

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**HİBRİDOMA YÖNTEMİ İLE LEISHMANIA
TROPİKA PARAZİTİNİN CELL SURFACE
ANTİJENİNE KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR
ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

ALİ RIZA OCAK

**DANIŞMAN
Prof. Dr. ABDURRAHİM KOÇYİĞİT**

**ŞANLIURFA
2009**

ALİ RIZA OCAK

BİYOKİMYA

UZMANLIK

ŞANLIURFA -2 009

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**HİBRİDOMA YÖNTEMİ İLE LEISHMANİA
TROPİKA PARAZİTİNİN CELL SURFACE
ANTİJENİNE KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR
ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

ALİ RIZA OCAK

**DANIŞMAN
Prof. Dr. ABDURRAHİM KOÇYİĞİT**

Bu tez, Harran Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 825 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ŞANLIURFA
2009**

TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince, benden hiçbir konuda desteğini esirgemeyerek, beni bu çalışmaya teşvik edip yönlendirerek bilgi ve araştırma ufkumu açan ve bana yalnız bir çalışan değil ayrıca bir arkadaş olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT'e teşekkür ederim. Eğitimim süresince her türlü desteklerini esirgemeyen, ilgi ve anlayış ile eğitimimde katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Özcan EREL'e ve Doç. Dr. Nurten AKSOY'a teşekkür ederim. Eğitimim süresi içinde dertlerimizi, sıkıntılarımızı, sevinçlerimizi ortakça paylaştığımız, her zaman sevgi ve saygı çerçevesinde bana bir dosttan daha yakın olan biyokimya laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim. Bu tez ile ilgili eğitimimde emeği geçen TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsünde görev yapan Doç. Dr. Fatıma YÜCEL'e, Doç. Dr. Selma ÖZTÜRK'e ve diğer çalışma arkadaşlarına ve bu tezin yapılmasında maddi destek veren Harran Üniversitesi Bilimsel Akademik Kurulu kurumuna teşekkür ederim.

Her türlü sıkıntımı paylaşan, ümitsizliğimi kıran, dertlerime ortak olan hayat arkadaşım Ayşe KÖSE OCAK'a ve gelecekteki umudum, oğlum Yaman Deniz OCAK'a sevgilerimle...

ÖZET

Leishmania (L) tropika'nın vektörü olan tatarcıklar Akdeniz ülkeleri içinde özellikle Türkiye'nin güneydoğusunda yaygın olarak bulunmaktadır. Hastalığın tanısı erken dönemde konamadığında aylarca ve belki yıllarca iyileşmemekte, enfekte olabilmekte veya skarlaşarak deride kansere kadar giden kalıcı hasarlar bırakabilmektedir. Ayrıca kalıcı hasarlar genç toplumda kozmetik ve psikolojik sorunlara yol açmaktadır. Bir halk sağlığı olan *L. Tropika* enfeksiyonunun önüne geçmek için ülkemizde bir çok sağlık politikaları geliştirilmesine rağmen hala enfeksiyon devam etmektedir. Son yıllarda daha hızlı ve spesifik tanı yöntemleri için araştırmalar artarak sürmektedir. Günümüzde hibridoma yöntemi kullanılarak monoklonal antikorların üretilmesi, teşhiste ve aşı çalışmalarında kullanılması ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır.

“ Hibridoma Yöntemi ile *Leishmania Tropika* Parazitinin Cell Surface Antijenine Karşı Monoklonal Antikor Üretimi ve Saflaştırılması” isimli çalışma ile *Leishmania tropika* enfeksiyonlarının erken tanısına yardımcı olabilecek kitlerin üretimi amaçlanmıştır.

Çalışmada, Hibridoma teknolojisi kullanılarak *Leishmania cell surface* antijeni ile immünize edilen Balb/c farelerden en iyi immün yanıt veren farenin dalak hücreleri ile daha önce temin edilen myeloma hücreleri, polietilen glikol yardımıyla füzyon işlemine alındı. Spesifik olarak monoklonal antikor üreten hibrit hücreler oluşturuldu ve bu hücrelerin sentezledikleri antikorlar, protein A kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Elde edilen kromatografik fraksiyonlardaki antikor spesifitesi, ELISA ile gösterildi.

Anahtar sözcükler: Hibridoma, Monoklonal antikorlar, *Leishmania tropica*, İmmünizasyon, Hücre Füzyonu, ELİSA, Kromatografi.

ABSTRACT

Sand flies, which are vectors of *Leishmania (L) tropica*, have commonly found in particularly South-east area of Turkey among the Mediterranean countries. Since the disease can not be diagnosed in early stages, perhaps, the disease has not been recovered for months and even years and has been impressed permanent damage to scarring on the skin and this lesion may be cancerous. This problem has also caused cosmetic and psychologic problems in the young population. *L. tropica* infection has been continued yet, although it has been developed many health politics in our country, because prevention from this infection is a public health problem. In recent years, more rapid and specific diagnostic methods had been developed. The most popular method among these methods at the present time is the Hybridoma method.

In our study named “Monoclonal antibody production and purification against the cell surface antigen of *Leishmania Tropica* with Hybridoma Method”, we have planned to find out a tool study for early diagnosis of the *Leishmania tropica* infections.

