as the high sensitivity in the adult population, not achieving immunization targets at the desired rate in all over the country and the vaccines used for protection to be imported from abroad, etc. emerges diphtheria as a potential problem. The clinical diagnosis of diphtheria is made by culture method, and that includes a specific time. In this case, the early diagnosis and treatment is very important for disease control. Monoclonal antibody based diagnostic kits provide very fast and reliable results. In this study, the production of monoclonal antibody against diphtheria toxin and the characterization of the produced antibody are intended to work. For this purpose, diphtheria toxoid used as an antigen were intraperitoneally injected to 6-8 weeks old Balb/C mice at specific doses and time intervals. The antibody titers of mice were determined by indirect ELISA, and the best immune response in mice were selected for the fusion. The fusion was carried out using the mouse spleen cell and the F0 myeloma cells in the presence of polyethylene glycol (PEG). After determining the hybridoma cells producing specific antibodies (2F5, 5A5, 5A6) by indirect ELISA, these cells were amplified *in vitro* (in which the cultivation medium). For 5A5 clone giving the highest antibody response, the purification process was performed using the methods of ultrafiltration and gel filtration chromatography. The immunoglobulin type and the light chain type of the obtained monoclonal antibody were determined as IgG1 and κ (kappa), respectively. 5A5 monoclonal antibody directed against both A and B fragments of diphtheria toxin were determined by Western blot analysis. With *in vitro* neutralization test, the limit of flocculation and 25 numbered fraction was found as 40 Lf/ml and 5 Lf/ml, respectively.

Science Code : 201.1.020

Key Words : Diphtheria, monoclonal antibody, ELISA, purification

Page Number : 127

Supervisor : Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca beni her zaman destekleyen, bu süreçte gerekli bütün yardım, tavsiye ve yönlendirmeleri yapan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU' na, tez konumun belirlenmesinde katkısı olan ve tecrübelerini, değerli bilgilerini benimle sabırla paylaşan Kimyager Mustafa HACIÖMEROĞLU' na, hücre kültrü çalışmalarında büyük emeği olan, bu konudaki yardım ve hoşgörüsü için Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü' nden Doç. Dr. Erkan YILMAZ' a, hücre kültürü çalışmalarında yardımları, hoşgörüsü ve emeği için Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü' nden Arş. Grv. Gülizar AYDOĞDU' ya, tüm yaşamım boyunca ve her koşulda bana destek veren, sevgisini ve varlığını her zaman hissettiğim babam Sinan ÇINAR' a, kardeşim Seda ÇINAR' a, annem Hediye ÇINAR' a, tanıştığımız günden bu yana bana her zaman destek olan ve sabır gösteren, güzel ve zor zamanlarımda her zaman yanımda olan değerli eşim Barış AVAR' a sonsuz teşekkürlerini sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| TEŞEKKÜR..... | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ..... | xi |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ..... | xii |
| RESİMLERİN LİSTESİ | xiv |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | xvi |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1. Difteri | 3 |
| 2.1.1. Difteri etkeni: <i>corynebacterium diphtheria</i> | 4 |
| 2.1.2. Difteri toksininin yapımı | 6 |
| 2.1.3. Difteri patogenezi..... | 7 |
| 2.1.4. Klinik belirti ve bulgular | 8 |
| 2.1.5. Tanı ve tedavi | 11 |
| 2.1.6. Korunma ve kontrol | 16 |
| 2.1.7. Epidemiyoloji..... | 19 |
| 2.1.8. Dünyada ve Türkiye’ de difteri | 20 |
| 2.2. Bağışıklık Sistemi | 23 |
| 2.2.1. Bağışıklık sisteminde görev yapan organlar | 26 |

| | Sayfa |
|--|--------------|
| 2.2.2. Bağışıklık sistemi hücreleri..... | 28 |
| 2.2.3. Antijenler..... | 30 |
| 2.2.4. Antikorlar | 34 |
| 2.2.5. Antikor-antijen reaksiyonları | 38 |
| 2.2.6. Poliklonal antikorlar..... | 42 |
| 2.2.7. Monoklonal antikorlar ve hibridoma teknolojisi..... | 43 |
| 2.2.8. Deney hayvanın seçimi | 51 |
| 2.2.9. Antijenin özellikleri | 52 |
| 2.2.10. Adjuvanlar ve kullanımları | 53 |
| 2.2.11. Enjeksiyon türleri | 54 |
| 2.2.12. Myeloma hücreleri | 57 |
| 2.2.13. Füzyon..... | 58 |
| 2.2.14. Hibrit hücrelerin elde edilmesi..... | 59 |
| 2.2.15. Bağışıklık yanıtının kontrolü: elisa yöntemi..... | 60 |
| 2.2.16. Hibrit hücrelerinin klonlanması | 63 |
| 2.2.17. Hibrit hücrelerinin geniş ölçekte üretimi | 64 |
| 2.2.18. Monoklonal antikorların saflaştırılması | 66 |
| 2.3. Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları | 69 |
| 2.4. Literatür Araştırması | 71 |
| 3. MATERYAL ve METOT | 75 |
| 3.1. Materyal | 75 |
| 3.1.1. Aletler..... | 75 |
| 3.1.2. Kimyasal maddeler..... | 76 |
| 3.1.3. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besiyerleri | 77 |

| | Sayfa |
|--|--------------|
| 3.1.4. Tamponlar | 78 |
| 3.1.5. Hücreler..... | 79 |
| 3.1.6. Antijen..... | 79 |
| 3.2. Metot | 79 |
| 3.2.1. Farelerin bağışıklanması | 79 |
| 3.2.2. Bağışık yanıtın kontrolü için elisa metodu ve uygulaması | 81 |
| 3.2.3. Hücre kültürü çalışmaları..... | 81 |
| 3.2.4. Füzyon..... | 85 |
| 3.2.5. Monoklonal antikorların saflaştırılması | 87 |
| 3.2.6. Saflaştırılan monoklonal antikorların karakterizasyonu | 89 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI | 95 |
| 4.1. Bağışık Yanıtta ELISA Bulguları | 95 |
| 4.2. Bağışık Dalak Hücre Bulguları | 99 |
| 4.3. Myeloma Hücre Bulguları..... | 99 |
| 4.4. Seçilen Klonlara Ait Bulgular | 100 |
| 4.5. Füzyon Sonrası Klonların Antikor Titresi..... | 102 |
| 4.6. Difteri Toksinine Karşı Geliştirilmiş Monoklonal Antikorların Saflaştırma ve ELISA Bulguları | 104 |
| 4.7. İn vitro Nötralizasyon Test Bulguları | 105 |
| 4.8. Western Blot Bulguları | 106 |
| 4.9. İzotiplendirme Bulguları | 107 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER | 109 |
| KAYNAKLAR | 115 |
| EKLER..... | 125 |
| EK-1. Deney hayvanları uygulama ve etik kursu katılım sertifikası..... | 126 |

ÖZGEÇMİŞ 127

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge | Sayfa |
|--|--------------|
| Çizelge 2.1. Difterinin çeşitli klinik görünümleri için antitoksin dozları | 15 |
| Çizelge 2.2. Difterinin tedavisinde antibiyotik dozları | 16 |
| Çizelge 2.3. Çocukluk dönemi aşı takvimi | 19 |
| Çizelge 2.4. Poliklonal antikorlar ve monoklonal antikorlar arasındaki farklar | 43 |
| Çizelge 2.5. FDA tarafından onaylanan terapötik monoklonal antikorlar | 49 |
| Çizelge 2.6. Antijenlerin immün yanıtı etkileyen genel özellikleri | 52 |
| Çizelge 2.7. Farelerde bağışıklamada kullanılan antijenler tipleri, enjeksiyon yolları ve doz miktarları | 53 |
| Çizelge 2.8. Farede kullanılan enjeksiyon yolları ve verilen antijen miktarları | 55 |
| Çizelge 2.9. Seçici HAT ortamının füzyon sonrası hücrelere etkisi | 60 |
| Çizelge 2.10. Safılaştırma yapılacak antikor kaynakları ve çeşitli parametreleri | 67 |
| Çizelge 2.11. Antikor safılaştırmada kullanılan yöntemler ve bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajları | 68 |
| Çizelge 3.1. Füzyon işleminde kullanılan hücreler ve kaynakları | 79 |
| Çizelge 3.2. Difteri toksoidi ile yapılan immünizasyon işleminde kullanılan toksoid miktarları ve kronolojik akış şeması | 80 |
| Çizelge 4.1. Füzyon sonrası klon oluşturan kuyulara ait absorbans değerleri | 102 |
| Çizelge 4.2. Füzyon sonrası 6 kuyulu plaklara alınan hücrelerin antikor titrelerine ait absorbans değerleri | 103 |

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil | Sayfa |
|--|--------------|
| Şekil 2.1. Difteri toksinine ait molekül modeli. Toksin 3 bölgeden oluşmaktadır. “B” bölgesi (konak) hücreye bağlanır. “T” bölgesi (yeşil), konakçı hücrenin sitoplazmasına toksinin taşınmasına yardımcı olur. “A” bölgesi (mavi), hücrede metabolik reaksiyonları engelleyen, toksinin aktif parçasıdır..... | 5 |
| Şekil 2.2. 1980 - 2008 yılları arasında DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından bildirilen tüm dünyada ve Avrupa bölgesinde görülen difteri vakaları | 21 |
| Şekil 2.3. 1925 - 1962 yılları arasında Türkiye’ de meydana gelen difteri olgu ve ölümleri | 22 |
| Şekil 2.4. 1970 - 2003 yılları arasında Türkiye’ de meydana gelen difteri olgu ve ölümleri | 23 |
| Şekil 2.5. Bağışıklık tipleri | 24 |
| Şekil 2.6. Bağışık yanıtta görev alan lenfoid organlar | 27 |
| Şekil 2.7. Kök hücresinin farklılaşması sonucu oluşan lenfoid hücreler | 29 |
| Şekil 2.8. Antikorların antijenik bir bakteriyel hücreye bağlanması | 32 |
| Şekil 2.9. Monoklonal bir antikorun Fab fragmentine bağlı hapten molekülü | 33 |
| Şekil 2.10. Antikor yapısı | 34 |
| Şekil 2.11. İmmunoglobulin tipleri | 36 |
| Şekil 2.12. IgG sınıf immunoglobulinlerin alt tipleri | 38 |
| Şekil 2.13. Antikor ve antijen etkileşiminde yer alan kimyasal bağ türleri | 39 |
| Şekil 2.14. Antikordlarda monovalent afinite ve multivalent avidite | 41 |
| Şekil 2.15. Poliklonal antiserum ve monoklonal antikorların hedef moleküle bağlanması | 42 |
| Şekil 2.16. Monoklonal antikor üretim basamakları..... | 45 |
| Şekil 2.17. Günümüzde çeşitli teknolojiler kullanılarak oluşturulabilen antikor türleri..... | 48 |
| Şekil 2.18. Direkt ELISA metodu çalışma prensibi..... | 62 |
| Şekil 2.19. ELISA çeşitleri ve uygulaması | 63 |

| Şekil | Sayfa |
|--|--------------|
| Şekil 2.20. FDA onaylı monoklonal antikorların uygulamaları | 71 |
| Şekil 4.1. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının 1/10 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçları ... | 95 |
| Şekil 4.2. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının, 1/10 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçlarının, immünizasyon sayısı ile değişen OD 405 okuma değerleri | 96 |
| Şekil 4.3. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının 1/100 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçları | 96 |
| Şekil 4.4. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının, 1/100 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçlarının, immünizasyon sayısı ile değişen OD 405 okuma değerleri | 97 |
| Şekil 4.5. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının 1/1000 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçları | 97 |
| Şekil 4.6. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının, 1/1000 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçlarının, immünizasyon sayısı ile değişen OD 405 okuma değerleri | 98 |
| Şekil 4.7. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının 1/10 000 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçları | 98 |
| Şekil 4.8. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının, 1/10 000 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçlarının, immünizasyon sayısı ile değişen OD 405 okuma değerleri | 99 |
| Şekil 4.9. Füzyon sonrası klon oluşturan kuyuların ELISA sonuçları | 102 |
| Şekil 4.10. Füzyon sonrası 6 kuyulu plaklara alınan hücrelerin ELISA sonuçları | 103 |
| Şekil 4.11. Jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılan 5A5 klonu antikorlarının ELISA ve 280 nm' deki absorpsiyon değerleri | 105 |

RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim | Sayfa |
|---|--------------|
| Resim 2.1. Solunum difterisinde hastada meydana gelen yalancı membran (psödomembran) | 9 |
| Resim 2.2. Bacak üzerinde oluşan difteri lezyonu | 11 |
| Resim 3.1. (a) Çalışmada kullanılan farelerin beslendiği kafes sistemi, (b) Farelere difteri toksoidinin enjekte edilmesi | 80 |
| Resim 3.2. (a) Difteri toksoidi ile bağışıklanmış farelerin füzyon günü görünümü, (b) ELISA ile en iyi antikor titresi alınarak füzyon için seçilen fare, (c) Disloke edilen farenin peritonunun açılması, (d) Dalağın fareden alınması, (e) Fareden alınan dalağın görünümü ve (f) Dalağın fazla yağ tabakasından temizlenmesi | 83 |
| Resim 3.3. Fareden elde edilen dalak hücrelerinin yıkama aşamasındaki görünümü | 84 |
| Resim 3.4. Dalak ve myeloma hücrelerinin sayımında kullanılan Thoma lamı | 85 |
| Resim 3.5. Ultrafiltrasyonda kullanılan spin kolon | 88 |
| Resim 3.6. Bioplot Pharmacia FPLC (Fast protein liquid chromatography) sistemi | 89 |
| Resim 3.7. Örneklerin yürütüldüğü ve transferin gerçekleştirildiği Western-blot sistemi | 92 |
| Resim 4.1. F0 myeloma hücreleri ve dalak hücrelerinin füzyon günü görünümleri | 100 |
| Resim 4.2. (a) Füzyon sonrası tek klondan oluşan hibridomalar, (b) Tek klondan oluşan hücrelerin yeni bir plağa aktarıldıktan hemen sonraki görünümü, (c) Tek klondan oluşan hücrelerin 2. gündeki görünümü, (d) Tek klondan oluşan hücrelerin 3. gündeki görünümü, (e) Tek klondan oluşan hücrelerin 4. gündeki görünümü, (f) Tek klondan oluşan hücrelerin 5. gündeki görünümü | 101 |
| Resim 4.3. Füzyon sonrası klon oluşturup, ELISA sonuçları pozitif olan hücrelerin 6 kuyulu plaktaki görünümleri | 103 |
| Resim 4.4. 5A5 klonunun üst sıvısının jel filtrasyon kolonundan alınan kromatogramı | 104 |
| Resim 4.5. İn vitro nötralizasyon tesiti için hazırlanan tüplerin flokülasyondan sonraki görünümleri | 105 |

Resim**Sayfa**

| | |
|---|-----|
| Resim 4.6. Difteri toksinine karşı monoklonal antikor üretimi çalışmalarında farklı kaynaklardan alınan örnekler için Western blot görüntüleri, (a) Fareden alınan kan serumundaki poliklonal antikorlar, (b) 5A5 klonunun ultrafiltrasyon işleminden sonra elde edilen ultrafiltrat, (c) Jel filtrasyon sonrası elde edilen 25 nolu fraksiyon | 107 |
|---|-----|

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| Simgeler | Açıklamalar |
|-----------------|-------------------------|
| Da | Dalton |
| kDa | Kilo dalton |
| cm | Santimetre |
| µm | Mikrometre |
| M.Ö | Milattan önce |
| dk | Dakika |
| U | Ünite |
| mg | Miligram |
| kg | kilogram |
| ml | Mililitre |
| Lf | Flokülasyon sınırı |
| mM | Milimolar |
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| rpm | Dakikadaki devir sayısı |
| °C | Santigrat derece |
| V | Volt |
| yy | Yüzyıl |

| Kısaltmalar | Açıklamalar |
|------------------------|---------------------|
| APS | Amonyum persülfat |
| BSA | Sığır serum albumin |
| DEAE | Dietilaminoetil |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| dH₂O | Damıtık su |

Kısaltmalar**Açıklamalar**

| | |
|--------------|------------------------------------|
| EDTA | Etilendiamin tetraasetik asit |
| ELISA | Enzim bağı immünolojik deneyler |
| FBS | Fetal sığır serum |
| HAT | Hipoksantin-aminopterin-timidin |
| HGPRT | Hipoksantin fosforiboziltransferaz |
| HT | Hipoksantin-timidin |
| OD | Optik dansite |
| PAGE | Poliakril amid jel |
| PBS | Fosfat tampon çözeltisi |
| PEG | Polietilen glikol |
| PNPP | Para-nitro-fenil-fosfat |
| PVDF | Poliviniliden florür |
| SDS | Sodyum dodesil sülfat |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin |

1. GİRİŞ

M.Ö 7. yy'da Hipokrat tarafından ilk kez tanımlanan difteri, 16. ve 19. yy.' lar arasında tüm dünyada farklı bölgelerde salgınlar halinde görülebilen bir hastalık olmuştur. Aynı yıllarda Doğu Avrupa' da meydana gelen iki büyük epidemide ülkemiz de etkilenmiş ve ölümler meydana gelmiştir. 1923 yılında toksoid aşının bulunmasıyla difteriden kaynaklı ölümler önemli ölçüde azaltılmıştır. Difteri, tüm aşılama politikalarına rağmen halen dünyada görülebilen bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü' nün 2013 verilerine bakıldığında Bangladeş, Afganistan, Brezilya, Dominik Cumhuriyeti, Hindistan, İran, Irak, Letonya, Myanmar, Nepal, Nijerya, Pakistan, Rusya, Tayland, Ukrayna gibi ülkelerde hala difteri kaynaklı ölümlerin meydana geldiği görülmektedir [1-3].

Difteriye karşı ülkemizde çeşitli aşılama programları uygulanmaktadır. Fakat aşılama ile kazanılan bağışıklık çok uzun yıllar sürmemekte ve destek doz yapılmadığında bağışıklık kaybedilmektedir. Hastalığın görülme sıklığı azalmış olsa da, yetişkin bireylerde duyarlılığın yüksek olması, ülkenin bazı bölgelerinde aşılama ve bağışıklık düzeylerinin düşük olması gibi nedenler difteriyi hala potansiyel bir sorun olarak gündemde tutmaktadır [2].

Georges Köhler ve Cesar Milstein' in 1975 yılında geliştirdikleri hibridoma tekniği ile devamlı bir şekilde monoklonal antikör üretimine olanak sağlanmış ve böylelikle antikörlerin tedavi ve teşhis amaçlı olarak kullanılmasında yeni bir çağ açılmıştır. Bu buluşlarıyla Milstein ve Köhler, 1984 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülü almışlardır [4, 5].

Monoklonal antikörler, tek bir B lenfosit hücresi tarafından üretilerek, hedef antijenin sadece bir epitopuna spesifik olarak bağlanabilme özelliğine sahip olduklarından dolayı; kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde ve tanısında, ticari proteinlerin saflaştırılmasında, alerjik hastalıkların teşhisinde, hormon testlerinde, kompleks karışımların saflaştırılmasında, bazı özelleşmiş hücrelerin tanımlanmasında, aşılarda hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadırlar [6, 7].

Günümüzde teşhis ve özellikle tedavi sistemlerinde monoklonal antikorlar başarıyla artan miktarlarda kullanılmaktadırlar. Rekombinant DNA teknolojisi, transgenik fareler ve faj teknolojisinin kullanımının yaygınlaşmasıyla; kimerik, insanlaştırılmış ve tamamen insan monoklonal antikorlarının üretimi mümkün hale gelmiştir. Bu sayede özellikle tedavi amaçlı olarak kullanılan tamamen fare antikorlarının, insan vücudunda istenmeyen yan etkileri giderilmiştir. 2001 ve 2002 yılları arasında tedavi edici olarak kullanılan monoklonal antikorların dünya pazarı, %37' lik bir artışla 5,4 milyar dolar olmuştur [8]. 2008 yılında 15 milyar dolarlık satış değeri ile monoklonal antikorlar, aynı yıl üretilen bütün biyolojik ilaçlar arasında ilk sıraya yerleşmişlerdir [9]. 2013 yılına ait veriler ise; bu antikorların dünya pazarında 57 milyar dolarla biyoteknolojik ürünler içerisinde önemli bir yeri olduğunu göstermektedir. Yapılan istatistikler, 2021 yılında tüm dünyada tedavi edici olarak kullanılan monoklonal antikor satışının 567 milyar doları bulacağını ön görmektedir [10].

Difteri hastalığında koruyucu olarak kullanılan ve belirli bir program çerçevesinde insanlara uygulanan toksoid aşı, ülkemize yurt dışından ithal edilmektedir. Aynı zamanda ülkemizde kullanılan monoklonal antikor temelli birçok ilaç ve tanı kitleri de yüksek maliyetlerle yine yurt dışından ithal edilmektedir. Difterinin erken tanısı, tedavi süreci için oldukça önemlidir. Klinik tanıda kullanılan en yaygın metot, kültür yöntemidir. Kültürlerde üremenin değerlendirilmesi en az 4 günde tamamlanır. Biyotiplendirme sonucunda kuşkulu kolonilerin *C.diphtheriae* olduğu saptandığında, toksijenik olup olmadığının da araştırılması gerekir [1, 2, 11].

Difteri vakası meydana geldikten sonra, tanısının yapılması hasta kişi için kritik sayılabilecek uzun bir süreyi kapsamaktadır. Böyle bir durumda tanısı geciken vakalar ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Kültür yöntemine alternatif olarak geliştirilen monoklonal antikor temelli tanı kitleri, bu anlamda oldukça hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir. Tüm bu olgular göz önünde bulundurulduğunda yapılan bu tez çalışmasında; hibridoma teknolojisi kullanılarak difteri toksinine karşı monoklonal antikor üretilmesi ve elde edilen bu antikorların karakterizasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Difteri

Difteri ilk olarak M.Ö 7. yy'da Hipokrat tarafından tanımlanan, bademcikler, yutak, gırtlak, burun gibi üst solunum yolları, deri ve bazen de konjunktivalar ve genital bölgede yerleşim gösterebilen akut bakteriyel enfeksiyöz bir hastalıktır. 16. ve 17. yüzyıllarda İspanya' da, 18. ve 19. yüzyılda ise; İngiltere, Avusturya, Almanya ve Danimarka'da epidemiler görülmüştür. Difterinin klinik olarak tanımı ilk kez 1826'da Bretonneau tarafından yapılmıştır. Enfeksiyon seyri devam ederken deriye benzer bir membran olduğundan dolayı bu hastalığa, Yunanca' da deri veya kaplama anlamına gelen difteri (diphthérite) adı verilmiştir [1]. 1883 yılında Almanya' da çalışan bir mikrobiyolog olan Edwin Klebs, difteri hastalarından elde edilen yalancı membranlarda hastalık etkeni olan iki tür bakteriyi tanımlamıştır. Edwin Klebs' in bu tanımından kısa bir süre sonra 1884 yılında Fredrick Loeffler, difteri etkeni olan basili saf kültür olarak izole edip karakterize etmiştir [12]. 1888' de Roux ve Yersin aynı lezyonların bakteri kültüründen steril filtrattan edilen toksin kullanılarak, hayvanlarda üretilebileceğini göstermişlerdir. 1890 yılında Von Behring ve Kitasato difteri antitoksinini elde etmişlerdir. 1897' de Paul Ehrlich toksin ve antitoksin arasındaki nicel ilişkileri incelemiş ve bugün kullanımı hala devam eden birçok birim ve test yöntemlerini tanımlamıştır. 1913' te Bela Schick difteri toksinini deriye enjekte etmiş, meydana gelen reaksiyona göre bir duyarlılık testi geliştirmiştir [13]. 1923 yılında Gaston Ramon difteri toksinini formaldehit ve ısı ile inaktive ederek difteri toksoidini geliştirmiştir. 1930' lardan 1940' lı yıllara kadar difteri aşısının yaygın kullanımı hastalığın önemli ölçüde azalmasını sağlamıştır [12].

Difteri halen dünyanın hemen her yerinde görülebilen bir hastalıktır. Dünyada 1920' li yıllarda başlayan difteri toksoidi ile bağışıklama çalışmaları günümüzde de devam etmektedir. Aşı ile yapılan bağışıklama ülkemizde de bugüne kadar başarıyla sürmüştür ve difteri vakaları yok denecek kadar azalmıştır [14]. 1982-1985 ve 1990-1995 yıllarında Avrupa' da iki epidemi kaydedilmiştir. Bu epidemiler Rusya ve Ukrayna başta olmak üzere özellikle Sovyet Cumhuriyetleri' nde etkisini göstermiştir. Doğu Avrupa' da görülen bu son epideminin başlıca nedenleri; bebek ve çocuklarda aşılama oranlarının düşmesi, erişkinlerde immünite azalması, göçmen hareketinde ve risk gruplarında artış, pediatristler ve diğer hekimlerin hastalığın ciddiyetinden, vakaların uygun tanısı için gerekli bilgiden ve

yakın temaslı takibinden yeterince haberdar olmayışlarıdır [2].

Difteri hastalığının günümüzde görülme sıklığı oldukça azalmış olsa da, yetişkinlerde duyarlılığın zamanla yüksek olması, ülkenin bazı bölgelerinde aşılama ve bağışıklık düzeylerinin hedeflerin altında kalması gibi nedenler bu hastalığa duyarlı bir popülasyonu işaret etmekte ve difteriyi potansiyel bir sorun olarak gündemde tutmaktadır [2].

2.1.1. Difteri etkeni: *Corynebacterium diphtheria*

Coryneform bakteriler grubundan *Corynebacterium diphtheriae*, difteri hastalığının etkeni olup, gram (+), kapsülsüz, sporsuz, fakültatif anaerop bir bakteridir. Bu bakteri oksijenli ortamlarda daha iyi ürer ve sadece insanda yaşar. Bakteri ismini genellikle uçlarında bulunan şişlikler nedeniyle lobuta benzediği için Yunanca' da lobut anlamına gelen corynee ve yutakta oluşturduğu sert zardan dolayı kösele anlamına gelen difteri sözcüklerinden almıştır [15, 16]. *Corynebacterium* 45 türden oluşur ve bunların genellikle 30 tanesi insanlarda hastalık etkeni oluşturan türlerdir [17]. *C.pseudotuberculosis* ve *C.ulcerans* gibi *Corynebacterium* türlerinin de toksin üretebildiği ve difteri kliniğinden sorumlu olabileceği gösterilmiştir [2].

Corynebacteriae basili 1-6 µm uzunluğunda, 0,5-1 µm eninde, gram-pozitif, bir ucu şişkin lobut şeklindedirler. Anilin boyaları ile düzensiz boyanır, birbirlerine paralel ve dik açılarla duran, polimorfizm gösteren, X, V, L, Y ve Çin harflerine benzer görünümündedirler. Gram olumludurlar. Üremeleri sırasında birbirinden kopan difteri basilleri yan yana veya uç uca açılı yapacak şekilde görünürler ve bu oluşum difteri basili için karakteristik bir özelliktir. Kanlı agarda *Corynebacterium diphtheriae* kolonileri; küçük taneli, düzensiz kenarlı ve gri renktedirler. Potasyum tellürit içeren agarda tellüriti indirgeyerek, siyah bir renk oluştururlar. Dört ayrı biyotipi vardır. Bu biyotipler; gravis, mitis, intermedius ve belfantidir. Bu biyotiplendirme, tellüritli agardaki koloni morfolojileri, fermentasyon reaksiyonları ve hemolizlerine göre yapılmıştır [18-20].

Corynebacterium diphtheriae fakültatif anaerop bir bakteri olmasına karşın oksijenli ortamda daha iyi bir şekilde ve bol miktarda üremektedir. En iyi ürediği besiyeri Löffler besiyeridir ve bu besiyeri; bir hacim %1 glikozlu buyyon ve üç hacim sığır serumundan oluşur. Optimum üreme ısısı; 35-37 °C olup, optimum üreme pH' sı 7,6 civarındadır [19].

Difteri basilleri genellikle jelatini eritmez, indol yapmayıp, H₂S gazı oluştururlar. Dekstroz ve levülozu asit yaparak parçalarlar. Nişasta, glikojen, sükröz, dekstrin üzerine etkileri ve hemoliz yapma özellikleri tiplere göre farklılıklar gösterir. Difteri basilleri ısıya karşı dayanıksız olup 10 dakika 58 °C ısıya maruz kaldıklarında ölürlür. Gün ışığına karşı duyarlı olup, kuruluğa karşı belirli bir oranda dayanıklıdırlar. Yalancı zar gibi organik maddeler içerisinde dayanıklılığı yaklaşık üç ay süreyle artar. Çeşitli besiyerlerinde uzun süre (2-3 hafta) canlı kalabilirler, fakat patojen etkileri zamanla azalabilir. Dezenfektanlara karşı dayanıksız olup, DNA' daki Guanin + Sitozin % 57-60 mol arasındadır [19].

Antijenik yapı ve hücre çeperi yapısına bakıldığında *Corynebacterium diphtheriae*, *Nocardia* ve *Mycobacterium*' larla benzer yapılar gösterirler. Hücre yüzeyinde bulunan, başka bakterilerin K antijenine uyan, ısıya dayanıksız antijenler serolojik olarak farklılıklar gösterirler. Bakterilerin serolojik olarak tiplendirilmeleri için bu farklılıklardan yararlanır. *Corynebacterium diphtheriae* bakterileri *Mycobacterium*' larinkine benzer ve bunlar mikolik asit içeren kord faktör oluştururlar. Bu kord faktör, adjuvan özellik gösterir ve fareler için toksik etki oluşturmaktadır. Bu nedenle bu bakterinin tanımlanmasında serolojik testler kullanılmamaktadır [19, 21].



Şekil 2.1. Difteri toksinine ait molekül modeli. Toksin 3 bölgeden oluşmaktadır. “B” bölgesi (kırmızı) konak hücreye bağlanır. “T” bölgesi (yeşil), konakçı hücrenin sitoplazmasına toksinin taşınmasına yardımcı olur. “A” bölgesi (mavi), hücrede metabolik reaksiyonları engeller ve toksinin aktif olan parçasıdır [12]

2.1.2. Difteri toksininin yapımı

Difteri hastalığının sistemik bulgularından, bakterinin protein yapısında olan ekzotoksini sorumludur. Bu toksin, kan dolaşımına karışarak difteri semptomlarına neden olur. Difteri toksini, tek bir polipeptit (molekül ağırlığı: 62 000 Da) olarak sentezlenir fakat enzimin etkin merkezi maskelenmiş olduğundan toksik bir etki göstermez. Birinci aşamada; hücre dışına 58.3 kDa molekül ağırlığında bir polipeptid salınımı gerçekleşir. Proteolitik çentiklenme ile bu polipeptit A ve B zincirlerine ayrılır, bu zincirler disülfür bağları ile bağlanmıştır. A zinciri ekzotoksinin amino ucunda bulunur ve 22 000 Da mol ağırlıklıdır. Bu zincir ADP-ribozun nikotinamid adenin dinükleotidden (NAD), EF-2' ye aktarılmasını katalizleyen bir enzimdir.



B zinciri ise 40 000 mol ağırlıklı olup, ekzotoksinin karboksil ucunda bulunan bir peptittir. Bu zincir, ökaryotik hücrelerin dış zarına bağlanır ve A zincirinin hücre içine aktarılmasında yardımcı olur [22].

Difteri toksininde R, T ve C olarak isimlendirilen 3 bölge bulunmaktadır. R; reseptör, T; translokasyon ve C; katalitik bölge olarak bilinmektedir. A zincirinde; C bölgesi, B zincirinde ise; R ve T bölgeleri bulunmaktadır. B zincirinde bulunan "R" bölgesi, konakçı hücre yüzeyinde bir proteine bağlanarak işlev görür. Toksin hücre yüzeyine bağlandıktan sonra konak hücre, toksini endotoksik vezikül içine alır ve toksin globüler bir şekil alır. A ve B zincirini bağlayan disülfür bağının indirgenmesi ile B zinciri, A zincirini sitoplazma içine geçerek serbest kalmasını sağlar. Sitoplazmada A zinciri tekrar globüler yapısına döner. Ökaryot hücrelerde protein sentezinde görev alan uzatma faktörü 2 (Elongation Factor-2=EF-2), toksinin A zinciri tarafından inaktive edilerek protein sentezi durur. Bunun sonucunda ise hücrenin ölümü, boğazda pseudomembranların oluşumuna ve miyokardit gibi difterinin en önemli iki semptomuna neden olur [21, 22].

Difteri toksini oldukça güçlü bir toksin olup, her tür ökaryot hücrede bulunan EF-2 molekülü için etkindir. *C.diphtheriae* suşlarının hepsi toksin yapmaz. Ancak, β ve W fajı gibi toksin genini taşıyan ılımlı fajlarla lizojen olabilen suşlar toksin üretirler. Ekzotoksin sentezinin düzenlenmesi besiyerinde bulunan demirin, bakteri tarafından sentezlenen bir

tox gen reseptörü ile karşılıklı etkileşimi tarafından denetlenir. Düşük demir düzeyinde, lizojen olmuş *C.diphtheriae*'nin toksin üretimi artar. Bu durumda, bakterinin demir stoklarını serbest hale getirmek için hücreyi öldürdüğünü akla getirir. Bunun sonucunda, difteri toksinin, bakterinin demir gereksinimi için kullandığı bir parçası olduğu anlaşılmaktadır [21].

2.1.3. Difteri patogenezi

Difteri etkeni olan *Corynebacterium diphtheria*, hava yolu ile farenks (yutak) mukozasına gelerek tonsilla (bademcik) üzerine yerleşir ve difteri basili mukozanın üst tabakalarında bulunan epitel hücreleri ile beslenerek üremeye başlar. Difteri basili invaziv (yayılma potansiyeli olan) bir mikroorganizma değildir, çoğalırken toksinini salgılar. Duyarlı bir insanda toksin, birkaç saat içinde hücrelerle birleşir ve nekroz (doku ölümü) yapar. Bakteriler bu hücrelerden beslenmeye ve çoğalmaya başlar. Difteri toksini polipeptit yapıda olup, ısı (75 °C, 10 dk), ışık ve yaşlanmayla kolay bir şekilde yıkılır. Toksin, yerleşim yerinin derinliklerine ve yanlarına doğru yayılarak yerleşme alanını genişletir. Tonsilla mukozasında iltihabi reaksiyonlar başlar, kılcal damarlar genişler ve bu damarlarda tıkanma meydana gelir. Lökosit, fagosit ve histiyositler odak çevresine doluşur. Nekroza uğramış kısımlarda fibrin oluşur. Lökosit ve bakteri epitel hücreleri birbirine karışmıştır [23]. Sağlam dokudan çıkan fibrin liflerinin de doluşması ile tonsilla üzerinde yalancı zar oluşur. Bu yalancı zarın rengi içinde bulunan lökositler nedeniyle gri-sarı renktedir. Bu pseudomembranlar submukozaya sıkıca yapışık durumdadır. Kaldırılmaya çalışılırsa submukozada kanamaya neden olur. Membran büyüklüğü genellikle üretilen toksin miktarını yansıtır. Yalancı zarın arasında bulunan bakteri daha kolay ürer. Salgılanan toksin inflamasyon alanını genişletir ve farenksin arka duvarına doğru ilerler. Bu sırada toksin, lenf kanalları ile genel dolaşıma da katılmaktadır. Toksin kan dolaşımına, farenks ve tonsile göre, larenks ve treakeadan daha hızlı karışır [21, 23]. Fakat kanda fazla miktarda toksin bulma olanağı yoktur. Çünkü toksin hücrelere yapışır ve ilk günlerde antitoksik serum yapılamazsa, bu hücrelerle ayrılması olanaksız birleşim yapar. Hücreler üzerindeki toksik etki, mikroorganizmanın büyümesi ve daha fazla toksin üretimi için gerekli ortamı sağlar. Parenkim hücrelerinde nekrozlar oluşur. Böylece toksin vücuttaki tüm hücreleri etkiler: fakat en belirgin etki kalp (miyokardit), sinirler (demyelinizasyon) ve böbrekler (tübüler nekroz) dedir. Böbreküstü bezlerinden fazla kan geçtiğinden toksinle daha çok ilişkilidir. İç salgısı azalır, organizmada hormon düzeni bozulur, metabolizma

bozuklukları ortaya çıkar, arter basıncı düşer. Toksikozun devamı ile miyokardit de buna eklenince yaşam sona erer [15, 21, 23].

Difteride, tonsillada oluşan membran altındaki yumuşak doku ödemi ve boyundaki lenf bezlerinin şişmesi özellikle çocuklarda solunum sıkıntısına sebep olmaktadır. Hastada, boğa boynu (bull neck) denilen görüntü meydana gelir. Yetişkinlerde ve çocuklarda membran aspirasyonu sonucunda boğulmanın meydana gelmesi, yaygın olarak görülen bir ölüm nedenidir. Difteri toksini, *C.diphtheriae*' nin en önemli virülans faktörü olmasına rağmen, mukoz membranların kolonizasyonu toksijenik ve nontoksijenik suşların her ikisi tarafından meydana getirilir [21, 23, 24].

2.1.4. Klinik belirti ve bulgular

Klinik olarak difteri hastalığı, anatomik yerleşimine göre sınıflandırılabilir. Buna göre difteri şu formlarda görülebilir;

- a) Solunum sistemi yerleşimli; tonsiller difteri, farenks difterisi, larenks difterisi, burun (nazal) difterisi.
- b) Solunum sistemi dışı yerleşimli; deri/kulak difterisi, konjunktival difteri, genital lezyonlar.

Difteri genellikle 2-4 günlük kısa bir inkübasyon döneminden sonra ortaya çıkar, inkübasyon süresi 1-5 gün arasında değişebilmektedir. Hastalık, hasta veya taşıyıcı kişilerden, öksürük damlacıkları ile saçılan basillerin, duyarlı kişiler tarafından alınması ile başlar. Halsizlik, hafif ateş, boğaz ağrısı ve yorgunluk hissi vardır. Tonsiller şişer ve üzerlerinde yalancı zar oluşur. Hastada genel bir toksemi hali vardır. Toksinin kalp kasına etkisi ile atım ve ritim bozukluğu gözlenir. Larenks ve trakea yalancı zarla kaplanırsa, ateş çok yükselir. Larenks ve trakea difterisi “krup difterik” denilen bu formda solunum hızlanması, öksürük ve ses kısıklığı gelişir [2, 23].

- a) Solunum Sistemi Yerleşimli Difteri

Burun Difterisi

Başlangıcı soğuk algınlığına benzer, enfeksiyon burun deliğinin ön kısmında gelişir. Burun akıntısı dışında başka belirtisi bulunmaz. Burun akıntısı başta seröz vasıftadır, tek veya iki

tarafıdır, daha sonra bu akıntı kanlı-seröz halini alır. Akıntı zamanla burun deliği dış kısmı ve üst dudakta aşındırıcı bir reaksiyon oluşturur. Hastalığın hafif şekilleri nezleye benzer. Burun difterisi antitoksik tedavi ile birkaç gün içinde kaybolur, akıntı durur. Fakat çoğu zaman, akıntı nezle sanılarak önem verilmediği için hastalık geç tanınır. Uzun süre tedavisiz kalan burun difterisi toksini iç kulağı etkileyerek sağırılık yapabilir [23, 24].

Boğaz Difterisi

Boğaz difterisi, difterinin en sık görülen klinik şeklidir. Hastalık aniden başlar ve hastalarda halsizlik, iştahsızlık, baş ağrısı, düşük derecede ateş (38-39 °C) gibi belirtiler görülür. Bu enfeksiyon gravis tipi ile oluşur, organizma direnci zayıftır veya difteri bir streptokok anjini ile birlikte seyretmektedir. Membran başlangıçta bir tonsil üzerinde küçük bir yama şeklindedir. Daha sonra yayılarak her iki tonsili, uvulayı, yumuşak damağı ve boğazı tamamen kaplar (Resim 2.1). Membran başlangıçta parlak ve beyaz renktedir, daha sonra gri renk alır. Şiddetli vakalarda boyunda zamanla meydana gelen şişlik ilerleyerek, boğa boynu görüntüsü oluşturur. Bu hastalarda, solunum güçlüğü, halsizlik, solukluk, çok hızlı nabız koma hali vardır ve 6-10 günler arasında ölüm görülür. Hastalığın seyri değişken olup, genellikle daha önce aşılanmış bireylerde hafif seyreder [21, 22, 23].



Resim 2.1. Solunum difterisinde hastada meydana gelen yalancı membran (psödomembran)

Larenks (Gırtlak) Difterisi

Larenks difterisi, farenks enfeksiyonunun lokal olarak yayılmasından kaynaklanabildiği gibi, iki yaşından küçük çocuklarda, burundaki difteri basilinin inhalasyonu ile de meydana

gelebilir. Bu nedenle larenks difterisinin 1-5 yaş arasındaki çocuklarda görülme sıklığı fazladır. Larenks difterisi; ateş, ses kısıklığı, havlama şeklinde sert öksürükle başlar. Membranın hava yolunu tıkamasıyla gittikçe artan hırıltılı solunum ortaya çıkar. Membran bir süre sonra aşağıya doğru ilerleyerek tüm trakeobronşiyal dalları kaplayabilir. Hafif vakalarda antitoksin tedavisi tabloyu değiştirir [2, 21]. Böyle hastalarda hava yolu açık kalır. Membran hastalığın 6-10 günlerinde öksürükle dışarı atılır. Şiddetli seyreden vakalarda ise; gittikçe artan obstrüksiyon, ilerleyici hipoksi, siyanoz, koma görülür ve ölümle sonuçlanır. Primer larenks difterisinde toksemi belirtileri minimaldir. Çünkü larenksin mukoz membranından toksin çok az absorbe olmaktadır [21, 23].

b) Solunum Sistemi Dışı Yerleşimli

Difteri enfeksiyonları seyrek olarak solunum yolu dışındaki bölgelerde gelişir. Kulak difterisi nadir görülür ve genellikle burunda veya boğazda difteri basillerinin öztaki kanalı ile orta kulağa geçmesinden olur. Ateş, kulak ağrısı ile başlar. Kulakta akıntı meydana gelir ve yalancı zarlar bulunabilir. Kültürde difteri basili ürer. Göz difterisi de primer olarak nadir görülür. Çoğu zaman burun veya boğaz difterisi bulunan kişilerde tek veya iki yönlü göz enfeksiyonu oluşabilir. Göz kapakları kızarıklık, ödemli ve membranlı bir duruma gelir. Yara difterisi, daha çok yaralanmalarda ve nadir olarak operasyonlar sonucunda görülmektedir. Bu difteri enfeksiyonu daha çok tropik bölgelerde, yoksul ve aşırı kalabalık yerleşimli alanlarda görülmektedir [2, 23]. Kronik, iyileşmeyen ve kirli gri bir membranla karakterize edilir. Özellikle burun difterisi olan kişilerde, kaşınma ile tırnak arasına yerleşen difteri basilleri, derinin diğer yüzeylerinde de enfeksiyona sebep olur. Hastalık akut ve kronik olmak üzere iki tiptedir. Deride ülser şeklinde lezyonlar görülür (Resim 2.2). Yaralardan yapılan kültürlerde *C.diphtheriae* üretilerek teşhis konur. Ülserler antitoksin tedavisine cevap vermezler. Deri difterisi epidemiyolojik olarak önemli olabilir, çünkü kronik deri enfeksiyonu organizmaya rezervuar görevi görebilir [24, 25].



Resim 2.2. Bacak üzerinde oluşan difteri lezyonu [26]

2.1.5. Tanı ve tedavi

Difteri hastalığı tipik belirtileri ile kolaylıkla tanınabilir. Hastalığın kesin tanısı ancak laboratuvar yöntemleriyle konulur. Erken tanı ve tedavi difteri prognozu üzerinde oldukça önemlidir. Bazı ipuçları ile hızlı değerlendirme yapıp muhtemel teşhise göre hareket edilmelidir.

1. Üzerinde membran bulunan hafif ağrılı tonsilit veya farenjit varsa; özellikle membran uvula ve yumuşak damağa uzanıyorsa,
2. Sistemik toksisite belirtileri ve membranöz farenjitle birlikte lefadenopati ve boyunda şişlik varsa,
3. Ses kısıklığı ve hırıltılı solunum bulunuyorsa,
4. Yumuşak doku paralizisi varsa,
5. Mukoz membranıyla birlikte: burunda kanlı seröz akıntı bulunuyorsa,
6. Ateş yükselmesi bulunuyorsa (nadiren $> 39\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Enfeksiyon nedeni olan mikroorganizma boğaz kültürü ile üretilir. Ucuna pamuk sarılmış steril bir eküvyon çubuğu lokal lezyonlara sürülür ve bu eküvyon çubukları steril lamlara sürülerek preparatlar hazırlanır. Löffler boyada metakromatik cisimcikler içeren bakterilerin görülmesi, gram boyada oluşan gram pozitif sonuç, klinik verilerle

doğrulandırsa *C.diphtheriae* varlığı doğrulanarak, antitoksik tedavinin başlatılması gerekir [16, 18, 24].