In this study, using Hybridoma Technology, earlier obtained myeloma cell and spleen cells from the most immun respondent mouse among the Balb/c mice immunized with *Leishmania* cell surface antigen is taken to fusion process by using polyethylene glycole. Specifically monoclonal antibody produced by hybridoma cells are developed and antibodies that are synthesized by these cells, are purified by protein A column chromatography. Specificity of these antibodies on chromatographic fractions is showed by ELISA.

Keywords: Hybridoma, Monoclonal antibodies, *Leishmania tropica*, immunization, cell fusion, ELISA, chromatography.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Leishmania (L.) tropica'nın infeksiyonu Akdeniz ülkeleri içinde özellikle Türkiyenin güneydoğusunda yaygın durumda bulunmaktadır. Hastalığın tanısı erken dönemde konamadığı için tedavi edilmemekte, aylarca ve belki yıllarca iyileşmemekte ve skarlaşarak deride kansere kadar gidebilen kalıcı hasar bırakabilmektedir. Ayrıca genç toplumda kozmetik ve psikolojik sorunlara yol açmaktadır. Bir halk sağlığı sorunu olan *L. tropica* infeksiyonunun önüne geçebilmek için ülkemizde birçok sağlık politikaları geliştirilmesine rağmen hala infeksiyon devam etmektedir.

Son yıllarda daha hızlı ve spesifik tanı yöntemleri geliştirmek için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bunlar arasında günümüzde en popüler olanı parazitten izole edilen çeşitli antijenler kullanılarak, Hibridoma yöntemi ile monoklonal antikorların üretilmesi ve bunların immunokimyasal yöntemler kullanılarak tanıda kullanılmasıdır.

İki somatik hücre sitoplazma ve çekirdeklerinin tamamen birbirine kaynaşması anlamına gelen hibridoma yöntemi 1975 yılında Georges Köhler ve Cesar Milstein adlı araştırmacıların koyun alyuvarları ile immünize ettikleri dalak hücreleri ile antikor sentezleyemeyen fare myeloma hücrelerini sendai virus aracılığıyla birleştirmeleri sonucunda oluşan hibrit hücrelerin, sadece alyuvarlara karşı antikor sentezlediklerini ve devamlı üreyebildiklerini belirtmeleri ile ortaya çıkmıştır. Sonraki çalışmalarda virüs çalışmalarındaki verimsizlik nedeniyle kanser (myeloma) hücrelerinden yararlanılmıştır. Bu yöntemde immünize fare dalak B lenfosit hücresiyle, myeloma hücreleri birleştirilerek sonsuz sayıda çoğalan ve sonsuz sayıda, antijene spesifik monoklonal antikor üreten hibrid hücreler oluşturulur.

Bizim araştırmadaki amacımız *L. tropica major* etkenine karşı özgül monoklonal antikor üretmektir. Bu monoklonal antikorlar pürifiye edilerek tanı kitlerinin yapımına öncül olunacaktır. Böylece infeksiyonun erken teşhisi ile hastaların erken tedavisine başlamada bir adım daha atılmış olunacaktır.

Bu çalışmayla birçok hastalığın erken tanı ve takibinde yaygın olarak kullanılan yöntemin bizim ülkemizde de yaygınlaşması ve gerekli alt yapıya katkı sağlanması istenmektedir.

Böylece bu teknik ile tedavi çeşitliliğinin artırılmasında, immün koruyuculukta, aşı yapımının geliştirilmesinde, çeşitli infeksiyöz hastalıklarda ve hatta kanserin tanısı, takibi ve tedavisinde, ülkemize daha yararlı olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Leishmania ve Leishmaniasis

Antartika kıtası hariç bütün diğer kıtalarda görülen leishmaniasis, vektörler aracılığı ile bulaşan zoonotik-antroponotik bir paraziter infeksiyon hastalığıdır. Hastalığın etkeni olan *Leishmania* parazitleri ilk kez William B. Leishman ve Donovan tarafından 1901 yılında saptanmış ve isimlendirilmiştir. Daha sonra bu genus 1903 yılında Ross tarafından Kala-azar etkeni *Leishmania Donovanii*'yi de içerecek şekilde tanımlanmıştır. *Leishmania* genusu Trypanosomatidea ailesinden bir protozoon parazit grubunu oluşturmaktadır (1, 2). Morfolojik olarak farklı olmayan pekçok *Leishmania* türü; göreceli olarak öldürücü olmayan ve kendiliğinden iyileşebilen deri infeksiyonlarından, iç organları tutarak ve epidemiler yaparak binlerce kişinin ölümüne neden olabilen sistemik bir infeksiyona yol açmaktadır (3).

Leishmania, insanların kan ve dokularına yerleşerek leishmaniasise neden olan kamçılı bir parazittir. İnsanlarda ve diğer omurgalı canlılarda 21 *Leishmania* türü, Leishmaniasise neden olmaktadır. Bu türler morfolojik olarak ayırt edilememiştir (4). WHO tarafından sınıflandırılan *Leishmania* türleri Tablo 2. 1.'de gösterilmektedir.

Tablo 2. 1. WHO tarafından belirlenen *Leishmania* türlerinin sınıflandırılması (5).