Eskiden membran ve boğaz sürüntü yaymaları metilen mavisi ile boyanarak tanı konulmaktaydı. Bugün ise; dört saatlik kültürden immünofloresan boyama ile bazen erken tanı konmaktadır. Fakat *C.diphtheriae*'nin varlığını kesin olarak belirleyebilmek için; koloni morfolojisi, mikroskopik görünüm ve izolatin fermentasyon reaksiyonlarına göre yapılmaktadır. Kesin tanımlama için, biyokimyasal testlerin yapılması ve bakterinin toksin salgıladığı gösterilmelidir. Bu durumda iki yol izlenir. Bunlar;

i) Serumda bulunan antitoksin miktarının saptanması

Serumda bulunan antitoksin miktarını saptamak için in vivo ve in vitro yöntemler kullanılır. İn vivo yöntemde, Loeffler besiyerindeki bir kültürün su içinde süspansiyonu yapılır. İki kobaya subkutan olarak, 4 ml enjekte edilir. Bu iki kobaydan birine 2 saat önce 1 000-2 000 ünite difteri antitoksini intraperitoneal olarak verilir. Antitoksinle korunmamış hayvan 2-3 günde ölürken, antitoksin verilmiş hayvan yaşamına devam eder. İn vitro yöntemde, en çok kullanılan test Elek testidir. Bu metotta ticari olarak satılan antiserum, 0,5 cm eninde şeritler halinde kesilmiş filtre kağıtlarına emdirilir ve şeritler, özel besiyeri dökülmüş petri kutularına agar katılmasından gömülür. Test edilecek basillerden, pozitif ve negatif kontrol suşlarından antitoksin emdirilmiş filtre kağıdına dik olacak şekilde çizgi ekimler yapılır. Ekim 37 °C'de 24 saat inkübe edilir ve inkübasyondan sonra plakta, presipitasyon bantlarının olup olmadığına bakılır. Bantlar çizgi ekimlerle 45° lik açı ile oluşur. Presipitasyon bantlarının varlığı basilin toksin ürettiğini gösterir. Bazı şartlarda presipitasyon bantları 48 saatte gelişir. Engler ve ark. tarafından İngiltere' de yapılan bir çalışmada Elek testi modifiye edilmiştir. Modifiye testten kesin sonuçlar 24 saatte alınabilmektedir. Petri kutusundaki besiyerinin ortasına, 10 IU/disk antitoksin içeren bir disk yerleştirilmekte ve etrafına toksin üretimi araştırılacak suşlardan yoğun bir şekilde, nokta ekim yapılmaktadır [27]. Arada oluşan presipitasyon bantlarına göre değerlendirme yapılır. İki test karşılaştırıldığında sonuçların aynı olduğu saptanmıştır [11, 16, 19].

ELISA, enzim bağlı immunolojik deneyler de in vitro test yöntemi olarak kullanılır. Bu deneyde, antijen- antikor etkileşimini antikorlara bağlanmış enzim aktivitesi belirler. Antijen olarak kullanılan difteri toksoidi, polietilenden yapılmış bir plağa kaplanır. Hasta

kişinin serumu plağa konulup, antijen-antikör birleşir. Enzimle işaretlenmiş sekonder antikör (insan globulini antiserumu) eklenir. İstenilen antikör ve antijen birbirine bağlanmışsa, sekonder antikör bu antijen-antikör kompleksine bağlanır ve yıkamayla uzaklaştırılmaz. Daha sonra, plağa sekonder antikora bağlı enzimin substratı eklenir. Enzim substratı parçaladığında meydana gelen renk şiddeti, reaksiyon ortamında bulunan antikörler doğru orantılıdır. Son aşamada plak, spektrofotometrede okunarak değerlendirme yapılır [19, 28].

ii) Difteri toksinine karşı duyarlılığın belirlenmesi (Schick Testi)

Belli oranda standart sulandırılmış difteri toksininden belli bir miktar deri içerisine verildiği zaman bu kimselerin kan ve dokularında bulunan antitoksin titrelerine göre değişik reaksiyon sonuçları alınır. Serumlarında yeteri kadar antitoksin bulunan kimselerde enjekte edilen toksin nötralize olacağından hiçbir reaksiyon görülmemesine karşın bağışıklığı olmayan kimselerde eritemden nekroza kadar giden olaylar açığa çıkar. Bu esasa dayanan bir test, ilk olarak Bela Shick tarafından ortaya atılmış ve bugüne kadar Shick testi olarak kullanılmıştır. Shick testinde, 0,001 U standart antitoksin ile karıştırılan toksin, ön kola enjekte edilir. Diğer kola ise, aynı miktarda toksin ya da toksoid kontrol amaçlı olarak enjekte edilir. Sonuçlar 24. ve 48. saatlerde, 4. ve 6. günlerde kontrol edilerek inceleme yapılır. Test yapılan kişinin immün durumuna göre 4 tip reaksiyon ortaya çıkar.

a) Olumlu Reaksiyon: Test yapılan kimselerde toksini nötralize edebilecek miktarda antitoksin bulunmadığı zaman görülen ve toksin verilen kolda önce kızarıklık sonra şişlik şeklinde ortaya çıkan, en yüksek sınıra 4. gün ulaştıktan sonra yavaş yavaş gerileyerek 6.ve 7. günü yerine esmer bir leke bırakarak kaybolan bir reaksiyondur. Lokal tepkime toksininin deri hücreleri üzerindeki öldürücü etkisine bağlıdır.

Kontrol olarak ısıtılmış toksin ya da toksoid verilen kolda ise hiçbir reaksiyon meydana gelmez. Bu kimselerde bağışıklık ve alerji yoktur.

b) Olumsuz Reaksiyon: Organizmada yeterli miktarda antitoksin varsa enjekte edilen toksin nötralize edileceğinden gerek testin yapılacağı ve gerekse kontrol olarak ısıtılmış toksin enjekte edilen kolda hiçbir reaksiyon ortaya çıkmaz. Bu kimseler difteriye karşı

bağışık olup alerjik değillerdir.

c) Aykırı veya Yalancı Reaksiyon: Enjeksiyon yapılan her iki kolda 6-18 saat sonra meydana çıkmaya başlayan ve en geç 2-4. günü kaybolan reaksiyondur. Bu reaksiyon enjekte edilen eriyik içerisinde bulunan, toksin dışındaki diğer maddelere karşı kişinin aşırı duyarlılığını gösterir. Aşırı duyarlılık, toksin enjeksiyonu işleminde ortamda bulunan proteinlere veya daha çok difteri basili vücut proteinlerine karşı oluşmuştur. Aykırı reaksiyon daha önce difteri hastalığı geçirerek difteri basillerinin proteinlerine karşı duyarlılık kazanmış kimselerde daha sık görülür. Olumsuz reaksiyon gibi değerlendirilir. Bu tür kimselerin de olumsuz test sonucu verenler gibi aşılması gerekir [11, 21].

c) Birleşik reaksiyon: Bu tip reaksiyonda hem olumlu hem de yalancı reaksiyonlar birlikte gelişir. Teste tabi tutulan kişilerin önce yalancı reaksiyondaki gibi her iki kolunda kızarıklık ve şişlik şeklinde bir reaksiyon ortaya çıkar. Fakat 2-4 gün içinde kontrol koldaki bulguların ortadan kalkmasına karşın esas toksin verilmiş koldaki bulgular, olumlu reaksiyonlar gibi gelişir. Bu gibi kimselerde bağışıklık yoktur, ancak aşırı bir duyarlılık vardır [11].

Tedavi

Difteri enfeksiyonu esnasında difteri toksini, dolaşımında, hücrelere bağılı olarak ve hücre sitoplazmasında bulunur. Tedavi iki basamakta gerçekleştirilir. Öncelikle toksin inaktive edilip, bakteri elimine edilir, sonrasında ise; toksinin etkisi ve meydana gelen komplikasyonlar tedavi edilmeye çalışılır [21, 24].

Klinik olarak bakteriyel inceleme uzun zaman alacağından, difteriden güçlü bir şekilde kuşkulandığı durumlarda, hemen antitoksin ve antibiyotik ile spesifik tedavi başlanır. Gerekli önlemler alındıktan sonra (deri ve konjunktiva testleri) 20 000 üniteden 100 000 üniteye kadar antitoksin, kas içi veya damar yoluyla enjekte edilir. Uygulanan antitoksin, dolaşımında bulunan toksini nötralize ederken, hücreye bağlanmış toksini kısmen etkiler fakat hücre içine girmiş toksin üzerine etkili değildir. Uygulanacak antitoksinin dozu; difteritik membranın yeri ve yaygınlığına, toksisitenin düzeyine ve hastalığın süresine bağılı olarak belirlenir. Çizelge 2.1.' de çeşitli klinik durumlara göre önerilen dozlar verilmiştir [1].

Çizelge 2.1. Difterinin çeşitli klinik görünümleri için antitoksin dozları [1]

| Difteri tipi | Doz (ünite) | Veriliş yolu |
|-----------------------------|-----------------|-------------------------------|
| Nazal difteri | 10 000 - 20 000 | intramuskuler |
| Tonsiller difteri | 15 000 - 25 000 | intramuskuler veya intravenöz |
| Faringeal/laringeal difteri | 20 000 - 40 000 | intramuskuler veya intravenöz |
| Karışık tip/gecikmiş tanı | 40 000 - 60 000 | intramuskuler veya intravenöz |

Difteri antitoksini at, sığır, koyun, keçi ve tavşanlardan elde edilebilen hiperimmün bir serum olup, genellikle daha çok at, sığır ve koyunlardan elde edilen serumlar tedavi amacıyla kullanılır. Antitoksik serum elde etmek için hayvanlara deri altına anatoksin enjekte edilir. Hayvanın serumunda antitoksik antikorlar meydana gelir ve bu antikor titresi en yüksek titreye ulaştığı zaman hayvanın kan serumu toplanır. Serumun titresi belirlenip kullanılır [11].

Difteri antitoksininin intravenöz uygulamasında, antitoksin 500 ml serum fizyolojik kullanılarak dilüe edilir. Enjeksiyonun ilk yarım saatlik kısmında antitoksin çok yavaş verilmelidir. Hastada bu sürede şok belirtisi görülürse, infüzyon hemen durdurulup, 0,1-0,3 ml 1/1 000 adrenalin antitoksin solüsyonuna katılıp önlem olarak hazır bir şekilde bulundurulmalıdır [24].

Difteri antitoksini çoğunlukla atlardan elde edildiğinden, insanlarda % 10 oranında yüksek duyarlılığa neden olabilir. Bu nedenle antitoksin verilmeden önce 1/10 dilüsyon hazırlanarak göze bir damla damlatılır, diğer göze ise kontrol amaçlı olarak bir damla serum fizyolojik damlatılır. At serumuna alerji hikâyesi varsa, 0,05 ml 1/1 000 dilüsyonda deri altına uygulanır. 20 dakika içinde test okunur, ciltte 1 cm veya üzerinde eritem veya gözde konjunktivit varsa test pozitifdir. Duyarlılık testi pozitif çıkan hastalara, en az miktarda difteri antitoksini ile tedaviye başlanır ve serum miktarı yavaş yavaş arttırılır. Anafilaksi belirtisi halinde 0,2-0,5 ml 1/1000 adrenalin hemen uygulanmalıdır [24].

Antibiyotik tedavisinde; penisilin, eritromisin, rifampisin, klindamisin ve tetrasiklin etkili antibiyotikler olup, önerilen ve en çok kullanılan antibiyotikler; penisilin ve eritromisindir. Penisilin tedavisinde, penisilin G tercih edilir ve serumla birlikte verilir ve toplam tedavi süresi yaklaşık 14 günlük bir zamanı kapsar. Antimikrobiyal tedavi antiserum tedavisinin

yerine geçmez [1]. Taşıyıcılık durumunu elimine etmek için eritromisin penisiline göre daha etkilidir, fakat bazı yan etkileri bulunmaktadır. Eritromisinle tedavi süresi 7 gün olup, tedavinin tamamlanmasından 2 hafta sonra kültür testi yapılarak, hastalığın atlatılıp atlatılmadığına bakılır [21].

Antibiyotik tedavisi bakteriyi öldürerek; toksin üretimini durdurur, belirli bir bölgeye yerleşen enfeksiyonun iyileşmesini sağlar ve enfekte olmayan komşu dokulara enfeksiyonun yayılmasını engelleyerek işlev görür. Difteri tedavisinde uygulanan antibiyotik dozları ve bunların uygulama şekli Çizelge 2.2' de verilmiştir. Hastalığın ilk dönemlerinde herhangi bir miyokardit komplikasyonu ihtimaline karşı en az 12 gün hasta yatıp istirahat etmelidir. Hasta, kültür testi negatif oluncaya kadar ve yakın temasta bulunanlar ise 7 gün süreyle gözlem altında bulundurulmalıdır [24].

Çizelge 2.2. Difterinin tedavisinde antibiyotik dozları [1]

| Antibiyotik | Doz | Veriliş yolu | |
|---------------------------------|--|--|---------------|
| Penisilin-G (Prokain penisilin) | | | |
| | Çocuklarda | 25 000 - 50 000 ünite/kg/gün (iki eşit doz) | intramuskuler |
| | Erişkinlerde | 1 200 000 ünite/gün (iki eşit doz) | intramuskuler |
| Penisilin-V | 500 - 1 000 mg/gün (dört eşit doz) | peroral | |
| Eritromisin | 40 – 50 mg/kg/gün (maks. 2 g/gün) (dört eşit doz) | parenteral | |

2.1.6. Korunma ve kontrol

Corynebacterium diphtheria üst solunum yoluna yerleşip, öksürükle kolay bir şekilde yayılan ve sağlıklı kişilere kolaylıkla bulaşabilen bir hastalıktır. Bu nedenle hem bakteri ile enfekte olmuş kişilerin önce gereken tedavileri yapılır ve bu hasta kişi ile son yedi gün içinde temasta bulunanlar da risk altında kabul edildiğinden, bu kişiler de koruma programına dahil edilir. Difteri vakası saptandığında araştırılması gereken yakın temaslılar arasında; ev halkı, arkadaşlar, akrabalar, evi düzenli ziyaret eden kişiler (temizlik görevlileri, bakıcı kişiler vb.), okulda aynı sınıfta bulunanlar, işyerinde aynı odayı paylaşanlar, vakanın orofaringeal sekresyonlarına maruz kalan sağlık çalışanları yer alır.

Bu risk durumları göz önüne alındığında difteri hastalığına karşı alınacak koruma önlemlerinin de niteliği ortaya çıkmaktadır [1].

Difteri olgularında koruma programı kapsamında, hasta kişiler ayrılır, tedavileri uygun sağaltım yöntemleriyle yapılır ve iyileştikten sonra birer hafta ara ile en az üç defa kültür testi yapılır, *C.diphtheria* olumsuz oluncaya kadar ayrı durumda bulundurulmalıdır. Bu süreç içerisinde sağlam olan taşıyıcılar tedavi edilmeli, bağışıklanmalı ve difteriye eğilimli olan kişilerin de aktif olarak bağışıklanması sağlanmalıdır [11].

Koruma iki temel aşamada gerçekleşir. Öncelikle toplumda toksijenik difteri basilinin yayılması önlenmeli, daha sonra olabildiğince yüksek düzeyde aktif immünizasyon sağlanmalıdır [21].

Difteri basilinin yayılmasını önlemek amacıyla hastalar, tedavinin tamamlanmasından en erken 24 saat sonrasında alınan üst yutak ve boğaz kültürü sonuçları ile bakterinin tam olarak elimine edildiği belirleninceye kadar kesinlikle sağlıklı kişilerden ayrı tutulmalıdırlar. Ayrıca hastanın temasta bulunduğu ve kullandığı bütün eşyalar da dezenfekte edilmelidir.

Aktif bağışıklama, difteri etkeni olan *C.diphtheriae* ile geçirilen enfeksiyon ya da difteri toksoidi ile aşılama sonrasında görülür. Çocukluk döneminde aşı ile yapılan bağışıklama, yetişkin döneme kadar yeterli bir antitoksin düzeyi sağlar. Yetişkinlerde antitoksin düzeyleri zamanla azalacağından, hatırlatma immünizasyonları belirli aralıklarla yapılmalıdır. Korumayı sağlayan aşılar iki yolla elde edilir. Bunlar:

a) Sıvı toksoid aşı ile bağışıklama, ilk kez 1923 yılında Ramon tarafından ortaya atılmıştır. Formol toksoid, difteri toksininin formaldehitte muamele edilmesi sonucunda elde edilir. *C.diphtheriae* kültüründen elde edilen süzüntü, % 0,3' lük formalinle muamele edilerek, toksik etkisi gidinceye kadar 37 °C' de bekletilir. Elde edilen bu sıvının toksik etkisi ortadan kalkar fakat antijenik özelliği bozulmaz. Canlı organizmaya enjekte edilen sıvı toksoid antikor oluşturur ve bu antikorlar toksin ile birleşip toksik etkiyi ortadan kaldırırlar. Difteri toksoidinde bulunan toksoid miktarı flokülasyon ünitesi (Lf) ile standardize edilir. Sıvı toksoid içinde bulunan *C.diphtheriae* basiline ait proteinler, küçük çocuklarda önemli olmayan reaksiyonlara neden olabilir. Bu reaksiyonlar yetişkinlerde

daha önemli ölçüde meydana geldiğinden, 12 yaş üstüne difteri toksoidi ile aşılama yapılması önerilmez [11, 21, 24].

b) Formalinle hazırlanmış sıvı toksoid, % 1-2' lik potasyum alum ile presipite edilir. Hazırlanan bu karışım daha iyi bir antijenik yapıya sahip olup, daha yüksek oranda bağışıklığın oluşmasını sağlar, fakat bireylerde aşırı duyarlılığa neden olur. Suda erimeyen bu materyal diğer aşılarda birlikte kullanılır ve deri altında uzun bir süre kalarak bağışıklığın uzamasına neden olur [11, 21].

Ülkemizde de olduğu gibi, genellikle difteri toksoidi, tetanoz toksoidi ve boğmaca aşısı ile birlikte kombine aşı olarak uygulanır. Yedi yaşın altında bulunan çocuklara; difteri-tetanoz-boğmaca karma aşısı, difteri-tetanoz-asellüler boğmaca karma aşısı veya tetanoz-dozu azaltılmış difteri karma aşısı uygulanır. Bu karma aşılarda 0,5 ml' sinde 6,7-25 Lf ünitesi difteri toksoidi bulunmaktadır [24].

Dünya Sağlık Örgütü' nün önerileri doğrultusunda, doğumdan sonra 2., 3. ve 4. aylarda birer doz DBT (difteri-boğmaca-tetanoz) olmak toplam üç doz, 16. ve 18. aylar arasında DBT aşısı ile dördüncü doz ve en az üç yıl sonra yani 4-6 yaşlarında da DT (çocuk difteri-tetanoz aşısı) şeklinde uygulamayla, toplam beş doz aşı ile bağışıklama gerçekleştirilir. 1998 yılından itibaren ilköğretim 1. ve 8. sınıf öğrencilerine DT aşısı yerine Td aşısı birer doz olarak uygulanmaya başlanmıştır [14, 29].

Ülkemizde, Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun 29.01.2013 tarih ve 9133 sayılı yazısının ekinde uygulanması önerilen aşılarda ve uygulama zamanları Çizelge 2.3.' de verilmiştir.

Yetişkinlerde ve yedi yaş üzeri çocuklarda bağışıklama, difteri-tetanoz-boğmaca karma aşısı (DTB) yerine tetanoz-dozu azaltılmış difteri karma aşısı(Td) kullanılır. Çünkü DTB aşısında bulunan boğmaca aşısı, bu yaş grubu ve üzerindeki için çeşitli yan etkiler oluşturmaktadır. Td aşısının her 0,5 ml' si 2 Lf ünitesinden daha düşük oranda difteri toksoidi içermektedir. 0,5 ml Td 4-8 hafta aralıklarla intramuskuler yoldan en az üç defa uygulanır. Bundan sonraki her 10 yılda bir hatırlatma dozu yapılmalıdır [24].

Difteri hastalığının eliminasyon hedefine ulaşabilmesi için, bağışıklık düzeyi çocuklarda en az % 90, yetişkinlerde ise % 75 olması öngörülmektedir. Epidemiyolojik amaçlar

doğrultusunda, bir serum örneğinde difteri antitoksininin minimum koruyucu düzeyi, 0,01 IU/ml olarak kabul edilir. Kişinin yeterli oranda korunabilmesi için 0,1 IU/ml. veya daha yüksek antikor seviyelerine ulaşması istenir [1].

Çizelge 2.3. Çocukluk dönemi aşı takvimi [30]

| | Doğumda | 1.ayın sonu | 2.ayın sonu | 4.ayın sonu | 6.ayın sonu | 12. ayın sonu | 18.ayın sonu | 24.ayın sonu | İlköğretim 1.sınıf | İlköğretim 8.sınıf |
|--------------|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|--------------|--------------|--------------------|--------------------|
| Hep-B | I | II | | | III | | | | | |
| BCG | | | I | | | | | | | |
| DaBT-İPA-Hib | | | I | II | III | | R | | | |
| KPA | | | I | II | III | R | | | | |
| KKK | | | | | | I | | | R | |
| DaBT-İPA | | | | | | | | | R | |
| OPA | | | | | I | | II | | | |
| Td | | | | | | | | | | R |
| Hep-A | | | | | | | I | II | | |
| Suçiçeği | | | | | | I | | | | |

Hep-B: Hepatit B Aşısı, *BCG*: Bacille Calmette-Guerin Aşısı, *DaBT-İPA-Hib*: Difteri, asellüler Boğmaca, Tetanoz, İnaktif Polio, Hemofilus influenza tip b aşısı (Beşli Karma Aşı), *KPA*: Konjuge Pnömonokok Aşısı, *KKK*: Kızamık, kızamıkçık, Kabakulak Aşısı, *DaBT-İPA*: Difteri, asellüler Boğmaca, Tetanoz, İnaktif Polio Aşısı (Dörtlü Karma Aşı), *OPA*: Oral Polio Aşısı, *Td*: Erişkin Tipi Difteri-Tetanoz Aşısı, *R*: Rapel (Pekiştirme), I: ilk aşı, II: 2. Aşı, III: 3. aşı

2.1.7. Epidemiyoloji

C. diphtheria çeşitli hayvanlardan izole edilmiş olmasına rağmen tek doğal rezervuarı insandır. Hastalık; solunum, solunum salgıları veya cilt lezyonlarına doğrudan temas ile yayılır. Difteri etkeni olan basil, haftalarca hatta bazen aylarca çevresel yüzeylerde ve toz taneciklerinde bile varlığını sürdürür. Nazofarenkste meydana gelen *C.diphtheria* enfeksiyonlarının büyük bir kısmı asemptomatik taşıyıcılığa neden olur. Bununla birlikte, asemptomatik taşıyıcılar hastalığın yayılmasında önemli rol oynarlar [31].

Difteri günümüzde dünyanın hemen her yerinde görülebilen bir hastalıktır. Toksoid aşı ile yapılan rutin immünizasyonun başlaması ile pek çok bölgede hastalığın görülme sıklığında önemli ölçüde azalma olmuştur. Aşılama programlarıyla beraber, genç bireylerde yüksek

bağışıklık düzeyine ulaşılmış, klinik difteri olguları azalmış ve asemptomatik difteri taşıyıcılığı nadir hale gelmiştir [31, 32].

1940' lı yıllarda Avrupa' da başlayan aşılama programları ile bir çok ülkede difteri hastalığında hemen hemen eliminasyon noktasına gelinmiştir. 1980 yılında Avrupa' da en düşük vaka sayısına ulaşılmıştır. İlki 1982-1985 arasında, ikincisi ise; 1990-1995 arasında Rusya ve Ukrayna başta olmak üzere iki önemli epidemi yaşanmış ve özellikle bu durum eski Sovyet Cumhuriyetleri' nde etkisini göstermiştir. Bu dönemde bildirilen vakaların %95' ini Rusya ve Ukrayna kökenli olguların oluşturduğu rapor edilmiştir. Meydana gelen bu önemli epidemi bütün yaş gruplarını etkilemiştir. Özellikle sağlık personelinin, evsizlerin ve aşırı alkol kullanan kişilerin daha yüksek risk altında olduğu ortaya çıkmıştır. Bebek ve çocuklarda aşılama oranlarının düşmesi, erişkinlerde immünite azalması, başka ülkelere göç ve risk gruplarında (evsizler, alkolikler, v.s.) artış, çocuk hekimleri ve diğer hekimlerin hastalığın ciddiyetinden, vakaların uygun tanısı için gerekli bilgiden ve yakın temashıların takibinden yeterince haberdar olmamaları bu önemli epideminin için başlıca nedenler arasındadır [1].

Ülkemizde her ne kadar difteriye karşı aşılamanın başlangıcı tek doz ile 1937 yılına dayanıyorsa da, sistematik bir aşılama programının uygulamaya konması 1960' ların ortalarına karşılık gelmektedir, aşılamanın başlaması ile difteri insidansında belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Geleceğe yönelik tahminlerde bulunabilmek için elde bulunan veriler yeterli olmayıp, ülkemizin bazı bölgelerinde bağışıklama ve bağışıklık düzeylerinin öngörülenden düşük olması, duyarlı bir toplumun varlığına işaret eder, bu durumda difterinin yeniden güncellik kazanması da olası bir durumdur [1].

2.1.8. Dünyada ve Türkiye' de difteri

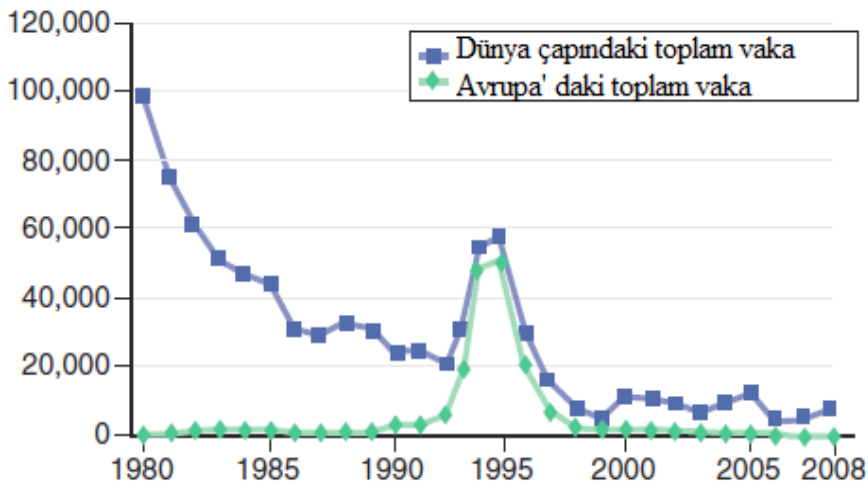
Difteri, 1920' lerin sonuna kadar dünyanın birçok bölgesinde bulunan hasta çocuklar arasında en yaygın ölüm nedeniydi. Bu hastalık, özellikle kalabalık kentsel alanlarda yaşayan binlerce çocuğun ölümüne neden oldu. Difteri hastalık etmeninin bulunmasıyla, hastalığın tedavisi ve hastalıktan korunma yöntemleri geliştirildi [33].

Difteri hastalığının tarihsel gelişimine bakıldığında, 16. ve 17. yüzyıllarda İspanya' da, 18. ve 19. yüzyılda İngiltere, Avusturya, Almanya ve Danimarka'da epidemiler görülmüştür

[2]. 1920' lerde ABD' de 125 000' den fazla vaka ve 10 000' den fazla ölüm meydana gelmiş olup, 1923' de difteri toksoidinin bulunmasıyla, özellikle Avrupa ve dünyanın birçok farklı bölgesinde geniş aşılama programları başlatılmıştır. Böylelikle hastalığın etkileri birçok ülkede önemli ölçüde azaltılmıştır. Avrupa' ya bakıldığında 1980 yılında en düşük vaka sayısına ulaşılmış ve Şekil 2.2' de de görüldüğü gibi 1982-1995 yılları arasında başlıca iki büyük epidemi görülmüştür. Bu epidemiler başta Rusya ve Ukrayna olmak üzere İtalya, Almanya, Portekiz, İsveç ve Türkiye' de etkili olmuştur [34].

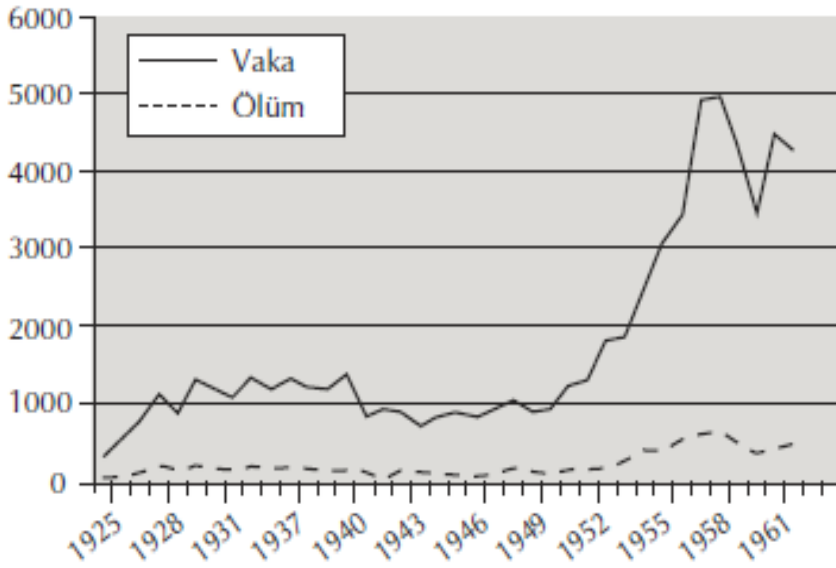
1990 yılında Rusya' daki ilk epidemi daha çok yetişkinlerde görülmüştür. 1991-1993 yılları arasında difteri hastalığı bu bölgede hızlı bir şekilde yayılmış olup hastalık insidansı her 100 000 popülasyonda 10,2' ye ulaşmıştır [35]. Epidemi bütün yaş gruplarını etkilemiş olsa da olguların %60' ı 14 yaş ve üzerindeki erişkinlerde meydana gelmiştir [34]. Bu epidemi özellikle bağımsızlığını yeni kazanmış Sovyet ülkelerinde görülmüştür.

Doğu Avrupa' da meydana gelen son epidemide ise rol oynayan başlıca faktörler arasında; bebekler ve çocuklarda aşılama oranlarının düşmesi, erişkinlerde meydana gelen bağışıklık azalması, göçmen hareketinde ve alkolikler, evsizler gibi risk gruplarındaki artışlar, sosyoekonomik düzensizlik, hekimlerin vakaları tanımlamak için yeterli bilgiye sahip olmamaları ve yakın temaslılar için gerekli takibin yapılamaması sayılabilir [2].



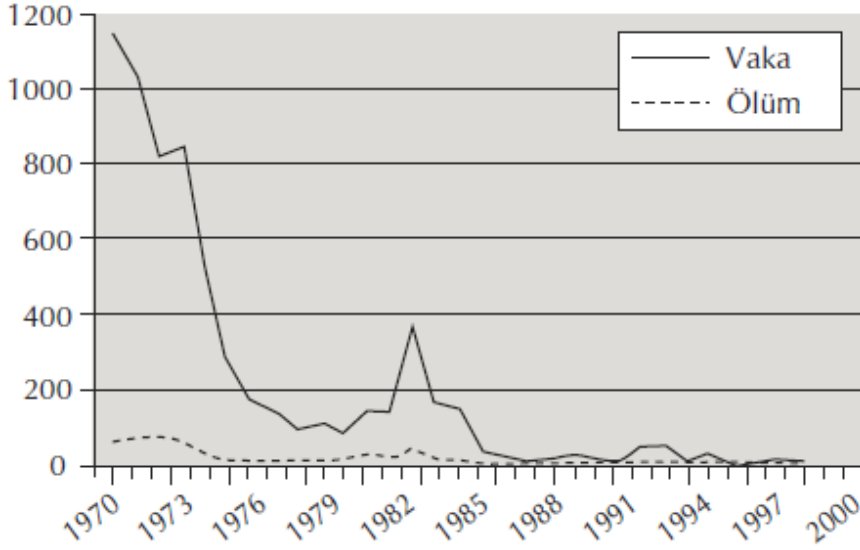
Şekil 2.2. 1980 - 2008 yılları arasında DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından bildirilen tüm dünyada ve Avrupa bölgesinde görülen difteri vakaları [31]

1930' lu yıllarda toksoid aşının üretilmesi ve uygulanmasıyla ülkemizde difteri morbitidesinde belirgin bir düşme görülmüştür. Ülkemizde difteri için tek doz aşılama 1937 yılında başlamış olup, 1968 yılında ise difteri-tetanoz-boğmaca karma aşısı (DTB) olarak uygulanmaya başlanmıştır. Şekil 2.3' te de görüldüğü gibi 1960' lı yılların başında difteri morbiditesi 100 000' de 20 civarında iken yapılan aşılama programlarıyla bu oran 100 000' de 0,01' e kadar düşmüştür [1, 2, 36].



Şekil 2.3. 1925 - 1962 yılları arasında Türkiye' de meydana gelen difteri olgu ve ölümleri [37]

Şekil 2.4.' te görüldüğü gibi, 1980 yılında Avrupa' da olduğu gibi Türkiye' de de 86 vakayla en düşük sayıya ulaşılmıştır. 1982-1995 yılları arasında Avrupa' da meydana gelen iki büyük epidemide Türkiye' de etkilenmiş olup, önceki yıllara göre belirgin bir vaka artışı gözlenmiştir [1, 2, 37].



Şekil 2.4. 1970-2003 yılları arasında Türkiye’ de meydana gelen difteri olgu ve ölümleri [37]

Dünya sağlık örgütünün 2013 verilerine bakıldığında, difterinin hala günümüzde var olan bir hastalık olduğu görülmektedir. Bu veriler doğrultusunda; Bangladeş, Afganistan, Brezilya, Dominik Cumhuriyeti, Hindistan, İran, Irak, Letonya, Myanmar, Nepal, Nijerya, Pakistan, Rusya, Tayland, Ukrayna gibi ülkelerde, 2000 yılından sonraki bütün yıllarda belirli sayıda difteri olguları görülmüştür [3].

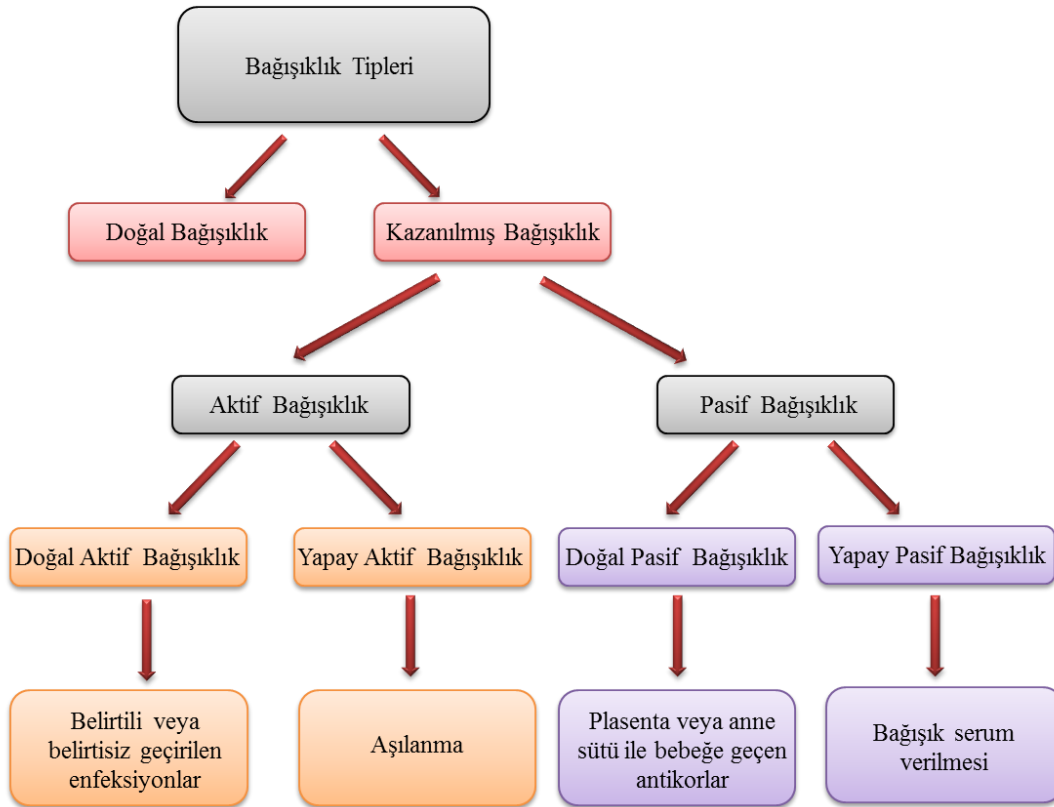
Ülkemizde ise son yıllara bakıldığında; 2011 yılında Ankara’da ve 2012 yılında Adana’ da birer vaka görülmüş olup, bu vakalar ölümle sonuçlanmıştır [38, 39] . Aşılama programları ile difteri vakaları geçmişten günümüze önemli ölçüde azalmıştır, fakat aşılama ile kazanılan bağışıklık yaşam boyu sürmemekte ve destek doz yapılmadığında bağışıklık kaybedilmektedir. Hastalığın günümüzde görülme sıklığı azalmış olsa da, yetişkin bireylerde duyarlılığın yüksek olması, ülkenin bazı bölgelerinde aşılama ve bağışıklık düzeylerinin düşük olması gibi nedenler difteriyi hala potansiyel bir sorun olarak gündemde tutmaktadır [2].

2.2. Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık genel olarak, vücuda giren yabancı maddelere (mikroorganizma, toksin, toksik maddeler, v.b.) karşı organizmanın bütün genel ve özel savunma sistemleri ile karşı koyması, direnç göstermesi ve immünolojik bir yanıt meydana getirmesi olarak tanımlanmaktadır. Organizma enfeksiyon etkenine, art arda yer alan iki önemli savunma

mekanizmasıyla karşı koyarak hastalıklardan korunmaya veya hastalık oluşmuşsa etkenin yok edilmesini sağlamaya çalışır. Bağışıklık sistemi, iki temel bölümde incelenir (Şekil 2.5) [40, 41]. Bunlar;

a) Doğal Bağışıklık: Bireylerde doğuştan var olan, yapısal ve kalıtsal karakterleri ile ilişkili olarak, hastalık yapıcı etmenlere karşı kendini savunma sistemidir. Yapısal ve genetik özelliklerine göre canlılarda doğal olarak çeşitli engeller bulunmaktadır. Birey bu engeller tarafından korunur ve doğal direnç olarak da adlandırılan bu doğal bağışıklık, savunmanın ilk aşamasını oluşturur. Doğal bağışıklıkta; mekanik, hümmoral ve hüccresel faktörler rol oynamaktadır. Deri ve mukozaların anatomik yapısı, mukozaların mukus salgısı, solunum sisteminin silli epitel hücrelerinin dışarıya yönelik hareketi, bağırsağın peristaltik hareketi hastalık etmenlerinin organizmaya girmesini veya yerleşmesini önleyen doğal engellerdir [40].



Şekil 2.5. Bağışıklık tipleri [40]

Doğal bağışıklık, konak canlıının yabancı mikroorganizmaya maruz kaldığında, ilk saatler içerisinde enfeksiyonu sınırlamayı hedefleyen, birinci savunma sistemidir. Doğal bağışıklığın majör hücreleri; makrofajlar ve NK (doğal öldürücü, *natural killer*) hücreleri

ve granülositler (özellikle nötrofiller) dir [42].

b) Kazanılmış Bağışıklık: Canlı organizma enfeksiyon oluşturan bir ajana karşı antikor yanıtı oluşturuyorsa, bu mikroorganizma çevrede bulunabileceğinden onunla tekrar karşılaşmak olası bir durumdur. Antijenle ilk karşılaşıldığı zaman değişen immün mekanizmalar, daha sonraki temaslarda yanıtın daha hızlı ve daha büyük olmasını sağlayacak bir hafıza sistemi geliştirirler. Örneğin; kızamık, kabakulak, suçiçeği ve boğmaca gibi hastalıklar nadiren ilk kez geçirilir ve bu ilk temas, belirli bir bilgiyi hafıza şekline dönüştürerek vücudun sonraki saldırılardan etkin bir şekilde korunmasını sağlar. Vücutta başlıca sıvısal (hümorale) ve hücresele (sellüle) savunma ile gerçekleştirilen kazanılmış bağışıklık başlıca 2 kısma ayrılır. Bunlar; aktif ve pasif olarak kazanılan bağışıklıktır [40, 43].

Aktif Bağışıklık: Hastalık etkeni mikroorganizmalarla ve bunların çeşitli ürünleri (toksin, toksoid, toksik maddeler, vs.) ile karşılaştıktan sonra canlıda oluşan ve canlıyı enfeksiyon etkenlerine karşı koruyan immüniteye, aktif kazanılan bağışıklık denir. Kazanılan aktif bağışıklık, etkenin ikinci bir enfeksiyonuna karşı uzun süreli koruma sağlarken, bazıları ise kısa süreli koruma sağlar. Bu korunma süresi; genellikle hastalık etkeni mikroorganizma, konak canlı ve çevresel faktörlerin değişmesiyle farklılık gösterir. Aktif bağışıklık sonucu iki türlü immünolojik yanıt oluşur. Bunlar; sıvısal (hümorale) ve hücresele yanıtlardır.

1- Sıvısal (hümorale) bağışıklık yanıtı: Canlıya bir immünojen verildikten sonra B lenfositleri fazlaca aktive olduktan sonra üreyip, plazma hücreleri haline dönüşürler. Bu hücreler immünojenle spesifik reaksiyon veren antikorlar sentezlerler. Dolaşımda oluşan bu antikorların bulunma süreleri; antikorların kimyasal ve fiziksel özelliklerine, enfeksiyon etkeninin türüne göre değişiklik gösterebilir. İkinci bir enfeksiyon durumunda, ilk oluşan enfeksiyondan daha yüksek miktarda ve daha uzun süreli olarak dolaşımda bulunan antikorlar sentezlenir. Enfeksiyon durumunda ilk oluşan antikor tipi genellikle IgM karakterdeki antikorlardır ve bunu; IgG ve IgA antikorları izler. Hastalıklardan korunmada en çok bu tip antikorlar işlev görürler [40, 42, 43].

Canlı organizmada hümorale yanıtı uyararak, antikor sentezini sağlayıp bu şekilde korunma sağlamak için genellikle canlıya aşılama yapılır. Aşılar organizmaya uygun yolla verildiğinde bağışık yanıt oluşturarak, canlının enfeksiyonlardan korunmasını sağlar.

Aşılar; ölü mikroorganizma aşıları, canlı mikroorganizma aşıları, mikroorganizmanın ürünlerinden hazırlanan aşılar ve biyoteknolojik aşılar olarak 4 farklı şekilde elde edilebilir. Canlı aşılar, ölü olanlardan daha iyi koruma yeteneğine sahip olduklarından, inaktif aşılar uygun bir adjuvanla birlikte verilip, genellikle iki defa uygulanırlar [40, 44].

2- Hücresel bağışıklık yanıtı: Bu bağışıklıkta T lenfositleri ve bunların aktivitesi büyük öneme sahiptir. B-lenfositlerinin kullandığı antikor moleküllerinden farklı olan T-hücre yüzey reseptörleri, antijeni ve T-lenfositinin başka bir hücreyle temas etmekte olduğunu haber veren yüzey yapısını birlikte tanır. İmmünojenik özelliğe sahip ajanlar T-hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerle birleşerek, hücre membranını uyarır ve aktif duruma getirir. Bunun sonucunda hücre içinde meydana gelen sinyallerin iletimleri, hücrelerin farklılaşım, büyüme, aktif olmuş yeni T-hücre alt popülasyonlarının (yardımcı-T, sitotoksik-T, baskılayıcı-T ve bellek hücreleri-T) oluşumunu sağlar. Bu hücrelerin salgıladığı mediatörlerin bir kısmı lenfositlerin, diğer kısmı da makrofajların aktivitesine etki eder [40, 43].

Pasif Bağışıklık: Başka bir organizmaya antijen verilmesi sonucu oluşan antikorların (bağışık/antitoksik serum), korunması istenen canlıya yapay olarak verilmesiyle pasif bağışıklık sağlanır. Bu şekilde sağlanan bağışıklık uzun ömürlü olmamakla beraber, yaklaşık 2-3 ay sonra sona ermektedir.

Doğal pasif bağışıklıkta ise; plasenta, kolostrum ve yumurta aracılığı ile IgG tipi antikorların bebeğe aktarılmasıyla, bebekte 6 aya kadar bir koruma sağlanır. Böylece yeni doğan bebekler, anneden antikor aldıkları için, yaşamlarının ilk günlerinde oluşabilecek enfeksiyonlara karşı kendilerini korurlar [40, 43, 44].

2.2.1. Bağışıklık sisteminde görev yapan organlar

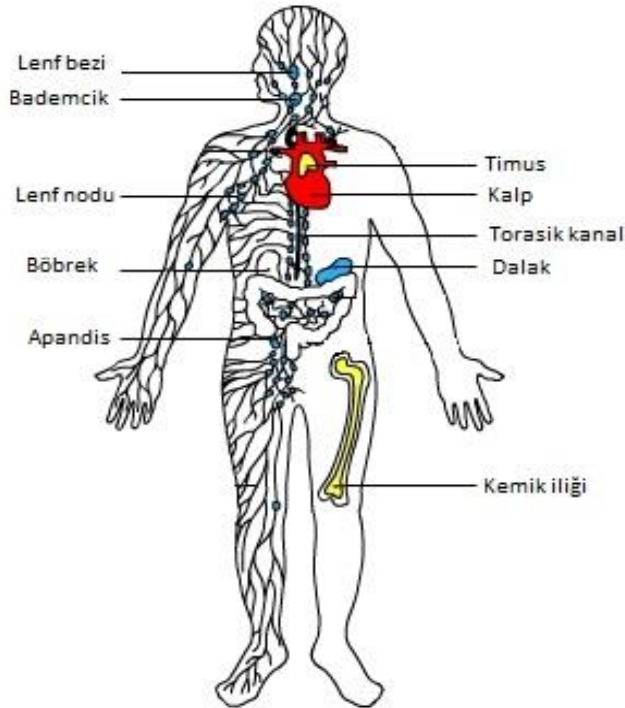
Bağışıklık sisteminde yer alan organlar, lenfoid organlardır. Bu organlar; lenfosit üretiminde ve üretimin düzenlenmesindeki etkinlikleri, antijen ile antijene duyarlı olan hücreler arasındaki ilişkileri, lenfositlerin olgunlaşmaları ve farklılaşmaları üzerindeki etkilerine göre iki gruba ayrılmışlardır. Bunlar;

a) Primer (Merkezi) Lenfoid Organlar: Bağışık yanıtı oluşturan hücrelerin kemik iliğinden

çıktıktan sonra olgunlaştığı organlara primer (merkezi/birincil) organlar denir. Dolaşımda bulunan kök lenfoid hücrelerin T ve B lenfosit şeklinde farklılaşması bu merkezi organlarda gerçekleşir. Primer organlardan biri kemik iliği diğeri ise timustur [40, 41].

Timus, fetal yaşamın 6. haftasında şekillenir, doğumdan sonra gelişip, ergenlik çağında en büyük şeklini alır ve daha sonra küçülmeye başlar. Anatomik olarak iki loblu bir organ olup, her lobda araları bağ doku ile ayrılan lobüller bulunur. Timusun her bir lobu medulla ve korteks bölgelerinden oluşur. Timus kontrolünde lenfositler farklılaşarak, T-lenfositleri oluştururlar. Timusa gelen öncü hücreler, korteksten medullaya geçişi sırasında, medullada bulunan epiteloid hücre salgılarıyla olgunlaşıp T-lenfosit şekline farklılaşır [41, 45].

Kemik iliği, fetal yaşamın 4. ayından itibaren bağışık yanıtta görev alan tüm hücrelerin oluştuğu en önemli lenfoid organdır. Kemik iliği, yassı kemiklerde ve uzun kemiklerin uç kısmında yer alır. Kemik iliğinde lenfosit ve diğerk kan hücrelerinin ana ve genç şekilleri bulunur. Lenfositler, kök kan hücrelerinin farklılaşmasıyla olgunlaşır ve bağışık yanıtta görevli diğerk kan hücreleri, kemik iliğinden kan dolaşımına verilir [40, 41, 45].



Şekil 2.6. Bağışık yanıtta görev alan lenfoid organlar [46]

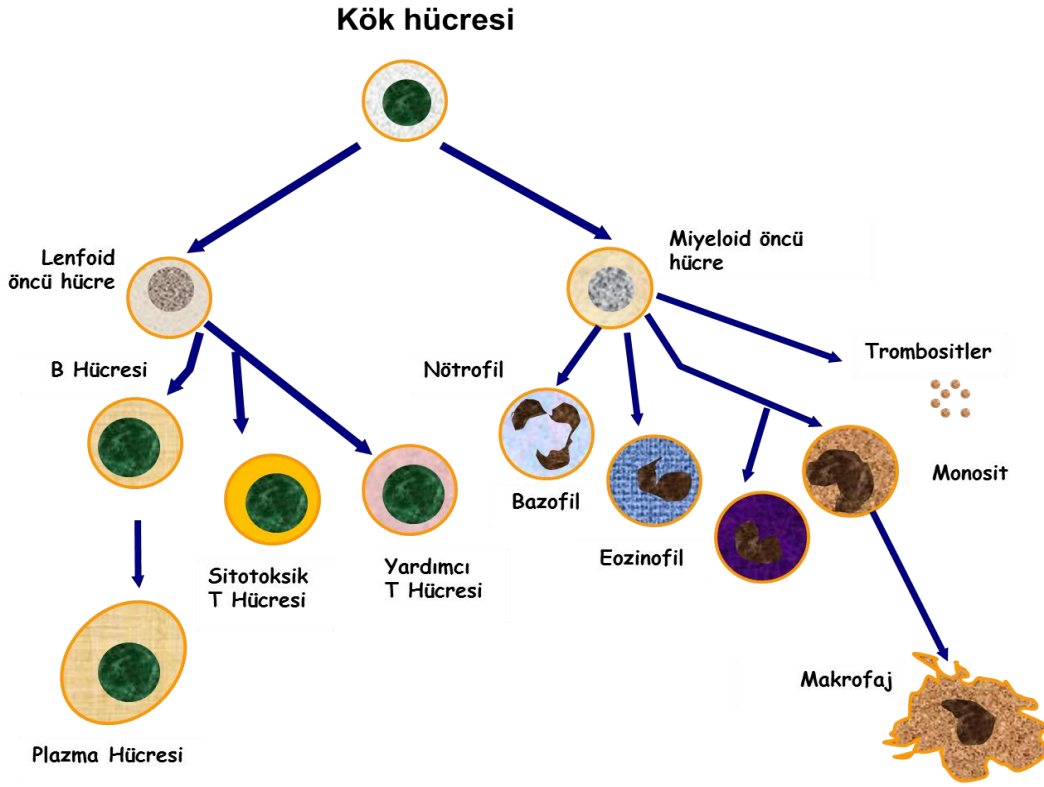
b) Sekonder (İkincil/Priferal) Lenfoid Organlar: Bu grupta yer alan organlar, primer lenfoid dokularda farklılaşarak dolaşıma geçerler. Bu lenfoid organlar makrofaj yönünden zengin olup, B- ve T- hücreleri de fazla miktarda bulunur.

Lenf düğümleri, vücudun farklı bölgelerinde bulunurlar, etraflarında bağ dokusu yapısında bir kapsül bulunur. Bu kapsülü aşarak organa giren lenf damarları sayesinde, lenf düğümlerinin içerisinden sürekli bir lenf sıvısı dolanımı geçer. Lenf sıvısı, vücuda doku yoluyla girmiş çeşitli antijenler ve mikroorganizmaları taşır. Antijen uyarımı sonucunda bağışık yanıtın oluşumunda görev alan makrofajlar ve T ve B lenfositler lenf düğümlerinde yer alır [45].

Dalak, dil biçiminde ve kırmızı renkte olup, lenfoid organların en büyüğüdür. Dış kısmında bağ dokusu yapısında bir kapsül bulunur. Dalak pulpası iki kısımdan oluşur. Bunlardan beyaz pulpa lenfoid bir doku olup, B ve T lenfositlerinin yerleşim yeridir. Kırmızı pulpa ise; eritrosit, makrofaj, lenfosit ve dendritik hücrelerin bulunduğu bölgedir. Dalak; yaşlanmış alyuvarları parçalar ve dolaşımdan elimine eder, içerisinde bulunan B- ve T- hücreleri sayesinde vücuda giren immünojenlere karşı yanıt oluşturur, alyuvar ve trombosit depo eder, antijenik uyarımlarda B- ve T- lenfositlerinin üremesini sağlar [40, 41].

2.2.2. Bağışıklık sistemi hücreleri

İmmünolojik uyarılara lenfoid hücreler aracılığıyla bağışık yanıt oluşturulur. Embriyonik gelişim sırasında kan hücresi öncülleri fetal karaciğer ve sarı kesesinde oluşur ve doğumdan sonra bu kök hücreleri kemik iliğine yerleşir. Kök hücreleri eritroid, miyeloid ve lenfoid hücrelerine evrimleşir. Bir kök hücresinin farklılaşması ile oluşan lenfoid hücreler Şekil 2.7' de görülmektedir.



Şekil 2.7. Kök hücresinin farklılaşması sonucu oluşan lenfoid hücreler

Kemik iliğinde yapılan hücrelerin lenfoid serisinden lenfositler, myeloid serisinden ise; fagositer hücreler gelişir. Lenfositler oluşuktan sonra temelde iki farklı hücreye evrimleşirler. Bu farklılaşma sonunda T ve B lenfositler ortaya çıkarlar. Bu hücrelerden bazıları kan dolaşımıyla dalak, lenf düğümleri, bademcikler ve mukoza altı lenfoid dokular gibi merkez (sekonder) lenfoid dokulara yerleşirler. Arada periyodik olarak dokudan dokuya geçmek için kan dolaşımında bulunsalar da; kandaki toplam lenfosit miktarı % 1' i geçmez [40, 47].

Öncü T lenfositler timusa gelip, kontrollü olarak olgunlaşırlar ve ileride karşılaşacakları yabancı antijenleri tanıyan, her bir antijene özgül reseptörleri de kazanırlar. Bu şekilde olgunlaşan T lenfositler, hücrel bağışık yanıtta sorumludurlar. T lenfositler, B lenfositlerinin antikor sentezi için uyarılmasında önemli bir rol oynarlar [40, 41, 47].

B lenfositler, kemik iliğinde bulunan bir kısım kök hücrelerin immunglobulin gen düzenlenmesine bağlı olarak ve birçok evreden geçerek farklılaşmasıyla oluşurlar. B lenfositleri sıvısal (hümorale) bağışık yanıtta sorumludurlar. Gelişiminin son evresinde, yüzeylerinde antijenlerin bağlanıp uyarım yapabileceği spesifik reseptörlere sahiptirler. Bu

olgunlaşmamış B lenfositler antijenik uyarılma ile klonlanıp olgun B lenfositleri (antikor sentezleyen plazma hücrelerini) meydana getirirler. İmmatür B lenfositleri, uyarıldıkları zaman, yüzeylerindeki aynı sınıf ve alt sınıfa ait antikolar sentezlerler. Her bir B lenfosit bir antikoron ağır ve hafif zincirini oluşturur [40, 41, 45].

Sekonder lenfoid organlarda B lenfositlerinin yerleştiği yerler, T lenfosilerinden farklıdır. Bu hücreler; lenf düğümlerinde, lenf düğümü foliküllerinin germinal merkezlerinde ve dalağın beyaz pulpasında bulunurlar. B lenfositlerinin kanda bulunan miktarı yaklaşık olarak 3.10^8 /litre olup, periferik kan lenfositlerinin % 15-20' sini oluştururlar. B lenfositlerini, diğer lenfositlerden ayıran en önemli özellik ise; membranında immünglobulin reseptörleri (yüzey Ig reseptörü) Taşımalarıdır. Bu sayede, immünofloresan yöntem kullanılarak B lenfositlerinin tanımı yapılmaktadır [41, 45, 47].

Doğal öldürücü hücreler (NK) ise; insan ve fare lenfoid hücreleri arasında yabancı hücrelere karşı sitotoksik etki gösteren, T lenfositlerinden olan Tc (sitotoksik) T' den farklı olan hücrelerdir. Bunlar, sitotoksik T lenfositleri gibi sitotoksinler salgılayarak virüsle enfekte hücreleri ve tümör hücrelerini yok etmede görev alırlar. Etkinlik gösterebilmeleri için önceden virüsle karşılaşmasına gerek olmayışı, verdikleri tepkinin virüsle karşılaşması ile şiddetlenmemesi ve herhangi bir virüse özgü olmayışlarından dolayı bu hücrelere doğal öldürücü hücreler olarak adlandırılır [47]. Bu hücreler kemik iliğinden köken alıp, lenfositlerin bir alt grubu olduğu kabul edilir, kan kemik iliği ve dalakta bulunurlar. Yüzeylerinde herhangi bir immünoglobulin ve antijen reseptörleri bulunmaz, periferik kandaki lenfositlerin % 10-15' ini, dalakta bulunan lenfositlerin ise % 1-2' sini oluştururlar [45].

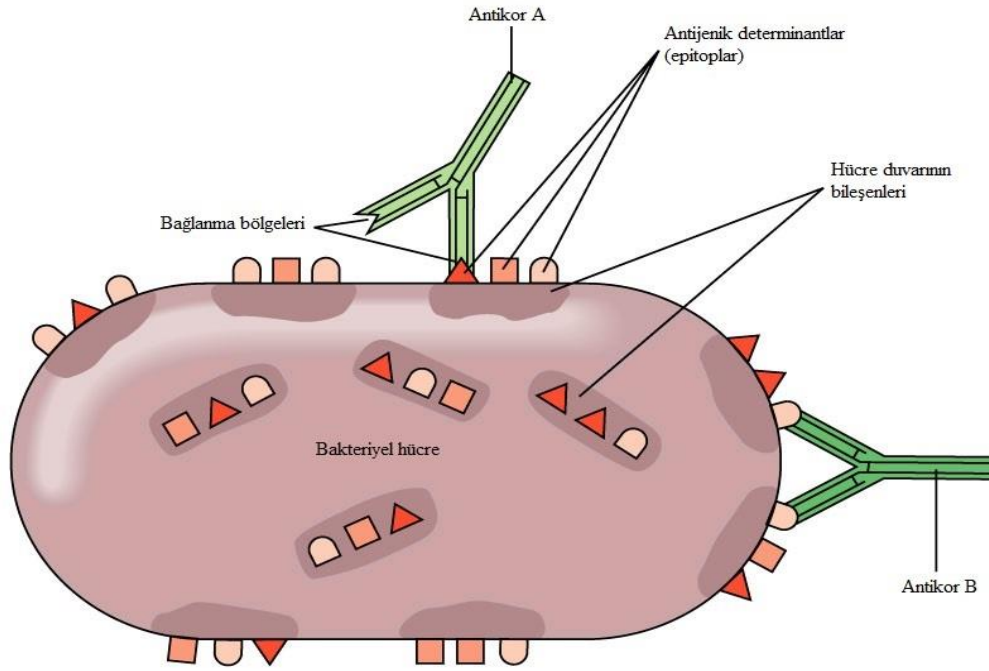
2.2.3. Antijenler

Bir organizmaya girdiğinde, kendilerine karşı bağışık bir yanıtın oluşmasına yol açan, oluşan bağışık yanıtı tepki veren, sonuçta ortaya çıkan antikolar ve duyarlı hücre reseptörleri ile özgül olarak birleşebilen, ayrıca bu maddelerle in vitro ve in vivo koşullarda reaksiyona giren moleküllere antijen denir. Antijenler, antikolarla tepkime veren moleküller iken, immünojenler ise bir bağışıklık yanıtı oluşturan moleküllerdir. Antijen moleküllerinin ucunda, antijenin özgüllüğünü belirleyen kimyasal gruplara determinant (antijenik uç) veya epitop denir. Bu epitopa karşılık antikorda bulunan özgül

uçlara ise; paratop denir. Bu antijenler; biyolojik bir molekül, basit bir ara metabolit, lipid yapısında bir molekül olabileceği gibi, karbohidratlar, fosfolipidler, nükleik asit ve proteinler gibi makromoleküler yapıda da olabilirler. Antijenik uyarımla sıvısal (hümorale) bağışık yanıt sonrası antikörler oluşurken, hücresele bağışık yanıtta ise; antijene özgü reseptörler taşıyan T lenfositleri oluşur. [41, 45, 48]

Antijenlerin bir organizmada bağışık yanıt oluşturabilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekir. Bir molekülün antijen olabilmesi ilişki kuracağı organizmanın genetik yapısına yabancı olmalıdır. Bu yabancılık, moleküllerin kimyasal birimlerinin ve üç boyutlu yapılarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Bir antijenin elde edildiği organizma, filogenetik olarak konakçı organizmaya ne kadar uzaksa, konak için o kadar iyi bir antijen özelliği gösterir.

Antijenler genellikle büyük molekülle maddelerdir. Molekül ağırlığı 100 kDa' dan büyük olan protein veya protein bileşikleri en iyi antijenik özellik gösterir. 5 kDa' dan daha az molekül ağırlığına sahip maddeler antijenik özellik göstermeyip, bir adjuvantla birleşmiş 14 kDa olan bir molekül zayıf, 40 kDa olan bir molekül orta ve 500 kDa olan özellikle protein veya polipeptit-karbohidrat molekülü çok iyi bir antijen olarak kabul edilir [21]. Bazı durumlarda molekül ağırlığı küçük olan maddeler iyi bir antijenik özellik gösterirken, büyük molekül ağırlığına sahip maddeler de herhangi bir antijenik özelliğe sahip olmayabilirler [45].



Şekil 2.8. Antikorların antijenik bir bakteriyel hücreye bağlanması

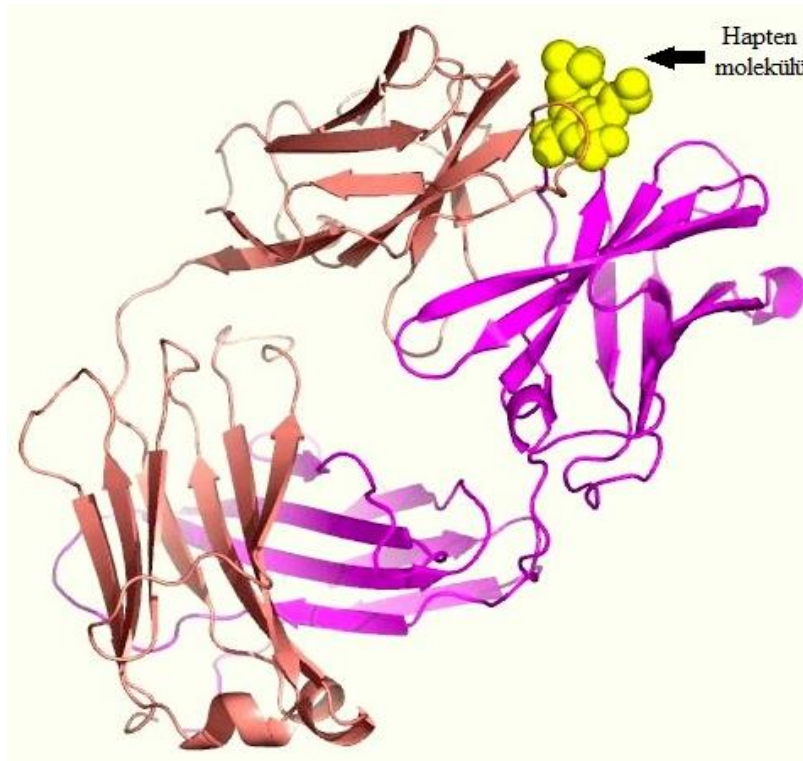
Bir maddenin iyi bir antijen olabilmesi için, yapısında bulunan epitopların belirli bir kimyasal yapıda ve sağlamlıkta olması gerekir, çünkü antijen üzerinde bulunan her epitop antijenik etki oluşturmayabilir. Antijenlerin yapısı karmaşıklaştıkça antijenik özellikleri de artmaktadır. Örneğin; farklı amino asitlerin peptitleşmesi sonucu oluşan antijenler kuvvetli antijen özelliği gösterirken, tek tür şeker birimlerinden oluşan polisakaritler (nişasta, dekstrin, vs.) ve tek tip birimlerden oluşan lipidler gibi moleküller daha az antijenik özellik gösterirler [40, 45].

Bağışıklık sisteminin uyarılmasında, antijenlerin eriyebilir olması fakat erime sırasında epitoplarının kararlı olup yapısının bozulmaması da iyi bir antijenik uyarım için önemlidir. Antijenlerin iyi bir bağışık yanıt oluşturmalarında; konakçı organizmanın türü, doz miktarı, antijenin konağa verilme şekli ve giriş yolu, bir deneyde kullanılacak olan deney hayvanının; genetik yapısı, yaşı, cinsiyeti ve türü de önemli rol oynamaktadır [40, 41, 45].

Antijenler kimyasal olarak karmaşık bir yapıya sahip olup, en iyi antijenik özelliği genellikle protein yapılı kompleks moleküller göstermektedir. Proteinlerden, L- formunda olanlar kolay metabolize olduklarından iyi bir antijen olarak değerlendirilir. Yapay D-formundaki proteinler ise: metabolize olmadıklarından antijen özellik göstermezler [21]. Bunlardan başka sentetik proteinler de antijenik uyarım yapıp kendilerine karşı spesifik bir

bağışık yanıt oluşturabilirler. Bunlar ya farklı amino asitlerden (heteropolimer) ya da aynı türden amino asitlerden (homopolimer) oluşmuş olup, polimerler şeklinde olan maddelerdir. Sentetik polimerler polipeptit bir omurgaya, düz veya zincirli polimerler veya çeşitli determinantların katılmasıyla oluşturulmaktadır. Sentetik veya yarı sentetik proteinler, doğal proteinlere oranla daha zayıf antijenik özellik gösterirler [40].

Bazı polisakkaritler de antijenik moleküller arasında bulunmaktadır. Saf olan ve sadece tek karbohidrat monomerinden oluşan polimerler zayıf antijenik özellik gösterirken, genellikle protein ve lipidlerle birleşmiş halde bulunan bu maddeler daha kuvvetli antijendirler. Aynı durum lipidler için de geçerli olup, saf halde zayıf antijen, proteinlerle birleştiklerinde ise kuvvetli antijendirler. Saflaştırılmış ve yüksek molekül ağırlığına sahip olan lipidler herhangi farklı bir yapıya (protein, karbohidrat vs.) bağlanmadıkça tek başlarına bir hapten gibi davranırlar. Nükleik asitler de ancak protein molekülleriyle birleştğinde bir antijen gibi davranarak bağışık yanıt oluştururlar [40, 41, 48].



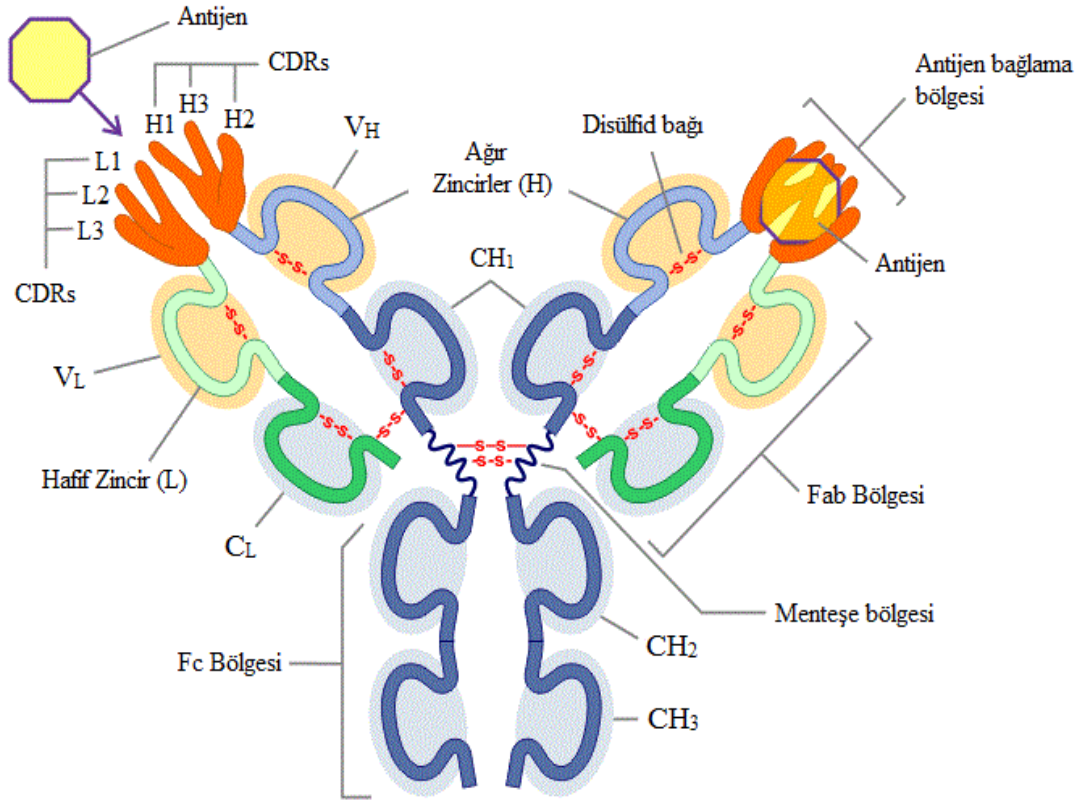
Şekil 2.9. Monoklonal bir antikorun Fab fragmentine bağlı haptent molekülü [49]

Bir organizmada antikor sentezini uyaramayan, meydana gelen antikorlarla in vitro ortamda özgül olarak birleşme yeteneğine sahip olan küçük molekül ağırlıklı kimyasal maddelere haptent denir. Haptentler, proteinler gibi büyük bir taşıyıcı moleküle bağlanarak

bağışık yanıt oluşturma özelliği kazanabilirler. Bu şekilde proteine bağlı olan haptent molekülü bir epitop gibi davranarak, bağışık yanıt oluşturup kendine özgül antikorların ortaya çıkmasını sağlar (Şekil 2.9). Mikrobiyal antijenik yapılar; bakteri, virüs, fungus (mantar) ve parazit gibi kaynaklarından gelerek, sağlıklı bir organizmayı enfekte edebilirler [41, 45, 50].

2.2.4. Antikorlar

Bir organizmada antijenik uyarımlar sonucunda, lenfoid hücreler ve özellikle plazma hücreleri tarafından sentezlenen, uyarım yapan bu antijenik epitoplarla özgül olarak reaksiyona giren moleküllere antikor veya immünoglobulin adı verilir [40, 48, 51].



Şekil 2.10. Antikor yapısı [52]

Antikorlar kimyasal olarak bakıldığında, globulin proteinlerdir. Kanda, serum elektroforezinde anoda doğru göç hızlarına bağlı olarak alfa 1, alfa 2, beta ve gamma olmak üzere üç tip globülin bulunur. Antikorlar ise; gamma globülinlerdir. İmmünoglobulin molekülü Şekil 2.10' da görüldüğü gibi, iki ağır (*H*, *Heavy*) polipeptit zinciri ve iki kısa (*L*, *Light*) polipeptit zincirinden meydana gelmiştir. Ağır zincirlerin her

biri ortalama 420 amino asitten, hafif zincirlerin her biri ise; ortalama 210 amino asitten oluşur. Bu zincirlerin bir ucunda amin ($-NH_2$) grubu bulunduğundan bu uç aminoterminal, bir ucunda ise karboksil ($-COOH$) grubu bulunduğundan bu uç ta karboksiterminal olarak isimlendirilir. Her bir ağır zincir 50 kD, hafif zincirler ise; 22 kD molekül ağırlığındadır. Antikorda bulunan her bir polipeptit zincirinin aminoterminal uca yakın kısımları özgül antijene bağlanma bölgesi olduğundan, burada bulunan amino asit diziliminde, diğer bölgelere oranla daha fazla değişiklik gözlenir. Bu nedenle bu bölgeye değişken (*V, variable*) bölge denir. Polipeptit zincirlerinin kalan kısımları nispeten değişmez durum gösterdiğinden bu bölgelere de değişmez (*C, constant*) bölge denir [41, 45, 51].

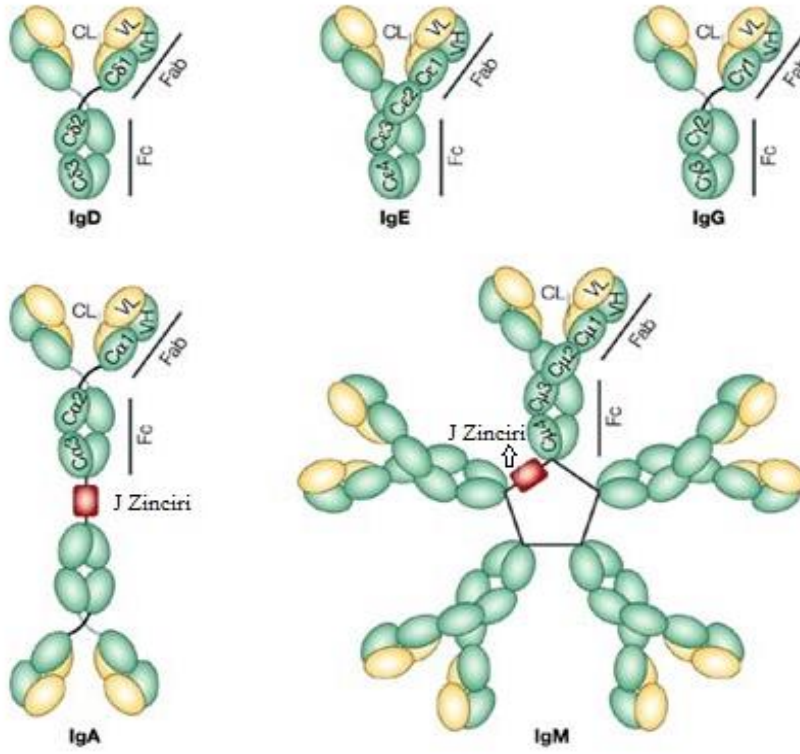
Antikorlarda bulunan ağır ve hafif zincirler, ağır zincirin CH_1 biriminde ve hafif zincirin karboksil ucunda bulunan sistein rezidüleri arasında oluşan disülfid bağları ile birbirlerine bağlıdırlar. Ayrıca her bir antikor molekülünün iki ağır zinciri de birbirlerine disülfid bağlarıyla kovalent olarak bağlıdırlar. Her polipeptit zincirinin üzerinde disülfid bağlarıyla ilmeklenmek koşuluyla oluşturulan belirli sayıda kıvrım alanları (domain) bulunur. Her bir kıvrım alanı 100-110 amino asitlik bir yer kaplamaktadır. Bir IgG tipi antikorda, ağır zincirde dört, hafif zincirde ise iki adet kıvrım alanları bulunur. İmmünoglobulinlerin bazı işlevlerinin bu kıvrımlarla ilişkili olduğu saptanmıştır [41, 45, 48].

Antikor Tipleri

İmmünoglobulinler, ağır zincirlerin sabit bölgelerinin fiziksel, kimyasal, serolojik, antijenik ve diğer karakterlerine göre sınıf ve alt sınıflara ayrılırlar. İnsanlarda biyolojik etkinlik ve moleküler özellikleri bakımından farklılık gösteren, IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE olmak üzere 5 sınıf bulunur (Şekil 2.11). İmmünoglobulinlerde bulunan ağır zincirlerinin C bölgeleri arasında stereokimyasal ve serolojik farklılıklar göz önünde bulundurularak 5 farklı yapı saptanmıştır. Bunlar; gamma (γ), alfa (α), mü (μ), delta (δ) ve epsilon (ϵ) olarak isimlendirilir. İmmünoglobulinlerdeki ağır zincirlerin yapısı, o immünoglobulinin sınıfını belirler. Bu nedenle; yapılan çalışmalar sonucunda, insanlarda biyolojik etkinlik ve moleküler özellik bakımından farklı olan IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE olmak üzere 5 ayrı immünoglobulin sınıfı bulunur [45, 48].

İmmünoglobulinlerin sedimentasyon sabitleri (Swedberg birimleri, S) 7S ile 19S arasında değişmektedir. Bu sınıflara özgü IgG' de γ , IgA' da α , IgM' de μ , IgD' de δ ve IgE' de ϵ

ağır zincir izotipleri bulunmaktadır. Ağır ve hafif zincirler arasındaki bağlantıyı oluşturan disülfür bağlarının sayısı ve bağlantı yerlerinin gösterdiği değişikliklere göre IgG; IgG₁, IgG₂, IgG₃ ve IgG₄ olmak üzere dört alt sınıfa, IgA; IgA₁ ve IgA₂ olarak iki alt sınıfa ve IgM de IgM₁ ve IgM₂ olarak iki ayrı alt sınıfa ayrılırlar [45].



Şekil 2.11. İmmunoglobulin tipleri [53]

IgA: Temel olarak IgG molekülüne benzer olup monomer olarak bulunduğu halde, IgA' da iki veya daha çok monomerin J bağlayıcı polipeptit zinciri ile birleşerek dimer ya da trimer şeklinde de bulunabilir. Molekül ağırlığı; monomer yapı için 160 kDa, trimer yapı için de 400 kDa' dur. İnsan kan serumunda 200-500 mg/dl oranında bulunarak, serumdaki toplam immunoglobülinlerin % 15' ini oluşturur. IgA' nın, antijenik farklılık gösteren ve IgA1 ve IgA2 olarak ifade edilen iki alt sınıfı bulunmuştur. IgA1 serumdaki IgA' nın %90' ını, IgA2 ise %10' unu oluşturur. Salgılarda ise IgA1 ve IgA2 oranı yarı yarıyadır. IgA, doğumdan itibaren 2. ayda sentezlenmeye başlar, yavaş yavaş yükselerek ergenlik çağına erişkin düzeye ulaşır. Solunum yolları, sindirim organları ve genital organ salgılarında, gözyaşı tükürük ve sütte IgA tipi immunoglobulin bulunur. Bir organizmada meydana gelen lokal enfeksiyonlar veya antijenler IgA salgılanmasını uyarır. Salgısal IgA düzeyi düşük olan

kişiler, üst solunum yolu virüs ve parazit enfeksiyonlarına daha duyarlıdırlar. IgA antiviral etkiye sahip olup, T lenfosit, monosit ve nötrofillerin yüzeylerinde bulunan IgA reseptörleri, fagositoz olayına yardım ederler [41, 43, 48, 54].

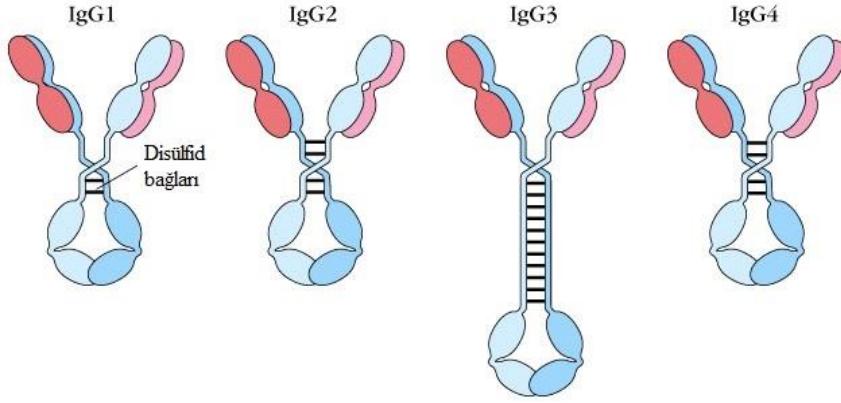
IgD: IgG immunoglobulinlerin yapısına benzerlik gösteren bir monomerdur. Molekül ağırlığı 184 kDa olup, sedimentasyon sabiti 7S-8S kadardır. Kan serumunda çok az bulunur ve total serum immunoglobulinlerin % 0,2' sini oluştururlar. Yarı ömürleri 3 gündür, ısıya ve proteazlara oldukça duyarlıdırlar. IgD' ler plasentayı geçemeyip, fetal sirkülasyona dahil olmamaktadırlar. Myelomalı hastaların kanında yüksek miktarlarda bulunurlar. B hücreleri yüzeyinde de, IgM' lardan sonra en çok bulunan antikor tipidir ve B lenfositlerinde ilk antijen bağlayan bir reseptör görevi yaptığı bildirilmiştir [40, 41, 54].

IgE: Bu antikorlar, IgG ve IgA' dan 100 amino asit kadar uzun olup, kan serumunda bulunan miktarları (0,01-0,03 mg/100 ml) oldukça azdır. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 190 kDa, sedimentasyon sabiti 8S olup, toplam immunoglobulinlerin % 0,004' ünü oluştururlar. IgE, deri ve diğer dokulardaki alerji olaylarında yer alır. Çiçek tozlarına karşı alerjisi bulunan kişilerde, bronş astması, saman nezlesi, atopik dermatitisli ve helmentiyaz gibi parazit kaynaklı enfeksiyonlarda serumdaki IgE miktarı artar. Parazitlere karşı oluşmuş IgE tipi antikorlar, hücre bağımlı bağışık yanıt mekanizmasına katılarak, parazitlerin bu şekilde elimine edilmesinde görev alırlar [40, 45, 48].

IgG: Birbirlerine disülfür bağlarıyla bağlı olan iki ağır ve iki hafif polipeptit zincirden oluşan IgG immunoglobulini, 150 kDa ağırlığında olup, sedimentasyon katsayısı 7S birimidir. Normal insan serumunda bulunan total antikorların % 80' nini oluşturur. IgG₁, IgG₂, IgG₃ ve IgG₄ olmak üzere dört alt sınıfı bulunur (Şekil 2.12). IgG₁ ve IgG₃ komplemanı aktive edip çoğunlukla protein yapıdaki antijenlerle etkileşerek bunların organizmadan atılmasını sağlarken, IgG₂ ve IgG₄ ise genellikle karbohidrat yapılı antijenlerle reaksiyona girerler [55].

IgG antikorları, gebeliğin üçüncü ve dördüncü aylarından itibaren plasentadan geçerek yeni doğanı enfeksiyonlardan koruyan tek immunoglobulin sınıfıdır. Serum IgG miktarı, doğumdan sonra giderek artar, 2 yaşında normal erişkinlerdeki miktarına (1 000 – 1 500 mg/ml) ulaşır ve 40 yaşından sonra tekrar azalmaya başlar.

IgG immunoglobulinleri; ikincil bağışık yanıtta rol alan esas antikordur, bakteri ve virüslere karşı önemli bir savunma sağlar. Komplemanı etkinleştirir, opsonizasyon yaparak fagositozu şiddetlendirir. Yarılma ömürleri yaklaşık olarak 23 gün olup, dolaşımında uzun süre bulunurlar. Tüm IgG' lerin % 65' ini IgG₁, % 23' ünü IgG₂, % 8' ini IgG₃ ve % 4' ünü ise IgG₄ oluşturur.



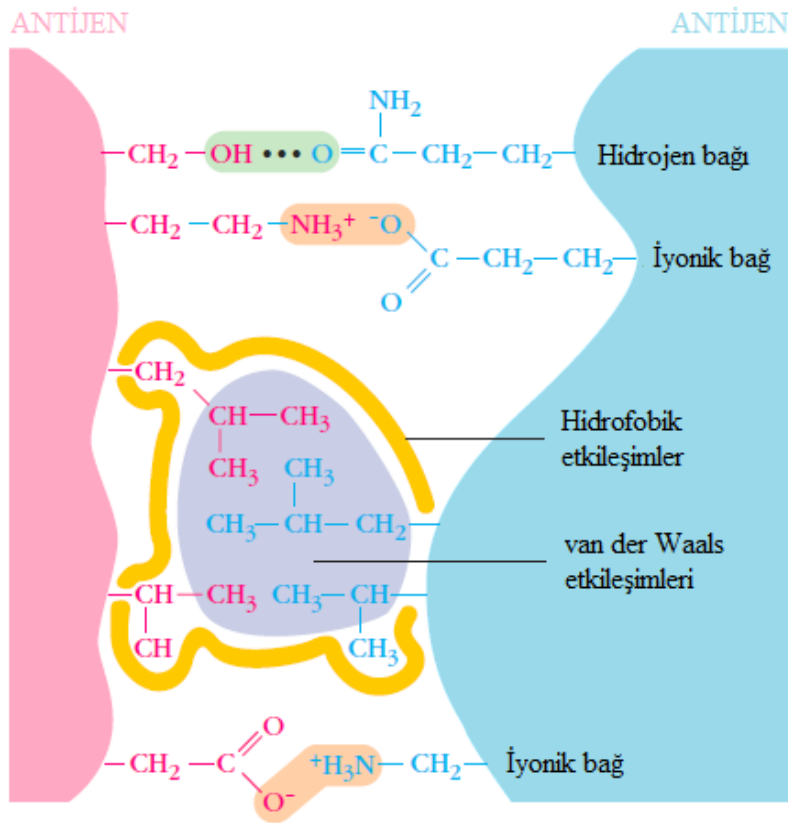
Şekil 2.12. IgG sınıf immunoglobulinlerin alt tipleri [56]

IgM: Kan serumunda bulunan immunoglobulinlerin yaklaşık olarak % 10' unu oluştururlar. Molekül ağırlığı 900 kDa olup, sedimentasyon sabiti 19S olan pentamer yapılı bir immunoglobulindir. Her bir IgM molekülü 5 tane IgG monomerinden oluşmuştur. IgM molekülünde “Y” şeklinde olan monomerleri birbirlerine bağlayan bir de J zinciri bulunur. Antijenik uyarımlarda, IgG' lerden daha erken sentezlenirler fakat makromoleküler yapıda olduklarından plesantadan geçemezler. Fetal yaşamda karşılaşılan enfeksiyon etkenlerine karşı fetüste gelişebilirler. Doğumdan 6-9 ay sonra yetişkinlerdeki düzeye (60-100 mg/100 ml) ulaşırlar. IgM' lerin; presipitasyon, hemaglutinasyon, virüs nötralizasyonu, aglütinasyonda etkili olup, komplemanı da bağlayabilirler. Enfeksiyonlarda ilk oluşan antikorlar IgM yapısındadır. Ayrıca; B hücrelerinin yüzeylerinde bulunurlar ve kan gruplarının izohemaglutininleri (anti-A ve anti-B) IgM grubundadır [40, 41, 45].

2.2.5. Antikor-antijen reaksiyonları

Antikor ile antijen birleşmesi, antijende bulunan spesifik determinant grupları ile (epitoplar), antikorda aminoterminal uçta bulunan, antikorun birleşme yeri olan paratoplar arasında yüksek özgüllükte gerçekleşen, tersinir biyokimyasal bir protein-protein birleşme reaksiyonudur.

Antijen ve antikorlar, proteinlerin hücre reseptörlerine veya enzimlerin substratlarına bağlandığı gibi yüksek özgüllükte, kovalent olmayan etkileşimlerle birbirlerine bağlanırlar. Bu bağlanma tersinir olup, yüksek pH' larda veya yüksek iyonik kuvvetlerle oluşan bağlar ayrışabilir. Antijen–antikor kompleks molekülünün oluşmasında yer alan moleküllerarası etkileşimler; Şekil 2.13' de görüldüğü gibi, hidrojen bağları, elektrostatik (Coulomb) etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals kuvvetleridir [56].



Şekil 2.13. Antikor ve antijen etkileşiminde yer alan kimyasal bağ türleri [56]

Elektrostatik etkileşimler: Antikor ve antijenlerin, birleşme bölgelerindeki amino asitler üzerinde bulunan, zıt yüklü (NH_4^+) ve (COO^-) gruplar arasında meydana gelen, elektrostatik çekim kuvvetlerine antikor ve antijen molekülleri birbirlerini çekerek birleşirler.

Hidrojen bağları: Antijen ve antikor molekülleri birbirlerine çok yakın bir mesafede oldukları zaman, eğer birleşme bölgelerinde, -OH, -NH₂, -COOH gibi hidrofilik gruplar varsa, antijen ve antikor arasında nispeten zayıf bir etkileşim olan hidrojen bağları meydana gelerek, bu moleküllerin birarada bulunmasını sağlar.

Hidrofobik etkileşimler: Yan zincirlerinde, valin, lösin ve fenilalanin gibi hidrofobik gruplar bulunan iki protein molekülü arasında su moleküllerinin itilmesi sonucu antijen ve antikor molekülleri bir arada tutulur. Hidrofobik etkileşme, bir antijen ve antikor molekülü arasında meydana gelen tüm etkileşimlerin ve bağların % 50' sini oluşturduğu düşünülmektedir.

Van der Waals bağları: Antijen ve antikor moleküllerinde bulunan, zıt yüklü elektron bulutları arasında meydana gelen etkileşimler sonucu, antijen ve antikor arasında birleşme gerçekleşir. Bütün etkileşimlerde olduğu gibi bu Van der Waals etkileşimlerinde de antijen ve antikor molekülleri birbirine ne kadar yakınsa, meydana gelecek olan etkileşimler de o kadar kuvvetli olur [56].

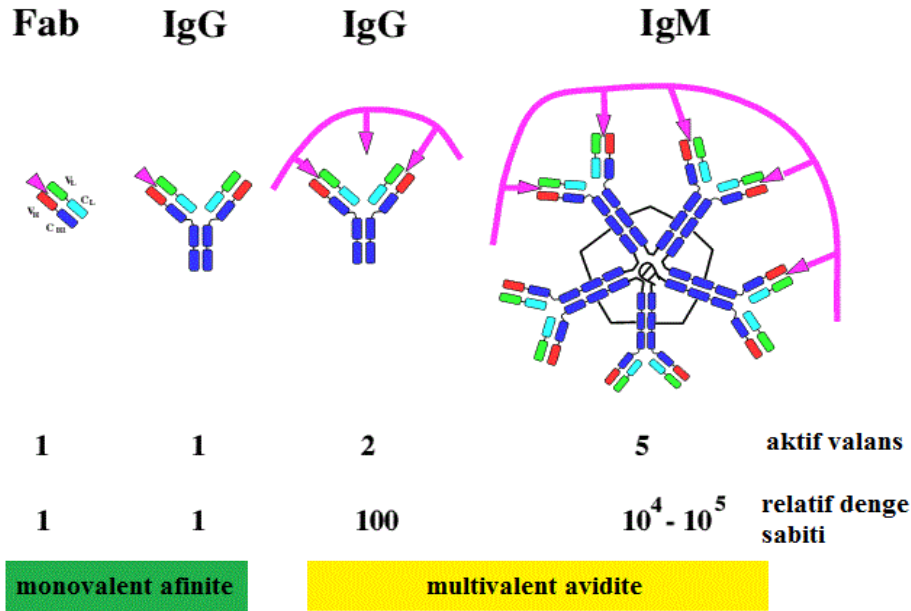
Antijen- antikor birleşmesi için oluşan bağların kuvveti, antijendeki birleşme noktası olan epitopların ve antikordaki antijen bağlayan bölgelerdeki bağlayıcı grupların konfigürasyonlarıyla oldukça yakından ilgilidir. Değişen konfigürasyona göre, antikor ve antijen molekülleri kuvvetli bir şekilde de bağlanabilirken, bu bağlanma zayıf bir şekilde de gerçekleşebilir. Antikor- antijen birleşmesi sonucu oluşan kompleksin sağlamlığı için iki farklı tanımlama yapılmıştır. Bunlar;

Afinite: Antijen ve antikor birleşmesi tersinir bir reaksiyondur. Birleşme sabiti olan “K” değeri, homojen bir antikor ile monovalanslı antijenik determinant arasındaki ilişkinin ölçüsü olup, antikor afinitesi olarak isimlendirilir. Doğal antijenlerin çoğu birden fazla epitopa sahiptirler. Antikorların da birden fazla bağlanma bölgesine sahip olması, antijen ve antikor arasında birden çok birleşmenin olmasına olanak sağlar. Tek epitopa sahip antijenin, antikorun tek bir paratopuna olan birleşme ilgisine afinite denir. Antijen ve antikor moleküllerinin bağlanma bölgelerinin üç boyutlu yapısı, birleşme durumunda aralarındaki mesafenin uzak veya yakınlığına göre, ortamın pH ve sıcaklık değerlerine bağlı olarak, afinite artıp azalabilir. Antikor-antijenin birleşmesi ile ölçülen afinite sabiti 10^5 mol^{-1} ile 10^{12} mol^{-1} arasındadır [41, 45].