Sınıf Adı	İsmlendirme
Alem	Protista
Altalem	Protozoa
Şube	Sarcomastigophora
Altşube	Mastigophora
Sınıf	Zoomastigophora
Ordu	Kinetoplastida
Aile	Trypanosomatidae
Cins	Crithidia, Endotrypanum, Blastocrithidia, Herpetomonas, Leptomonas, Phytomonas
Cins	<i>Leishmania</i>
Altçins	<i>Leishmania</i>
Tür	<i>Leishmania donovani</i> , <i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania chagasi</i> , <i>Leishmania tropica</i> , <i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania aethiopica</i> , <i>Leishmania mexicana</i> (<i>L. mexicana</i> , <i>L. amazoensis</i> , <i>L. venezuelensis</i> , <i>L. pifanoi</i> , <i>L. enriettii</i>)
Altçins	<i>Viannia</i>
Tür	<i>Leishmania braziliensis</i> kompleksi (<i>L. braziliensis</i> , <i>L. colombiensis</i> , <i>L. equatorensis</i> , <i>L. peruviana</i>) <i>Leishmania guyanensis</i> (<i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. shawi</i>), <i>Leishmania lainsoni</i> , <i>Leishmania naiffi</i>

2.2. Kutanöz Leishmaniasis Etkenleri

Kutanöz Leishmaniasis (KL)'e neden olan etken, *leishmania* cinsi bir protozoondur ve enfekte kum sinekleri (*phlebotomus*, *lutzomyia*, tatarcık, yakarca,) tarafından konağın ısırılması sırasında bulaşmaktadır.

KL etkenleri; eski dünyada *L. tropica*, *L. major* ve *L. aethiopica* iken, yeni dünyada ise *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. pensviana*, *L. panamensis*'tir.

2.3. Türkiye Dışında Görülen Kutanöz Leishmania Türleri

L. aethiopica

Kronik deri leishmaniasis etkenidir, Kenya, Habeşistan ve Yemende görülür. Rezervuarı, kayalık yerlerde yaşayan hyrax adı verilen kemirici memelilerdir. Oluşan ülserler derinin yanı sıra mukozaya da sıçrayabilir. Yaygın deri lezyonlarına neden olabilirler.

L. mexicana (m.)

Bu parazit ve alt türleri yeni dünyada deri leishmaniasis etkenleridirler. Meksikada, Kuzey ve Orta Amerikada ve Teksasta görülmektedirler. Kulaktaki infeksiyonları hariç birkaç ayda kendiliğinden iyileşebilir.

a. *L. m. mexicana*: Bu parazit tarafından oluşturulan yaraya “şiklero” adı verilir. Yüzde ve kulaklarda görülür ve kulakta kıkırdak dokusu tahrip olur.

b. *L. m. pifanoi*: Venezuellada ve Brezilyada görülen infeksiyon etkeninin yaptığı yaranın kenarlarının düzensiz olması nedeniyle, mikobakterilerin bir türünün neden olduğu lepra hastalığı ile karıştırılır.

c. *L. m. amazonensis*: Deri lezyonları yaygın olan ve rezervuarları ormanlarda yaşayan küçük memeli kemiriciler ve köpeklerdir. “Espundia” adı verilen deri hastalığının etkenidirler. Lezyonlar sayısal olarak çok ve genişirler. Lezyon genelde ağızda veya burun mukozasında olur ve ülserasyonlar burun, dudak ve damağın yumuşak kısımlarını tahrip eder.

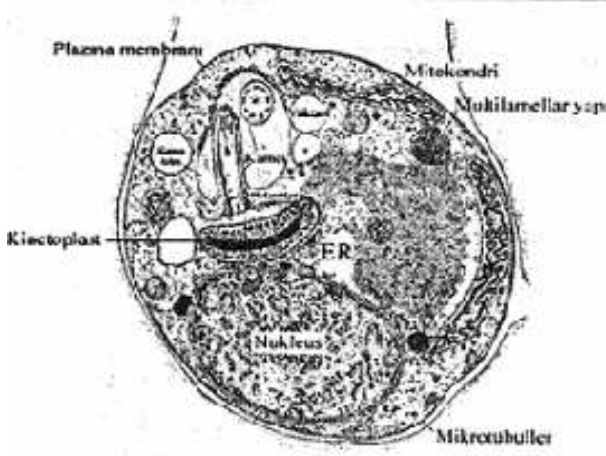
Lezyonun gelişimi ülkemizde de görülen şark çıbanının gelişimine benzerdir. Genelde sekonder olarak gelişen infeksiyonlar ile ölüm görülür.

2.4. Leishmania'nın Morfolojisi

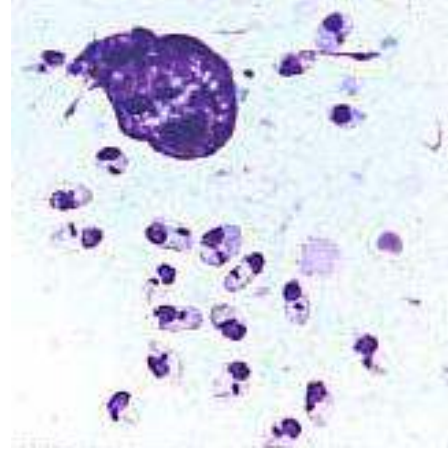
Leishmania cinsine ait türlerin yaşam evrelerinde, morfolojik olarak memeli konakta görülen “amastigot” formu ve vektörlerde görülen “promastigot” formu olmak üzere iki farklı formu vardır (6).