Avidite: Doğal antijenlerin büyük bir kısmı birden çok epitopa sahiptir. Antikorlar da en az iki valansa sahiptirler. Çok valanslı bir antijenin yine birden fazla valansa sahip olan bir antikor molekülüne bağlanma gücüne avidite denir. Antijen yüzeyinde birden fazla determinant gruplar bulunduğu bunlara karşı oluşan antikorlar da farklı

özgüllüktedirler.

Antijen antikor birleşmesi iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamak çok hızlı bir şekilde gerçekleşirken, ikinci basamağın gerçekleşmesi saatler hatta günler alabilir. Birinci adımda, antijenin determinant grupları (epitopları), antikorlarda uygun bir paratop ile birleşirler. Kimyasal bir olay olan bu basamakta enerji açığa çıkar ve ortamda elektrolitlerin bulunmasına gerek yoktur. İkinci basamakta ise; antijenlerin çok valanslı, antikorların ise hem Fab hem de Fc kısımlarına sahip olmaları gereklidir. Böyle bir reaksiyonda ortamda elektrolitlerin varlığına da gerek duyulur. Bu basamakta ortaya çıkan olayları in vitro koşullarda gözlemleyebilmek mümkündür [41, 51, 56].

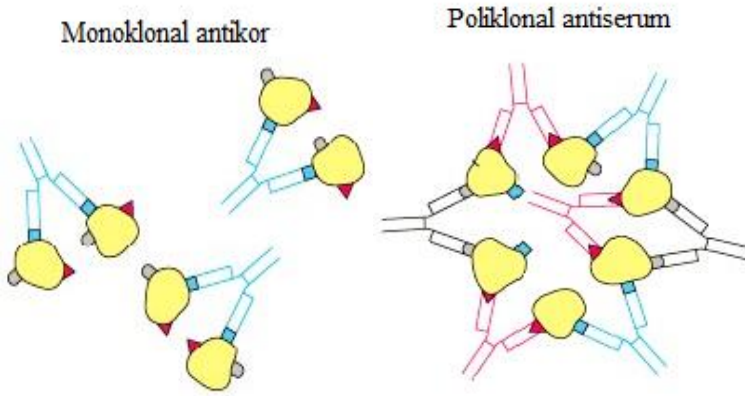


Şekil 2.14. Antikorlarda monovalent afinite ve multivalent avidite

Antijen ve antikor birleşmesi oldukça spesifik olduğundan, meydana gelen bu reaksiyonlardan yararlanılarak, bilinmeyen antijen ve antikorlar belirlenerek enfeksiyon etkenleri tanımlanıp, konak canlıının bağışık yanıt seviyesi ölçülebilir. Antijen-antikor birleşmesi temeline dayanan; presipitasyon, flokülasyon, aglütinasyon, immünoelektroforez, immünofloresan, radio immünoassay ve enzim immünoassay gibi farklı yöntemler ile klinik olarak çeşitli ölçümler yapılabilir [41, 43, 51].

2.2.6. Poliklonal antikorlar

Yabancı bir organizmanın, konak organizmaya girmesiyle uyarılan B lenfosit hücreleri, bu yabancı organizmada bulunan antijenlerin her bir epitopuna özgü farklı antikorlar üretirler. Bu şekilde bir antijene karşı çok sayıda farklı antikor üretilmiş olur. Şekil 2.15' te de görüldüğü gibi; poliklonal antikorlar, kan serumunda bulunan farklı antijenlere ve bu antijenlerin farklı epitoplarına karşı gelişmiş antikorların tamamı olarak tanımlanırken, monoklonal antikorlar ise tek bir epitopa karşı gelişen antikorlardır. Poliklonal karakterli kompleks antikor popülasyonu, immünoglobulinlerin IgG, IgM, IgE, IgA ve IgD gibi farklı alt sınıflarını içerir [57, 58].



Şekil 2.15. Poliklonal antiserum ve monoklonal antikorların hedef moleküle bağlanması [57]

Poliklonal antikorlar birden çok farklı antikoru içerdiğinden dolayı, özgüllükleri de oldukça düşüktür. Bu duruma karşın monoklonal antikorlar ise; bir antijenin tek bir epitopuna karşı gelişmiş oldukları için, spesifiteleri oldukça yüksektir. Poliklonal antikorlar, geniş bir pH aralığında ve yüksek tuz konsantrasyonlarında oldukça kararlıdır fakat monoklonal antikorlar ise; hem pH değerindeki hem de tuz konsantrasyonundaki meydana gelebilecek küçük değişimlere bile oldukça duyarlıdır [58].

Poliklonal antikorlar, monoklonal antikorlara göre; çok daha kısa sürede, daha ucuz maliyetle ve ileri uzmanlık tekniklerine ihtiyaç duyulmadan üretilir. Hibridoma üretiminde monoklonal antikorların önemli bir avantajı da, sürekli ve yenilenebilir bir kaynak olmasıdır. Monoklonal antikorlar; bir defa üretildikten sonra sıvı azotta saklanarak uzun süre muhafaza edilebilirler ve istenilen zamanda tekrar kullanılabilirler. Poliklonal antikorlar ise; kullanılan deney hayvanının birden fazla bağışıklanması sonucu elde edilip,

uzun süre antikor aktivitelerini koruyamazlar [57, 58].

Poliklonal antikor üretiminde, birden fazla bağışıklama sonrasında istenilen düzeyde antikor titresi elde edildikten sonra, deney hayvanının kan serumundan antikorlar uygun tekniklerle saflaştırılıp kullanılır [51, 58]. Poliklonal ve monoklonal antikorlar arasındaki farklar Çizelge 2.4.' te verilmiştir.

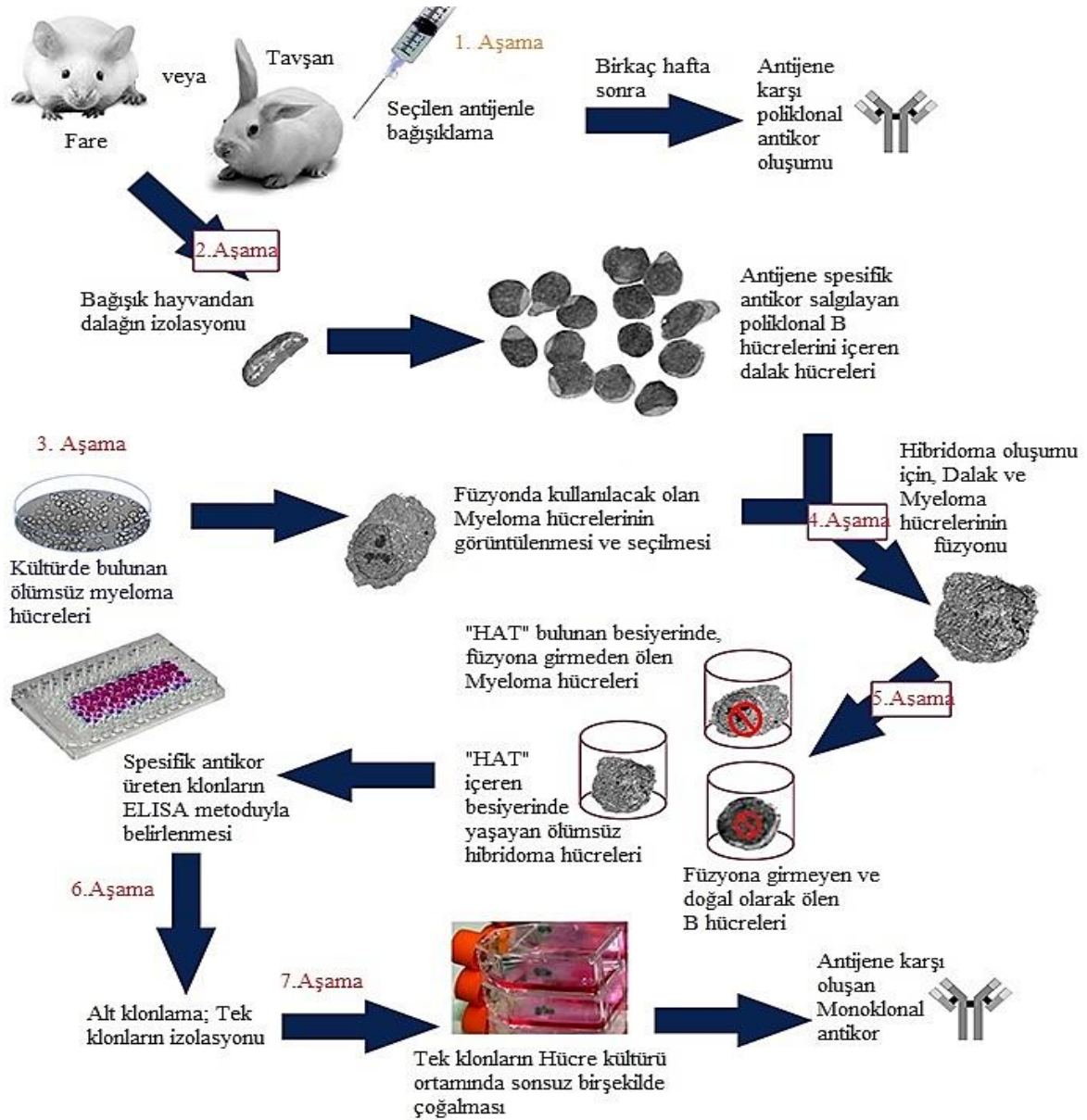
Çizelge 2.4. Poliklonal antikorlar ve monoklonal antikorlar arasındaki farklar

| | Poliklonal Antikor | Monoklonal Antikor (düşük afinite) | Monoklonal antikor (yüksek afinite) |
|---|---|--|-------------------------------------|
| Tanınan antijenik determinant sayısı | Birkaç tane (sıklıkla çapraz reaksiyon) | Bir tane (fakat sıklıkla çapraz reaksiyon) | Çoğunlukla bir |
| Spesifiklik | Polispesifik | Sıklıkla polispesifik | Monospesifik |
| Afinite | Değişken (farklı antikorlar) | Düşük | Yüksek |
| Spesifik olmayan immünoglobulinlerin konsantrasyonu | Yüksek | Düşük | Düşük |
| Verim | Yüksek | Düşük | Düşük |
| Üretim maliyeti | Düşük | Yüksek | Yüksek |
| Standardize edilebilirliği | Hemen hemen yok veya kolay değil | Kolay | Kolay |
| Miktar | Sınırlı | Sınırsız | Sınırsız |
| Uygulanabilirliği | Metoda bağlı olarak | Düşük | Çok iyi seviyede |

2.2.7. Monoklonal antikorlar ve hibridoma teknolojisi

Monoklonal antikorlar, tek bir hücreden köken alarak çoğalan, özdeş hücrelerin ürettiği tek tip (homojen) bir immünoglobulin yapısındaki moleküllerdir [59]. Monoklonal antikorlar,

tek bir B lenfosit hücresi tarafından üretilerek, hedef antijenin sadece bir epitopuna bağlanabilirler. İki farklı hücrenin füzyonu sonrasında hibrit hücrelerin elde edilmesiyle monoklonal antikor üretimi gerçekleştirilir. Bu iki hücreden biri dalak B-lenfosit hücresi, diğeri ise; kemik iliği tümör hücresi (myeloma) dir. Bu işlemde; lenfosit hücresinin antikor üretme özelliğinden, myelomanın da hızlı ve sınırsız bölünme özelliğinden yararlanır. Hibridoma kolonileri tek tip hücreden oluştukları için sentezledikleri antikorlar “monoklonal antikor” adını alırlar. Füzyonda işlemi için kullanılan hücrelerin belirli özel koşullar altında kaynaştırılmasıyla hibrit hücreler elde edilir [60]. Bu üretim tekniğine hibridoma teknolojisi adı verilir. Monoklonal üretim aşamaları Şekil 2.16’ da görülmektedir.



Şekil 2.16. Monoklonal Antikor üretim basamakları [61]

Arjantinli biyokimyacı Cesar Milstein (1927-2002) ve Alman doktora-sonrası araştırmacı Georges Köhler (1946-1995) tarafından, Milstein' in Cambridge' de bulunan "Moleküler Araştırma Kurumu (MRC)" moleküler biyoloji laboratuvarında yaptıkları çalışmalar sonrasında geliştirdikleri monoklonal antikorlar ve hibridoma teknolojisiyle yeni bir çağ açılmıştır. Bu buluşlarıyla Milstein ve Köhler, 1984 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülü almışlardır. Çalışmaları sırasında Milstein' in önerisiyle Köhler, P3 myeloma antikorlarının antijen spesifikliğini incelemiştir fakat iki myeloma hücrelerinin füzyonu yerine bir hücrenin; antikor üreten fare dalak hücresi olmasına karar vermiştir. Yapılan füzyon işlemi sonrasında belirgin koloniler oluşuncaya kadar bu hücreler seçici besi

ortamında tutulmuş ve bu şekilde ilk defa tek determinanta spesifik antikor hücre kültür ortamında sürekli olarak üretmişlerdir. Köhler ve Milstein' in önerdiği bu tekniğin üç temel prensibi bulunmaktadır. Bunlar: i) her bir B-lenfosit hücresi sadece bir antikor üretebilir, ii) füzyonda kullanılan lenfositler, spesifik bir immünojenle bağışıklanmış dōnorlardan elde edilmelidir, iii) in vitro hücre hatlarında immünoglobulin üreten B-lenfosit hücreleri ölümsüzleştirilebilir [4, 5].

Köhler ve Milstein geliştirdikleri bu metot için patent almamışlardır. Böylece, geleceğin potansiyel tedavilerinin geliştirilmesi için akademik alanda ve ilaç sanayisinde hibridoma teknolojisinin kullanılmasına izin vermişlerdir [4].

Paul Ehrlich 20. yüzyılın başlarında “sihirli mermi (magic bullet)” kavramını öne sürmüştür. Ehrlich' e göre; organizmada hastalığa neden olan maddeleri seçimli olarak bulan ve bu hastalık etmenlerini etkisiz hale getiren maddeler onun için birer sihirli mermiydi. Monoklonal antikorlar da günümüzde biyokimya, moleküler biyoloji ve tıp alanında özellikle tedavi ve teşhis amaçlı olarak yaygın bir şekilde kullanılan birer sihirli mermi haline gelmiştir [59, 62].

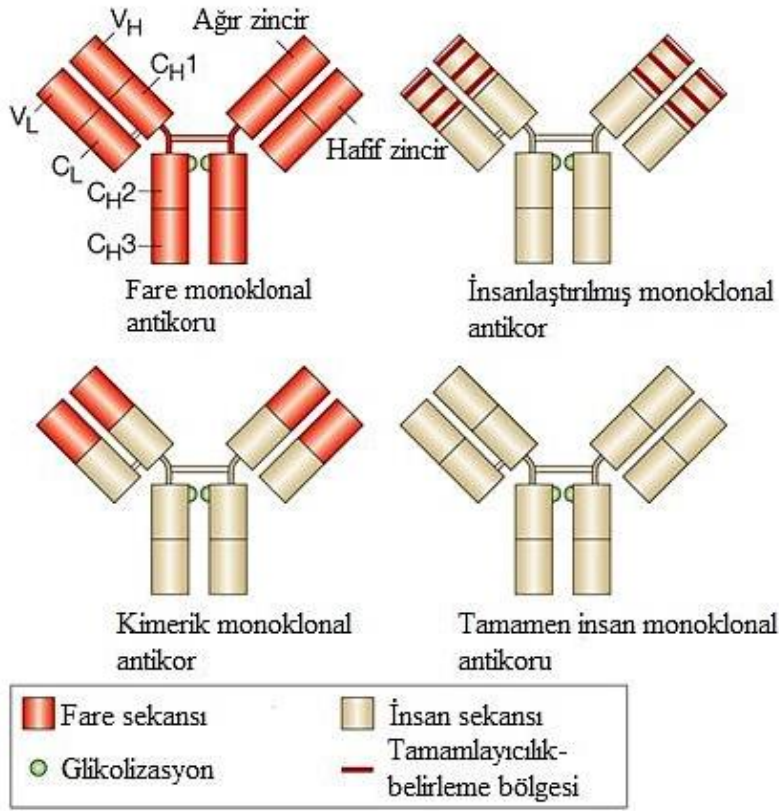
Monoklonal antikor aracılı tedavi yöntemleri fare kökenli monoklonal antikorlarla başlamış olup, bunları; fare-insan kimerik antikorları ve daha sonraları insanlaştırılmış monoklonal antikorlar takip etmiştir. Fare kökenli, kimerik ve insansı olarak geliştirilen bütün türdeki monoklonal antikorlar, FDA (Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmıştır. 1980' lerin sonunda, fare monoklonal antikorları klinik olarak geliştirilmiştir. Muromonab (Orthoclone® OKT3) başta böbrek olmak üzere [63], organ nakillerinde doku reddini önlemek için geliştirilen, insanlarda tedavi edici olarak ilk kez kullanılan ve FDA tarafından onaylanan ilk fare kökenli monoklonal antikordur [4, 9, 64].

Farelerin kullanılmasıyla elde edilen mürin monoklonal antikorları, klinik çalışmalarda hedeflenen moleküllere karşı yeterli etkiyi göstermiş fakat insan vücudu bu antikorları yabancı bir madde gibi algılayıp, bunlara karşı HAMA (insan anti-fare antikorları) olarak isimlendirilen immün bir yanıt oluşturmuştur [59]. Fare antikoruyla tedavi edilmeye çalışılan hastalarda genellikle; mide bulantısı, eklem yerlerinde şişkinlik ve kızarıklık gibi yan etkiler görülmüştür. İnsan vücudu tarafından oluşturulan bu HAMA yanıtı böbrek yetmezliğine ve tedavi amaçlı olarak uygulanan fare antikorlarının organizma tarafından

yok edilmesine de neden olmuştur [4, 9, 59]. Tüm bu olgular göz önünde bulundurularak, 1984 yılında antikörlerin kimerizasyonu için çalışmalar başlamıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda; rituximab/rituxan (MabThera®) isimli anti-CD20 kimerik (fare+insan) monoklonal antikoru üretilerek 1997 yılında FDA tarafından onay almıştır [4].

Kimerik monoklonal antikörler: İnsan antikörünün sabit bölgesiyle (% 66 insan antikörü), fare antikörünün değişken bölgesinin birleşiminden oluşan antikörlerdir [7, 59]. Üretilen kimerik monoklonal antikörler hedef antijene karşı etkinlik göstermiş fakat yine de anlamlı bir şekilde uygulanan ilaca karşı organizmada antikör oluşumu gözlenmiştir. Kimerik monoklonal antikörlerin bu yan etkilerini giderebilmek için rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak insanlaştırılmış (hümanize) monoklonal antikörlerin üretimi sağlanmıştır. Rekombinant DNA tekniğinde; önce fare antikörünü kodlayan gen dizileri belirlenip, daha sonra bu dizilerde yer alan fare DNA' ları insan immunoglobulin DNA' ları ile değiştirilir. Bu şekilde elde edilen rekombinant monoklonal antikörlerin sadece hedef molekülü tanıyan bölgeleri fare kökenli, diğer kısımları ise insan kaynaklıdır. İnsanlaştırılmış monoklonal antikörler % 5-10 fare proteini içerirler [7, 59, 65].

1980' lerde ilk kez tamamıyla insan monoklonal antikoru geliştirilmiştir, fakat klinik veya ticari bir başarı elde edilememiştir. Transgenik farelerin, mayaların kullanılması ve faj gösterim metotları gibi teknolojik gelişmeler, 1990' larda insan monoklonal antikörlerinin üretimini tekrar güncel hale getirmiştir. 2002' de geliştirilen Adalimumab isimli antikör, FDA tarafından onaylanan ilk insan monoklonal antikördür. Günümüzde insan monoklonal antikörleri daha çok tedavi amaçlı olarak üretilmektedir. Öncelikli olarak immünolojik hastalıklar ve kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmektedirler [5, 59].



Şekil 2.17. Günümüzde çeşitli teknolojiler kullanılarak oluşturulabilen antikor türleri [64]

Günümüzde kanser tedavisinde monoklonal antikorlar, aşı ve hücre tedavilere göre daha çok kullanılmaktadır. Kanser türleri için geliştirilen monoklonal antikorlar daha çok tümör oluşumunda dokuya spesifik olarak üretilen reseptörler ve büyüme faktörlerini hedef alacak şekilde geliştirilmiştir. Monoklonal antikorlar kanser tedavilerinde; kanser hücrelerinin bölünmek için kullandıkları sinyal yollarını harekete geçiren faktörler ve reseptörleri inhibe ederek, kompleman aktivasyonu ile komplemente bağlı sitotoksosite (CDC) ve antikora-bağlı hücre sitotoksosite (ADCC) ile etkinlik gösterirler. Fab kısımları ile tümör dokusunu kaplayan monoklonal antikorların bir ucunda Fc bölgesi yer alır. Fc reseptörleri taşıyan mononükleer hücreler ve lökositler bu tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan antikorlarla birleşip, tümör hücrelerini ya fagosite ederek ya da öldürücü granüllerini hücre içine geçirerek tümörlere etki ederler [66, 67].

Çizelge 2.5. FDA tarafından onaylanan terapötik monoklonal antikorlar [9]

| Onay yılı | Antikor adı | Ticari adı | Üretildiği firma | Antikor tipi | Hedef hastalık |
|-----------|----------------------|-----------------------|--|------------------|---------------------------------------|
| 1986 | Muromonab-CD3 | Orthoclone OKT3 | Johnson& Johnson | Fare | Doku reddi |
| 1994 | Abciximab | ReoPro® | Eli Lilly | Kimerik | Kardiyovasküler hastalıklar |
| 1997 | Rituximab | Rituxan® ve MabThera® | Roche, Biogen Idec ve Genentech | Kimerik | Non-Hodgkin lenfoma |
| 1997 | Daclizumab | Zenapax® | Roche | İnsanlaştırılmış | Doku reddi |
| 1998 | Trastuzumab | Herceptin® | Roche ve Genentech | İnsanlaştırılmış | Meme kanseri |
| 1998 | Basiliximab | Simulect® | Novartis | Kimerik | Doku reddi |
| 1998 | Infliximab | Remicade® | Johnson& Johnson | Kimerik | Chron hastalığı ve romatoid artrit |
| 1998 | Palivizumab | Synagis® | MedImmune | İnsanlaştırılmış | solunum sinsiyal virüsü |
| 2000 | Gemtuzumab | Mylotarg® | Wyeth | İnsanlaştırılmış | Akut miyeloid lösemi |
| 2001 | Alemtuzumab | Campath® | Berlex ve Genzyme | İnsanlaştırılmış | Kronik lenfositik lösemi |
| 2002 | Adalimumab | Humira® | Abbott | İnsan | Romatoid artrit ve sedef hastalığı |
| 2002 | Ibritumomab tiuxetan | Zevalin® | Biogen Idec | Fare | Non-Hodgkin lenfoma |
| 2003 | Tositumomab | Bexxar® | GlaxoSmith Kline | Fare | Non-Hodgkin lenfoma |
| 2003 | Efalizumab | Raptiva® | Genentech ve Merck Serono | İnsanlaştırılmış | Sedef hastalığı |
| 2003 | Omalizumab | Xolair® | Novartis ve Genentech | İnsanlaştırılmış | Astım |
| 2004 | Cetuximab | Erbix® | Bristol-Myers Squibb, Imclone ve Merck | Kimerik | Kolorektal Kanser |
| 2004 | Bevacizumab | Avastin® | Roche ve Genentech | İnsanlaştırılmış | Kolorektal kanser |
| 2004 | Natalizumab | Tysabri® | Biogen Idec ve Elan | İnsanlaştırılmış | Multiple skleroz ve Kron Hastalığı |
| 2006 | Panitumumab | Vectibix® | Amgen | İnsan | Kolorektal kanser |
| 2007 | Eculizumab | Soliris® | Alexion Pharmaceuticals | İnsanlaştırılmış | Paroksizmal noktürnal hemoglobinüri |
| 2008 | Certolizumab pegol | Cimzia® | UCB | İnsanlaştırılmış | Kron hastalığı |
| 2009 | Canakinumab | Ilaris® | Novartis | İnsan | Kriyopirin ilişkili periyodik sendrom |

Çizelge 2.5. (devam) FDA tarafından onaylanan terapötik monoklonal antikorlar [9]

| | | | | | |
|------|---------------------|-----------|--|------------------|---|
| 2009 | Ofatumumab | Arzerra® | GlaxoSmith Kline | İnsan | Kronik lenfositik lösemi |
| 2009 | Golimumab | Simponi® | Johnson& Johnson | İnsan | Romatid Artrit, psoriatik artrit, ankilozan spondilit |
| 2009 | Ustekinumab | Stelara® | Johnson& Johnson | İnsan | Plak psoriasis |
| 2010 | Denosumab | Prolia® | Amgen | İnsan | Osteoporozlu kadınlarda menepoz sonrası kemik kırılma risklerinde |
| 2010 | Tocilizumab | Actemra® | Roche ve Genentech | İnsanlaştırılmış | Romatoid artrit |
| 2011 | Belimumab | Benlysta® | GlaxoSmith Kline ve Human Genome Science | İnsan | sistemik lupus eritematozus |
| 2011 | Brentuximab vedotin | Adcetris® | Seattle Genetics | Kimerik | Hodgkin lenfoma ve |
| 2011 | Ipilimumab | Yervoy® | Bristol-Myers Squibb | İnsan | Metastatik melanoma |

Hibridoma tekniğinde kullanılan başlıca aşamalar Köhler ve Milstein' in yaptığı ilk çalışmadan bu zamana kadar küçük modifikasyonlar dışında temelde aynı kalmıştır. Aşağıda klasik bir hibridoma tekniğinde kullanılan basamaklar verilmiştir. Bu adımların her biri oldukça titizlikle çalışmayı ve teknik uzmanlığı gerektirir.

- Hedeflenen antijen molekülüyle fare immünizasyonu,
- Myeloma hücrelerinin uygun bir şekilde kültür ortamına alınıp çoğaltılması,
- Bağışık fareden uygun metotlar kullanılarak dalak B-lenfosit hücrelerinin izolasyonu,
- PEG ortamında hücre füzyonu,
- Hibrit hücreler tarafından antikor üretiminin kontrolü ve takibi,
- Monoklonal antikor üreten hibritlerin uygun koşullarda büyük ölçekte çoğaltılması,
- Elde edilen monoklonal antikorların uygun metotlarla saflaştırılması.

2.2.8. Deney hayvanının seçimi

Monoklonal antikor üretim çalışmalarında;

- 1) Ne kadar seruma ihtiyaç duyulduğu,
- 2) Antijenin hangi kaynaktan izole edildiği,
- 3) Mevcut antijen miktarının ne kadar olduğu,
- 4) Myeloma hücre hatlarının kökeninin hangi türe ait olduğu,
- 5) Kullanılacak olan deney hayvanı modelinin kolay temin edilebilmesi,
- 6) Yaşı, türü ve kan alımının, beslenmesinin, bakımının kolay olması,
- 7) Verilen antijene karşı oluşturduğu bağışık yanıtın düzeyi,

yapılacak olan deneye uygun hayvanın belirlenmesi için en önemli parametrelerdir. Tavşan, fare, rat, hamster ve guinea pig, en çok kullanılan deney hayvanlarıdır. Domuzlar, atlar, keçiler ve eşekler ise genellikle çok büyük hacimlerde serum üretiminde kullanılırlar [51, 68].

Poliklonal antikor üretiminde daha çok tavşanlar kullanılırken, monoklonal antikor üretiminde ise; genellikle fare ve ratlardan yararlanır. Fare ve ratların, fiziksel olarak küçük yapılı olmaları, kolay temin edilebilmeleri, üretim, bakım ve beslenmelerinin kolay ve az maliyetli olması, ayrıca bağışıklama sonucunda iyi yanıt oluşturmalarından dolayı monoklonal antikor üretimi için en çok tercih edilen deney hayvanlarıdır. Çalışmalarda genellikle genç hayvanların yaşlı olanlara göre daha iyi bağışık yanıt oluşturması nedeniyle; fareler ve ratlar 6-8 haftalık, tavşanlar ise 12 haftalık olacak şekilde seçilir [68, 69].

Monoklonal antikor üretiminde genellikle Balb/C genetik soyuna ait fareler kullanılır, çünkü bu fareler hem antijenik uyarımlara iyi yanıt verir hem de füzyon aşamasında kullanılan myeloma hücre hatları bu soya ait tümörlerden elde edilir. Ayrıca Balb/C fareler, diğer fare soylarına göre daha güçlü sıvısal (hümorale) bağışık yanıt oluştururlar.

Monoklonal antikor üretiminde, kullanılan deney hayvanının dişi veya erkek olması da çalışmanın yüksek verimli olması açısından önem arz etmektedir. Çalışmalarda genellikle dişi fareler tercih edilir. Erkek farelere göre dişi fareler daha az agresif olup, kolay bir

şekilde elle tutulabilir ve bir arada grup halinde yaşayabilirler. Ayrıca dişi fareler erkek farelere göre, uzun bir sürede düşük antijen dozlarında, primer ve sekonder bağışık yanıt oluşturmada daha duyarlıdır [51, 68, 69].

2.2.9. Antijenin özellikleri

Antijenler, proteinler gibi tek moleküller veya kompleks yapıda bulunan multiantijenler olabilirler. Proteinler, peptitler, karbohidratlar, nükleik asitler, lipidler ve çoğu doğal olarak kendiliğinden oluşmuş veya sentetik olan bileşikler iyi bir immünojen olabilirler. Antijenlerin immün yanıtı etkileyen genel özellikleri Çizelge 2.6’ da verilmiştir. Büyük kompleks yapılı karbohidratlar iyi bir bağışık yanıt oluştururken, basit karbohidratlar ise zayıf immünojen olduklarından taşıyıcı bir proteine bağlanıp immünojen özellik kazanırlar. Organizmaya verilen antijene karşı oluşan bağışık yanıt düzeyi, antijenin boyutu ve yabancı bir kaynaktan olmasıyla doğrudan ilişkilidir. Partiküler antijenler, tek moleküllü antijenlere göre genellikle daha iyi bir immünojendirler. Küçük molekül yapılı antijenler (<3 – 4 kDa) belirgin bir bağışık yanıt oluşturamayıp, T hücrelerini aktive etmek için protein yapıda bir taşıyıcıya ihtiyaç duyarlar. Büyük yapılı moleküller daha iyi bağışık yanıt oluştururlar. Zayıf antijenik proteinler ise; bir matrikse, agaroz boncuklara, taşıyıcı bir proteine bağlanarak antijenik özelliği arttırmaktadırlar [51, 68, 69].

Çizelge 2.6. Antijenlerin immün yanıtı etkileyen genel özellikleri [70]

| Parametre | İmmünojenite |
|----------------|--|
| Kaynak | Ksenojen > Allojenik > Sinjenik > Otolog |
| Kimyasal tür | Protein > Polisakkarit > Lipid |
| Boyut | Yüksek molekül ağırlığı > Düşük molekül ağırlığı |
| Kompleks yapı | Kompleks yapı > Basit yapı |
| Kararlılık | Kararlı > Kararsız |
| Ayrışabilirlik | Ayrışabilir > Ayrışamaz |

İyi bir immünojen; B hücrelerinde bulunan yüzey antikorları tarafından tanınabilecek düzeyde en az bir epitopa ve T hücre reseptörleri ve sınıf II protein tarafından eş zamanlı olarak tanımlanabilecek bir yüzey yapısına sahip olmalıdır. Antijen kaynağı ve immünize edilen hayvan arasındaki filogenetik farklılık ne kadar büyükse, meydana gelecek olan bağışıklık yanıtı da o kadar büyük olur. Antijenin saf olması da immünolojik uyarım için

oldukça önemli bir kriterdir [51, 68] .

Uygun antijen dozu için iki önemli kriter göz önünde bulundurulmalıdır. Birincisi; en iyi bağışık yanıtı ulaşılmak için optimum doz, ikincisi ise; poliklonal antiserum üretimini arttıracak minimum dozdur [51, 68, 69].

Çizelge 2.7. Farelerde bağışıklamada kullanılan antijenler tipleri, enjeksiyon yolları ve doz miktarları [71]

| Antijen Tipi | Örnek | Enjeksiyon Bölgesi | Miktar |
|-----------------------|--|---|-------------|
| Çözünür Proteinler | Enzimler, Taşıyıcı proteinler ile konjuge edilmiş peptidler, İmmün kompleksler | Deri altı Kas içi Deri içi Damar içi | 50 – 100 µg |
| Partiküler proteinler | Virüsler (öldürülmüş) Mayalar (öldürülmüş) Bakteriler (öldürülmüş) Yapısal proteinler | Deri altı Kas içi Deri içi | 50 – 100 µg |
| Çözünmeyen Proteinler | Bakteriyel ürünler Katı faza bağlı proteinler | Deri altı Deri içi Kas içi | 50 – 100 µg |
| Karbohidratlar | Polisakkaritler Glikoproteinler | Deri altı Deri içi Kas içi Damar içi | 50 – 100 µg |
| Nüklein Asitler | Nükleik asitler ile konjuge edilmiş taşıyıcı proteinler | Deri altı Deri içi Kas içi Damar içi | 50 – 100 µg |

2.2.10. Adjuvanlar ve kullanımları

Adjuvanlar; kendileri immünojen olmayan, antikor oluşturmayan fakat verildikleri oraganizmada antijeninin immünojenitesini arttırarak kuvvetli bir sıvısal (hümorale) ve hücresele bağışık yanıtın oluşmasını sağlayan yardımcı maddelerdir. Adjuvanlar genel olarak; yüksek saflıkta elde edilmiş veya rekombinant olarak üretilmiş antijenlerin immün etkinliğini arttırmak, kısa sürede daha güçlü ve uzun süreli bir immün yanıt oluşturmak ve hücresele immüniteyi uyarmak için kullanılırlar [70].

Poliklonal veya monoklonal antikor üretiminde kullanılacak adjuvan seçilirken; deney hayvanlarına en az acı verecek şekilde uygulanabilir olmasına, istenen antikorun özelliğine, kullanımının kolay ve maliyetinin düşük olması gibi önemli faktörler göz

önünde bulundurulur [70, 72].

Alüminyum esaslı adjuvanlar: Antijenin enjekte edildiği bölgede depolanmasını ve yavaş bir şekilde sürekli salınım sağlayarak antikor yapımını uyarır.

Yağlı adjuvanlar: Bu grupta bulunan adjuvanlar, yağ içinde su veya su içinde yağ olan emülsiyonları içerirler. Enjeksiyon yerinde depo oluşturarak, bu noktadan antijenin yavaş salınımı ile plazma hücrelerinde antikor üretimini uyarırlar. Yağlı adjuvanlar temel olarak; tam Freund's adjuvanı ve tam olmayan Freund's adjuvanı olarak iki gruba ayrılır.

Tam Freund's adjuvanı; mineral yağ, mannitol ve oleik asit esteri ve 500 µg/ml ısıyla öldürülmüş *Mycobacterium tuberculosis* içerirken, Tam olmayan Freund's adjuvanı ise; *Mycobacterium tuberculosis* içermez. Freund's adjuvanlar, antijenin yavaş ve sürekli salınımına, lenf yoluyla lenf nodu ve dalak gibi uzak noktalara ulaşmasını sağlar. Freund's adjuvanının en önemli dezavantajı enjeksiyon bölgesinde granüloma oluşturabilmesi ve intravenöz olarak uygulamasının yapılamamasıdır [72, 73].

Bakteriyel adjuvanlar: Bakteriler veya mantarlar immün sistemi uyarma kapasiteleri bulunduğundan dolayı adjuvan olarak kullanılabilirler. Bakteri (*Corynebacterium suşları* ve *Bordetella pertusis*) hücre duvarı ve lipopolisakkaritler antijen olarak iyi bir immünojen olmamalarına rağmen immün yanıtı güçlendirip, adjuvan etkisi gösterebilir [51, 72, 74].

İmmün uyarıcı kompleksler: Antijen; kolesterol, fosfolipid ve saponinden oluşan, kafes benzeri moleküler yapısı olan bileşiklerdir. Kolesterol, fosfolipid ve saponin birbirlerine hidrofobik bağlarla tutunur. Bu kompleks yapıları içeren aşılar çeşitli hayvan modellerinde hem hücresel hem de hümmoral bağışık yanıtı artırırlar [51, 72-74].

2.2.11. Enjeksiyon türleri

Enjeksiyon yolu belirlenirken bazı pratik durumlar göz önünde bulundurulur; verilecek antijenin miktarı, belirli tamponlar ve diğer bileşiklerin immünojenle birlikte enjekte edilip edilmeme durumu, enjekte edilecek olan immünojenin lenfatik sistemde ve dolaşımda yayılma hızı gibi durumlar göz önüne alınır. Ayrıca antijenin enjeksiyon yolunun seçiminde; antijenin hacmi, miktarı ve kimyasal bileşiminin yanısıra immünize edilecek hayvan ve kullanılan adjuvan maddenin türü de önemlidir. İmmünizasyon yolu

belirlenirken, adjuvan kullanımının hayvanda acı ve strese neden olabileceği göz önünde bulundurulup bu duruma göre bir seçim yapılmalıdır. Tüm bu hususlar göz önüne alındığında, bütün antijenler, adjuvanlar ve hayvan türleri için tek bir immünizasyon protokolü bulunmamaktadır. Tipik enjeksiyon yolları; damar içi (intravenöz, i.v.), kas içi (intramuscular, i.m.), subkutan (subkutan, s.c), periton içi (intraperitoneal, i.p.) ve deri altı (intradermal, i.d.) enjeksiyonlarıdır [51, 69, 75].

Tavşanlarda, büyük hacimli enjeksiyonlar genellikle subkutan (deri altı) olarak birden fazla noktaya uygulanırken, farelerde ise; intraperitoneal (periton içi) yolla verilir. Eğer immünojen adjuvan veya partiküler bir madde içeriyorsa, deney hayvanına damar içi yolla enjekte edilememelidir. Eğer verilen immünojenin yavaş bir şekilde yayılması isteniyorsa, enjeksiyonlar ya kas içi ya da deri içi yollar uygulanmalıdır. Eğer antijenin hemen yayılması isteniyorsa; damar içi enjeksiyon yolu kullanılır [75].

Çizelge 2.8. Farede kullanılan enjeksiyon yolları ve verilen antijen miktarları [71]

| Enjeksiyon yolu | Maksimum Uygulama Miktarı | Adjuvant madde varlığı | Antijen Tipi | Açıklama |
|-----------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|--|
| Deri altı | 50 – 500 µl | +/- | Çözünebilir veya çözünmez | Kolay enjeksiyon |
| Kas içi | 50 – 200 µl | +/- | Çözünebilir veya çözünmez | Antijen salınımı yavaş |
| Deri içi | 50 – 400 µl | +/- | Çözünebilir veya çözünmez | Zor immünizasyon ve yavaş salınma |
| Damar içi | 10 – 100 µl | Freund's adjuvantsız | Çözünebilir proteinler | Birinci immünizasyon için etkili değil |

Damar içi enjeksiyon (i.v.): Bu enjeksiyon yoluyla antijen primer olarak dalağa ve sekonder olarak lenf nodlarına sunulur. Organizmaya bu yolla verilen antijen hızlı bir şekilde dalak, karaciğer ve akciğere ulaşır. Bazı küçük tanecikli antijenler için tercih edilmesinin yanısıra, emülsiyeye veya büyük tanecikli adjuvanlarla uygulama yapıldığında emboli riski oluşturabilen bir enjeksiyon yoludur. Direkt yapılan damar içi enjeksiyonu; anafilaktik şok, antijenik yapıya bağlı toksisite (bakteriyel endotoksinler) gibi birçok risk etmeni taşımaktadır. Damar içi enjeksiyonda Freund' s adjuvant kullanmak güvenli değildir [51, 69].

Kas içi enjeksiyon (i.m.): Antijenin organizmaya yavaş bir şekilde salınımını sağlar. İskelet kası küçük molekülleri (< 2 kDa) kılcal damarlar yoluyla hızlı bir şekilde absorbe ettiğinden dolayı kas içi enjeksiyon, küçük moleküller için uygun bir seçenektir. Bu enjeksiyon yöntemi direkt kas dokusunda depolanır ve en yakın olan lenf noduna taşınır. Küçük rodentlerde kas dokusuna yapılan enjeksiyonlar zor olduğundan dolayı, kas içi enjeksiyon uygulaması fareler için önerilmez. Tavşanlara ise; kas içi yoluyla en fazla 0,5 ml' ye kadar enjeksiyon yapılabilir [51, 75].

Subkutan enjeksiyon (s.c.): Laboratuvar hayvanlarında yaygın bir şekilde kullanılır, enjeksiyon uygulamasında immünojen ve adjuvan bir arada bulunabilir. Enjekte edilen materyal lokal lenfatik sisteme kolayca ulaşır ve enjeksiyonun yapıldığı bölgelere en yakın lenf nodlarında konsantre olur. Organizmaya subkutan yolla verilen antijenin yayılma oranı, intraperitoneal ve intramuskular enjeksiyonlara göre daha yavaştır. Enjeksiyonlar genellikle boyun arkasından yapılır. Freund's adjuvan içeren büyük hacimli enjeksiyonlar, granuloma oluşumuna sebebiyet vermemesi için birden çok farklı bölgelere uygulanır [75].

Periton içi enjeksiyon (i.p.): Direkt olarak periton boşluğuna yapılan bu enjeksiyon, küçük hayvanlar için uygun bir yol olup, uygulaması oldukça kolaydır. Antijenin bu yolla, partiküler halde veya adjuvanla beraber enjeksiyonu güvenlidir. Tam Freund's adjuvanla birlikte tekrarlanan enjeksiyonlar sonucu granuloma ve asitik sıvı oluşumuna neden olabilir [68, 69].

Periton içi enjeksiyonda; büyük hacimlerdeki antijenlerin kolay bir şekilde uygulanabilir olması, farklı türdeki adjuvanların kullanılabilirliği ve yeterli miktarda enjeksiyon uygulamasıyla, antijenin organizmaya kolay bir şekilde yayılması önemli avantajlar arasındadır.

Monoklonal ve poliklonal antikor üretim çalışmalarında genellikle bu enjeksiyon yolu kullanılır. İntraperitoneal uygulama başta fareler olmak üzere, diğer küçük deney hayvanlarında da sıklıkla kullanılırken, tavşan gibi büyük yapılı hayvanlarda genellikle tercih edilmez.

Deri altı (i.d.): Bu enjeksiyon yolu, büyük yapılı hayvanlarda yaygın olarak kullanılır. Kas içi enjeksiyonlar gibi deri içi enjeksiyonlar da, immünojenin çok yavaş bir şekilde

organizmaya yayılmasını sağlar. Farelerin derisi çok ince olduğundan dolayı, bu uygulama yöntemi farelerde pek tercih edilmez. Bu enjeksiyonda antijen partiküler halde veya adjuvanla birlikte uygulanabilir. Küçük hacimlerdeki ve konsantre formdaki antijenler için uygun bir enjeksiyon tipidir [51, 68, 69, 75, 76].

2.2.12. Myeloma hücreleri

Antikor salgılayan B hücrelerinin gelişimi; ölümsüz olan myeloma hücreleriyle, immün deney hayvanından elde edilen ve antikor salgılayan B hücrelerinin başarılı bir şekilde füzyonu ile gerçekleşir. Hibridoma yönteminde, Balb/c kökenli myeloma (kemik iliği kanser hücresi) hücrelerinin seçimi monoklonal antikor üretimi açısından oldukça önemlidir. Antikor üretmeyen ilk fare myeloma hücre hattı (SP2-O-Ag14) 1978’ de Schulman ve arkadaşları tarafından izole edilmiş ve monoklonal antikor çalışmalarında başarıyla kullanılmıştır. 1979 yılında da başka bir myeloma hücre hattı olan P3x63-Ag8-653 Kearney ve arkadaşları tarafından bulunmuştur [69, 71, 77, 78].

Myeloma hücre hattı seçilirken; antikor üretmemesi, in vitro şartlarda sonsuz üreme özelliğine sahip olması, HGPRT mutanti olması, yüksek birleşme yeteneğine sahip olması, seçici besi ortamına (HAT) duyarlı olması ve B hücreleriyle aynı kaynaktan elde edilmiş olması istenir. İki farklı türe ait hücreler ile oluşturulan hibrit hücreleri sürekli karakter değiştirip, kromozom kaybına ve antikor sentezleme sürelerinin azalmasına neden olurlar. [51, 69, 71].