Omurgalılarda görülen Leishmania'nın amastigot yani kamçısız (hareketsiz) formu 2-4 µm boyutunda oval veya yuvarlak görünüme sahiptir. Bu formdaki bir Leishmania'nın sitoplâzmasında arka uca yakın bazen giemsa ile boyanan preparatlarda pembe veya koyu kırmızı boyanan, oldukça büyük bir nükleus ve nükleusa bitişik parlak koyu kırmızı veya menekşe renginde boyanan çomak tarzında kinetoplast ve pembe renkli boyanan sitoplâzma bulunmaktadır. Amastigotlar genelde monositler, polimorf çekirdekli lökositler ve endotel hücreler içinde bazen kümeler halinde bulunurlar; bu hücrelerin parçalanmasından dolayı bu hücrelerin dışında tek tek görülebilirler. Sitoplâzma ayrıca vakuoller, nokta şeklinde bir bleforablast (kamçı kökü) ve bleforablasttan çıkıp ön kısımda sonlanan bir aksonem (kamçının sitoplâzma kalan kısmı) bulunmakta, ancak kamçı hücre dışına serbest olarak çıkamamaktadır. Bütün Leishmania türlerinde sitoplâzma tek bir mitokondrium yer almakta, golgi aygıtı ve lizozomlar çeşitli enzim aktiviteleri ile parazitin beslenmesine yardımcı olmaktadır (Şekil 2. 1. – Şekil 2. 2.) (4, 6, 7).

Şekil 2. 1. Leishmania amastigot şekli.



Şekil 2. 2. Leishmania amastigotları

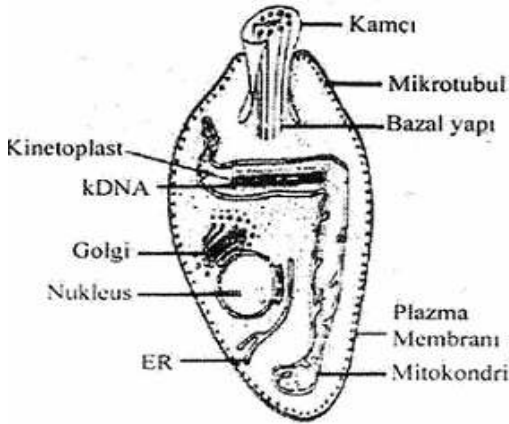


Tatacık gibi omurgasızların vücutlarında bulunan ve besi yerlerinde görülen promastigot formu hareketli (kamçılı), 12 – 20 μm boyutlarında ve 1,5-5 μm genişlikte mekik şeklinde olup yapısında 7 nm kalınlığında, çift tabakalı merkezi bir nükleus vardır. Nükleolus ve nükleus membranında 80-90 nm çapında porlar bulunur. Kromatin nükleusta daha çok periferde yerleşmiştir ve nükleolusla aynı yoğunlukta olduğundan boyalı preparatlarda farklı olarak gözlenememektedir. Leishmania promastigotlarında Ön uçtan çıkan 18-20 mikron uzunluğunda hareketi sağlayan ince, uzun, ip gibi, dışı hücre mebranından daha yapılı bir kılıf ile kaplı bir kamçı bulunmaktadır. Kamçı 200 nm kalınlığındadır ve parazitin boyundan daha uzundur (10). Kamçının bazal kısmında yerleşmiş yuvarlak veya at nalı şeklinde kinetoplast adı verilen bir organel vardır. Kinetoplast büyük daire (maxicircle) ve küçük daire (minicircle) adı verilen iki gruptan oluşmuş bir deoksiribo nükleik asit (DNA) şebekesi içermektedir. Maxicircle, 20-35 kb büyüklüğünde, homojen dairesel DNA molekülüdür. Minicircle ise bunun tam tersine 0,5-1,5 kb kalınlığında heterojendir (10). Leishmania kinetoplastlarındaki minicircle yapısı türden türe değişmektedir. Genellikle her minicircle 200 bp'lik 3 sabit bloktan oluşan korunmuş bir bölgeye sahiptir. Bu bölge "CSB (Conversed Sequence Block) 1-3" olarak adlandırılmaktadır. Adenin ve Timin bazları açısından zengin olan minicircle'in geri kalan kısmını ise çok değişken olan ribo nükleik asit (RNA) geni oluşturmaktadır (9).

Elektron mikroskopik incelemede 2 – 4 nm'lik plazma membranının tipik olarak üç katlı olduğu gösterilmiştir ve bu yapı hücreye destek görevi sağlar. Makromoleküllerin hücre içine alınışında rol oynayan 20-22 nm kalınlığında subpeliküler mikrotübüllerin sayıları, kalınlıkları, birbirinden uzaklıkları türlere göre değiştiği için *Leishmania* türlerinin ayırımında da kullanılmaktadır. Örn: *L.mexicana*'da 150-200; *L.donovani*'de 80-120; *L.tropica*'da ise 80-115 arasında mikrotübül bulunmaktadır (4).

Kamçı köküne yerleşik olan aksonem; 9 çift periferel fibril çiftinin merkezi bir çift fibrili çevrelemesi ile oluşmaktadır (Şekil 2. 3. – Şekil 2. 4.). Kamçının dip kısmında bir bleforoplast vardır.