Monoklonal antikor üretim çalışmalarında seçilen myeloma hücrelerinin, hibridomalardan ayırt edilebilmesi için bir mutasyona sahip olması gerekir. En yaygın kullanılan mutasyon pürin biyosentezinde görev alan hipoksantin fosforiboziltransferaz (HGPRT) mutasyonudur. Fare myeloma hatlarında 8-azaguanin veya 6-tyoguanin ile seçim yapılmaktadır. Hücreler genellikle pürin veya pirimidin sentezleri aracılığıyla DNA’ yı oluştururlar. Pürin veya pirimidinlerden birinin olmadığı durumda DNA sentezi bloke edileceğinden, bu da hücrelerin ölümüne neden olur. Füzyonda “hipoksantin-aminopterin-timidin (HAT)” içeren seçici kültür ortamı kullanılır, HAT ortamında bulunan aminopterin pürin ve pirimidin “denovo” (temel sentez yolu) sentez yolu inhibitörüdür. Seçici besi ortamında, HGPRT enzimi yönünden mutant olan myeloma hücrelerinin üremesi engellenir. Pirimidin sentezi için timidin kinaz (TK), pürin sentezi için de HGPRT pozitif

olan dalak B lenfositleri ve yan yol denilen “salvage” sentez yolundan yararlanarak pürin ve pirimidin sentezini tamamlarlar. Füzyona girmemiş olan normal HGPRT pozitif B lenfositleri kültür şartlarında 4-5 gün içerisinde ölürlür. Böylece hibridoma hücreleri myeloma hücrelerin sonsuz üreme özelliğini ve B hücrelerinin HGPRT enzim sağlam genini aldığından, HAT ortamında üremeye devam eder [69, 71].

Myeloma hücreleri, farelerin bazı soyları kullanılarak, periton içine mineral yağ enjeksiyonuyla uyarılabilir. İlk myeloma hücre hatları Balb/c farelerden izole edilmiştir. Myeloma hücreleri aynı zamanda; rat ve insanlardan da elde edilip, füzyon işleminde kullanılabilir [51, 77, 78].

2.2.13. Füzyon

Hücre hibridizasyonu, temel olarak kullanılan üç farklı metot ile gerçekleştirilir. Bunlar; 1) HJV, 2) polietilen glikol (PEG) gibi kimyasal maddeler kullanılarak, 3) elektrofüzyon (elektrik pulsları) ile gerçekleştirilen yöntemlerdir.

HJV (Japonya Hemaglutinleyici Virüs): Sendai virüsü olarak da bilinen HJV, hücre füzyonunda kullanmak için efektif olduğu belirlenen ilk hibridizasyon ajanıdır. HJV parçacıklarının hücre füzyon aktivitesi ilk olarak, 1957’ de rapor edilmiştir. HJV partikülleri, yaklaşık olarak 100-200 nm çapta olup, dışında bulunan zar glikoprotein içerir. Bu virüs, hücre zarı üzerinde bulunan ve füzyonunun etkin bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan HJV reseptörleri aracılığıyla, hücrelerin aglütine olmasını sağlar. Bu yöntem; bütün hücre tiplerinde aynı sonucu meydana getirmediğinden, virüs üretiminin zaman alması, hücreye viral genlerin girebilmesi gibi nedenlerden dolayı günümüzde pek tercih edilmemektedir. Bu metotta; virüs 37 °C’ de inkübe edilirken, hücre membranına tutunur ve adsorpsiyonu sırasında bu bölgelerde zarar görmekte ve membranda köprüler oluşturmaktadır. Hücrede oluşan bu harabiyet hücre füzyonuyla tamir edilmektedir [51, 79-82].

Kimyasal Aracılı Füzyon: Bu yöntemde kimyasal madde olarak; lizolesitin ve polietilen glikol kullanılmaktadır. Polietilen glikol (PEG) hücre hibridizasyon işlemi en çok kullanılan kimyasal ajan olup, hücre zarında bulunan çift lipit tabakasının yapısını bozar, membran akışkanlığını artırır ve hücre füzyonunu kolaylaştırır. Bağışık lenfositler ile

myeloma hücrelerinin füzyonu için, 1 000-6 000 arasında molekül ağırlığına sahip olan polietilen glikol sıklıkla kullanılmaktadır. Düşük molekül ağırlığına sahip PEG kolayca hücrelere girerek sitotoksositeye sebebiyet verirken, yüksek molekül ağırlığındaki PEG ise daha az toksik olmasına karşın yüksek viskoziteye sahip olduğundan kullanımı zordur. 4000 molekül ağırlığındaki PEG, yapılacak olan füzyon işlemi için genellikle optimum ağırlığa sahiptir [79, 80, 83]. PEG, memeli hücreleri için toksik etkiye sahip olduğundan, füzyon işleminden sonra yıkanarak hemen ortamdan uzaklaştırılmalıdır [84].

PEG' in kullanıldığı füzyon işlemlerinde; reaksiyon ortamının pH' sı, sıcaklığı, PEG konsantrasyonu ve füzyon süresi gibi parametreler kritik noktalardır. Füzyon işleminin gerçekleştiği reaksiyon ortamında, pH değerinin 8-8,2 arasında ve sıcaklığın 20-37 °C arasında olması iyi bir hibridizasyonun gerçekleşmesini sağlar. Ayrıca PEG konsantrasyonunun %40 ile %50 aralığında olması ve füzyon süresinin kullanılan PEG konsantrasyonuna bağlı olarak (%50 PEG için mak. 1-2 dakika gibi) uygun sürelerle sınırlandırılması da hibrit hücre oluşumuna katkı sağlayacak parametrelerdir [51, 80, 83, 84].

Elektrofüzyon: Bu yöntem 1982' de Zimmermann tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde füzyonu yapılacak olan hücrelere, dielektroforetik etkiyle düşük elektrik gücünde farklı elektrik alanlar uygulanır ve böylelikle hücreler bir araya getirilir. Uygulanan bu elektriksel alan, hücrelerin polarize olmasını ve dizi zincirleri oluşturmalarını sağlar. Bu şekilde bir araya gelen hücrelere daha yüksek voltajda kısa süreli uyarılar verildiğinde, hücrelerin birbirleriyle teması artar ve membranlarında meydana gelen kırılmalar sonucu kaynaşmaları sağlanır [51, 84-86]. Hücre elektrofüzyonu, güvenli, viral olmayan ve kimyasal içermeyen bir metot olduğundan farklı hücre tiplerine uygulanabilir [87]. Ayrıca diğer yöntemlere göre daha az sayıda lenfosit hücre kullanılarak füzyon işlemi gerçekleştirilebilir. Yöntemin dezavantajları ise; elektrofüzyon işleminde kullanılan cihazların pahalı olması, füzyon işlemi sırasında ortam sıcaklığının yükselmesini önlemek için, düşük iyonik güçte uygun olmayan fizyolojik şartlara ihtiyaç duyulmasıdır [84, 87].

2.2.14. Hibrit hücrelerin elde edilmesi

Füzyon sonrasında kültür ortamında birçok farklı hücre tipi bulunur. Bu kültür ortamında bulunan hibrit hücreleri ve füzyona girmemiş myeloma hücreleri dışındaki tüm hücreler

ölür. Myeloma hücreleri hibrit hücrelerinden daha fazla çoğalacağından dolayı, kültürdeki hibritlerin seçiminde kullanılan en yaygın yöntem, HGPRT enziminden yoksun olan myeloma hücre soylarını kullanmaktır. Bu karmaşık besi ortamından sıçan-sıçan, sıçan-fare ve fare-fare hibrit hücrelerin seçimi HAT (hipoksantin-aminopterin-timidin) seçici ortamı ile gerçekleştirilir. Seçici HAT ortamı ile hücre karışımı füzyonu takiben 14 gün süreyle inkübe edilir. Bu süre sonunda, füzyona girmeyen myeloma hücreleri ortamdaki ayrılırlar ve sadece hibridomalar çoğalmaya devam ederler. Bundan sonraki süreçte, küçük koloniler takip edilir ve çeşitli tarama testleri ile antikor taraması yapılır [51, 56, 79, 88].

Çizelge 2.9. Seçici HAT ortamının füzyon sonrası hücelere etkisi [71]

| Hücre Tipi | DNA Sentezi | | HAT besiyerindeki Canlılık Durumu |
|--------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------------|
| | Salvage sentez yolu | De novo sentez yolu | |
| Myeloma | HGPRT ⁽⁻⁾ | Aminopterin duyarlı | Ölür* |
| Dalak | HGPRT ⁽⁺⁾ | Aminopterin duyarlı | Ölür** |
| Myeloma-Dalak (Hibrit) | HGPRT ⁽⁺⁾ | Aminopterin duyarlı | Yaşar |
| Myeloma-Myeloma (Hibrit) | HGPRT ⁽⁻⁾ | Aminopterin duyarlı | Ölür* |
| Dalak-Dalak (Hibrit) | HGPRT ⁽⁺⁾ | Aminopterin duyarlı | Ölür** |

*DNA sentezi yok, **İn vitro ortamdaki yaşamı sınırlı

2.2.15. Bağışıklık yanıtının kontrolü: elisa yöntemi

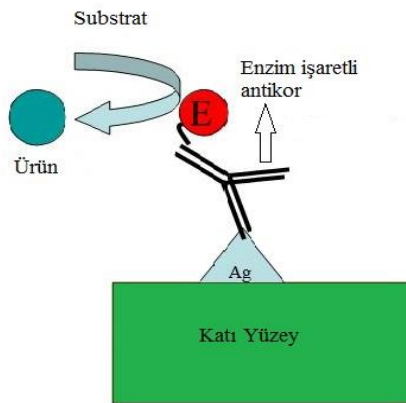
Antikor ve antijen etkileşimini inceleyerek, tarama imkânı veren farklı immünolojik testler bulunmaktadır, hibridoma üretiminde tüm testler aynı sonucu vermeyebilir. Bu nedenle, seçilecek olan tarama testi, yapılan deneyin amacına ve antijen karakterine göre değişiklik gösterir. Kullanılması planlanan yöntem; güvenilir, duyarlı, tekrarlanabilir, hızlı, uygulaması kolay ve aynı anda birçok örnek taraması yapmaya elverişli olması istenilen özellikler arasındadır. Bu amaçla; ELISA, RIA (radioimmünoassay), IFA (immünofloresans) kullanılan testler arasında bulunmaktadır [51, 89].

ELISA metodu; kolay uygulanabilmesi, yüksek duyarlılığı, kullanılan reaktiflerin uzun süre saklanabilmesi, otomatize edilerek çok sayıda örneğin kısa sürede çalışabilmesi ve sonuçların spektrofotometrede objektif olarak değerlendirilebilmesi gibi üstünlüklerinden

dolayı, hibrit hücre üretiminde en yaygın kullanılan tarama yöntemidir. Enzim bağlı immünolojik testler (ELISA), çeşitli protein, peptit, antikor, virüs, toksin ve hormon miktarlarının belirlenmesinde kullanılan, antikor-antijen ilişkisini temel alan serolojik bir tanı yöntemidir [90]. ELISA tekniği, katı materyaller içinde veya üzerinde oluşturulan antijen-antikor kompleksine enzim işaretli konjugenin eklenmesi ve sonrasında substratın eklenmesiyle, pozitif örneklerde renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanır. Araştırılan örnekteki antikor veya antijen miktarı, enzim-substrat reaksiyonu sonunda oluşan renk şiddetini belirler.

ELISA sistemleri üç temel yöntemeye dayanır. Bunlar; i) Direkt ELISA, ii) Dolaylı (indirekt) ELISA ve iii) Sandwich ELISA yöntemleridir.

i) Direkt ELISA: Bu yöntemde, antijen pasif adsorpsiyon ile katı faza bağlanır. İnkübasyon sonunda, antijenin bağlanmayan kısmı yıkama ile uzaklaştırılır. Antijene özgül ve enzimle işaretli antikor (konjuge) eklenir ve inkübe edilir. Konjuge, katı fazdaki antijene bağlanır ve bağlanmayan kısım yıkamayla uzaklaştırılır. Kromojenik substrat eklenince renkli ürün oluşur. Reaksiyon durdurma solüsyonuyla sonlandırılır ve spektrofotometrede okunur [91, 92].



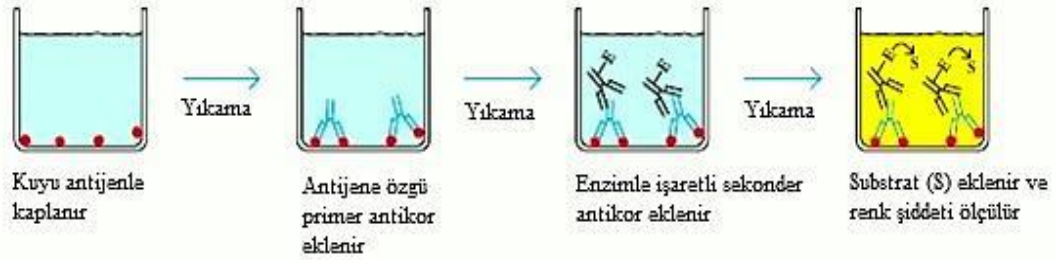
Şekil 2.18. Direkt ELISA metodu çalışma prensibi

ii) Dolaylı (İndirekt) ELISA: Bu yöntemde antijen katı faza direkt bağlanması ve ölçümü yapılacak olan antikorun eklenmesi ile direkt sisteme benzerlik gösterir. Ancak eklenen bu antikorun enzimle işaretli olmaması ve araştırılan antikoru hedefleyen enzimle işaretli başka antikorların eklenmesiyle direkt yöntemden farklılık gösterir. Bu şekilde olan antikorlar immunglobulin türüne karşı üretilir ve anti-tür konjuge olarak adlandırılır.

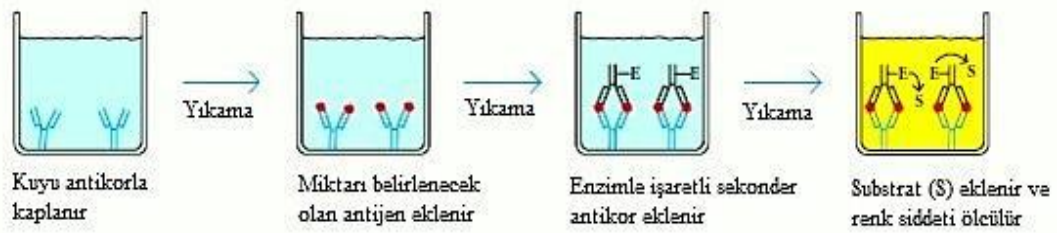
Dolaylı ELISA metodunda, antijen katı bir yüzeye, belirli inkübasyon süresi sonunda bağlanır ve bağlanmadan kalan kısımlar yıkama ile uzaklaştırılır. Katı faza adsorbe olan antijen üzerine araştırılan antikor eklenip, inkübe edilir. Antijene özgül antikor varsa bağlanır ve inkübasyon sonrasında bağlanmayan kısımlar yıkanıp uzaklaştırılır. Daha sonra, araştırılan antikora karşı enzimle işaretli olan ikinci (sekonder) antikor eklenir ve belirli bir süre inkübe edilir. İnkübasyon sonunda bağlanmayan ikinci antikorlar yıkanarak uzaklaştırılır. Kromojenik substrat eklenir ve enzim olan örneklerde renkli ürün oluşur. Bir süre sonra reaksiyon durdurma solüsyonu ilave edilip reaksiyon durdurulur ve plak spektrofotometrede okunur [91, 92].

Dolaylı ELISA metodu, bilinen bir antijen ve tek bir konjuge kullanılarak, çok sayıda örneğin taramasını sağlar. Bu yöntem, tanı amaçlı olarak en sık kullanılan ELISA sistemidir. Bazı örneklerdeki spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için, sonucu bilinen çok sayıda kontrol örneği her testte kullanılarak, bu problem de giderilmiş olur.

a) Dolaylı (İndirekt) ELISA



b) Sandwich ELISA



c) Yarışmalı ELISA



Şekil 2.19. ELISA çeşitleri ve uygulaması [56]

ELISA sisteminde kullanılan yarışmalı ve inhibisyon testleri ise; antijen ve antikor miktarını ölçmeye yarayan ve yukarıda anlatılan 3 temel yöntem ile uygulanabilen testlerdir. Yarışmalı sistemde, antijen ve konjugenin ideal konsantrasyonları belirlenir. Araştırılan antikoru içeren örnek konjuge antikor ile karıştırılarak antijen kaplı plağa eklenir. Örnekte bulunan antikor katı fazdaki antijene bağlanmak için ikinci antikorla yarışır. Örnekte antikor varsa, antijene bağlanır ve bağlanmadan kalan ikinci antikorlar yıkamayla uzaklaştırılır. Kromojenik substrat eklendiğinde renkli bir ürün oluşur ve renk şiddetleri spektrofotometre ile belirlenir [90, 91, 92].

iii) Sandwich ELISA: Bu test metodu, serum proteinlerinin, çeşitli tümör markırlarının ve hormonların tayininde kullanılmaktadır. Tampon bir solüsyonda bulunan antikor, inkübe edilerek katı faza pasif olarak bağlanır ve bağlanmayan antikorlar yıkamayla uzaklaştırılır. Araştırılan antijen eklenir, inkübasyon süresince katı fazdaki antikor tarafından antijenler yakalanır ve bağlanmayan antijenler yıkamayla uzaklaştırılır. Antijene özgü olan ve enzimle işaretli ikinci antikor (konjuge) eklenir ve inkübasyon sonunda bağlanmayan ikinci antikorlar yıkanarak uzaklaştırılır. Kromojenik substratın eklenmesiyle renkli ürün oluşur ve spektrofotometrede okunur. Standart şartlar altında ölçülen enzim aktivitesinin miktarı, bağlı antijen miktarı ile doğru orantılıdır. Bu metotta kullanılan enzimle işaretli antikor, araştırılan antijene özgül olduğu için kullanımı sınırlıdır [91, 92].

2.2.16. Hibrit hücrelerinin klonlanması

Füzyon sonrasında uygun tarama testi ile pozitif sonuç alınan hibrit hücrelerinin, tek klondan meydana gelen soyu (monoklonal) oluşturmaları için hemen klonlanması gerekir. Klonlama işleminden önce hibritlerin stoklarının oluşturulması, çalışmanın devamlılığı açısından büyük önem taşımaktadır. Klonlama işlemi, antikor üretmeyen hücrelerin ortamda çoğalmasını ve meydana gelebilecek olan kontaminasyon riskini azaltır. Ayrıca yapılan bu işlem, doğru klonların varlığından emin olabilmek için monoklonal antikor üretiminde önemli bir basamaktır [93, 94]. Bu amaçla kullanılan 3 temel klonlama yöntemi bulunmaktadır. Bunlar;

Sınırlı seyreltme ile klonlama (*cloning by limiting dilution*): Pozitif sonuç alınan klonların merkezinden yaklaşık 10 μ L hacminde hücre alınarak 2 kez seyreltilir. Bu hücreler daha sonra besleyici hücre içeren kültür plaklarına aktarılır.

Uç nokta klonlama: Klondan alınan hücrelerin sayımı yapılarak, 1 ml' de 1 000 hücre olacak şekilde yeniden süspansedilir. Besleyici hücrelerin bulunduğu plaklara her kuyuya 100 µL (100 hücre) düşecek şekilde aktarılır ve 2 kez seyreltilir [89].

Agarda klonlama: Bu yöntemde klonlama işlemi yumuşak agarda yapılır. Tipik olarak iki tabaka kullanılır. Sağlam yapıdaki alt tabaka, kültür solüsyonunda % 0,5 (a/h) oranında agar içerir. Klonlanacak hücreleri içeren ikinci bir yumuşak agar tabakası (% 0,3 (a/h)) alttaki tabaka üzerine eklenir. Antikor salgılayan klonların bulunduğu yerde çökme olur ve bu klonların normal kültüre alınarak çoğalmaları sağlanır. Bazen eriyik agar hazırlamak 37 °C' nin üzerindeki sıcaklıklarda çalışmayı gerektirdiğinden, agarda klonlama yöntemi pek tercih edilmemektedir [93-95].

2.2.17. Hibrit hücrelerinin geniş ölçekte üretimi

Monoklonal antikorların kullanım amaçlarına göre üretim şekilleri ve miktarları değişmektedir. Üretimde, *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki temel yöntem kullanılır.

In vivo üretimde; monoklonal antikor üreten hibrit hücreleri, kullanılan deney hayvanının (genellikle fare) karın boşluğuna enjekte edilir. 10-20 gün süresince enjekte edilen hücreler tümör oluşturarak ortama monoklonal antikor salgırlar. Monoklonal antikorlar farenin karın boşluğundan belirli zaman aralıklarıyla toplanır. Her bir fare 5-10 mg/ml monoklonal antikor konsantrasyonuna sahip 5-10 ml sıvı salgılar. Bu şekilde *in vivo* yöntemle elde edilen antikor titresi (1-10 mg/ml) *in vitro* yöntemle üretilen kültür ortamındaki antikorlarla (20 µg-1 mg/ml) karşılaştırıldığında daha yüksek olmasına rağmen üretim hacmi sınırlıdır [89]. Bu yöntem özel bir ekipman ve teknoloji gerektirmez, küçük hacimlerde fakat oldukça yüksek konsantrasyonda monoklonal antikor üretimine olanak sağlar. Fakat yöntemin insan dışı bir organizmada yürütülmesi, üretilen monoklonal antikorların patojen ve fare IgG antikorunu içermesi nedeniyle, saflaştırma ve kalite kontrol aşamalarında problemler ortaya çıkarmaktadır [71]. Bu nedenle tedavi amaçlı antikorların üretimi için *in vivo* yöntem tercih edilmez. Günümüzde hala yüksek titrede antikor üretiminde *in vivo* yöntem kullanılsa da, fazla miktarda hayvan gerektirdiğinden etik sebeplerden dolayı bazı ülkelerde bu yöntem yasaklanmıştır ve yerini *in vitro* üretime bırakmıştır [70, 95].

In vitro üretimde ise; antikor üreten hibrit hücreleri yapay besiyeri içeren in vitro koşullarda üretilir. Patojen ve IgG içermeyen (veya az miktarda yabancı IgG içeren) monoklonal antikor üretimine olanak sağlaması ve üretim verimliliğinin artırılması için çok sayıda farklı seçeneğin varlığı yöntemin avantajları arasındadır [71, 96, 97]. Bazı tedavi uygulamaları için oldukça yüksek antikor miktarları gerekli olabilir ve bu nedenle ölçek-büyütme için elverişli olabilecek sistemler kullanılır. Günümüzde monoklonal antikor üretimi için kullanılmakta olan in-vitro sistemler;

T-flasklar: Bunlar statik olarak kullanılan kültür kaplarıdır. Kültür hacimleri 5 ml' den 400 ml' ye kadar değişebilir ve flask başına yaklaşık 8-10 mg monoklonal antikor üretimine olanak sağlayabilir. Flasklar CO₂ inkübatörlerde kolayca ölçeklendirilebilir.

Döner şişelerler, 850 cm² yüzey alanına sahip olup, döner şişe başına 20-30 mg verim ile kolaylıkla ölçeklendirilebilir.

Spinner kültür kapları, genellikle manyetik karıştırıcı ve boyunlu erlen tipinde olan kültür kaplarıdır. Bu kaplarda, karıştırıcı tabanı ile birlikte 2 litreye kadar ölçeklendirme yapılabilir. Karıştırma tabanı üzerinde 4 veya daha fazla kap karıştırılıp, 200-300 mg' a kadar antikor üretimi yapılabilir.

Perfüzyon sistemlerde ve hallow fiber reaktörlerde ise; 1-2 kg' a kadar olan miktarlarda antikor üretmek mümkündür. Bu tip sistemlerde, reaktör içinde meydana gelebilecek farklılıkların ve kültür sıvısının doğrudan kontrolü güç olup, ölçek büyütmede ve optimizasyonda bazı sorunlar meydana gelebilmektedir.

Karıştırmalı tanklar ve hava kaldırmalı biyoreaktör sistemleri de hücre kültürleri için kullanılan fermentörlerdir. Bu sistemler günümüzde monoklonal antikor üretiminde kullanılan en büyük ölçekte olan sistemlerdir. Bu sistemler, kısmen küçük ölçekli karıştırmalı tanklarda 5-200 litre aralığında, karıştırmalı tank biyoreaktörlerde ise 10 000 litreye kadar büyük ölçekli üretim yapılmasına olanak sağlar. Yöntem diğer üretim sistemlerine göre; daha maliyetli olup, özel eğitim ve beceri gerektirir [71].

Monoklonal antikor üretiminde, 0,5-1,5 litre hacminde üretim için CO₂ etüvlerinde kullanılabilen steril gaz geçiren kültür torbaları, hafif çalkalamalı bir taban üzerinde

karışım sağlayan yine aynı şekilde çalışan wave biyoreaktörler ve yarı geçirgen membran içeren modifiye bir döner şişe olan Miniperme reaktörler yeni teknolojik sistemler arasında bulunmaktadır [71, 95, 98].

2.2.18. Monoklonal antikorların saflaştırılması

Antikor saflaştırmada çeşitli yöntemler geliştirilmiş olup, kullanım amacına göre seçilecek olan saflaştırma metodu da değişkenlik göstermektedir. Başarılı bir saflaştırma işlemi; kullanılacak yöntemin doğru seçilmesine ve saflaştırmada başlangıç materyali olan kaynağa göre değişmektedir. Araştırma amaçlı olarak üretilen antikorlar için tek basamaklı bir yöntem yeterli olurken, teşhis ve tedavi amaçlı kullanılan antikorların buldukları ortamdaki birden çok basamaklı bir prosesle yüksek derecede saflaştırılması büyük önem taşır [89, 92].

Antikor saflaştırmada; amonyum sülfat presipitasyonu, kaprilik asit, dietilaminoetil (DEAE), hidroksiapatit, jel filtrasyon, amonyum sülfat ve DEAE ile birlikte, Protein A veya G kolunu, antijen afinite kolonu, Anti-IgG kolonu gibi yöntemler yaygın olarak kullanılır. İstenilen saflığı elde edebilmek için çoğu kez birkaç yöntem bir arada kullanılır [51, 92]

Antikorların saflaştırılma süreçlerinde, saflık oranı, miktarı ve antijene bağlanma aktivitesi gibi değişkenlerin izlenmesi gerekir. Herhangi bir aşamada, antikor solüsyonunun saflığını belirlemek için kullanılan en basit yöntem, solüsyonun bir kısmının SDS poliakrilamid jelde yürütülmesi ve jelin Commassie blue veya gümüş boyasıyla boyanmasıdır. Eğer antikor saf değilse; solüsyonda bulunan antikor miktarı SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile ağır ve hafif zincirler ayrılır. Ayırma işleminden sonra bilinen standart kontroller boyanarak karşılaştırılır. Eğer antikor safsa, bu yöntemlerin herhangi biri toplam protein miktarını ölçen teknikler ile desteklenebilir. Uygun bir yöntem ultraviyole absorbansının ölçülmesidir. Antikor miktarı, 280 nm’ de bir absorbans ölçümü yoluyla belirlenebilir [92, 99].

Çizelge 2.10. Saflaştırma yapılacak antikor kaynakları ve çeşitli parametreleri

| Kaynak | Antikor tipi | Toplam antikor miktarı (mg/ml) | Spesifik Antikor Konsantrasyonu (mg/ml) | Spesifik olmayan antikorlar | Saf spesifik antikor saflaştırma oranı |
|--|---------------------|---------------------------------------|--|------------------------------------|---|
| Serum | Poliklonal | 10 | (% 10 maksimum) en iyi | Diğer serum antikorları | % 10 (en iyi koşullarda) |
| Hücre kültür üst sıvısı % 10 FCS | Monoklonal | 1 | 0,05 (% 5) | Sığır antikorları | > % 95 |
| Serumsuz ortamdaki hücre üst sıvısı | Monoklonal | 0,05 | 0,05 (% 100) | Yok | > % 95 |
| Asidik sıvı (fare karnı boşluğunda) | Monoklonal | 1-10 | 0,9-9 (% 90) | Fare antikorları | > % 90 |

Çizelge 2.11. Antikor saflaştırmada kullanılan yöntemler ve bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajları

| Teknik | Uygunluğu | Avantajları | Dezavantajları |
|--------------------------------|---|---|---|
| Amonyum sülfat (%45- %50) | Tek başına yeterli değildir, tüm kaynaklardan (serum, hücre üst sıvısı) antikorların kısmi saflaştırılmasında ve konsantre edilmesinde kullanılır | Ucuz olması, Konsantre olması, Kolay olması, Yüksek miktarlar için uygun olması | Antikorların saf elde edilememesi, Diğer tekniklere bağımlılığın olması (tam saflaştırma için) |
| DEAE (dietilamino etil kolonu) | Tek başına yeterli değildir, tüm kaynaklardan (serum, hücre üst sıvısı) antikorların kısmi saflaştırılmasında ve konsantre edilmesinde kullanılır | Ucuz olması, Konsantre olması, Yüksek miktarlar için uygun olması | Antikorların saf elde edilememesi, Diğer tekniklere bağımlılığın olması (tam saflaştırma için) |
| Hidroksiapatit | Tek başına yeterli değildir, tüm kaynaklardan (serum, hücre üst sıvısı) antikorların kısmi saflaştırılmasında ve konsantre edilmesinde kullanılır | Konsantre olması, Diyaliz işleminin gerekli olmaması | Antikorların saf elde edilememesi, Pahalı olması |
| Jel filtrasyon | Tek başına yeterli değildir, IgM tipi antikorlar için uygundur | Poliklonal serumlardan, IgM' nin diğer antikorlardan ayrılması | Antikorların saf elde edilememesi, Düşük kapasitede olması, Örneklerin dilüe olması, IgG' ler için uygun olmaması |
| Protein A sefaroza | IgG' ler için (IgG1, IgG2a, IgG2b) | Saf antikor, Kolay, Tek aşamalı, Yüksek ürün kapasitesi | Pahalı olması, Tüm sınıf ve alt türler için uygun olmaması |
| Protein G sefaroza | IgG' ler için (IgG2a, IgG2b, IgG3) | Saf antikor, Kolay, Tek aşamalı, Yüksek ürün kapasitesi | Pahalı olması, Tüm sınıf ve alt türler için uygun olmaması |
| Antijen afinite kolonu | Poliklonal serumlar | Saf antikor, spesifik antikor | Pahalı olması, çok aşamalı olması, saf antijenin gerekli olması, antikorların inaktive olabilmesi |
| Anti-Ig afinite kolonu | Poliklonal serumlardan özgün antikor tiplerinin seçiminde | Tür ve sınıfa özgü antikor eldesi | Pahalı olması, Çok aşamalı olması, Ürün kapasitesinin düşük olması |

2.3. Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları

Monoklonal antikorlar, temel biyomedikal araştırmalarda, hastalıkların teşhisinde ve tedavisinde, enfeksiyon ve kanser olgularında, hormon, enzim, virüs, bakterilerin tanı testlerinde ve tedavisinde, histolojik çalışmalarda, kompleks karışımların saflaştırılmasında, aşıların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [100]. Belirli bir hedefe yönelik üretilmiş olan monoklonal antikorların antijenleri özel epitoplara göre son derece yüksek duyarlılık ve özgünlükte tanıyabilmeleri, bu moleküllerin özellikle tıp ve ziraat alanlarında yoğun bir şekilde kullanımına yol açmıştır [101, 102].

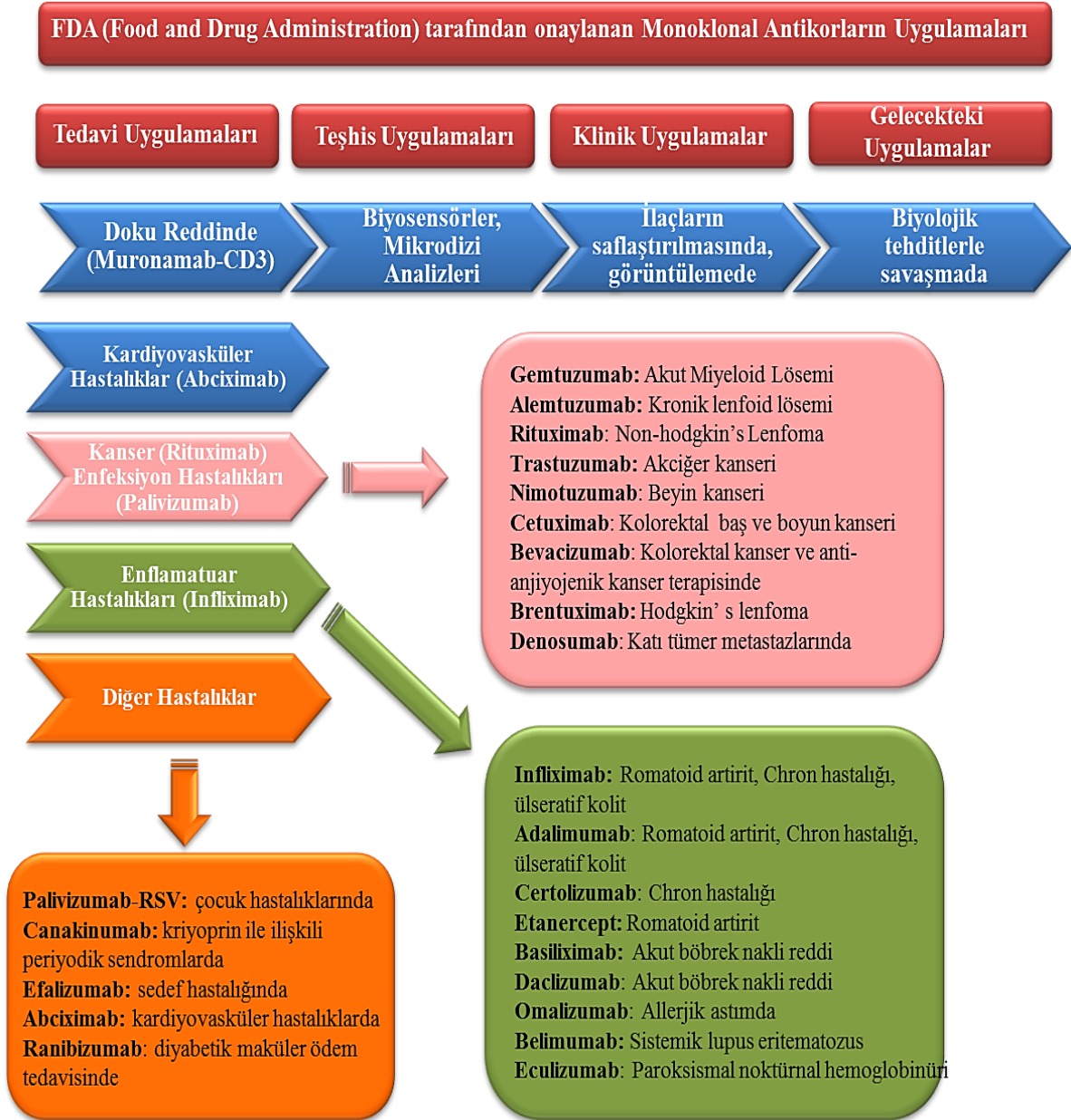
Monoklonal antikorlar teşhis amaçlı olarak analitik uygulamalarda, gıda maddelerinin mikrobiyolojik testlerinde, bakteri, virüs, mantar ve parazit gibi enfeksiyon etkenlerinin veya alt türlerinin belirlenmesinde, bazı moleküllerin afinite kromatografisi ile saflaştırılmalarında, ayrıca histolojik çalışmalarda; hücrelerin yüzey proteinlerinin belirlenmesinde, çeşitli hücrelerin yüzeylerinde bulunan antijenik moleküllere göre birbirinden ayrılmasında ve böylelikle antijenik haritaların çıkarılmasında oldukça yaygın olarak kullanılırlar [59].

Günümüzde rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle monoklonal antikorların kullanım alanları oldukça genişlemiştir. Hibridoma teknolojisinin gelişmesiyle, klinik uygulamalarda önceleri fare kökenli monoklonal antikorlar kullanılmıştır. Tedavi edici olarak fare monoklonal antikorlarının insana uygulanması, HAMA (human anti-mouse antibodies) cevabı olarak adlandırılan, insanda fare monoklonal antikorlarına karşı antikorların ve alerjik reaksiyonların oluşumuna, genellikle eklem bölgelerinde şişlik ve kızarıklığın oluşmasına yol açmaktadır [62]. Ayrıca bu monoklonal antikorların insan vücudundaki yarı ömürleri de oldukça kısadır. Bu nedenlerden dolayı son yıllarda rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle ve genetik mühendisliği alanının da katkısıyla yarı insansı (kimerik) veya tamamen insansı antikorlar geliştirilmiş olup, tedavi uygulamalarında karşılaşılan bu sorunların çözümünde etkili olmuşlardır. Kimerik antikorların % 65-90' ı insan kaynaklıdır. Bu antikorlar, insan antikorunun sabit bölgeleriyle, fare antikorunun değişken bölgelerinin birleşmesinden oluşurlar. İnsanlaştırılmış monoklonal antikorların %95' i insan kaynaklı olup, fare antikorlarının çok değişken bölgelerinin, insan antikorlarıyla birleşmesiyle elde edilirler [100].

Tamamen insan kökenli olan monoklonal antikorlar ise, tedavi uygulamaları için oldukça umut verici moleküllerdir. 1980' li yıllarda bu antikorları üretmeye yönelik ilk çalışmalar yapılmış olup, klinik ve ticari bir başarı sağlanamamıştır. 1990' lı yıllara geldiğimizde gelişen teknolojiyle, özellikle transgenik fareler ve faj görüntüleme teknikleriyle birlikte, insan monoklonal antikor üretimi tekrar ilgi uyandırmıştır. 2002 yılında ise, Adalimumab FDA tarafından onaylanan ilk insan monoklonal antikoru olmuştur [103].

Kanser olgularının tedavisi için kullanılan immün terapi yöntemlerinden klinik uygulamalara en fazla aktarılan ve onaylananı, tedaviye yönelik monoklonal antikorlar olmuştur. Monoklonal antikorlar kanser tedavilerinde kullanılırken, üç temel mekanizmayla çalışırlar. Bunlar; 1) tümör hücrelerinin bölünmesinde ve anjiyogenezinde kullandıkları yolları aktive eden faktör ve reseptörleri inhibe ederek, 2) antikora bağlı hücrel sitotoksiteyi ve 3) komplement aktivasyonu ile komplemente bağlı sitotoksiteyi aktive ederek çalışırlar [66].

Monoklonal antikorlar, tümör hücrelerinin yüzey antijenik moleküllerinin belirlenmesinde, kanda bulunan ve hücrelere bağlanmış olan tümör antijenlerinin ve alt tiplerinin tayininde, tümörlerin teşhisine yönelik çalışmalarda kullanılırlar [104, 105]. Ayrıca monoklonal antikorlar bazı radyoaktif maddeler ile işaretlenerek, tümör hücrelerinin yerlerini belirlemek için de kullanılırlar. Öncül ve olgun B lenfositlerin yüzeyinde bulunan, bir transmembran proteini olan CD20 molekülüne karşı üretilmiş olan Rituximab, kanser tedavisi için geliştirilmiş olan ilk monoklonal antikor olup, IgG1 tipinde ve kimerik yapıdadır [106].



Şekil 2.20. FDA onaylı monoklonal antikorların uygulamaları [100]

2.4. Literatür Araştırması

Hayakawa ve arkadaşları 1983 yılında yaptıkları çalışmada, difteri toksinine karşı monoklonal antikorlar izole etmişlerdir ve bu antikorların bazılarının özelliklerini belirlemişlerdir. Antikor 2, toksinin $-NH_2$ ucunun 30 ve 45 kDa arasında olan bölgesi ile reaksiyon verirken, antikor 7 ise; toksinin karboksil ($-COOH$) ucunun 17 kDa olan bölgesi ile reaksiyon vermiştir. Bu iki antikor, hücre kültüründe bulunan toksin üzerine olan etkileri bakımından keskin bir zıtlık göstermiştir. 2 ve 7 no' lu antikorlar, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de inkübe

edilmiş ve daha sonra hassas Vero hücrelerine eklenmiştir. Bunun sonucunda; antikor 7, toksininin hareketini bloke ederken, antikor 2 ise; bunu sağlayamadığı sonucuna varmışlardır. Monoklonal antikorların izolasyonu için 8 haftalık BALB/c farelere intraperitoneal olarak, complete Freund's adjuvant içerisinde formalinlenmiş difteri toksini 0,1 mg olarak enjekte edilmiştir. İki hafta sonra, incomplete Freund's adjuvant içindeki toksoidin 0,1 mg intraperitoneal yolla enjeksiyonu yapılmıştır. Son enjeksiyondan 4 gün sonra, immünize olmuş farenin dalak hücreleri (2×10^8), F0 myeloma hücreleriyle (2×10^7), %50 (w/v) PEG 4000 ve %15 (v/v) dimetil sülfoksit içeren ortamda füzyon işlemi yapılmıştır. Füzyondan sonra, hücreler 96 (well plate) kuyulu pleyt içerisine inoküle edilmiştir. Doku kültür pleytleri ve HAT (1×10^{-4} M hipoksantin, 4×10^{-7} M aminopterin, 1×10^{-5} M timidin) ortamında kültür haline bırakılmıştır. 384 adet başlangıç hibridoma kültüründen 174 tanesinin, 10 gün sonra seçici ortamda iyi bir şekilde büyüdüğü görülmüştür. Hücrelerin HAT ortamında, toplam 14 gün sonunda halen büyümekte olduğu ve adım adım aminopterin olmayan fakat hipoksantin ve timidin olan ortamda 7 gün pasajlanmasıyla, Dulbecco's modified Eagle's medyumunu ile %15 fetal calf serum içeren ortama yavaş yavaş adapte olduğunu gözlemlemişlerdir. İstenen antikorları salgılayan hücreler, besleyici hücre (feeder cell) olarak makrofajların kullanıldığı ortamda sınırlı seyreltme metodu ile klonlanmıştır. Klonlama prosedürü ikinci kez tekrarlanmıştır. Monoklonal antikorlar, DE52 ve difteri toksini bağlı Sefaroz 4B kullanılarak saflaştırılmıştır. İmmünodifüzyon testi kullanılarak, IgG ve IgM tipi antikorlar gösterilmiş ve 1,2,5,7 ve 15 no' lu antikorların IgG tipi antikor olduğunu belirlemişlerdir [107].

Yoshimori ve arkadaşları (1984) yaptıkları çalışmada, difteri toksininin A fragmentine karşı monoklonal antikorlar izole edip, bu antikorların karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Elde edilen antikorlar, A fragmentine karşı benzer affinite gösterirken, A fragmentinin NAD:EF2-ADP riboz transferaz aktivitesine olan etkilerinin farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmada, DA1 antikorunu 1 molar oranda neredeyse tamamen enzimatik etkiyi inhibe ederken, DA2 antikorunu kısmen inhibisyon sağlamış olup, DA3 antikorunu ise hiçbir etki göstermemiştir. Bunun yanısıra, CRM176 mutant toksinin A176 fragmenti kullanıldığında, DA2 antikorunun DA1 antikorundan daha etkili olduğu gözlenmiştir. Enzimatik olarak inaktif olan A197 ve A228 mutant fragmentleri için bu antikorların affinitesinin, doğal bir suş olan fragment A' dan daha düşük olduğu gözlenmiştir [108].

Hallas ve arkadaşları (1990) yaptıkları çalışmada, farede difteri toksinine karşı monoklonal antikor üretmiş olup, bu antikorların IgG1 tipi antikor olduğunu ELISA metodu ile belirlemişlerdir. Kaprilik asit ile saflaştırılmış monoklonal antikorlardan askitik sıvı üretmek için, hibridomalar fareye inoküle edilmiştir. Bu monoklonal antikorların, A fragmentine ve ayrıca yapısı bozulmamış toksin molekülüne karşı olduğu immüblotlama yöntemiyle gösterilmiştir. Florosein izotiyosiyanat ile konjugasyondan sonra bu monoklonal antikorlar, *C.Ulcerans* ve *Corynebacterium diphtheriae* kültür üst sıvısında toksin tayini için bir immüntest olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, Balb/c fareler iki gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan biri difteri toksini ile diğeri ise difteri toksoidi ile immünize edilmiştir. İmmünizasyon, 50 µg muranil dipeptit(MDP) ile incomplete Freund' s adjuvant içinde 100 µg toksoid ya da 50 µg toksinin olacak şekilde intraperitoneal enjeksiyonla yapılmıştır. 2 hafta aralıklarla MDP ve adjuvant içinde 10 µg toksoid ile 3 enjeksiyon daha yapılmıştır. Diğere fare grubuna ise; 10 µg toksin 2 hafta aralıkla, 2 defa enjeksiyon yapılmıştır. Her iki fare grubu için, bir önceki enjeksiyondan 19 gün sonra 10 µg toksin veya toksoid ile fareler enjekte edilmiştir. Son immünizasyondan 3 gün sonra, aseptik koşullarda farelerin dalakları izole edilmiştir. İmmünize farelerden elde edilen dalak hücreleri, JK-Ag 8653 myeloma hücre hattı ile standart metot kullanılarak füzyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hibridoma kültürünün üst sıvısı enzim immün testi ile incelenmiştir. Başlangıçta, 20 hibridoma kültürü pozitif sonuç vermiştir ve bunlardan 11'i sınırlı seyreltme ile klonlanmıştır. Salgılanan antikorun izotipi ELISA metodu ile belirlenmiştir. Elde edilen monoklonal antikorlar, kaprilik asit ile askitik sıvıdan saflaştırılmıştır [109].

Gupta ve arkadaşları (1992) yaptıkları çalışmada, difteri toksoidi ile in vitro olarak immünize edilen insan bademcik lenfositlerini, heteromyeloma SP2/HPT hücre hattı ile füzyon yapmışlardır. Hibritler, hipoksantin– timidin– aminopterin (HAT) olan ortamda seçilmiştir. Bu hibritlerin antikor üretmeleri, ELISA ve Western blot teknikleriyle incelenmiştir. 3 – 7 mg/mL insan IgG1 antikorunu üreten hibridoma hücre hattı ortamdan izole edilmiştir. Western blot çalışmalarında, bu antikorların difteri toksininin B fragmentine bağlandığı görülmüştür. P2-131/G35 alt klonundan hücreler, fareye intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir ve 4-6 haftadan sonra oluşan askidik sıvı toplanmıştır. Bu monoklonal antikor, Vero hücre test sisteminde, difteri toksininin sitotoksitesini nötralize etmiştir. Sonuçta, elde edilen bu insan monoklonal antikorunun, difteri hastalığının immünoterapisinde alternatif bir tedavi yöntemi olabileceği sonucuna

varmışlardır [110].

Ouyang ve arkadaşları (2004) yaptıkları çalışmada, difteri toksininin A fragmentini (DTA) *E. Coli*' den saflaştırmışlardır. Q- Sefaroz FF kromatografisi ve (Ni⁺²)- Sefaroz affinite kromatografisinden sonra 6xHis – DTA füzyon proteinini % 90 saflıkta elde etmişlerdir. Bu saflaştırılan DTA, Balb/c farelerin immünizasyonunda antijen olarak kullanılmıştır. DTA' ya karşı monoklonal antikor salgılayan 2 tane hibridoma hücre hattı geliştirilmiştir. Elde edilen bu monoklonal antikorların, 1:10 titreye sahip IgG1 tipi antikor olduğu belirlenmiştir. Bu monoklonal antikorların, difteri toksininin A fragmentine bağlanmasının, difteri toksinine karşı geliştirilen at serumu tarafından yarışmalı olarak inhibe edildiği gözlenmiştir [111].

Kakita ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada, difteri toksinine karşı insan monoklonal antikorunu izole etmişlerdir. Tavşanda deri testi yapılarak, nötralizasyon aktivitesini 73,600 IU/g olarak tahmin etmişlerdir. Bu monoklonal antikorun, difteri toksinine karşı geleneksel at serumlarının yerine tedavi edici bir ilaç olarak kullanılabilmesi önerilmiştir [112].

Valyakina ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada, elde ettikleri antikorların kantitatif tayini için sandwich ELISA (enzim bağlı immünosorbent) yöntemini seçmişlerdir. Toksinin pleyttteki tayin sınırını 0,7 ng/ml ve mikroçip ELISA' da 1,6 ng/ml olarak tespit etmişlerdir. Deneylerde kullanılan fareler difteri toksini ve difteri toksini konjugatı olan polistirenle immünize edilmiştir. Çoğunlukla konjugat ile yapılan immünizasyon sonucunda difteri toksininin A alt birimi için, native toksinle yapılan immünizasyon sonucunda, difteri toksininin B alt birimi için antikorlar elde etmişlerdir [113].

Lyubavina ve arkadaşları (2010) yaptıkları çalışmada, farklı su örneklerindeki difteri toksinini tayin etmek için tek basamaklı immünokromatografik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, koloidal altınla işaretli monoklonal antikorların bir konjugatı kullanılmıştır. Difteri toksininin tayin sınırının 10 ng/mL ve analiz süresinin 15 dakika olduğu gözlenmiştir. Reaksiyon hassasiyetini arttırmak ve immünokromatografi sonuçlarını değerlendirmede kullanılan tarama cihazlarını geliştirmek için, gümüşün kullanılması tayin sınırını 1,25 ng/ml ye düşürdüğü gözlenmiştir [6].

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Aletler

- Steril hücre kültürü odası,
- % 5 CO₂, % 96 Nem, 37 °C sıcaklık koşullarını sağlayabilen İnkübatör (Sanyo, İncusafe)
- Steril Laminar Akımlı Kabin (Holten)
- Otoklav (Alp)
- İnvart Mikroskop (Leica, DMIL)
- Yüksek hızlı santrifüj (Sigma)
- Masaüstü santrifüj (Hettich, Rotina 35R)
- Sıcak su banyosu (Lab-Line)
- Buzdolabı + 4 °C, -20 °C (Uğur)
- Derin Dondurucu -80 °C (Sanyo)
- Sıvı Azot Tankı -196 °C (Statebourne, biorack 6000)
- ELISA Okuyucu (Perkin Elmer, 1420 Multilable Counter)
- Spektrofotometre (UV-1700 Shimadzu PharmaSec.)
- pH metre (Hanna Instrument pH300)
- Hassas Terazi (Shimadzu)
- Superdeks 75 jel filtrasyon Kolonu (Bioplot Pharmacia FPLC)
- Elektroforez Tankı (Bio-Rad Protean Ilxi Cell)
- Thoma Lamı, Hemositometre (Neubauer)
- Vortex (Bio Vortex)
- Pipet Tabancası (Eppendorf Easypet)
- Tek kullanımlık Pipet 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml (Sarstedt)
- Sekiz kanallı otomatik pipet (Dragonmed)
- Mikropipetler 1-10 µl, 10-100 µl, 25-250 µl, 100-1000 µl (Eppendorf)
- Dondurma Tüpleri (TPP, 2ml)
- Santrifüj Tüpleri 15 ml, 50 ml (Sarstedt)
- Kültür Kapları 25 cm², 75 cm² (TPP)

- Füzyon Kültür plakları, 48 kuyulu (Nunc)
- Hücre Kültür plakları, 6 kuyulu (Nunc)
- 96 Kuyulu Düz Tabanlı ELISA plakları (Grainer-Bio)
- Hücre Kazıyıcı, Cell Scrapper (TPP)
- Enjektör 1 cc, 2 cc, 5 cc, 10 cc (Set Inject)
- Otoklavlanabilir Cam Şişeler 10-1000 cc (İldam)
- 0,22 µm ve 0,45 µm Filtre (Sartorius)
- Santrifüj filtrasyon kolonu (Leucosep)
- PVDF Membran (Bio-rad)
- IsoStrip Mouse MAB Isotyping Kit (Roche)
- Makas, Pens (Hammacher)

3.1.2. Kimyasal maddeler

- Freund's Complete Adjuvant, FCA (Sigma)
- Freund's Incomplete Adjuvant, IFA (Sigma)
- Bovine Serum Albumin, BSA (Sigma)
- Fetal Bovine Serum (Lonza)
- RPMI medium without glutamine, (Lonza)
- Penicillin/Streptomycin, 10 000 units/ml Penicillin, 10 000 Units/ml Streptomycin (Lonza)
- L-glutamine (Lonza)
- Anti-fare IgG-Alkalen fosfataz işaretli konjugat (Sigma)
- Anti-fare Polivalen-Alkalen fosfataz işaretli konjugat (Sigma)
- Para-nitro-fenil-fosfat, PNPP (Sigma)
- Tween 20 (Sigma)
- Kazein (Sigma)
- Hipoksantin aminopterin timidin, HAT (Sigma)
- Hipoksantin timidin, HT (Sigma)
- Polietilen glikol 4 000, PEG-4 000 (Sigma)
- Dimetil Sülfoksit, DMSO (Sigma)
- Glisin (Merck)
- Sodyum klorür, NaCl (Merck)

- Sodyum bikarbonat, NaHCO₃ (Sigma)
- Potasyum dihidrojen fosfat, KH₂PO₄ (Merck)
- Potasyum monohidrojen fosfat, K₂HPO₄ (Merck)
- Magnezyum Klorür, MgCl₂.6H₂O (Merck)
- Çinko Klorür, ZnCl₂ (Merck)
- Potasyum Hidroksit, KOH (Merck)
- Sodyum Hidroksit, NaOH (Merck)
- Hidroklorik Asit, HCl (Merck)
- Triklor asetik asit, TCA (Sigma)
- Tris (Sigma)
- Etilendiamin tetra asetikasit, EDTA (Sigma)
- N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin, TEMED (Sigma)
- Akrilamid (Sigma)
- Bisakrilamid (Sigma)
- B-merkaptotanol (Sigma)
- Amonyum persülfat (Sigma)
- Etanol, C₂H₅OH (Terkim)
- Metanol, CH₂OH (Sigma)

3.1.3. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besiyerleri

RPMI besiyeri: RPMI 1640 besiyeri içerisine ilk olarak % 10 fetal sığır serumu eklenmiş daha sonra 200 mM L-glutaminden son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde ilave edilmiştir. Son olarak 100X konsantrasyondaki penisilin streptomisin (1 mililitrede penisilin 10, 000 ünite, streptomisin 10 mg' dır) besiyerine eklenip besiyeri iyice karıştırılmıştır. Hücreler üzerine ilave edilecek besiyerinin sıcaklığı 37 °C olmalıdır.

HAT besiyeri: RPMI 1640 besiyerindeki oranı % 2 olacak şekilde hipoksantin, aminopterin ve timidin içeren (50X HAT) çözelti eklenerek hazırlandı.

Hücre dondurma çözeltisi: % 10 fetal sığır serumu içeren RPMI besiyeri, % 10 DMSO (dimetil sülfoksit).

3.1.4. Tamponlar

PBS (fosfat) Tamponu: 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM K_2HPO_4 ile pH=7,2 olacak şekilde hazırlandı ve 0,15 M NaCl ilave edildi.

PBS-Tween 20 Yıkama Tamponu: Fosfat tamponuna % 0,05 Tween 20 eklendi ve +4 °C' de muhafaza edildi.

Substrat Tamponu: 1 mM ZnCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,1 M Glisin, pH=10,4 (KOH ile ayarlanır) olacak şekilde hazırlandı ve +4 °C' de muhafaza edildi. Kullanımdan yaklaşık 10 dakika önce, 1 ml. substrat tamponuna 1 mg PNPP (para-nitrofenil fosfat) ilave edilerek karanlık ortamda bekletildi.

Sodyum sitrat çözeltisi: 2,3 g Sodyum sitrat, 0,8 g Sitrik asit, 2,2 g glukoz 100 ml distile suda çözüldü ve -20 °C' de muhafaza edildi.

Transfer Tamponu: 86,4 g glisin, 15,4 g tris, 1 g SDS maddeleri 1 litre suda çözülerek hazırlandı.

Yürütme Tamponu: 30,3 g tris, 142,5 g glisin, 5 g SDS, 2,92 g EDTA maddeleri 1 litre suda çözülerek hazırlandı.

Yükleme (Laemmlı) Tamponu: 10 g SDS, 50 ml gliserol, 30 ml tris tamponu (1X, pH=6,6), beta-merkaptotanol 20 ml, %1 BPB 1 ml olacak şekilde hazırlandı.

TBS (Tris) Tamponu: 6 g tris, 43,9 NaCl, 1,5 g EDTA maddeleri 1 litre suda çözülerek hazırlandı ve pH 7,4' e ayarlandı.

TBS-T (Tris-Tween) Tamponu: 1 litre tris tamponuna 5 ml Tween 20 ilave edilerek hazırlandı.

PEG Çözeltisi: Kullanım anında 0,5 g PEG (molekül ağırlığı: 4 000) 1 ml PBS içinde çözüldü. Otoklav ile 30 dakika 121 °C'de steril edildi. 37 °C'ye getirilerek füzyon kullanıldı.

3.1.5. Hücreler

Çizelge 3.1. Füzyon işlemine kullanılan hücreler ve kaynakları

| Hücre | Özellik | Kaynak |
|--------------------|-----------------------|----------------------|
| Myeloma | FO | ATCC |
| Besleyici hücreler | Makrofaj | Balb/C fare peritonu |
| Dalak hücreleri | Bütün dalak hücreleri | Balb/C fare dalağı |

3.1.6. Antijen

Bu çalışmada antijen olarak kullanılan difteri toksoidi, Halk Sağlığı Kurumu, Aşı Üretim Müdürlüğü'nden temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Farelerin bağışıklanması

Difteri toksinine karşı monoklonal antikor üretimi için, hibrit hücre çalışmalarında 6-8 haftalık altı adet BALB/c türü dişi fare kullanıldı. 3 adet fare immünizasyon işlemine kullanılırken, diğer 3 adet fare ise kontrol grubu olarak seçildi. Çalışma grubunda bulunan farelere ilk enjeksiyon, difteri toksoidi ve Freund's Complete Adjuvant (CFA) eşit oranda karıştırılarak uygulanırken, ikinci enjeksiyon ise; Freund's Incomplete Adjuvant (IFA) ile birlikte uygulandı. Son 3 enjeksiyonda ise sadece difteri toksoidi kullanıldı. Aynı zamanda immünize edilen farelere farklı miktarlarda antijen enjekte edilerek, doz optimizasyonu yapıldı. Her enjeksiyon öncesinde difteri toksinine özgü antikor yanıtı, immünize farelerin kuyruk kanı alınarak, dolaylı ELISA metodu ile kontrol edildi. Bağışıklama işlemine kullanılan antijen miktarları, enjeksiyon sayısı ve uygulama yöntemi Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Difteri toksoidi ile yapılan son immünizasyondan sonra, füzyon işleminden 3 gün önce farelere intravenöz, pati içleri ve intraperitoneal olarak hatırlatma amaçlı olarak immünizasyonlar yapıldı.

Çizelge 3.2. Difteri toksoidi ile yapılan immünizasyon işleminde kullanılan toksoid miktarları ve kronolojik akış şeması

| Gün sayısı | Enjeksiyon sayısı | Antijen miktarı | | | Uygulama yöntemi |
|------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|------------------|
| | | Sağ kulağı kesik fare | Sol kulağı kesik fare | Sağlam kulak fare | |
| 1.gün | 1. enjeksiyon | 29 µg/ml (CFA) | 46 µg/ml (CFA) | 50 µg/ml (CFA) | intraperitoneal |
| 10.gün | 2. enjeksiyon | 29 µg/ml (IFA) | 46 µg/ml (IFA) | 50 µg/ml (IFA) | intraperitoneal |
| 21.gün | 3. enjeksiyon | 29 µg/ml | 46 µg/ml | 50 µg/ml | intraperitoneal |
| 31.gün | 4. enjeksiyon | 29 µg/ml | 46 µg/ml | 50 µg/ml | intraperitoneal |
| 42. gün | 5. enjeksiyon | 29 µg/ml | 46 µg/ml | 50 µg/ml | intraperitoneal |
| 45. gün | ELISA İle bağışık yanıtın kontrolü | | | | |
| 50. gün | Füzyon | | | | |



Resim 3.1. (a) Enjeksiyonda kullanılan difteri toksoidi ve adjuvan, (b) Toksoid ve adjuvanın karışmasını sağlayan sistem, (c) Karışmış toksoid ve adjuvan, (d) Çalışmada kullanılan farelerin beslendiği kafes sistemi, (e) Farelere difteri toksoidinin enjekte edilmesi

3.2.2. Bağışık yanıtın kontrolü için elisa metodu ve uygulaması

ELISA plağına kaplanacak olan antijen çözeltisi, 10 µg/ml (difteri toksoidi/PBS) olacak şekilde fosfat tamponunda (PBS, pH=7,2) hazırlandı. 96 kuyuluk ELISA plakları 100 µl antijen çözeltisi ile kaplandı. Gece boyu +4 °C' de inkübe edildi. Bağlanmayan antijenleri uzaklaştırmak için, plak 3 defa PBS-Tween 20 tamponu ile yıkandı. % 0,2 derişimdeki kazein çözeltisi her kuyuya 200 µl olacak şekilde eklendi ve 1 saat 37 °C' de bekletildi. Plak kuyularındaki bağlanmayan kazein çözeltisi döküldü ve kuyular 3 defa PBS-Tween 20 tamponu ile yıkandı. Bağışıklanan fare serumları (primer antikorlar): 1/10, 1/100, 1/1 000 ve 1/10 000 oranlarında PBS içerisinde seyreltilerek, negatif kontrol için de bağışıklanmayan bir fareden alınan kan serumu da aynı şekilde hazırlanarak kuyulara 100 µl eklendi ve 1 saat 37 °C' de bekletildi. Kompleks oluşturmadan kalan kısımlar döküldü ve plaklar yıkama tamponu ile 3 defa yıkandı. 1/1 000 dilüsyonla seyreltilmiş anti-mouse IgG konjugatı (sekonder antikor) her kuyuya 100 µl olacak şekilde ilave edildi ve 1 saat 37 °C' de bekletildi. 1 saat inkübasyondan sonra kuyular 5 defa yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyuya substrat tamponu (substrat tamponunun içerisinde kullanımdan 10 dk. önce, içerisinde 1mg/ml olacak şekilde 4-nitrophenil fosfat ilave edildi karanlıkta bekletildi) her kuyuya 100 µl olacak şekilde ilave edildi ve plak karanlık bir ortamda bekletildi. Substrat tamponu ilave edildikten sonra 30., 45. ve 60. dakikalarda 405 nm' de ELISA okuyucuda okuma yapıldı [71].

3.2.3. Hücre kültürü çalışmaları

Myeloma Hücrelerinin Hazırlanması

Füzyondan 7 gün önce myeloma (F0) hücre hattı sıvı azottan (-196 °C) çıkarılıp, % 10 FBS içeren RPMI besiyerine alındı. Füzyondan 3 gün önce ise RPMI besiyerinde bulunan F0 hücreleri HT besiyerine alındı. Füzyon günü F0' lar 50 ml' lik santrifüj tüpüne alınarak serumsuz besiyeri ile 400 g' de 1 kez yıkandı ve çöken hücreler 10 ml besiyerinde süspansiyon edilerek hücre sayımı yapıldı.

Besleyici Hücrelerin Hazırlanması

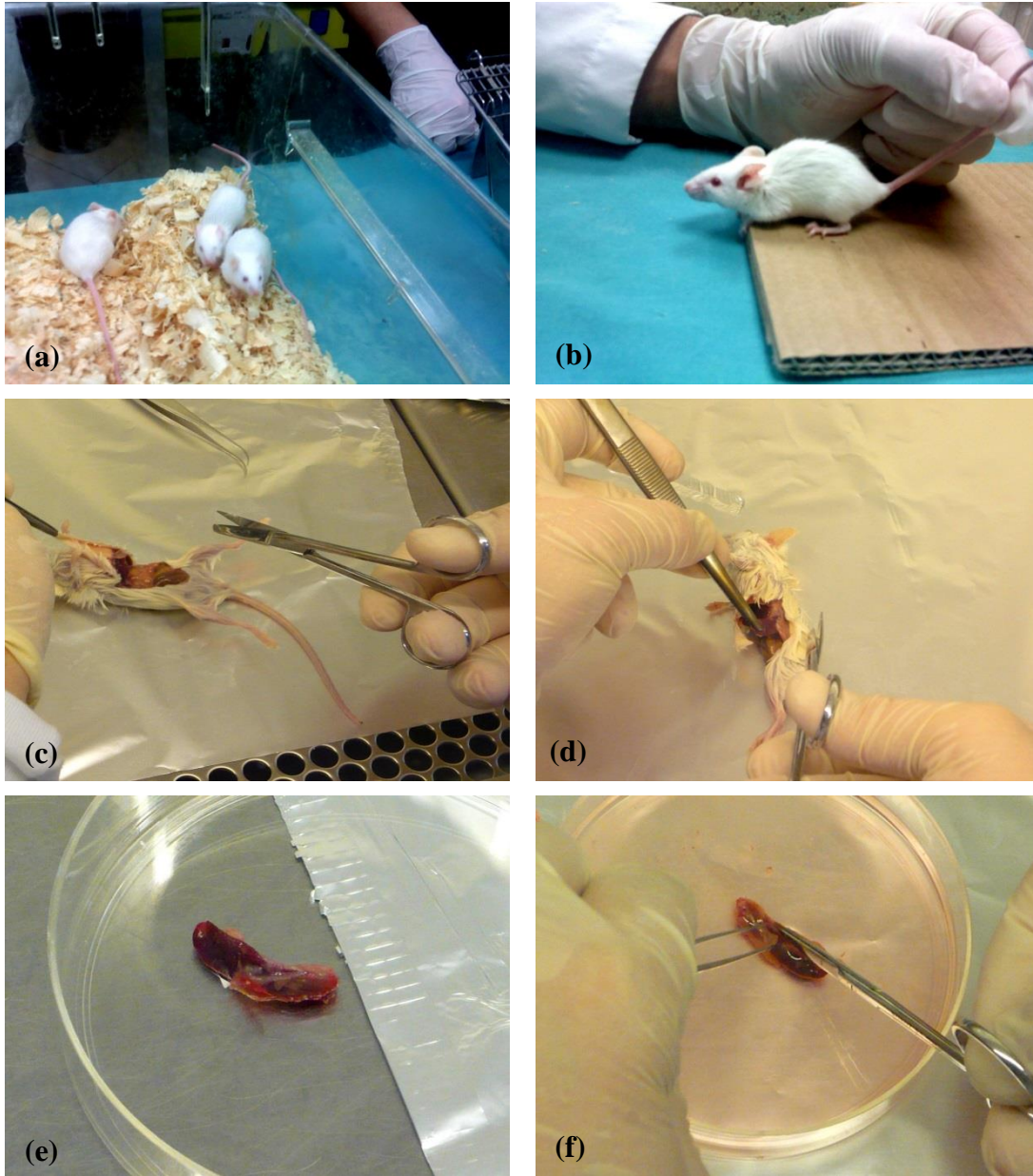
Polistirenden yapılan hücre kültür plaklarında hibridomaların uzun süre yaşaması güç olduğundan dolayı, füzyon sonrasındaki hücre süspansiyonu, daha önceden makrofajların bulunduğu kültür plaklarına aktarılır. Makrofaj hücreleri, salgıladıkları sitokinler ile hücre aktivitesini arttırmaları. Ayrıca kültür ortamında istenmeyen mikroorganizmaları da fagosite ederek, hibrit hücrelerinin yaşaması için daha sağlıklı bir ortam sağlarlar [71, 114]

Besleyici hücrelerin hazırlanması için, bağışıklanmamış 6-8 haftalık BALB/c türü fare kullanıldı. Füzyondan 2 gün önce fareler disloke edilip, % 70' lik etanol içerisinde bekletilerek steril hale getirildi. Fareler laminar akımlı kabin içerisinde sırt üstü yatırılarak sabitlendi, steril makas ve pens yardımıyla karın kısmı açılarak ön peritonu açığa çıkarıldı. Periton içerisine dikkatli bir şekilde 5 ml PBS tamponu enjekte edilip geri çekildi. Böylece periton içi PBS ile yıkanarak makrofaj toplandı. Toplanan makrofaj hücrelerinin bulunduğu PBS çözeltisi 1000 g' de 5 dakika santrifüj edilip, % 10 serum içeren RPMI besiyerine alınarak süspansiyon edildi. RPMI besiyerinde bulunan makrofajlar 48 kuyulu hücre kültür plaklarına, her kuyuya 200 µl olacak şekilde dağıtıldı.

Bağışıklanmış Fareden Dalak İzolasyonu

Difteri toksoidi ile yapılan immünizasyonlar sonucunda, ELISA testinde en iyi immün yanıtı veren farenin füzyonda kullanılmasına karar verildi. Fare disloke edildikten sonra, % 70' lik etil alkol içerisinde steril hale getirildi ve laminar akımlı kabine alındı. Farenin karnı yanlara doğru kesilerek dalağa ulaşıp, bulunduğu yerden izole edildi. Elde edilen dalak, steril 10 cm' lik petri kabına alındı ve steril bir pens ve makas yardımıyla üzerinde bulunan yağ dokusundan temizlendi (Şekil 3.2).

Fareden alınan dalak, steril bir petri kabına 10 ml serumsuz besiyeri konularak steril bir enjektörün arka kısmıyla ezildi. Dalak hücrelerin bulunduğu serumsuz besiyeri bir pipet yardımıyla süspansiyon edilerek, steril bir falkon tüpe aktarıldı. 400 g' de 8 dakika santrifüjlenerek iki kez yıkanan dalak hücreleri daha sonra 10 ml besiyerine alınarak hücre sayımı yapıldı.



Resim 3.2. (a) Difteri toksoidi ile bağışıklanmış farelerin füzyon günü görünümü, (b) ELISA ile en iyi antikor titresi alınarak füzyon için seçilen fare, (c) Disloke edilen farenin peritonunun açılması, (d) Dalağın fareden alınması, (e) Fareden alınan dalağın görünümü ve (f) Dalağın fazla yağ tabakasından temizlenmesi

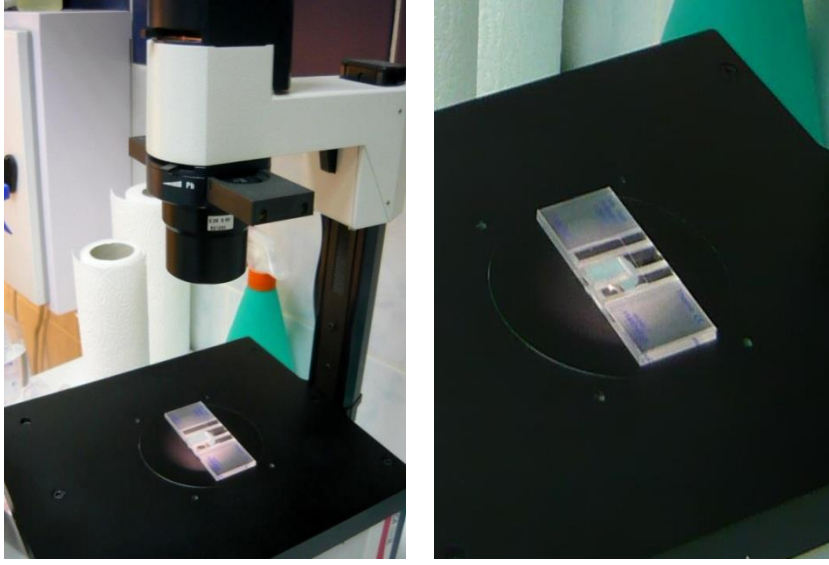


Resim 3.3. Fareden elde edilen dalak hücrelerinin yıkama aşamasındaki görünümü

Hücre Sayımı

Füzyon işleminden önce yıkanan myeloma ve dalak hücrelerinin Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı. Thoma lamı üzerine lamel konulduktan sonra belirli bir miktarda olan hücre süspansiyonlarından mikropipet yardımıyla alınarak dikkatli bir şekilde lamın yan kısmından yayılması sağlandı. Hemositometrede bulunan 25 kareye düşen hücreler sayılıp aşağıda verilen formül kullanılarak, füzyonda kullanılacak olan hücre sayıları belirlendi.

Toplam hücre sayısı = 10^4 x hücrelerin bulunduğu çözelti hacmi (ml) x sayılan hücre miktarı



Resim 3.4. Dalak ve myeloma hücrelerinin sayımında kullanılan Thoma lamı

3.2.4. Füzyon

Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı yapılan F0 myeloma ve dalak hücreleri 1/5 oranında olacak şekilde santrifüj tüpünde birleştirildi. 800 g' de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atılarak altta kalan hücelere, 500 µl % 50 PEG (4 000), 1 dakikada çevirip karıştırarak hücelere eklendi ve 1 dakika daha karıştırmaya devam edildi. 10 ml serumsuz besiyeri pipetle çekilerek, ilk 1 ml' si 1 dakikada karıştırılarak ilave edildi. Kalan 9 ml besiyeri karıştırarak 2 dakikada eklendi. Elde edilen hücre süspansiyonu 400 g' de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve 10 ml besiyeri ile tekrar süspansiyon edildi. Üzeri uygun miktarda % 20 FBS, 50X HAT, 100 µg/ml streptomisin, 100 u/ml penisilin, 2 mM L-glutamin içeren RPMI besiyeri ile tamamlanıp, 2 gün öncesinde makrofaj hücrelerini ekildiği 48 kuyulu kültür plaklarına dağıtıldı. Füzyon işlemi tamamlandıktan sonra ekim yapılan kültür plakları mikroskopla incelenip, 37 °C' deki CO₂ inkübatörüne kaldırıldı. Hücrelerin gelişimine bağlı olarak normal besiyerine geçildi.

İnvert mikroskopla incelendiğinde, myeloma hücreleri büyük ve belirgin olarak gözlenirken, dalak hücrelerinin ise daha küçük boyutlu olduğu gözlemlendi. Füzyondan sonraki günlerde, plaklar tek tek mikroskopla incelenip klon oluşturan kuyular belirlendi.

Füzyon Sonrası Hücrelerin Takibi

Füzyon sonrası hücrelerin ekildiği 48 kuyulu 10 adet kültür plağı tek tek incelenerek klon

oluşumu kontrol edildi. Klon oluşumu gözlenen kuyulardaki hücrelerin antikor titreleri ELISA yöntemi ile belirlendi. ELISA sonucunda pozitif sonuç veren klonlar, alt klonlama işlemi için hücreler mikroskop altında her kuyuya tek hücre düşecek şekilde yeni 48 kuyulu kültür plaklarına alınarak çoğalmaları sağlandı. Bu aşamada hücreler için kullanılan besiyerindeki serum miktarı % 20' den % 10' a düşürüldü.

Dolaylı ELISA ile Aktif Klonların Belirlenmesi

Alt klonlama işleminden sonra kuyulardaki klonların spesifik antikor titreleri ELISA yöntemi ile belirlendi. Bunun için ELISA plağına kaplanacak olan antijen çözeltisi, 10 µg/ml (diferi toksoidi/PBS) olacak şekilde fosfat tamponunda (PBS, pH=7,2) hazırlandı. 96 kuyuluk ELISA plakları 100 µl antijen çözeltisi ile kaplandı ve gece boyu +4 °C' de inkübe edildi. Bağlanmayan antijenleri uzaklaştırmak için, plak 3 defa PBS-Tween 20 tamponu ile yıkandı. % 0,2 derişimdeki kazein çözeltisi her kuyuya 200 µl olacak şekilde eklendi ve 1 saat 37 °C' de bekletildi. Plak kuyularındaki bağlanmayan kazein çözeltisi döküldü ve kuyular 3 defa PBS-Tween 20 tamponu ile yıkandı. Hibridoma üst sıvılarından 100 µl kuyulara eklenirken, pozitif kontrol için de füzyonda kullanılan fareden alınan kan serumu da 1/1 000 oranında PBS tamponunda seyreltilerek kuyulara 100 µl eklendi ve 1 saat 37 °C' de bekletildi. Kompleks oluşturmadan kalan kısımlar döküldü ve plaklar yıkama tamponu ile 3 defa yıkandı. 1/1 000 dilüsyonla seyreltilmiş anti-mouse IgG konjugatı (sekonder antikor) her kuyuya 100 µl olacak şekilde ilave edildi ve 1 saat 37 °C' de bekletildi. 1 saat inkübasyondan sonra kuyular 5 defa yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyuya substrat tamponu (substrat tamponunun içerisinde kullanımdan 10 dk. önce, içerisinde 1mg/ml olacak şekilde 4-nitrophenil fosfat ilave edildi karanlıkta bekletildi) her kuyuya 100 µl olacak şekilde ilave edildi ve plak karanlık bir ortamda bekletildi. Substrat tamponu ilave edildikten sonra 30., 45. ve 60. dakikalarda 405 nm' de ELISA okuyucuda okuma yapıldı [71].

Stokların Oluşturulması

ELISA yöntemi ile pozitif sonuç veren hibrit klonları buldukları 48 kuyulu plaklardan 75 cm²' lik kültür kaplarına alınarak ve birkaç defa pasajlanarak çoğalmaları sağlandı. Daha sonra bir adet 75 cm²' lik kültür kabında bulunan hücreler 400 g' de 5 dakika santrifülenerek (+4 °C' de) üzerindeki süpernatant atıldı. Santrifüjün alt kısmında kalan

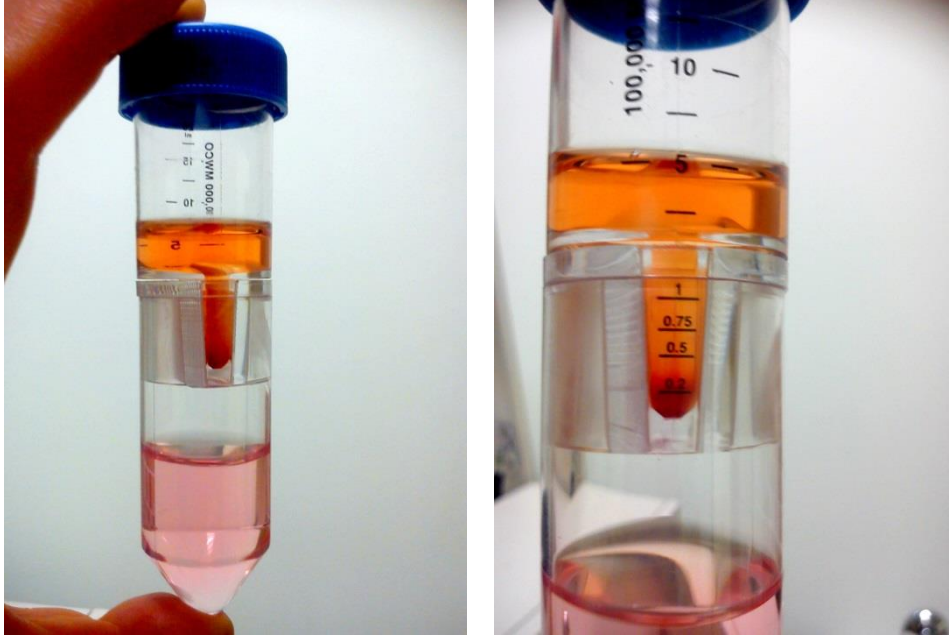
hücre peleti, serum içeren besiyeri ile süspansiyon edilerek, 2 ml' lik kryo tüplere alındı ve üzerine DMSO eklenerek karıştırılıp hemen -80 °C' deki dondurucuya bırakıldı. -80 °C' de bir gece bekletilen hücreler, daha sonra sıvı azot tankına alınarak stokları oluşturuldu.

3.2.5. Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

ELISA testi ile spesifik antikor yanıtı alınan 5A5 hücre klonunun, difteri toksinine karşı oluşturduğu monoklonal antikorları geniş ölçekte üretmek için, bu hücreler RPMI besiyeri içeren 75 cm²' lik hücre kültür kaplarına alındı. Bu şekilde yaklaşık olarak 100 ml kültür üst sıvısı toplanarak ölü hücre artıklarını uzaklaştırmak için 7200 rpm' de 8 dakika santrifüjlendi ve saflaştırma işlemi için + 4 °C' de muhafaza edildi.

Ultrafiltrasyonla Antikorların Konsantre Edilmesi

5A5 klonundan toplanan ve santrifüjlenerek + 4 °C' de muhafaza edilen kültür üst sıvısında, besiyerinden gelen ve oldukça fazla miktarda serum albumini bulunmaktadır. Bu da monoklonal antikorların saflaştırılmasında bir takım güçlükler meydana getirmektedir. Serumdan gelen ve istenmeyen proteinleri uzaklaştırmak amacıyla ilk basamakta, spin kolon kullanılarak ultrafiltrasyon yapıldı. Bu işlem için, yaklaşık olarak 100 ml. kültür üst sıvısı, Resim 3.5 ' te görülen spin kolona alınarak 6000 rpm' de 50 dakika süreyle + 4 °C' de santrifüjlendi. Kültür üst sıvısında besiyerinden gelen albuminin molekül ağırlığının yaklaşık olarak 66,5 kDa olduğu bilindiğinden, 100 kDa' dan daha küçük proteinleri elimine eden spin kolon kullanıldı.



Resim 3.5. Ultrafiltrasyonda kullanılan spin kolon

Jel Filtrasyon Yöntemiyle Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

Jel filtrasyon metodu, proteinleri molekül büyüklüklerine göre ayırmada kullanılan etkili bir kromatografi metodudur. Bu yöntemde, bir kolona hidratize olmuş Sefaroz veya Sefadex gibi bir polisakarit yapıları polimer materyal yıkanıp, uygun bir tamponla dengelenir. Daha sonra dengeleme tamponu içerisinde hazırlanmış olan protein karışımı kolona uygulanır. Büyük molekül proteinler jel partiküllerinin porlarına girmeyip hızlıca kolondan ayrılırken, küçük molekül proteinler ise porlara girip daha sonra kolondan akışları sağlanır. Böylelikle ayrı ayrı toplanan fraksiyonlarda, önce büyük molekül proteinler, sonra da küçük molekül proteinler toplanır [115].

Ultrafiltrasyonla konsantre edilen 5A5 klonunun kültür üst sıvısına monoklonal antikorları saflaştırmak amacıyla, jel filtrasyon kromatografi yöntemi uygulandı. Bu amaçla, saflaştırma işleminde kullanılan Superdex 75 jel filtrasyon kolonu (2,6x60 cm) bir gece öncesinden 50 mM glisin-NaOH tamponu ile dengelendi. Ultrafiltrattan 10 ml alınıp, hazırlanan kolona 3 ml/dak akış hızında olacak şekilde tatbik edildi. Fraksiyonlar, 90 saniye aralıklarla, her tüpte yaklaşık olarak 3 ml olacak şekilde toplandı. Fraksiyonların her biri 260 ve 280 nm’ de değerlendirilip, ELISA ile aktiviteleri incelendi. Bu şekilde istenilen antijene karşı üretilmiş olan monoklonal antikorların kaçınıcı tüpte olduğu ve hangi dakikada geldiği tespit edildi. Ayrıca molekül kütleleri belli protein standartları da

kolondan aynı şekilde elüe edildi ve elüe oldukları süreye göre bir standart grafik hazırlandı. Bu standart grafik yardımıyla antikorun molekül kütlesi yaklaşık olarak hesaplandı [92, 115].



Resim 3.6. Bioplot Pharmacia FPLC (Fast protein liquid chromatography) sistemi

3.2.6. Saflaştırılan Monoklonal Antikorların Karakterizasyonu

İn vitro Nötralizasyon Testi

İmmünolojik testlerin temelini antikor-antijen reaksiyonları oluşturmaktadır. Antikor molekülleri, bir immün kompleks oluştururken antijenlerle geri dönüşümlü olarak birleşip, oluşan bu kompleks tekrar ayrışabilir. Antikor ve antijen reaksiyonları kimyasal bir reaksiyon olup, kompleks oluşumunda başlıca elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağları, hidrofobik moleküllerin oluşturduğu kuvvetler ve Van der Waals kuvvetleri gibi etkileşimler rol oynamaktadır. Antikorla antijenin birleşmesi için epitop adı verilen antijenik determinatlarla, antikorların Fab bölgelerinin yapısal olarak birbirlerine uygunluk göstermesi gerekmektedir. Bu durum bir anahtar-kilit ilişkisine benzetilebilir [116, 117].

İmmünolojik yöntemlerle, bilinen bir antijen varlığında örnek madde içindeki spesifik

antikor veya bilinen bir antikor varlığında yine bir örnekteki spesifik antijen tespit edilebilir. Flokülasyon, antikor ve antijen arasında meydana gelen reaksiyon sonucu tüpte belirgin bir bulanıklığın meydana gelmesidir. Bu yöntemde, antijen veya antikordan biri sabit bir miktarda tutulurken, diğeri seyreltilerek buna eklenir, karışım yaklaşık olarak 50 °C’ de tutulur. İlk bulanıklığın meydana geldiği tüp, flokülasyon titresini verir. Toksin miktarı Lf (Limit of flocculation) olarak kısaltılan, flokülasyon sınırı birimi cinsinden ifade edilir. Bir Lf birimi, bir birim antitoksini (antijeni) en hızlı şekilde floküle eden toksin miktarı olarak değerlendirilir [116, 117].

Difteri toksinine karşı üretilen monoklonal antikorun, in vitro nötralizasyon testi için öncelikle 10 adet deney tüpüne, 100 Lf/ml konsantrasyonunda ve gittikçe artan hacimlerde (0,05 ml, 0,1 ml, 0,15 ml...) difteri toksoidi örnekleri hazırlandı. Her tüpe, flokülasyon sınırı (Lf) değeri belirli olmayan monoklonal antikor karışımından 1 ml olacak şekilde ilave edildi ve 50 °C’deki su banyosuna alınarak bekletildi. Antikor ilavesinden sonra saat kontrollü olarak tüpler gözlenmeye başlandı. Flokülasyonun ilk görüldüğü tüpte bulunan miktar; flokülasyon (Lf) ünitesi/ml veya Lf/ml olarak kabul edildi. Tüplerde sırasıyla önce bulanıklık, daha sonra ise tüpün dip tarafında çökme gözlemlendi. Başlangıçtan ilk flokülasyonun görüldüğü zamana kadar geçen süre de flokülasyon kinetiği (kinetics of flocculation) olarak kabul edilip birimi dakika olarak verilmektedir. Standart bir değeri olmayıp, çalışılan örneğe göre değerlendirilir.

Western Blot Analizi

Sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid (PAGE) Jel Elektroforeziyle Antijenin Yürütülmesi

Jelde yürütülecek olan antijenin molekül ağırlığı göz önünde bulundurularak çeşitli hesaplamalar sonucu, yürütme jeli olarak % 12 konsantrasyonundaki SDS-PAGE jelin kullanılmasına karar verildi. Bu amaçla, 10 ml jel için; 3,265 ml dH₂O, % 30’ luk akrilamid (29,2 g akrilamid, 0,8 g bisakrilamid) stok çözeltisinden 4 ml, 1,5 M tris tamponundan (pH: 8,8) 2,532 ml, % 10 SDS stok çözeltisinden 100 µl olacak şekilde kullanıldı. Polimerizasyon reaksiyonunun başlaması için amonyum persülfat (APS) kullanıldı. % 10 konsantrasyonda kullanılan amonyum persülfat, 30 mg APS’ nin 300 µl dH₂O’ da çözülmesiyle hazırlandı. Taze hazırlanan % 10’ luk APS’ den 100 µl ve 10 µl

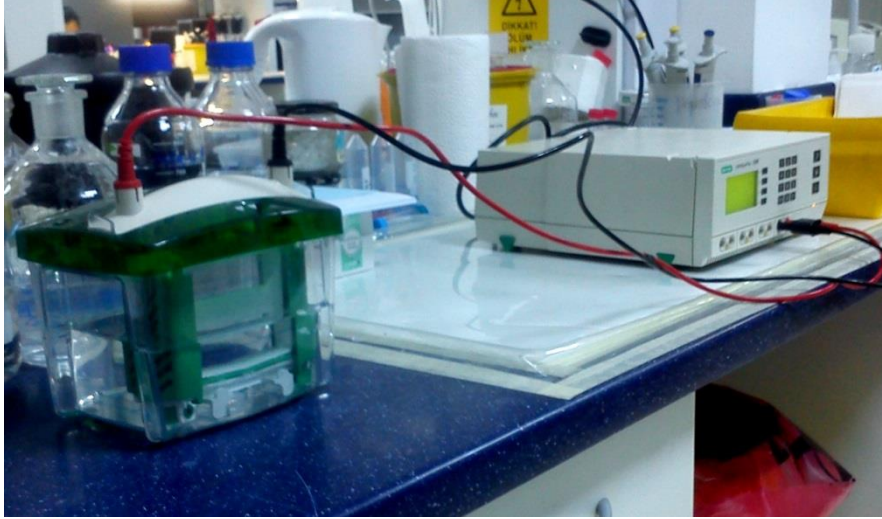
TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin) ilave edildi. Jelin döküleceği cam plakaların son derece temiz olmasına dikkat edilerek, hazırlanan jel karıştırılıp hızlı bir şekilde polimerleşme gerçekleşmeden döküldü. Dökülen jel polimerize olduktan sonra üzeri % 20 izopropanol ile kapatıldı ve dH₂O ile yıkanarak, kurutma kağıdıyla yıkama suyu iyice uzaklaştırıldı. Daha sonra % 5' lik istifleme jeli hazırlandı. Toplamda 4 ml istifleme jeli için; 2,760 ml dH₂O, 500 µl 0.5 M tris tamponu (pH:6,8), 657 µl % 30 stok akrilamid, 39 µl % 10 SDS çözeltisi, 39 µl taze hazırlanmış APS ve 4 µl TEMED karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan istifleme jeli yürütme jelinin üzerine dökülerek, uygun tarak yerleştirilip polimerleşmesi beklendi.

Jelde yürütülecek olan örneklerin hazırlanması

Elimizde bulunan difteri toksoidindeki protein miktarı hesaplanarak her kuyuya 25,5 µg protein düşecek şekilde toksoid eklenmesine karar verildi. Difteri toksoidi örnek tamponu (Laemmlı tamponu) içerisinde 95 °C' de 5 dakika kaynatıldı. Laemmlı tamponu (pH:6,8); % 20 gliserol, % 4 SDS, % 10 2-merkaptetanol, % 0,004 brom fenol mavisi ve 0,125 M Tris-HCl kullanılarak hazırlandı.

Jele örneklerin yüklenmesi ve yürütülmesi

Hazırlanan jelin üzerindeki tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve tarağın oluşturduğu kuyulara eşit miktarda protein düşecek şekilde örnekler yüklendi. % 0,1 SDS, 192 mM glisin ve 25 mM Tris tamponu kullanılarak yürütme tamponu hazırlanarak, jel tankının içi dolduruldu. Jele uygulanacak olan akımın, jelin tüm bölgelerine etki etmesi için yürütme tamponunun jele tamamen temas etmesi gerekir. Güç kaynağına bağlanan elektrotlar ile 15 mili amperde ve yaklaşık olarak 2 saat süreyle örnekler jelde yürütüldü.