Şekil 2. 3. *Leishmania* promastigot morfolojisi(4).



Şekil 2. 4. *Leishmania* Promastigotları



Parazitte bütün organizmayı saran büyük bir mitokondri vardır (4). Dıştaki nükleus zarının endoplazmik retikulum ile devam ettiği ve bunun yanında sitoplazma içerisinde golgi cisimciği, lizozomlar, lipid ve mikrocisimsiklerin bulunduğu da tespit edilmiştir (Şekil 2. 3.) (2, 7, 9). Ribozomlar serbest halde, lizozomlar kamçı rezervuarı ile nükleus arasında ve golgi aygıtı kinetoplast ve nükleusa yakın bir yerde bulunmaktadır (4,10).

Aeorop canlılar olan Leishmania'ların beslenmeleri osmozla olur ve gıdaları dokulardan alırlar. Çoğalma, boyuna ikiye ayrılarak ve büyük makrofaj hücreleri içinde olur. Önce kinetoplast ve bleforoplast sonra çekirdek ve sitoplâzma bölünür. Makrofajlara yerleşme sırasında promastigotlar, amastigotlara dönüşür, vektörde ise aksi oluşmaktadır. Bir hücre içerisinde birçok parazit görülebilir. Leishmania, NNN: Novy, Nicole ve McNeal baş harflerine göre adlandırılmış tavşan kanlı tuzlu agarda kolayca üretilebilir. Burada 2 – 3 gün içerisinde amastigotlardan promastigotlar ortaya çıkmaktadır (9).

2.5. Leishmania'nın Yaşam Evreleri

Leishmania türü vektörleri olan Phlebotomus veya Lutzomyia cinsi tatarcıklar, leishmaniasisli bir omurgalı konaktan kan emerken makrofajlar içinde bulunan parazitin amastigot şeklini almaktadırlar. Emilen kan, orta midede “peritrofik membran” adı verilen bir membran ile sarılmakta ve sineğin sindirim enzimleri ile bu membran içine salgılanmaktadır. Leishmania'ların bir kısmı makrofajların parçalanması esnasında sindirilirken, geriye kalanların vücutları uzamakta ve kamçı gelişerek enfektif olmayan promastigot şekline dönüşüp bölünerek çoğalmaya başlamaktadır (4)

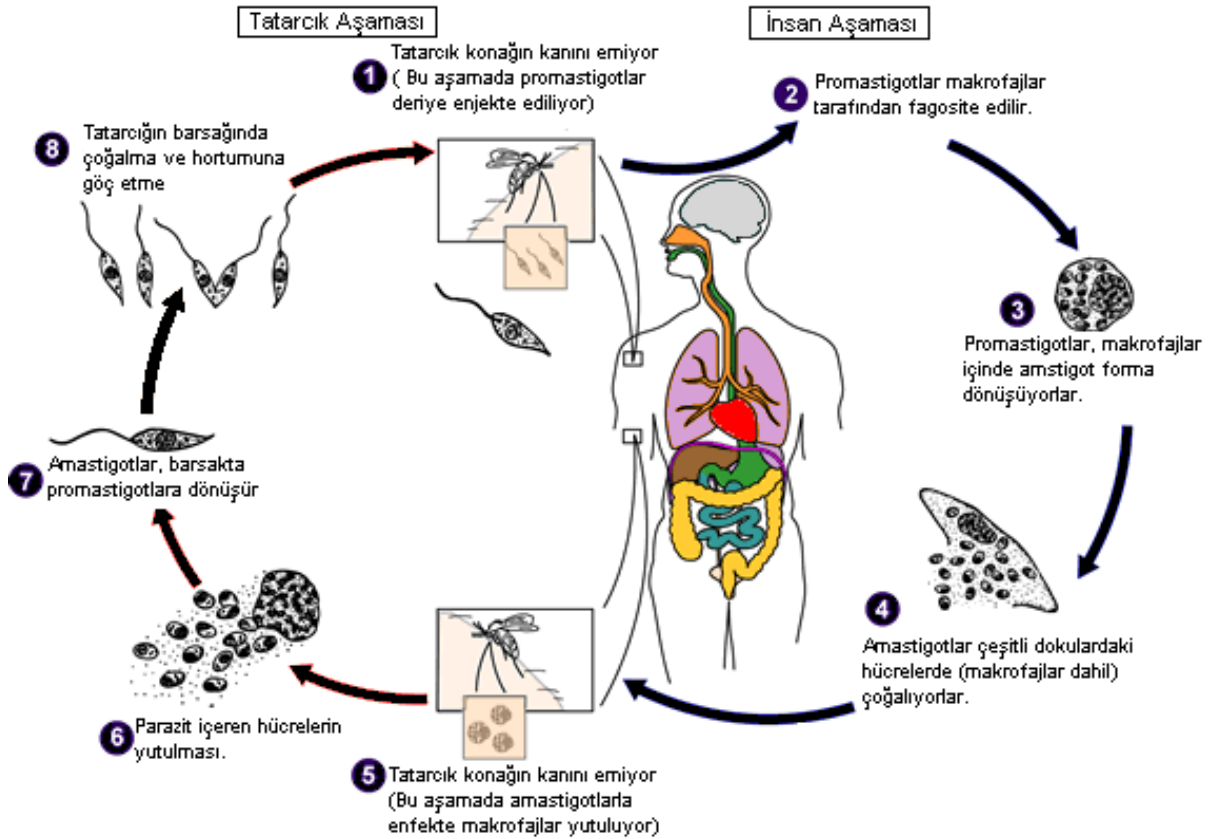
Tatarcıkların kan emmesinden 1 saat sonra, abdominal midede amastigotlar, 12- 24 saat sonra abdominal midenin peritrof zarının içinde promastigotlar görülmektedir. Nektomonadlar midede 36- 48 saat sonra, 3. günde torasik midede haptomonadlar, 6. günde bütün sindirim kanalında promastigotlar görülmeye başlar, 14. güne kadar gittikçe artar (11).

Enfektif promastigotları taşıyan vektör tatarcık, kan emmek için bir omurgalı konağı ısırıldığı zaman belli bir miktardaki promastigotu da kan akımının geliş yönünün tersine doğru inoküle etmektedir. Vücuda giren promastigotlar, ilk saatlerde serumdaki kompleman tarafından opsonize edilmekte ve uygun hücreler tarafından fagosite edilmektedir. Fagosite edilen promastigotlar kamçısını kaybederek amastigot şekline dönüşmektedirler. Enfekte

hücre, parazitin sayıca çoğalması sonucu parçalanmakta ve amastigotlar etrafa dağılmaktadırlar. Daha sonra bu amastigotlar tekrar diğer makrofajları enfekte edebilmektedirler (4, 12).

İnfeksiyonun bundan sonraki seyri, *Leishmania*'nın türü tarafından şekillenir. İnfeksiyon deride sınırlı kalabilir (Ör; *L. tropica*) ya da iç organlara göç edebilir (Ör; *L. infantum*). Enfekte makrofajlar, kan yoluyla deriden başta karaciğer, dalak ve kemik iliği olmak üzere diğer dokulara doğru hareket etmekte ve bu organlarda patolojilere neden olmaktadır. Ancak bu yayılım, konağın immun sisteminin durumuna göre değişiklikler gösterebilmekte ve parazitler türüne uygun olmayan yerlere de göç edebilmektedirler. Bu durum türlerin visserotropizm / dermatropizm karakterlerine bağlı olarak meydana gelmektedir (Şekil 2. 5.) (4).

Şekil 2. 5. *Leishmania*'nın yaşam evreleri (28).



2.6. Türkiyede Kutanöz Leishmaniasis

Türkiye'deki *L. tropica*'nın etken olduğu antroponik Kutanöz Leishmaniasis, zaman zaman epidemilere varan sayılarda 1833 yılından beri bildirilmektedir. 1950'li yıllardan önce en fazla Güneydoğu Anadolu Bölgesinde olmak üzere Türkiye'nin endemik bir bölge olduğu 1950'den sonra sıtma kontrolünde kullanılan DDT nedeniyle bir ara azalma gösterdiği ancak 1960'dan sonra sıtma kontrol çalışmalarındaki yetersizlik sonucu tekrar olgu sayısının arttığı bildirilmektedir (4).

Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nde Şanlıurfa, bu hastalığın görüldüğü başlıca ilimizdir. Güneydoğu Anadolu dışında kutanöz leishmaniasis, 1980'lerden sonra daha önceleri son derece nadir olguların görüldüğü Çukurova gibi yerlerde endemik hale gelirken, son derece nadir olguların bildirildiği Ege, Marmara, Orta Anadolu, Batı Akdeniz gibi bölgelerimizde de olguların görüldüğü bildirilmiştir (4, 6, 12).