Resim 3.7. Örneklerin yürütüldüğü ve transferin gerçekleştirildiği Western-blot sistemi

Proteinlerin PVDF membrana transferi

Jelde örnekler yürütüldükten sonra jel dikkatli bir şekilde çıkarılarak, uygun büyüklükte bir PVDF (poliviniliden florid) membran kesildi. PVDF membran 3-5 dakika metanolde bekletilerek, kuru olan membranın rehidrasyonu sağlandı. Jel ve membran, soğuk transfer tamponuna (% 0,04 SDS, % 20 metanol, 48 mM Tris, 39 mM glisin) alınarak 10 dakika süreyle yavaşça çalkalandı. Membrana transferde kullanılacak olan kurutma kağıdı ve süngerler transfer tamponunda ıslatıldı. Transfer için Bio-rad marka ıslak transfer düzeneği kuruldu. Proteinler negatif yükle yüklendiklerinden dolayı, jelden membrana geçişin pozitif yükten negatif yüke doğru olacağı göz önünde bulundurulup, membran ve jel bu düzene göre yerleştirildi. Kurutma kağıtları ve süngerler hem alt hem de üst kısma yerleştirilip, jel ve membran da yerleştirildikten sonra hava kabarcığının kalmamasına dikkat edildi. Transfer için tankın içine buz kalıbı konulup, kurutma kağıdı, jel ve membranın yerleştirildiği aparatlar da yerleştirilip, elektrotlar güç kaynağına dikkatlice kağlandı. Transfer için tüm hazırlıklar yapıldıktan sonra, 100 V' da 2 saat süreyle transfer gerçekleştirildi. Membrana transfer olmuş protein bantlarını görmek için membran ponceau S boyasıyla 5 dakika kadar boyanarak, membran distile su ile yıkandı.

Membranın bloklaması

Membranla antikorlar arasındaki spesifik olmayan bağlanmaları en aza indirmek için, transfer sonrasında membran uygun bir bloklama ajanı ile bloklandı. Bu amaçla % 5' lik BSA (bovin serum albumin) PBS-Tween çözeltisinde hazırlandı. Bloklama işlemi için

membran, hazırlanan BSA çözeltisinde bir saat süre ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

Birincil (primer) antikor ile işaretleme

Membranlara uygulanan primer antikor olarak; füzyonda kullanılan fareden alınan kan serumunun (poliklonal serum) 1/500 oranında seyreltilmiş çözeltisi, 5A5 klonundan elde edilen monoklonal antikorların ultrafiltrasyon sonrasındaki solüsyonu, jel filtrasyondan sonra elde edilen 23, 24 ve 25 no' lu tüpte bulunan filtratlar kullanıldı. Bu antikorlar her bir membrana ayrı ayrı olacak şekilde 3 saat süreyle oda sıcaklığında uygulandı. Primer antikor uygulandıktan sonra membranlar 3 defa 10' ar dakika süreyle PBS-Tween yıkama çözeltisiyle yıkandı.

İkincil (sekonder) antikor ile işaretleme

İkincil antikor uygulaması için, HRP (horseradish peroxidase) işaretli anti-mouse IgG antikor kullanıldı. Bütün primer antikorlar için sekonder antikor 1/5 000 oranında seyreltilerek uygulandı. Seyreltme işlemleri % 5 BSA PBS-Tween çözeltileri kullanılarak yapıldı. Sekonder antikor içerisinde membranlar oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat süreyle, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Daha sonra membranlar 3 defa 10' ar dakika süreyle PBS-Tween yıkama tamponu ile yıkandı.

Membranın görüntülenmesi

Görüntülemeye kullanılan SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate kiti içerisindeki luminol ve peroksit içeren çözeltiler bire bir oranda karıştırıldı. Hazırlanan bu solüsyondan 250µl kadar alınıp, membranın üzerine konulmuş ve üzeri streç film ile örtülüp karanlıkta 5 dakika bekletilerek veya bazı durumlarda da hiç bekletilmeden direkt görüntü alındı. Görüntüleme işlemi için, Kodak 4000MM image Station cihazın kullanıldı.

İzotiplendirme

Difteri toksinine karşı geliştirilen monoklonal antikorun alt tipini belirlemek amacıyla, Roche firmasından temin edilen ticari kit kullanılarak, immunoglobulin sınıf ve alt sınıfları belirlendi. Bu amaçla, saflaştırılan monoklonal antikor solüsyonu (%1 BSA veya PBS

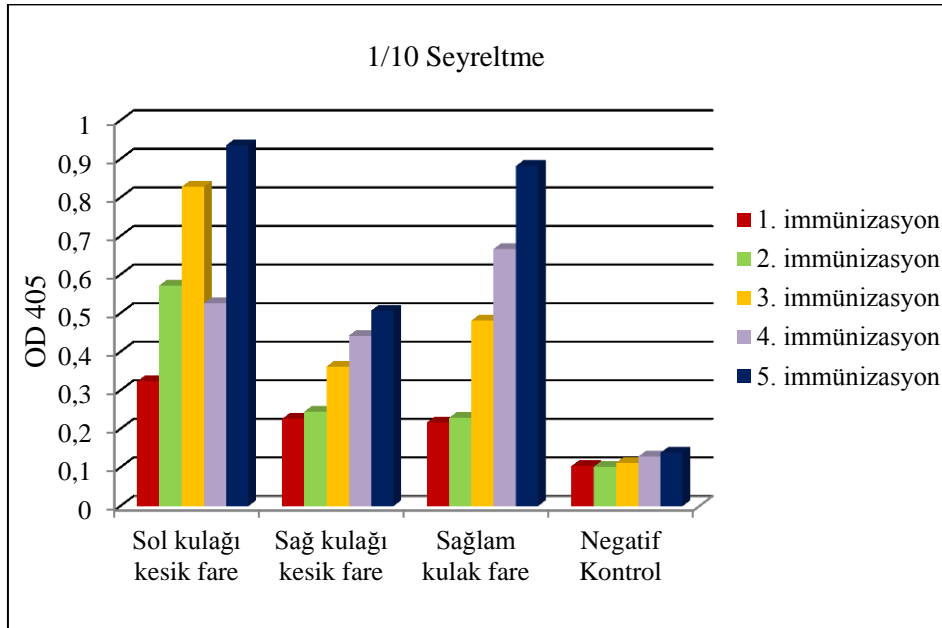
tamponunda) 1/10 ve 1/100 oranında seyreltildi. 150 µl seyreltilmiş olan solüsyondan alınarak, kite ait olan tüpe ilave edildi. Tüp 25 °C' de 30 dakika bekletilerek inkübasyon sağlandı. Tüpte homojen bir karışım elde etmek için vorteks yardımıyla karıştırılıp süspanse edildi. IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM ve IgA reajanlarını içeren kit stripi tüpe daldırılarak, 5 dakika bekletilip sonuçlar alındı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

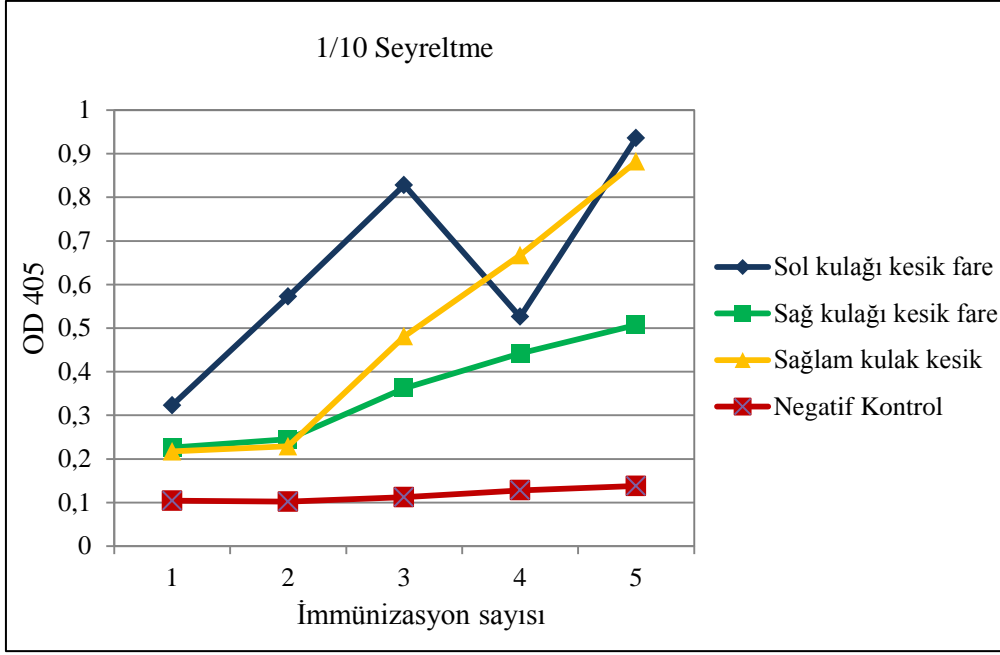
4.1. Bağışık Yanıtta ELISA Bulguları

8 haftalık 3 adet BALB/c türü fare, farklı miktardaki difteri toksoidi belirli zaman aralıkları ile immünize edildi. İlk immünizasyon “*Freund’s complete*” adjuvan, ikinci immünizasyon ise “*Freund’s incomplete*” adjuvan ile gerçekleştirildi. İlk iki immünizasyon dışındaki enjeksiyonlar sadece difteri toksoidi ile gerçekleştirildi. Aynı zamanda farelerden, her immünizasyon öncesinde kuyruk kanı alınarak, dolaylı ELISA testi ile antikor titrelerine bakıldı. İmmünize olmuş farelerin yanı sıra negatif kontrol amaçlı olarak bir adet immünizasyon yapılmayan fareden kan alındı. Serum örnekleri 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000 oranlarında seyreltilerek ELISA testinde kullanıldı. Difteri toksinine karşı bağışık farelerin verdiği immün yanıtlar aşağıdaki grafiklerde verilmiştir.

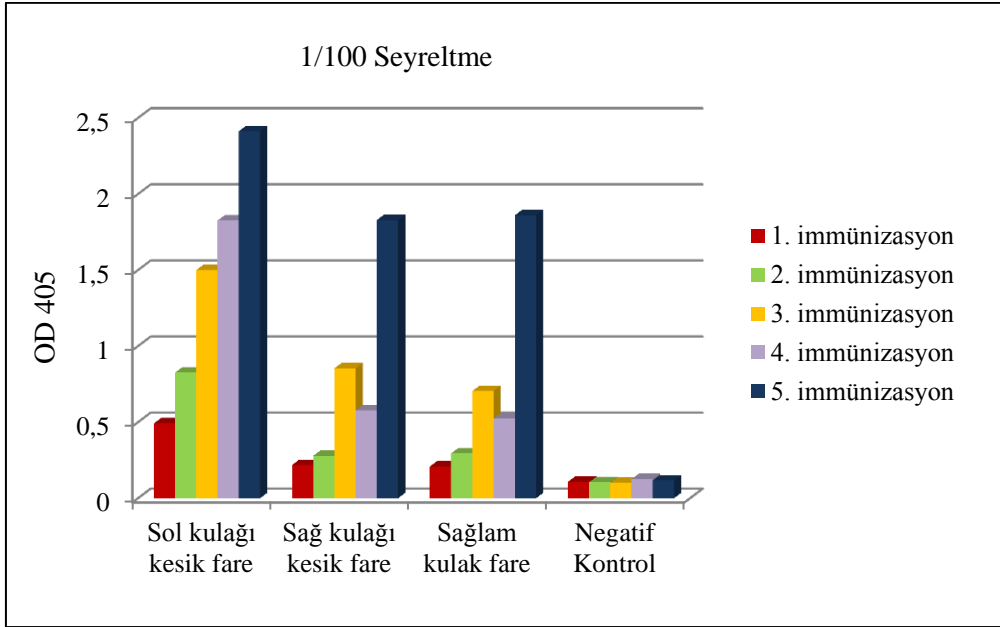
Dolaylı ELISA yöntemi ile test edilen farelerden, 46 µg/ml oranında difteri toksoidinin enjekte edildiği sol kulağı kesik fare, grafiklerden de görüldüğü gibi 1/100 seyreltme oranında en iyi bağışık yanıtı vermiştir. Böylece füzyon işleminde kullanılmak üzere sol kulağı kesik fare seçilmiştir.



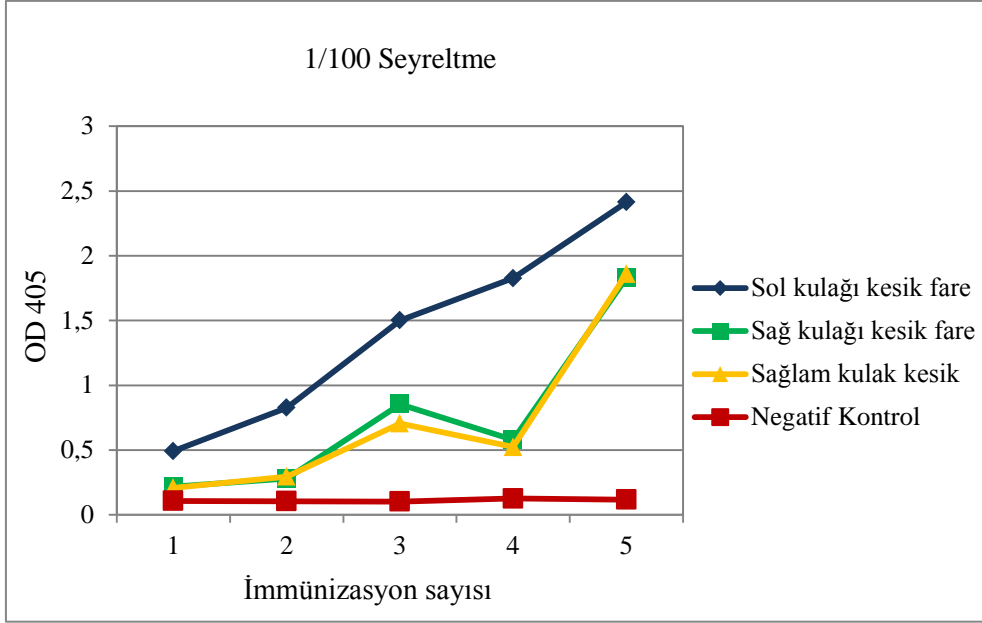
Şekil 4.1. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının 1/10 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçları



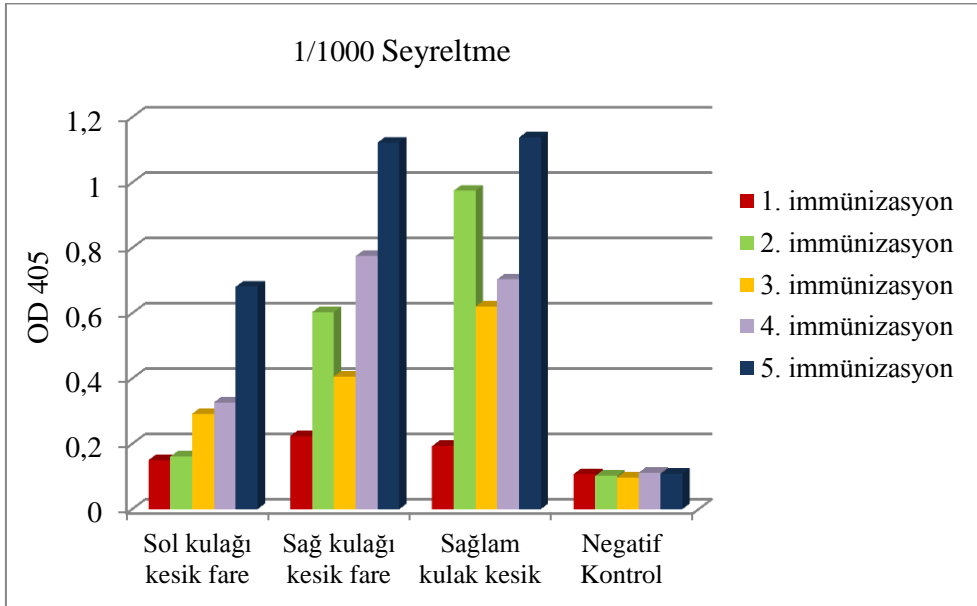
Şekil 4.2. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının, 1/10 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçlarının, immünizasyon sayısı ile değişen OD 405 okuma değerleri



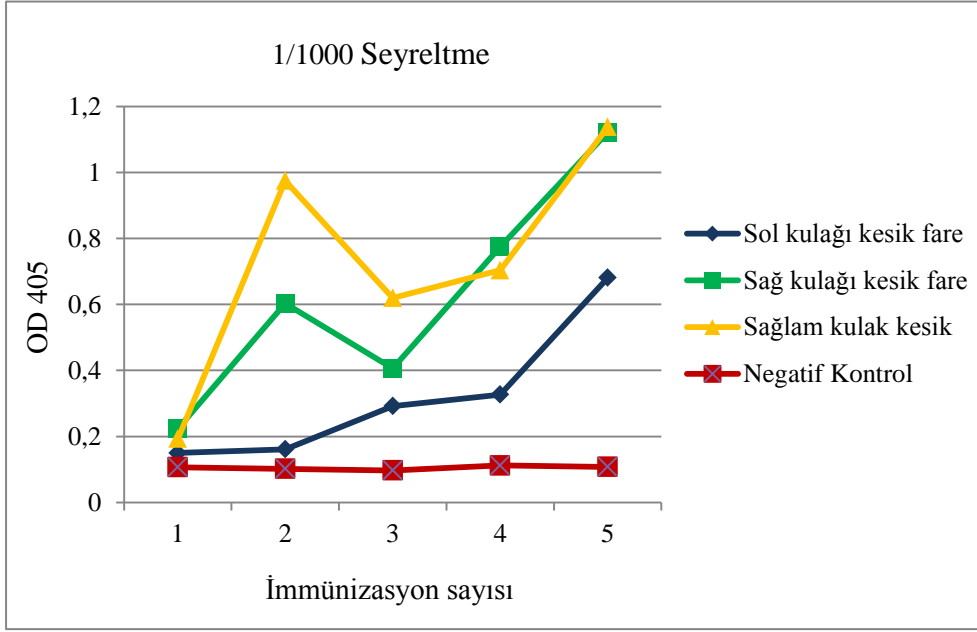
Şekil 4.3. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının 1/100 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçları



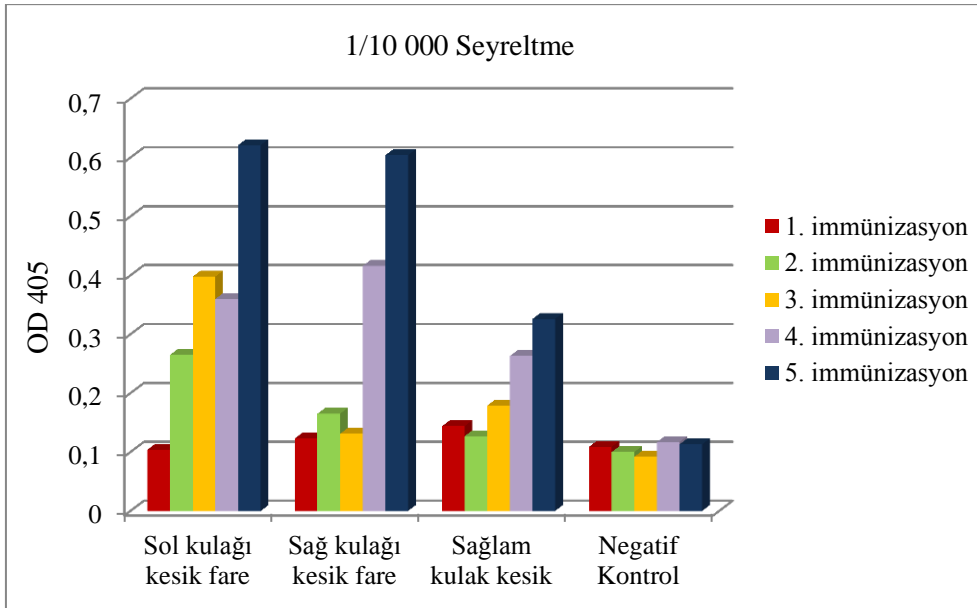
Şekil 4.4. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının, 1/100 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçlarının, immünizasyon sayısı ile değişen OD 405 okuma değerleri



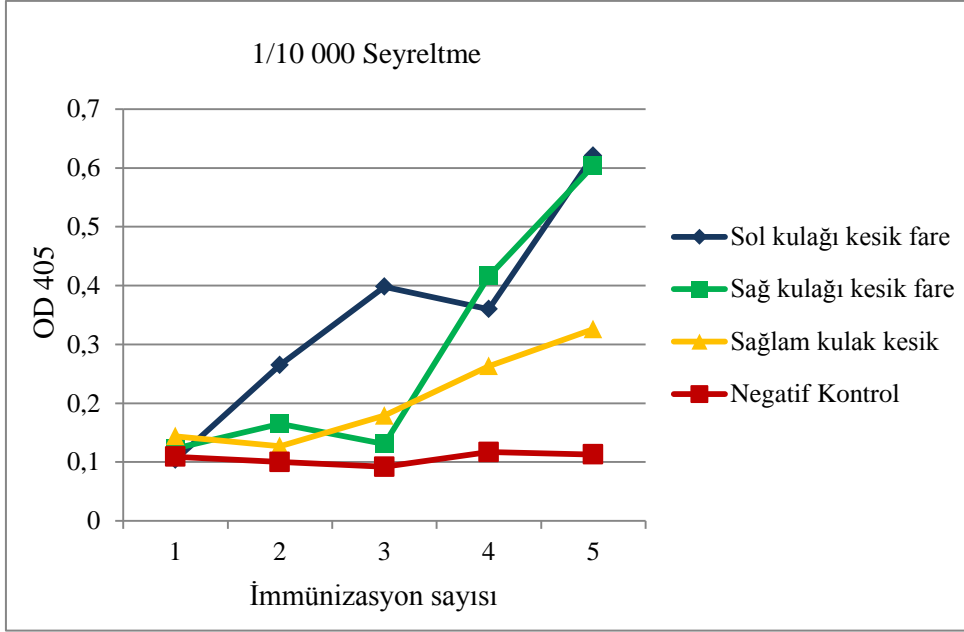
Şekil 4.5. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının 1/1000 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçları



Şekil 4.6. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının, 1/1000 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçlarının, immünizasyon sayısı ile değişen OD 405 okuma değerleri



Şekil 4.7. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının 1/10 000 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçları



Şekil 4.8. Difteri toksoidi ile immünize edilen farelerden alınan kan serumlarının, 1/10 000 oranında seyreltilmesi ile elde edilen ELISA sonuçlarının, immünizasyon sayısı ile değişen OD 405 okuma değerleri

4.2. Bağışık Dalak Hücre Bulguları

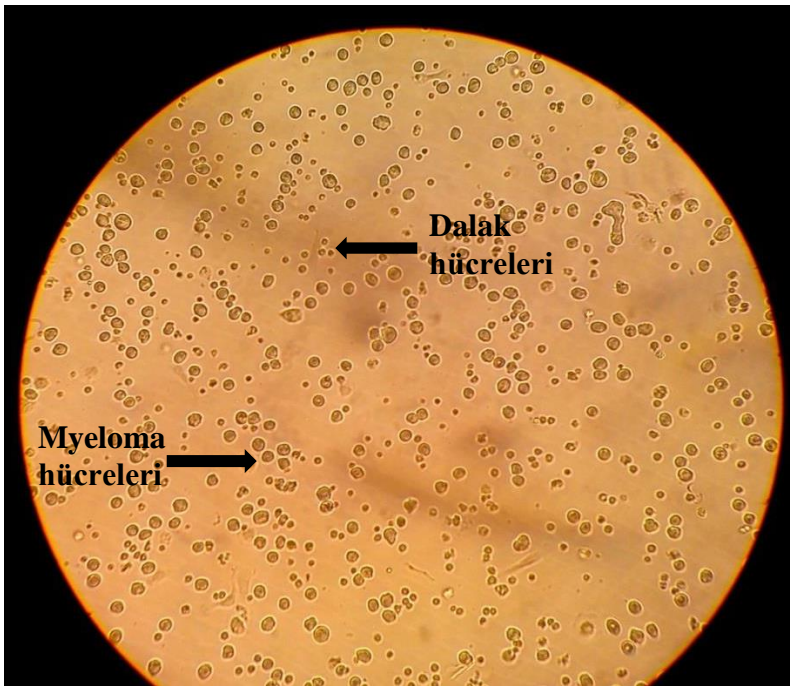
Füzyon işleminin yapılacağı gün, difteri toksoidi ile bağışıklanmış ve en iyi immün yanıtı veren farenin dalağı uygun koşullarda izole edildikten sonra, 20 ml PBS tamponu içerisinde süspansiyon edildi. Elde edilen bu dalak süspansiyonundaki hücre sayısı, hemositometre (thoma lamı) kullanılarak belirlendi. Hazırlanan hücre süspansiyonunun her mililitresinde $1,68 \times 10^6$ hücre olduğu ve süspansiyonun tamamında ise 34×10^7 sayıda hücre bulunduğu belirlendi.

4.3. Myeloma Hücre Bulguları

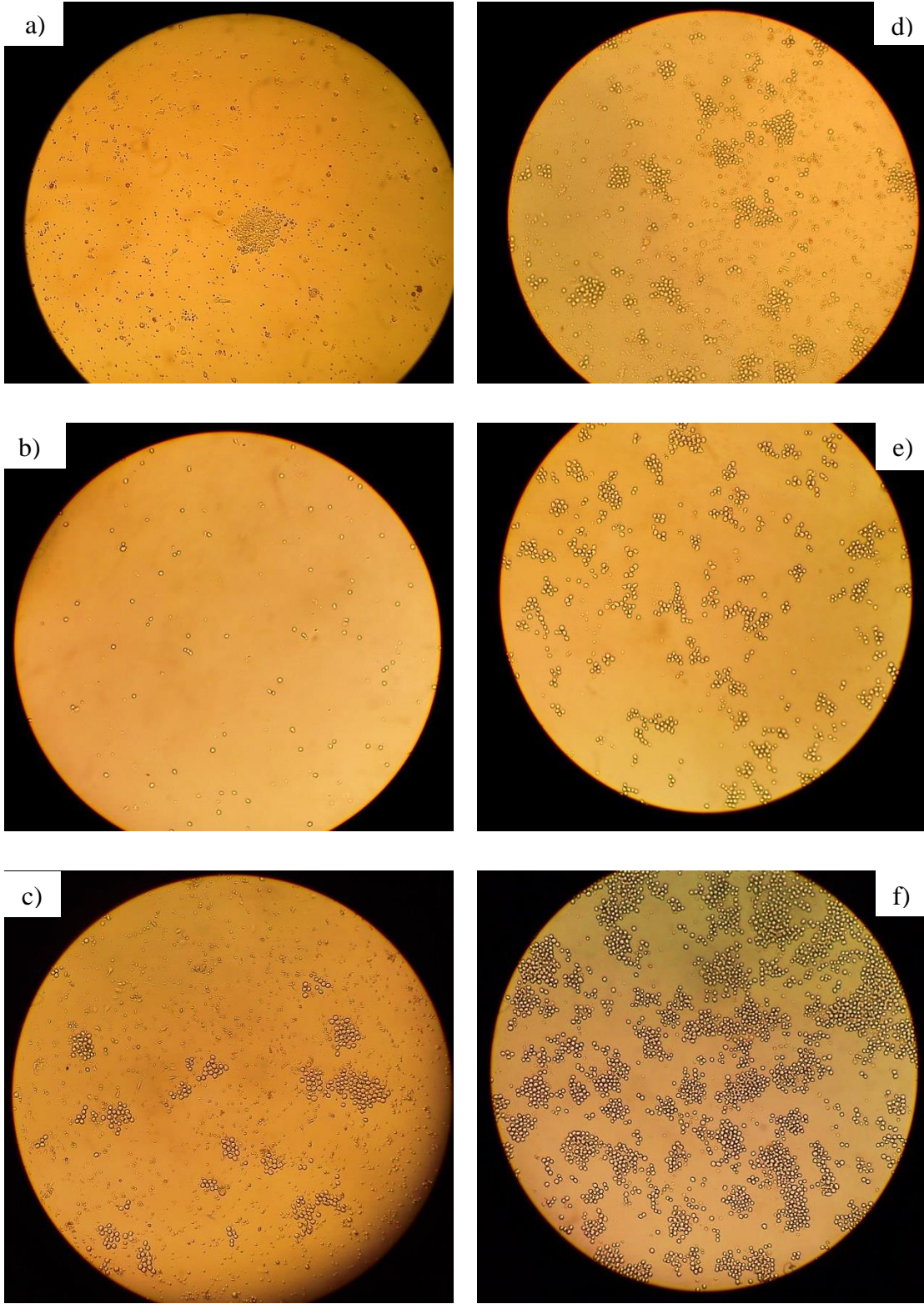
Füzyondan yaklaşık olarak 1 hafta önce sıvı azottan çıkarılarak, %10 FBS içeren RPMI besiyerine alınan F0 myeloma hücreleri, füzyondan önce yıkandı. 20 ml besiyerinde süspansiyon edilen myeloma hücrelerinin sayısı, hemositometre (thoma lamı) kullanılarak belirlendi. F0 myeloma hücre süspansiyonunun her mililitresinde $4,05 \times 10^6$ hücre olduğu ve süspansiyonun tamamında ise $8,1 \times 10^7$ sayıda hücre bulunduğu belirlendi.

4.4. Seçilen Klonlara Ait Bulgular

Füzyon işleminden sonra, 48 kuyulu plaklara ekilen hücreler taranarak 5. günde buldukları besi ortamında klon oluşturdıkları gözlemlendi. Bütün plaklar incelenerek tek klondan oluşan hücreler buldukları besi ortamından yeni bir plağa aktarıldı. Bu yeni plaklara aktarılan hücreler her gün taranarak gelişimleri Resim 4.2' de görüldüğü gibi takip edildi. Bu plaklarda bulunan her bir kuyudan üst sıvı alınarak antikor titreleri ELISA ile belirlendi.



Resim 4.1. F0 myeloma hücreleri ve dalak hücrelerinin füzyon günü görünüşleri



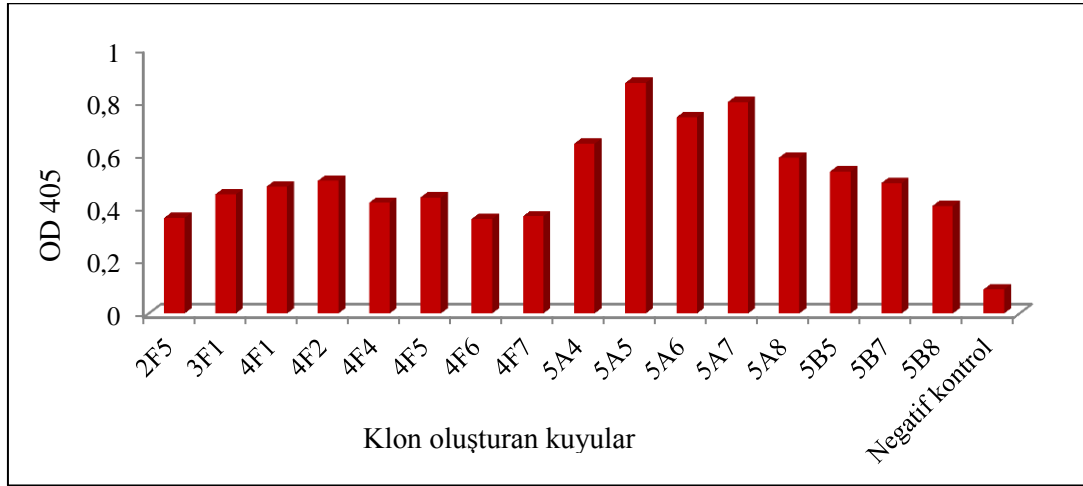
Resim 4.2. (a) Füzyon sonrası tek klondan oluşan hibridomalar, (b) Tek klondan oluşan hücrelerin yeni bir plağa aktarıldıktan hemen sonraki görünümü, (c) Tek klondan oluşan hücrelerin 2. gündeki görünümü, (d) Tek klondan oluşan hücrelerin 3. gündeki görünümü, (e) Tek klondan oluşan hücrelerin 4. gündeki görünümü, (f) Tek klondan oluşan hücrelerin 5. gündeki görünümü

4.5. Füzyon Sonrası Klonların Antikor Titresi

Füzyon işleminden sonra, hücre ekimi yapılan kuyulardan üst sıvı alınarak ELISA ile antikor titreleri belirlendi. Negatif kontrol olarak PBS tamponu kullanılırken, pozitif kontrol olarak da füzyonda kullanılan fareden alınan kan serumu kullanıldı. Antikor titreleri ve absorbans değerleri Çizelge 4.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Füzyon sonrası klon oluşturan kuyulara ait absorbans değerleri

| Kuyu no | OD 405 | Kuyu no | OD 405 | Kuyu no | OD 405 |
|---------|--------|---------|--------|-----------------|--------|
| 2F5 | 0,361 | 4F6 | 0,357 | 5A8 | 0,588 |
| 3F1 | 0,450 | 4F7 | 0,367 | 5B5 | 0,536 |
| 4F1 | 0,479 | 5A4 | 0,641 | 5B7 | 0,492 |
| 4F2 | 0,501 | 5A5 | 0,871 | 5B8 | 0,406 |
| 4F4 | 0,418 | 5A6 | 0,741 | Negatif kontrol | 0,091 |
| 4F5 | 0,438 | 5A7 | 0,798 | Pozitif kontrol | 2,68 |

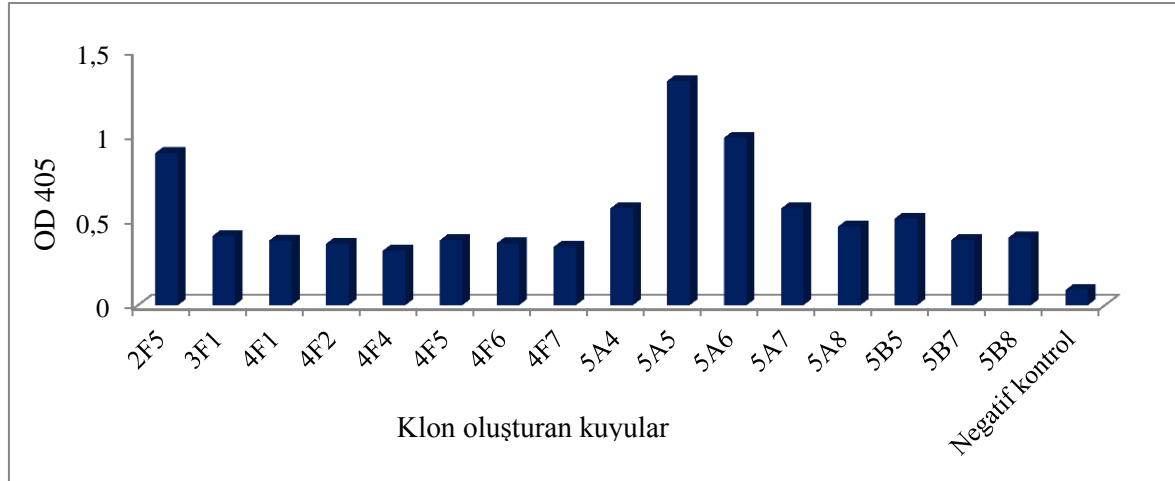


Şekil 4.9. Füzyon sonrası klon oluşturan kuyuların ELISA sonuçları

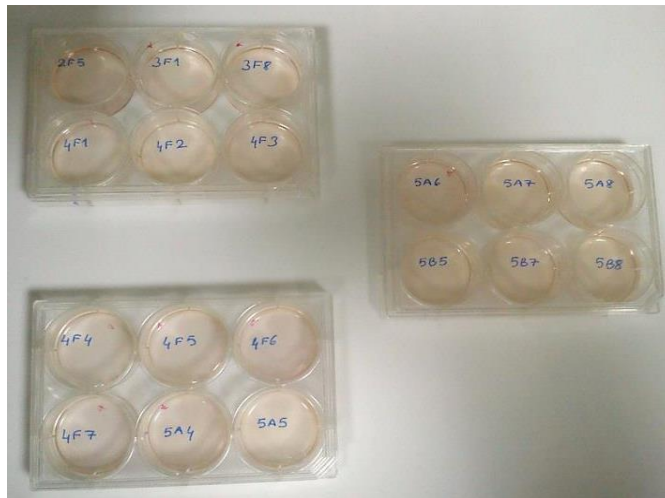
Şekil 4.9’ da görüldüğü gibi difteri toksinine karşı antikor yanıtı oluşturan füzyon kuyularındaki hücreler, 6 kuyulu yeni plaklara alınarak çoğalmaları sağlandı. Daha sonra hücrelerin üremeleri mikroskopik olarak takip edilip, üst sıvıları alınarak ELISA testi ile antikor titreleri belirlendi. ELISA sonuçları Çizelge 4.2 ve Şekil 4.10’ da verilmiştir.

Çizelge 4.2. Füzyon sonrası 6 kuyulu plaklara alınan hücrelerin antikor titrelerine ait absorbands değerleri

| Kuyu no | OD 405 | Kuyu no | OD 405 | Kuyu no | OD 405 |
|------------|--------|------------|--------|------------------------|--------|
| 2F5 | 0,897 | 4F6 | 0,364 | 5A8 | 0,462 |
| 3F1 | 0,406 | 4F7 | 0,342 | 5B5 | 0,510 |
| 4F1 | 0,380 | 5A4 | 0,570 | 5B7 | 0,385 |
| 4F2 | 0,361 | 5A5 | 1,321 | 5B8 | 0,398 |
| 4F4 | 0,321 | 5A6 | 0,987 | Negatif kontrol | 0,088 |
| 4F5 | 0,382 | 5A7 | 0,569 | Pozitif kontrol | 2,67 |



Şekil 4.10. Füzyon sonrası 6 kuyulu plaklara alınan hücrelerin ELISA sonuçları

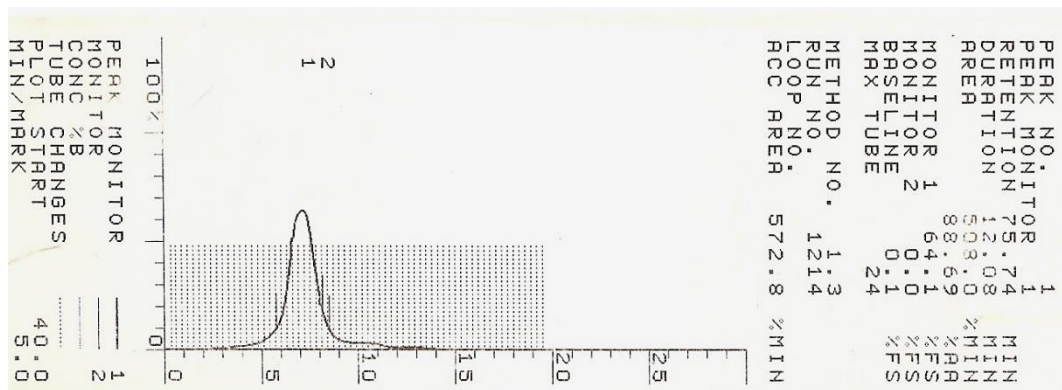


Resim 4.3. Füzyon sonrası klon oluşturup, ELISA sonuçları pozitif olan hücrelerin 6 kuyulu plaktaki görünüşleri

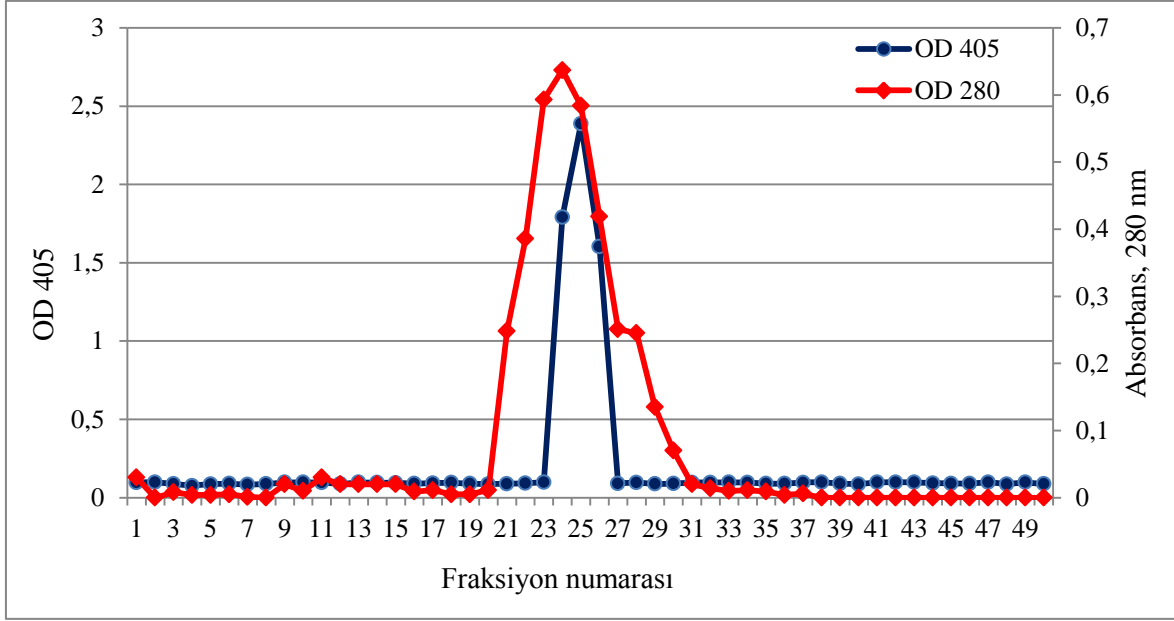
Füzyon sonrası ELISA ile antikor yanıtları belirlenen; 2F5, 3F1, 4F1, 4F2, 4F4, 4F5, 4F6, 4F7, 5A4, 5A5, 5A6, 5A7, 5A8, 5B5, 5B7, 5B8 kodlu hücre klonları difteri toksinine karşı pozitif sonuç vermiştir. Daha sonra bu hücre klonları 6 kuyulu plaklara alınarak çoğalmaları sağlanmıştır. Bu hücre klonlarının antikor yanıtı tekrar ELISA ile kontrol edilmiş ve en iyi yanıtı 5A5 klonun verdiği belirlenmiştir. Bundan sonraki aşamada, en iyi antikor yanıtı veren ilk üç hücre klonu (2F5, 5A5, 5A6) seçilerek büyük ölçekte üretilmiştir. Bu işlem için hücreler önce 25 cm² lik, daha sonra ise 75 cm² lik kültür kaplarına alınarak üremeleri sağlanmıştır. Bu süreçte, hücrelerin mikroskopik takipleri yapılarak antikor yanıtları yine ELISA ile kontrol edilmiştir. Yapılan ELISA testlerinde yine en iyi antikor yanıtını 5A5 klonunun verdiği belirlenmiştir. Araştırma boyunca yapılan ELISA testleri en az 3 defa tekrarlanarak çalışılmıştır.

4.6. Difteri Toksinine Karşı Geliştirilmiş Monoklonal Antikorların Saflaştırma ve ELISA Bulguları

Difteri toksinine karşı en iyi antikor yanıtının 5A5 klonu üst sıvısına ait olduğu ELISA testi ile belirlendikten sonra, bu hücre klonunun üst sıvısı fazla miktarda üretilip saflaştırma işleminde kullanıldı. Bu amaçla, öncelikle üst sıvı spin kolon kullanılarak konsantre edilip, daha sonra jel filtrasyon kromatografi yöntemiyle saflaştırıldı. Jel filtrasyon kromatografi cihazından toplamda 50 fraksiyon toplanarak bu fraksiyonların spektrofotometrik olarak optik dansiteleri 280 nm’ de okundu. Aynı zamanda fraksiyonların spesifik antikor yanıtları ELISA ile belirlendi. Spektrofotometrik olarak 280 nm’ de yapılan okumalarda en yüksek değeri 24 no’ lu fraksiyon verirken, ELISA ile yapılan testte ise en iyi antikor yanıtının 25 no’ lu fraksiyona ait olduğu belirlendi.