2.7. Kutanöz Leishmaniasise Giriş

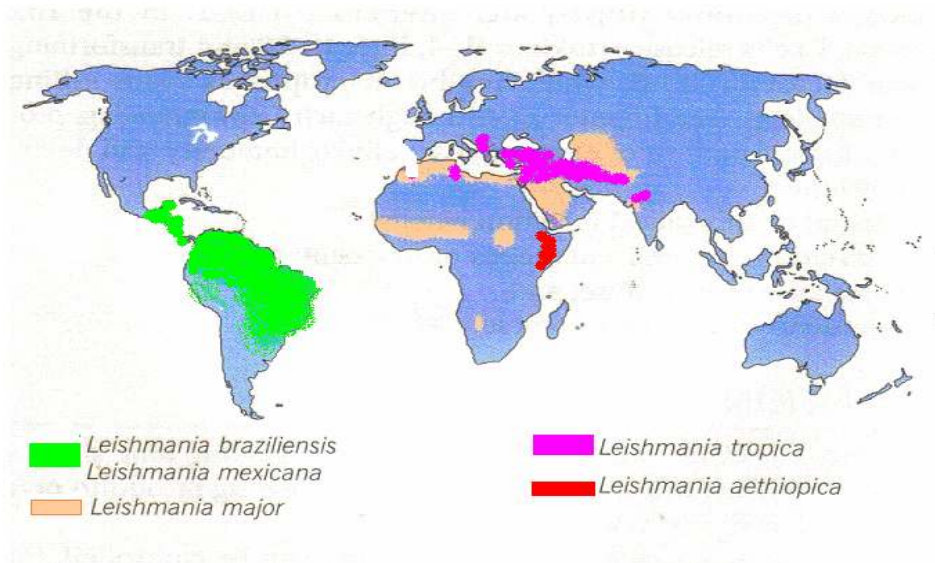
2.7.1. Epidemiyoloji

Leishmaniasis kemirgenlerde ve köpeklerde sık rastlanan bir zoonozdur. Genelde vektörler, Leishmaniasise uyum sağlayarak deride hafif lezyonlarla hastalığı atlatabilmektedirler. Sadece *Leishmania infantum* köpeklerde ölümcül hastalığa neden olabilmektedir. Vektör olarak eski dünyada Phlebotomus türleri, yeni dünyada ise Lutzomyia türleri bulunmaktadır. Tatarcıkların her iki cinside genellikle şeker içeren bitki özleriyle beslenmektedir ve dişi tatarcıklar yumurtalarını olgunlaştırmak için her gonadotropik siklusta bir, iki veya daha fazla kan emmek zorunda kalmaktadırlar. Enfekte tatarcıkların 30 gün kadar canlı kalabildikleri saptanmıştır. Enfekte tatarcıkların bağırsağı kısmen promastigotlarla tıkalı

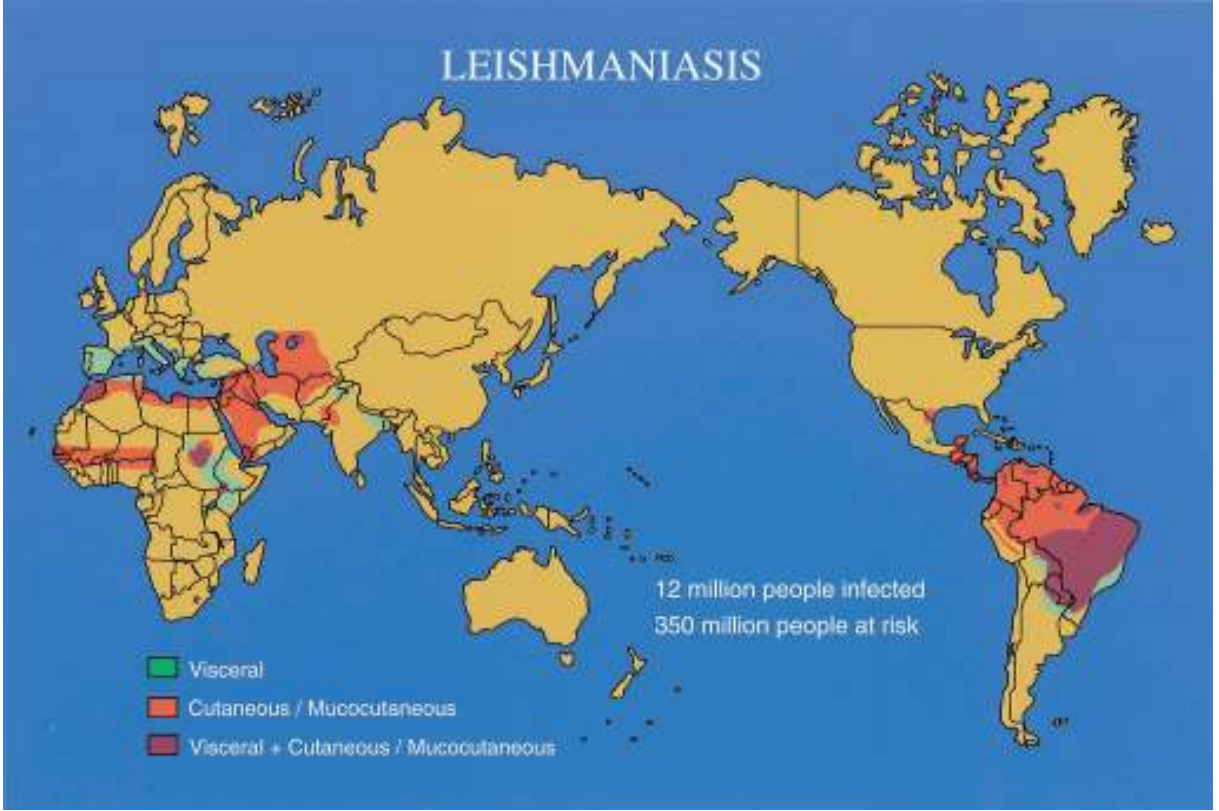
durumdadır ve kan emme sırasında konağı birkaç kez ısırarak bulaşma riskini arttırmışlar. Rezervuar ve vektörler aynı ortamda bulduklarında infeksiyonun yayılışı ve rastlantısal ara konak olan insan olguları artabilmektedir (13, 14).

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre leishmaniasis günümüzde 88 ülkede endemik olarak görülmekte ve 350 milyon insan risk altında bulunmaktadır. Leishmania'ların dünyada 12 milyon kişiyi etkilediği ve her yıl 1,5 – 2 milyon yeni vaka olduğu tahmin edilmektedir. Bunların ancak 600.000 kadarı resmi olarak açıklanmaktadır. Kutanöz Leishmaniasis'e ait bildirimler 9. yüzyıla kadar varmakta ve bugün hala bir dünya sağlık sorunu olarak karşımızdadır. Meydana gelen 500.000 yeni Visseral Leishmania'lı olgunun %90'ı Brezilya, Nepal, Bangladeş, Hindistan ve Sudan'da, Mukokutanöz Leishmania'lı hastaların %90'ı Bolivya, Brezilya ve Peru da, Kutanöz Leishmanialı olguların %90'ı ise Afganistan, Suriye, İran, Irak, Suudi Arabistan ve Brezilya'da görülmektedir (Şekil 2. 6-7) (15-17).