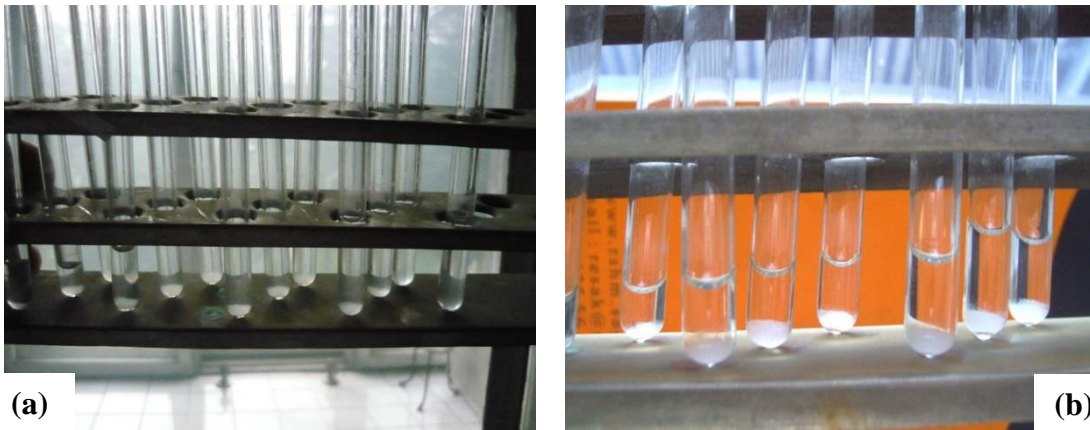
Resim 4.4. 5A5 klonunun üst sıvısının jel filtrasyon kolonundan alınan kromatogramı



Şekil 4.11. Jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılan 5A5 klonu antikorlarının ELISA ve 280 nm’deki absorban değerleri

4.7. İn vitro Nötralizasyon Test Bulguları

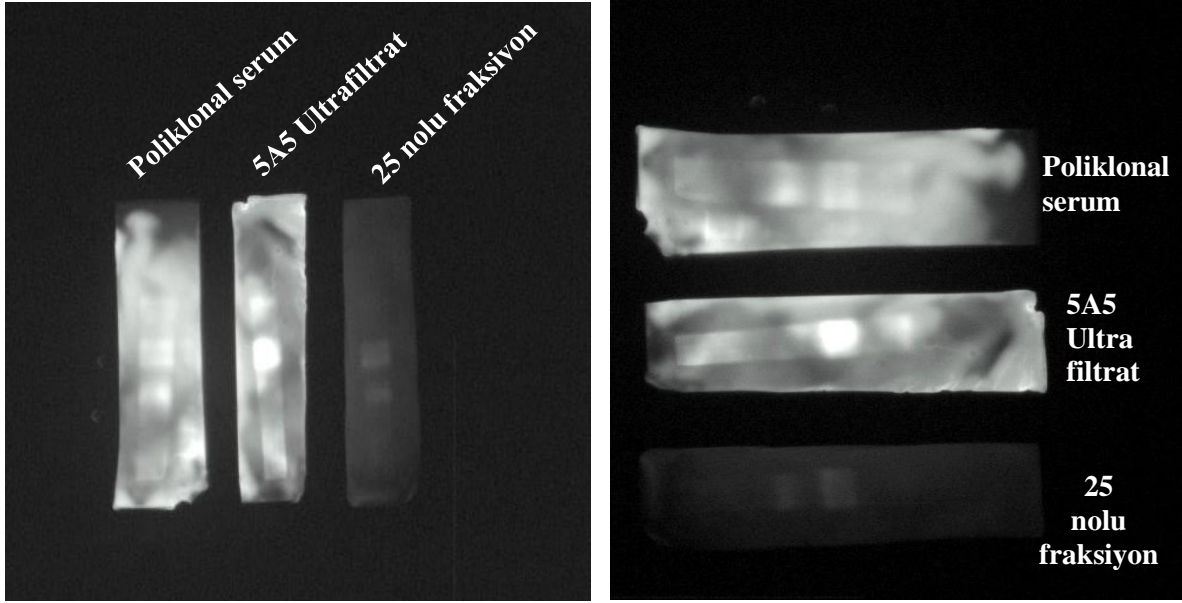
Jel filtrasyon kromatografi cihazından alınan ve ELISA testinde en iyi antikor yanıtı veren 25 nolu fraksiyon kullanılarak, in vitro nötralizasyon testi yapıldı. Bu işlem için deney tüplerine belirli konsantrasyonda ve değişen hacimlerde difteri toksoidi konulup, tüplere 1’er ml 25 nolu tüpteki fraksiyondan ilave edildi. Tüpler daha sonra 50 °C’deki su banyosunda bekletilerek ilk bulanıklığın meydana geldiği tüp tespit edildi. Sonuç olarak, spin kolonla ultrafiltre edilen örnek için flokülasyon değeri 40 Lf/ml, jel kromatografisiyle saflaştırılan 5A5 hücre klonu üst sıvısı için ise bu değer 5 Lf/ml olarak bulundu.



Resim 4.5. İn vitro nötralizasyon testi için hazırlanan tüplerin flokülasyondan sonraki görünümleri

4.8. Western Blot Bulguları

5A5 monoklonal antikorunun jel filtrasyon kromatografî metoduyla saflaştırılmasıyla elde edilen ve ELISA ile en iyi antikor yanıtı veren 23, 24 ve 25 nolu fraksiyonlarda, difteri toksinine karşı üretilen monoklonal antikorun varlığını doğrulamak amacıyla Western blot analizi yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, elimizde bulunan difteri toksoidi % 12 konsantrasyonundaki SDS-PAGE jelde yürütüldükten sonra proteinler PVDF membrana aktarılmış ve spesifik olmayan bağlanmaları en aza indirmek için membran % 5' lik BSA (bovin serum albumin) PBS-Tween çözeltisi ile bloklanmıştır. Daha sonra membranlar birincil (primer) ve ikincil (sekonder) antikorlarla işaretlenip görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Difteri antijeninin SDS-PAGE' de yürütülmesiyle toksininin A ve B fragmentlerine ait bantlar gözlemlenmiştir. Yapılan Western blot analizi sonunda Resim 4.6' da görüldüğü gibi birinci membranda, füzyonda kullanılan farenin kan serumuyla çalışılmış olup, poliklonal antikorlar için çok sayıda bant gözlenmiştir. İkinci membranda ise ultrafiltrasyon işleminden sonra elde edilen filtratla çalışılmış ve yine birden fazla bant gözlenmiştir. Üçüncü membranda ise jel filtrasyon kromatografî sonrası elde edilen 25 nolu fraksiyonla çalışılmış ve belirgin bir şekilde bir bant ve yanında şiddeti diğerine göre daha az olan ikinci bir bant gözlenmiştir. Başlangıçta difteri toksoidinin SDS-PAGE' de yürütülmesi sonucu toksinin A ve B fragmentine ait 2 bant gözlemlendiğinden, western blotlama sonrası elde edilen üçüncü banttaki iki bant, 5A5 klonundaki monoklonal antikorların difteri toksininin hem A hem de B fragmentine karşı geliştiğini düşündürmektedir. Böylelikle western blot sonrası 25 nolu fraksiyonda difteri toksininin A ve B fragmentlerine karşı, poliklonal serum ve ultrafiltrata göre daha saf olarak monoklonal antikorun oluştuğu gözlenmiştir.



Resim 4.6. Difteri toksinine karşı monoklonal antikor üretimi çalışmalarında farklı kaynaklardan alınan örnekler için Western blot görüntüleri, a) Fareden alınan kan serumundaki poliklonal antikorlar, b) 5A5 klonunun ultrafiltrasyon işleminden sonra elde edilen ultrafiltrat, c) Jel filtrasyon sonrası elde edilen 25 nolu fraksiyon

4.9. İzotiplendirme Bulguları

Bir antikorun izotipini belirlemesi çoğu zaman bu antikorun tanı sistemlerinde kullanılması için işaretlenmesinde, saflaştırma metodunun belirlenmesinde ve çalışmalarda kullanılacak ikincil (sekonder) antikorun immünglobulin sınıfına karar verilmesi gibi işlemler için önem taşımaktadır. Yapılan çalışmada; difteri toksinine özgün 5A5 monoklonal antikorun immünoglobulin tipi ve alt tipi, Roche firmasından temin edilen kit ile belirlenmiştir. 5A5 monoklonal antikorun immünglobulin tipi IgG1 ve hafif zincirinin ise κ (kappa) olduğu belirlenmiş olup, literatürde yer alan çalışmalarla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

M.Ö. 7. yy' da Hipokrat tarafından tanımlanan difteri, genellikle bademcikler, yutak, gırtlak gibi üst solunum yollarında görülen, etkeni *Corynebacterium diphtheriae* bakterisi olan akut enfeksiyöz bir hastalıktır [1]. 1923 yılında difteri aşısının bulunmasıyla birlikte 1930' lardan 1940' lı yıllara kadar aşının yaygın kullanımı, hastalığın önemli ölçüde azalmasını sağlamıştır. Dünyada 1920' li yıllarda başlayan difteri toksoidi ile bağışıklama çalışmaları günümüzde de devam etmektedir. [12].

Difteri hastalığının tarihsel gelişimine bakıldığında, 16. ve 17. yüzyıllarda İspanya' da, 18. ve 19. yüzyılda İngiltere, Avusturya, Almanya ve Danimarka' da epidemiler görülmüştür. Avrupa' ya baktığımızda, 1982-1985 ve 1990-1995 yıllarında iki epidemi kaydedilmiştir. Bu epidemiler Rusya ve Ukrayna başta olmak üzere özellikle Sovyet Cumhuriyetleri' nde etkisini göstermiştir. Aynı dönemde birçok Avrupa ülkesinden bildirilen vakaların %95' ini de Rusya ve Ukrayna kökenli olgular oluşturmaktadır [2].

Dünya sağlık örgütünün 2013 verilerine bakıldığında, difterinin hala günümüzde var olan bir hastalık olduğu görülmektedir. Bu veriler doğrultusunda; Bangladeş, Afganistan, Brezilya, Dominik Cumhuriyeti, Hindistan, İran, Irak, Letonya, Myanmar, Nepal, Nijerya, Pakistan, Rusya, Tayland, Ukrayna gibi ülkelerde, 2000 yılından sonraki bütün yıllarda belirli sayıda difteri olguları görülmüştür [3].

Difteri hastalığının ülkemizde görülme oranı 1960-1999 yılları arasında belirli bir düzeyde seyretmiş olup, çeşitli aşılama politikaları ile günümüzde nadir rastlanan bir hastalık halini almıştır. En son, ülkemizde 2011 yılında Ankara' da ve 2012 yılında Adana' da birer vaka görülmüş olup, bu vakalar ölümle sonuçlanmıştır. Aşılama programları ile difteri vakaları geçmişten günümüze önemli ölçüde azalmıştır, fakat aşılama ile kazanılan bağışıklık yaşam boyu sürmemekte ve destek doz yapılmadığında bağışıklık kaybedilmektedir. Hastalığın günümüzde görülme sıklığı azalmış olsa da, yetişkin bireylerde duyarlılığın yüksek olması, ülkenin bazı bölgelerinde aşılama ve bağışıklık düzeylerinin düşük olması gibi nedenler difteriyi hala potansiyel bir sorun olarak gündemde tutmaktadır [2].

Georges Köhler ve Cesar Milstein, 1972' li yılların ikinci yarısında geliştirdikleri yeni bir teknikle monoklonal antikor geliştirdiler ve bu çalışmalarlarıyla 1984 yılında fizyoloji ve tıp alanında Nobel ödülü aldılar. Monoklonal antikorlar, hibrit hücreler tarafından üretilerek, hedef antijenin sadece bir epitopuna bağlanabilirler. Monoklonal antikorların kaynağı olan bu hibrit hücreler; sonsuz çoğalma yeteneğine sahip olan myeloma (kemik iliği tümör) hücreleriyle, bağışık bir hayvandan alınan dalak B-lenfosit hücrelerinin çeşitli yöntemlerle kaynaşmaları sonucunda oluşurlar. Hibridoma teknolojisinin gelişmesiyle monoklonal antikorlar; kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde ve tanısında, ticari proteinlerin saflaştırılmasında, alerjik hastalıkların teşhisinde, hormon testlerinde, kompleks karışımların saflaştırılmasında, bazı özelleşmiş hücrelerin tanımlanmasında, aşuların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadırlar [118].

Difteri toksinine karşı monoklonal antikor üretmek için yapılan bu tez çalışmasında, antijen olarak difteri toksoidi kullanılmıştır. Kullanılan bu difteri toksoidi ticari olarak temin edilmiş olup yüksek saflıkta olduğu bilinmektedir. Deney hayvanı olarak 6-8 haftalık Balb/c türü fare kullanılmış ve difteri toksoidi bu farelere belirli zaman aralıklarıyla enjekte edilmiştir. İmmünizasyon işlemlerinde difteri toksoidinin antijenik etkinliğini arttırmak amacıyla bazı enjeksiyonlar, uygun adjuvan maddelerle yapılmıştır. Farelere enjekte edilen difteri toksodi için doz optimizasyonu yapılmış ve en iyi immün yanıtın alındığı antijen miktarının 46 µg/ml olduğu belirlenmiştir.

Her immünizasyon işleminden belirli bir süre sonra farelerden kuyruk kanı alınarak, farelerin antijene karşı oluşturdukları immün yanıt ELISA testi ile belirlenmiştir. Yapılan ELISA çalışmaları için, miktar ve uygun madde optimizasyonları yapılmıştır. ELISA için yapılan optimizasyon çalışmalarında düz tabanlı, U tabanlı ve V tabanlı farklı ticari markalarda ELISA plakları kullanılmış ve en iyi sonuç düz tabanlı plakta alınmıştır. ELISA' da bloklama işlemi için; % 0,2 , % 0,4 ve % 1 konsantrasyonlarında olacak şekilde yağsız süt tozu, kazein ve BSA (bovine serum albumin) kullanılmış ve en iyi sonuç % 0,2 konsantrasyondaki kazein çözeltisi ile alınmıştır.

ELISA testi için farelerden alınan kan serumları PBS tamponunda farklı oranlarda seyreltilerek (1/10-1/10 000) kullanılmıştır. Yapılan ELISA testleri sonucunda en iyi serum seyreltme oranının 1/100 olduğu ve en iyi immün yanıtı sol kulağı kesik farenin verdiği belirlenmiştir. Füzyon işleminde kullanmak için sol kulağı kesik fare seçilmiş ve diğer iki

adet farenin dalağı da uygun aseptik şartlarda izole edilerek sıvı azotta (-196 °C) muhafaza edilmiştir. Füzyon işleminden önce bağışıklanmamış sağlıklı durumda olan Balb/c türü farelerin karın peritonundan besleyici hücreler alınarak, füzyon sonrası hücre ekimi yapılacak plaklara aktarılmış ve böylelikle hibridomaların sağlıklı bir şekilde gelişmesi sağlanmıştır.

Füzyon işlemi için seçilen fare etik kurallar gözetilerek uygun bir yöntemle öldürülmüş ve steril şartlarda karın kısmı açılarak dalağı çıkarılmıştır. Dalağın beklenenden daha büyük olduğu gözlenmiş ve uygun bir şekilde ezilerek PBS tamponunda süspanse edilmiştir. Daha sonra dalak ve myeloma hücreleri için thoma lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. Füzyonda kullanılacak fareden alınan dalak için hücre sayısı 34×10^7 , myeloma hücreleri için ise; $8,1 \times 10^7$ olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada kimyasal aracılı füzyon işlemi yapılmıştır. Hücre hibridizasyon işleminde en çok kullanılan kimyasal olan polietilen glikol (PEG 4 000) kullanılmıştır. PEG, hücrelerin zarında bulunan çift lipit tabakasının yapısını bozarak membran akışkanlığını artırır ve böylece hücre füzyonunu kolaylaştıracak şekilde görev yapar. Hücre sayımları yapılan dalak ve myeloma hücreleri PEG ortamında, belirli bir prosedüre uyularak bir araya getirilmiş ve böylelikle hücrelerin kaynaşması sağlanmıştır. Ayrıca füzyon sonrasında kültür ortamında istenmeyen hücreleri uzaklaştırarak hibrit hücrelerin seçimini kolaylaştırmak için HAT (hipoksantin-aminopterin-timidin) seçici ortamı kullanılmıştır.

Füzyon sonrasında ekim yapılan plaklardaki bütün kuyular mikroskopla hergün kontrol edilmiştir. Monoklonal antikorlar tek klondan çoğalan hücreler tarafından üretildiğinden, kuyulardaki tek hücreden meydana gelen klonlar seçilerek, farklı kuyulara aktarılmış ve böylece tek klondan üreyen hücrelerin çoğalması sağlanmıştır. Daha sonra seçilen hücreler için ELISA testi yapılmış ve 18 adet kuyuda pozitif sonuç elde edilmiştir. Pozitif sonuç veren hücreler 6 kuyulu plaklara aktarılmış ve fazla miktarda üremeleri sağlanmıştır. Yapılan ELISA testleri sonrasında en iyi sonucu 5A5 klonu vermiştir. Bu klon için ELISA testleri tekrarlanarak sonuçlar doğrulanmıştır. 5A5 klonundan oluşan hücre üst sıvısı yaklaşık olarak 150 ml hacminde toplanmış, antikorların bu üst sıvıdan önce saflaştırma işlemi sonrasında tanımlama ve karakterizasyonu yapılmıştır.

Monoklonal antikorların saflaştırılmasında çeşitli yöntemler geliştirilmiş olup, kullanım amacına göre seçilecek olan saflaştırma metodu da değişkenlik gösterir. Bu yöntemlerden başlıcaları; amonyum sülfat presipitasyonu, kaprilik asit, dietilaminoetil (DEAE), hidroksiapatit, jel filtrasyon, amonyum sülfat ve DEAE birlikte, Protein A veya G kolunu, antijen afinite kolonu, Anti-IgG kolonu gibi yöntemlerdir. İstenilen saflığı elde edebilmek için çoğu kez birkaç yöntem bir arada kullanılır [92, 115]. Bu tez çalışmasında elde edilen 5A5 hücre üst sıvısını saflaştırmak amacıyla bizi sonuca kısa yoldan ulaştıracak, az maliyetli, istenilen saflıkta ürün elde edebilmemizi sağlayan ve imkanlarımız dahilinde olan ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon metotları kullanılmıştır.

Monoklonal antikorların saflaştırılmasında en büyük sorunlardan birisi de bu kültür ortamından gelen serum albümininin, antikorların bulunduğu ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Bu amaçla öncelikle elimizde bulunan ham örneğin protein içeriğine bakılmış ve ortamda oldukça fazla miktarda protein olduğu belirlenmiştir. Kültür üst sıvısında besiyerinden gelen albüminin molekül ağırlığının yaklaşık olarak 66.5 kDa olduğu bilindiğinden, 100 kDa' dan daha küçük proteinleri elimine eden spin kolon kullanılmıştır. Ultrafiltrasyon sonrasında konsantre olan ürünün tekrar protein içeriğine aynı yöntemle bakılmış ve ortamdan büyük miktarda proteinin ayrıldığı belirlenmiştir.

Ultrafiltrasyonla konsantre edilen kültür sıvısı daha sonra jel filtrasyon kromografi yöntemiyle saflaştırılmıştır. FPLC (Fast protein liquid chromatography) cihazından alınan kromatogram incelendiğinde; albümin proteini için herhangi bir olası pik gözlenmemekle birlikte, immünglobulin G proteini için beklenen aralıkta pik görülmüştür. Bu aşamadan sonra jel filtrasyon sonrası alınan kromatogramda aktivite gözlenen tüpler için ELISA testi yapılarak, antikor aktivitesinin varlığı araştırılmıştır. Kromatografi cihazından toplam 50 adet fraksiyon alınmış ve bütün fraksiyonlar için 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik değerleri okunarak grafiğe geçirilmiştir. Aynı şekilde bütün fraksiyonlar için ELISA testi yapılmıştır. Bu işlemlerin sonucunda, yapılan 280 nm spektrofotometrik okuma sonuçlarıyla ELISA sonuçlarının, FPLC cihazından alınan kromatogramdaki sonuçlarla aynı olduğu görülmüş ve saflaştırma işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Saflaştırma işlemi sonrasında ELISA ile en iyi aktivite veren 24, 25 ve 26 nolu fraksiyonlar için western blot analizi yapılmıştır. Analiz için difteri toksoidi SDS-PAGE elektroforeziyle yürütülmüş ve iki bant gözlenmiştir. Daha önce yapılan literatür

çalışmalarından da bilindiği gibi, difteri toksininin A ve B olmak üzere iki alt birimi (fragmenti) bulunmaktadır ve bu iki alt birime ait bantlar jelde gözlenmiştir. Western blot analizinde primer antikor olarak 24, 25 ve 26 nolu fraksiyonlar kullanılmış olup, alınan analiz sonucu görüntülerden, üretilen monoklonal antikorun, toksininin A ve B fragmentine karşı olduğu görülmüştür. Böylece yapılan çalışmada başarılı bir şekilde difteri toksinine karşı üretilen monoklonal antikorun varlığı doğrulanmıştır.

Yapılan çalışma sonrası elde edilen 5A5 monoklonal antikorunun, difteri toksinini nötralize edip etmediğini araştırmak amacıyla in vitro nötralizasyon testi yapılmıştır. Bu işlem için deney tüplerine farklı miktarlarda antijen ve aynı miktarlarda 5A5 monoklonal antikorunun bulunduğu 25 nolu fraksiyondan ve ultrafiltrattan ilave edilerek, tüplerde meydana gelen bulanıklıklar zamana karşı değerlendirilerek sonuçlara ulaşılmıştır. İn vitro nötralizasyon test sonucunda spin kolonla ultrafiltre edilen örnek için flokülasyon değeri 40 Lf/ml, jel kromatografisiyle saflaştırılan 5A5 hücre klonu üst sıvısı için ise bu değer 5 Lf/ml olarak bulunmuştur. Bu çalışmada üretilen monoklonal antikorun difteri toksini için iyi düzeyde nötralizasyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, ultrafiltratın nötralizasyon değerinin 40 Lf/ml, 25 nolu fraksiyonun 5 Lf/ml olması da, aynı miktardaki antikor karışımının jel filtrasyon metoduyla saflaştırılmasıyla daha seyreltik duruma geldiği belirlenmiştir.

Hibridoma teknolojisiyle üretilen bir monoklonal antikorun alt tipininin belirlenmesi, bu antikorun tanı sistemlerinde kullanılmasında, saflaştırma metodunun seçiminde karakterizasyon çalışmalarının yapılmasında önem arz etmektedir. Bu çalışmada üretilen 5A5 monoklonal antikorunun alt tipi, ticari olarak temin edilen izotiplendirme kiti ile belirlenmiştir. 5A5 monoklonal antikorunun immünglobulin tipi IgG1 ve hafif zincirinin ise κ (kappa) olduğu belirlenmiş olup, literatürde yer alan çalışmalarla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Difterinin erken tanı ve tedavisi difteri prognozu açısından oldukça önemlidir. Günümüzde difterinin klinik tanısında en yaygın kullanılan ve “altın standart” olarak değerlendirilebilecek yöntem kültür yöntemidir. Kültürlerde üremenin değerlendirilmesi en az 4 günde tamamlanır. Biyotiplendirme sonucunda kuşkulu kolonilerin *C.diphtheriae* olduğu saptandığında, toksijenik olup olmadığının da araştırılması gerekir [1, 2, 11]. Toksin araştırmasında günümüzde yaygın olarak Elek testi ve polimeraz zincir reaksiyonu

(PZR) gibi iki önemli metot kullanılmaktadır. Özetle; difteri olgusu meydana geldikten sonra, tanısının yapılması hasta kişi için kritik sayılabilecek uzun bir süreyi kapsamaktadır. Böyle bir durumda tanısı geciken vakalar ölümlerle sonuçlanmaktadır. Kültür yöntemine alternatif olarak geliştirilen monoklonal antikor tabanlı tanı kitleri, bu anlamda oldukça hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir. Bilindiği gibi ülkemizde kullanılan monoklonal antikor temelli birçok ilaç ve tanı kitleri yüksek maliyetlerle yurt dışından ithal edilmektedir. Bu durum ülke ekonomisinin yurt dışına bağımlılığını beraberinde getirmektedir. Bu durumda monoklonal antikor üretimi ve tanı kitlerinin geliştirilmesi de oldukça büyük önem kazanmaktadır. Yapılan literatür araştırmaları, ülkemizde difteri toksinine karşı şimdiye kadar monoklonal antikor çalışmalarının yapılmadığını ve bu konuda sadece yurt dışındaki araştırmacıların çalıştığı görülmüştür. Bugün ülkemizde difteri hastalığının önlenmesinde kullanılan aşular yurt dışından ithal edilmektedir. Bu durumlar göz önünde bulundurularak üretilen 5A5 monoklonal antikoru için ileri çalışmalar yapılarak, difterinin erken tanısında kullanılabilecek tanı kitleri hazırlanabilir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). (1994). *Diphtheria: Manual for Management and Control of Diphtheria in the European Region*. Copenhagen: World Health Organization (WHO), 2-16.
2. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü. (2003). *Difteri Hastalığının Kontrolü İçin Saha Rehberi*. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, 1-23.
3. İnternet: World Health Organization. Diphtheria reported cases. WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system 2014 global summary. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fapps.who.int%2Fimmunization_monitoring%2Fglobalsummary%2Ftimeseries%2Ftsincidediphtheria.html&date=2014-09-08 Son Erişim Tarihi: 08.09.2014.
4. Ribatti, D. (2014). From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: An historical reappraisal. *Immunology Letters*, 161: 96-99.
5. Köhler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity, *Nature*, 256: 495-497.
6. Lyubavina, I. A., Valyakina, T. I., Grishin, E. V. (2011) Monoclonal Antibodies Labeled with Colloidal Gold for Immunochromatographic Express Analysis of Diphtheria Toxin. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 37: 326-332.
7. Buss, N. A., Henderson, S. J., McFarlane, M. Shenton, J. M. and Haan, L. (2012). Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Current Opinion in Pharmacology*, 12: 615-622.
8. Reichert, J. and Pavlou, A. (2004). Monoclonal antibodies market. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1-2.
9. Yagami, H., Kato, H., Tsumoto, K. and Tomita, M. (2013). Monoclonal antibodies based on hybridoma technology, *Patent Review: Pharmaceutical Patent Analyst*, 2: 249-263.
10. Evans, J. B. and Syed, B. A. (2014). Next-generation antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1-2.
11. Bilgehan, H. (1986). Gram olumlu sporsuz basiller. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*, (Üçüncü Baskı). İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. 370-395.
12. Guilfoile, P. (2009). *Diphtheria. Deadly Diseases And Epidemics*. New York: Infobase Publishing, 10-72.
13. Pappenheimer, A. M. (1977). Diphtheria Toxin. *Annual Reviews Biochemistry*, 46:69-94.
14. Özcengiz, E. (2003). Difteri Bağışıklaması. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 12(3), 103.

15. Funke, G. ve Bernard, A. K. (1999). *Coryneform gram-positive rods. Manual of Clinical Microbiology*, (Seventh Edition). Washington: American Society of Microbiology, 319-345.
16. Bilgehan, H. (2000). *Gram olumsuz sporlu basiller, Gram olumlu sporlu basiller. Klinik Mikrobiyoloji*, (Onuncu Baskı). İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. 364-377, 400-421.
17. Cavalieri, S. J., Knoop, F. C., Enna, S. J. and Bylund, D. B. (2007). *The Comprehensive Pharmacology Reference*. Ülke: xPharm, 1-5.
18. Ertem, E., Serter, D. ve Gökengin, D. (2000). *Başlıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 206-211.
19. Bilgehan, H. (2002). *Gram olumlu sporsuz bakteriler. Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, (Üçüncü Baskı). İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. 553-558.
20. Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S. and Morse, S. A. (2007). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology* (Twenty-Fourth Edition). ABD: The McGraw-Hill Companies, 212-222.
21. Kıyan, M. Fındık, D., Ustaçelebi, Ş., Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, T. A., Tümbay, E. ve Mete, Ö. (1999). *Bakteriyoloji. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, (Birinci Baskı). Ankara: Güneş Tıp Kitabevi. 387-399, 624-649.
22. Levinson, W. (2008). *Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji*. (Çev: Özgüvenen, T.), (Dokuzuncu Baskı). Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 371-391.
23. Onul, B. (1980). *İnfeksiyon Hastalıkları, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını*, (391), 676-696.
24. Willke Topçu, A., Söyletir, G. ve Doğanay, M. (2008). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, (Üçüncü baskı), İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 2, 2081-2088.
25. Pan American Health Organization, (2005). *Control of Diphtheria, Pertussis, Tetanus, Haemophilus influenzae type B, and Hepatitis B Field Guide*. Washington: Scientific and Technical Publication No. 604, 1-10.
26. Fauci, A. S., Braunwald, E., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L. and Loscalzo, J. (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Seventeenth Edition). ABD: McGraw-Hill, 113-115.
27. Engler, K. H., Glushkevich, T. Mazurova, I. K., George, R. C. And Efstratiou, A. (1997). A Modified Elek test for Detection of toxigenic corynebacteria in the diagnostic laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(2), 495-497.
28. World Health Organization (WHO). (1994). *Manual for the Laboratory Diagnosis of Diphtheria*. Copenhagen, World Health Organization (WHO).
29. Arısoy, E. S. (2007). Ergenlerde Aşılama. *Çocuk Enfeksiyon Dergisi*, 1: 11-4.

30. İnternet: T.C. Sağlık Bakanlığı Çocukluk Dönemi Aşı Takvimi. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fthsk.saglik.gov.tr%2FDosya%2Fhalk_sagligina_yonelik_bilgiler%2Fasi_takvimi_07022014.pdf&date=2014-09-10, Son Erişim Tarihi: 10.09.2014.
31. Goldman, L. and Schafer, A. I. (2011). *Goldman's Cecil Medicine* (Twenty-fourth Edition). ABD: Elsevier Saunders, 1832-1833.
32. Both, L., White, J. and Efstratiou, A. (2014). Access to diphtheria antitoxin for therapy and diagnostics. *Euro Surveill*, 19(24), 1-6.
33. İnternet: Diphtheria. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.uic.edu%2Fsph%2Fprepare%2Fcourses%2Fph500%2Fresources%2Fdiphtheria.pdf&date=2014-09-09>, Son Erişim Tarihi: 09.09.2014.
34. Galazka, A. (2000). The Changing Epidemiology of diphtheria in the vaccine era. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 2-9.
35. Dittmann, S., Wharton, M., Vitek, C., Ciotti, M., Galazka, A., Guichard, S., Hardy, I., Kartoglu, U., Koyama, S., Kreysler, J., Martin, B., Mercer, D., Ronne, T., Roure, C., Steinglass, R., Strebel, P., Sutter, R. and Trostle, M. (2000). *Successful Control of Epidemic Diphtheria in the States of the Former Union of Soviet Socialist Republics: Lessons Learned*, 181(1), 10-22.
36. Özmert, E. N. (2008). Dünya'da ve Türkiye'de aşılama takvimindeki gelişmeler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 51: 168-175.
37. Doğan, H., Hot, İ. ve Kesmezacar, Ö. (2006). Difteri Aşısı: Koruyucu Hekimlik Tarihinden Bir Örnek. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 37:110-114.
38. İnternet: Doğan Haber Ajansı. Ankara' da kuşpalazı ölümü. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.dha.com.tr%2Fankarada-kuspalazi-olumu_139595.html&date=2014-09-16, Son Erişim Tarihi: 17.09.2014.
39. İnternet: Trt Haber. Adana\da Difteri Şüphesi. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.trthaber.com%2Fhaber%2Fsaglik%2Fadanada-difteri-suphesi-49405.html&date=2014-09-16>, Son Erişim Tarihi: 16.09.2014.
40. Arda, M. (1986). *İmmünoloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, 1-226.
41. Özbal, Y. (2000). *Temel İmmünoloji*, (İkinci Baskı). İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri, 203-207.
42. Kılıçturgay, K. (2003). *İmmünoloji*, (Üçüncü Baskı). İstanbul: Nobel&Güneş Kitapevi, 204-248.
43. Roitt, I., Delves, P., Martin, S. and Burton, D. (2006). *Roitt's Essential Immunology*, (Eleventh Edition). ABD: Wiley-Blackwell Publishing, 21-36.

44. Ajjan, N. (1995). *Başışıklama*, (Çev. Pekus M.). İstanbul: Pasteur Merieux Serum ve Aşı, (İkinci Baskı). 7-21.
45. Bilgehan, H. (2008). *Temel Mikrobiyoloji ve Başışıklık Bilimi*, (Onikinci Baskı). İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. 303-342.
46. İnternet: BSCI423 Immunology Lab. Cells and Organs of the Immune System. URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.life.umd.edu%2Fclassroom%2Fbsci423%2Fsong%2FLab1.html&date=2014-09-08> Son Erişim Tarihi: 08.09.2014.
47. Burry, R.W. (2010), *Immunocytochemistry: A Practical Guide for Biomedical Research*, New York: Springer Science+Business Media, 7-16.
48. Abbas, K. A., Lichtman, H. A. and Pillai, S. (2010). *Cellular and Molecular Immunology*. (Sixth edition). Philadelphia: Saunders Elsevier. 75-97, 153-243.
49. Bringer, A. T., Leahyt, D. J., Hynes, T. R. And Fox, R. O. (1991). The 2.9 Å resolution structure of an anti-dinitrophenyl-spin-label monoclonal antibody Fab fragment with bound hapten. *Journal of Molecular Biology*, 221, 239-256.
50. Janeway, C., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology*. (Fifth edition). London: Garland Publishing. ?
51. Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies A Laboratory Manuel*. ABD: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1-318.
52. İnternet: Antibodies. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.novimmune.com%2Fsience%2Fantibodies.html&date=2014-09-16>, Son Erişim Tarihi: 16.09.2014.
53. Rojas, R. and Apodaca, G. (2002). Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 944-956.
54. Gülmezoğlu, E. ve Ergüven, S. (1994). *İmmünoloji*. Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık, 125-252.
55. Chapel, H., Haeney, M., Misbah, S. and Snowden, N. (1999). *Essentials of Clinical Immunology* (Fourth edition). London: Blackwell Science, 1-10.
56. Kuby, J., Goldsby, A. R., Kindt, J. T. and Osborne, A. B. (2002). *Immunology*. (Fifth edition). ABD: W.H. Freeman & Company, 138-200, 148-154.
57. Dunbar, B. S., Schwoebel, E. D., Deutscher, M. P. (1990). *Methods in Enzymology*. İngiltere: Academic Press, 182:663-700.
58. Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trude, L. J. and Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) Journal*, 46(3), 258-268.

59. Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M. and Strober, W. (1991) Antibody detection and preparation, *Current Protocols in Immunology*, ABD: John Wiley and Sons Ltd., 2(1), 1-16.
60. Chandel, P. and Harikumar, S. L. (2013). Pharmaceutical Monoclonal Antibodies: Production, Guidelines to Cell Engineering and Applications. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 13-20.
61. İnternet: Serological reactions, which are used in virology. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fintranet.tdmu.edu.ua%2Fdata%2Fkafedra%2Finternal%2Fmicbio%2Fclasses_stud%2Fen%2Fpharm%2Fprov_pharm%2Fptn%2FMicrobiology%2520with%2520basis%2520immunology%2F2%2FLesson%25206.%2520Serological%2520reactions%2C%2520which%2520are%2520used%2520in%2520virology.htm&date=2014-09-10, Son Erişim Tarihi: 10.09.2014.
62. Acharya, S., Shukla, S., Mahajan, S. N. and Diwan, S. K. (2011). The charisma of “Magic Bullets”– Monoclonal antibodies (mAB/moAB) in clinical medicine. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine*, 12(4), 283-289.
63. Justin, L. K. H. (in press). The History of Monoclonal Antibody Development – Progress, Remaining Challenges and Future Innovations. *Annals of Medicine and Surgery*, doi: 10.1016/j.amsu.2014.09.001.
64. Carter, P. (2001). Improving The Efficacy of Antibody-Based Cancer Therapies. *Nature Reviews Cancer*, 1, 118-129.
65. İnternet: Peptit ve Protein Yapıda Biyoteknoloji Ürünü İlaçlar. Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.eczfak.anadolu.edu.tr%2FbolumSayfaları%2Fbelgeler%2FOnayl%25C4%25B1%2520Rekombinant%2520Antikorlar_20140112041633.pdf&date=2014-09-08 Son Erişim Tarihi: 08.09.2014.
66. Şakalar, Ç., İzgi, K. ve Canatan, H. (2013). Kanser İmmün Terapi ve Monoklonal Antikorlar. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, 27(2), 105-110.
67. Demirelli, F. H. (2005). Hedefe Yönelik Kanser Tedavisi ve Monoklonal Antikorlar. *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği (ANKEM) Dergisi*, 19(2), 123-125.
68. Guidelines on: antibody production. (2002). Kanada: *Canadian Council on Animal Care*, 3-27.
69. Howard, G. C. and Kaser, M. R. (2006). *Making and Using Antibodies A Practical Handbook*, ABD: CRC Press Taylor & Francis Group, 1-125, 361-371.
70. Hau, J. And Hoosier, V. (2003) *Handbook of Laboratory Animal Science* (Second Edition). ABD: CRC Press, 1:397-414.
71. Yücel, F. ve Öztürk, S. (2012). *Hibridoma Teknolojisi ve Antikora Dayalı Tanı Sistemlerinin Geliştirilmesi Uygulamalı Eğitimi Kurs Kitabı*. Kocaeli-Gebze, 63-87.
72. Harini, P. A., HG Kumar, A., Kumar, G. P. and Neeta, S. (2013). An Overview of Immunologic Adjuvants. *Journal of Vaccines & Vaccination*, 4(1), 1-4.

73. Yurdakök, K. ve İnce, T. (2008). Aşı adjuvanları. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, (51), 225-239.
74. O'Hagan, D. (2000). *Vaccine Adjuvants Preparation Methods and Research Protocols*. New Jersey, ABD: Humana Press, 1-105.
75. Hanly, W. C., Artwohl, J. E. and Bennett, B. T. (1995). Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) Journal*, 37(3), 93-118.
76. Schunk, M. K. and Macallum, G. E. (2005). Applications and Optimization of Immunization Procedures. *Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) Journal*, 46(3), 241-257.
77. Köhler, G., Lefkovits, I. and Pernis, B. (1981). The Technique of Hybridoma Production. *Immunological Methods*, 285-298.
78. Asai, D. J. and Wilder, J. K. (1993). Making Monoclonal Antibodies, *Methods in Cell Biology*, (37), 57-74.
79. Shirahata, S., Katakura, Y. and Teruya, K. (1998). Cell hybridization, hybridomas, and human hybridomas, Laboratory of Cellular Regulation Technology. *Methods in Cell Biology*, (57), 111-145.
80. Campbell, A. M., Vliet, P. C. (1991). *Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Hollanda: Elsevier Science Publishers, vol:23, 189-204.
81. Okada, Y. (1993). Sendai Virus-Induced Cell Fusion. *Methods in Enzymology*, (221), 18-41.
82. Okada, Y., Düzgüneş, N. and Bronner, F. (1998). *Current Topics in Membranes and Transport: Membran Fusion in Fertilization Cellular Transport and Viral Infection*, İngiltere, Londra: Academic Press, 18-41.
83. Davidson, R. L. and Prescott, D. M. (1977). *Methods in Cell Biology*. ABD: Academic Press, (15), 335-337.
84. HuI, S. W. and Stenger, D. A. (1993). Electrofusion of cells: Hybridoma production by electrofusion and Polyethylen glycol. *Methods in Enzymology*, (220), 212-227.
85. Neil, A. and G., Zimmermann, U. (1993). Electrofusion. Membrane Fusion Techniques Part A, *Methods in Enzymology*, (220), 174-196.
86. Usaj, M., Trontelj, K. Miklavcic, D. and Kanduser, M. (2010). Cell–Cell Electrofusion: Optimization of Electric Field Amplitude and Hypotonic Treatment for Mouse Melanoma (B16-F1) and Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *The Journal of Membrane Biology*, (236), 107–116.
87. Scott-Taylor, T. H., Pettengell, R., Clarke, I., Stuhler, G., La Barthe, M. C., Walden, P. and Dalglish, A. G. (2000). Human tumour and dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential for cancer vaccines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 265–279.

88. Köhler, G. (1985). Derivation and diversification of monoclonal antibodies. *The EMBO Journal*, 4(6), 1359-1365.
89. Akçael Aslankaraoğlu, E. (2006). *Poliester Fiber Destekli Dolgulu Reaktörlerde Hibridoma Kültürü ve Monoklonal Antikor Üretimi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
90. Engvall, E., Perlman, P.O. (1971). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, (8)871-875.
91. Crowther, J.R. (1995). *Methods in Molecular Biology: ELISA theory and practice*, ABD: New Jersey: 42: 1-99, 131-149.
92. Korkmaz, M. ve Ok, Z. Ü. (2011). *Parazitolojide Laboratuvar*. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği, Meta Basım, 219-235.
93. Goding, J. W. (1996). *Monoclonal Antibodies Principles and Practice* (Third Edition). ABD: Academic Press, 141-191.
94. Campbell, A. M., Burdon, R. H. and Knippenberg, P. H. (1984). *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Monoclonal Antibody Technology*. Hollanda, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 13: 151-165.
95. Even, M. S., Sandusky, C. B. and Barnard, N.D. (2006). Serum-free hybridoma culture: Ethical, scientific and safety considerations. *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108.
96. Jaspert, R., Geske, T., Teichmann, A., Kaszner, Y., Kretzschmar, K. and L'age-Stehr, J. (1995). Laboratory scale production of monoclonal antibodies in a tumbling chamber. *Journal of Immunological Methods*, 178(1), 77-87.
97. A Report of the Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies Institute for Laboratory Animal Research National Research Council. (1999). *Monoclonal Antibody Production*, Washington, ABD: National Academy Press, 4-34.
98. Jackson, L. R., Trudel, L. J., Fox, J. G. and Lipman, N. S. (1999). Monoclonal Antibody Production in Murine Ascites, I. Clinical and Pathologic Features. *American Association for Laboratory Animal Science*, 49(1), 70-80.
99. Lova, D., O'Leary, R. and Pujar, N. S. (2006). Future of antibody purification, *Journal of Chromatography B*, (848), 48-63.
100. Ansar, W. and Ghosh, S. (2013). Monoclonal Antibodies: A Tool in Clinical Research, *Indian Journal of Clinical Medicine*, 4: 9-21.
101. Zola, H. and Thomson, P. R. (2001). Monoclonal Antibodies: Diagnostic Uses. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-9.
102. Çırakoğlu, Beyazıt. (2002). Genetik 2: Monoklonal Antikorlar. *TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi*, 6-7.

103. Nelson, A. L., Dhimolea, E. and Reichert J. M. (2010). Development trends for human monoclonal antibody therapeutics, *Nature Reviews Drug Discovery*, 9: 767-777.
104. Roitt, I. M., Brostoff, J. and Male, D. K. (2001). *Immunology* (Sixth Edition). ABD, New York : Mosby, 294-300.
105. Ocak, A. R. (2009). *Hibridoma Yöntemiyle Leishmania Tropika Parazitinin Cell Surface Antijenine Karşı Monoklonal Antikor Üretimi ve Saflaştırılması*. Uzmanlık Tezi, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Biyokimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa.
106. Breedveld, F. C. (2000). Therapeutic monoclonal antibodies. *The Lancet*, 355: 735-740.
107. Hayakawa, S., Uchida, T., Mekada, E., Moynihan, M.R. and Okada, Y. (1983). Monoclonal Antibody against Diphtheria Toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 258: 4311-4317.
108. Yoshimori, T., Yamada, M., Sugawa, H., Mekada, E., Uchida, T. and Okada, Y. (1984). Monoclonal antibodies against diphtheria toxin fragment A: Characterization and introduction into living cells. *Experimental Cell Research*, 151: 334-353.
109. Hallas, G., Harrison, T. G., Samuel, D. and Colman, G. (1990). Detection of diphtheria toxin in culture supernates of *Corynebacterium diphtheriae* end C. Ulcerans by immunoassay with monoclonal antibody. *Journal of Medical Microbiology*, 32: 247-253.
110. Gupta, K. C., Agha, R., Santos, E. and Brodeur, B. R. (1992). Isolation of human monoclonal antibodies binding to B fragment of diphtheria toxin. *Human Antibodies Hybridomas*, 3: 25-31.
111. Ouyang, J., Wang, J. W., Wang, C.X., Guo, L., Tuo, H. Z., Cui, T. and Hong, T. (2004). Expression, purification and specific monoclonal antibodies preparation of diphtheria toxin A fragment. *Chinese Journal of Biotechnology*, 20: 689-93.
112. Kakita, M., Takahashi, T., Komiya, T., Iba, Y., Tsuji, T., Kurosawa, Y. and Takahashi, M. (2006). Isolation of a Human Monoclonal Antibody with Strong Neutralizing Activity Against Diphtheria Toxin. *Infection and Immunity*, 74: 3682-3683.
113. Valyakina, T. I., Lakhtina, O. E., Komaleva, R. L., Simonova, M. A., Samokhvalova, L. V., Shoshina, Kalinina, N. A., Rubina, A. Y., Filippova, M. A., Vertiev, Y. V. and Grishin, E. V. (2009). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to the Diphtheria Toxin. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 35: 556-565.
114. St. Groth de Fazekas, S. and Scheidegger, D. (1980). Production of Monoclonal Antibodies: Strategy and Tactics. *Journal of Immunological Methods*, 35:1-21.
115. Denizli, A. ve Küfrevioğlu, İ. Ö. (2010). Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, *Jel filtrasyon kromatografisi ve İyon değişim kromatografisi yöntemleriyle proteinlerin saflaştırılması*, Ankara: Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti., 257-267.

116. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı (2011), *Tıbbi Laboratuvar, Enfeksiyon Hastalıklarının Teşhisinde Kullanılan Serolojik Testler*, Ankara.
117. İnternet: Mustafa Altınışık. İmmünolojik Teknikler. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.mustafaaltinisik.org.uk%2F45-uzm-03.pdf&date=2014-09-08>, Son Erişim Tarihi: 09.08.2014.
118. Little, M., Kipriyanov, S. M., Gall, F. L. and Moldenhauer, G. (2000). Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Review Immunology Today*, 21(8), 364-370.

EKLER

Ek-1 Deney hayvanları uygulama ve etik kursu katılım sertifikası



**XI. DENEY HAYVANLARI
UYGULAMA VE ETİK KURSU**
02-10 Mayıs 2012



KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, **Eda ÇINAR AVAR**

Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından, 02-10 Mayıs 2012 tarihleri arasında düzenlenen “Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu XI” e katılarak, Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. Rıza AYHAN
REKTÖR

Prof. Dr. Gökhan ALPASLAN
ETİK KURUL BAŞKANI

2012/11-41

Prof. Dr. Sacit TURANLI
MERKEZ MÜDÜRÜ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇİNAR AVAR, Eda
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 27.06.1986, Elazığ
Medeni hali : Evli
Telefon : 0 (531) 9292211
Faks : -
E-Posta : edaavar@gazi.edu.tr



Eğitim

| Derece | Okul/Program | Mezuniyet tarihi |
|---------------|--------------------------|------------------|
| Yüksek Lisans | Gazi Üniversitesi/Kimya | 2014 |
| Lisans | Kahramanmaraş Sütçü İmam | 2008 |

İş Deneyimi

| Yıl | Çalıştığı Yer | Görev |
|------------|-------------------|---------------------|
| 2010-devam | Gazi Üniveristesi | Araştırma Görevlisi |

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Kitap, Gezi, Tiyatro



GAZİ GELECEKTİR..