Akdeniz havzası, Orta Doğu, Hindistan ve Pakistan'da Eski Dünya Kutanöz Leishmaniasis'ine *L. tropica*; Orta Asya, Güney Rusya, Orta Doğu ve Afrika'da kuru çöl bölgelerindeki kırsal alanlardaki Eski Dünya Kutanöz Leishmaniasis'ine ise *L. major* ve sporadik olarak *L. infantum* sebep olmaktadır. Meksika ve Güney Amerika'da görülen Yeni Dünya Leishmaniasis'una ise *L. braziliensis* ve *L. mexicana* sebep olmaktadır (5).



Şekil 2. 6. Kutanöz Leishmaniasis olgularının dağılımı (18).



Şekil 2. 7. Leishmaniasis olgularının dağılımı.

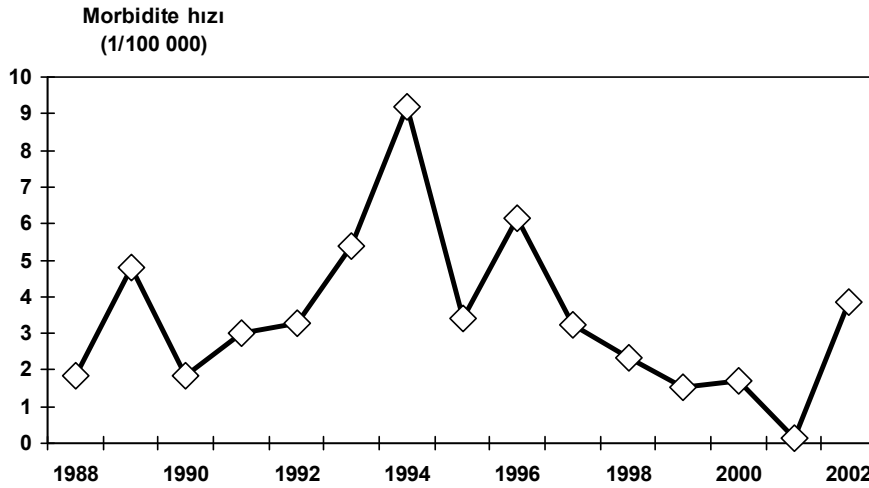
Ülkemizde ve Şanlıurfa bölgemizde son yıllarda, Leishmania'lı hasta sayısı azalma eğilimi göstermektedir. Şark çıbanı için morbidite hızları 5-6 seviyelerinden 1.5'in altına düşmüş, toplam vaka sayıları 3-5 binli seviyelerden binin altına gerilemiştir. Bölgemizde Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) ile sulama alanlarının artması, bilinçsiz hayvancılığın ilerlemesi, antimon ilacının ithalinde yaşanan sıkıntılarla hastaların tedavi edilememesi nedeniyle son zamanlarda çok hızlı bir artış göstermiştir. Sadece ilimiz Şanlıurfa bölgesinde görülen Şark çıbanı vaka sayısı 2000 yılında 271 iken 2003 yılında 1432'ye yani tüm Türkiye'de 2000'li yıllara kadar görülen toplam hasta sayısından daha fazla seviyeye yükselmiştir. 2004 yılında da durum değişmemiş yılın ilk dört ayında 943 vaka tespit edilmiştir ki; 3 yıl önceki Türkiye'deki toplam vaka sayısına yakındır (19,20). Tablo 2. 2.'de

1988-2002 yılları arasında Türkiyede bildirim yapılmış Kutanöz Leishmaniasis vaka sayıları ve morbidite hızları verilmiştir. Şekil 2. 7.'de yıllara göre morbidite hızları grafikte

verilmiştir. Türkiye, Şanlıurfa ilinde 2000 – 2003 yıllarında yaş gruplarına göre Kutanöz Leishmaniasis vaka sayıları ve dağılımı Tablo 2. 3.'te verilmiştir.

Tablo 2. 2. 1988-2002 yıllarında Türkiye'de bildirilen Kutanöz Leishmaniasis vaka sayıları ve morbidite hızları

Yıllar	Yıl Ortası Nüfus	Vaka Sayısı	Morbidite Hızı (100.000)
1988	54.176.000	1005	1,86
1989	57.426.316	2743	4,78
1990	57.582.446	1056	1,83
1991	57.736.288	1732	3,00
1992	59.088.101	1935	3,27
1993	60.384.474	3235	5,36
1994	61.779.288	5692	9,21
1995	63.206.510	2158	3,41
1996	62.727.000	3857	6,15
1997	63.745.000	2038	3,20
1998	64.786.000	1499	2,31
1999	65.819.000	1010	1,53
2000	67.844.903	1135	1,67
2001	69.081.716	994	1,44
2002	70.415.064	2721	3,86



Şekil 2. 8. Kutanöz Leishmaniasis morbidite hızı, Türkiye 1989-2002.

Tablo 2. 3. Türkiye, Şanlıurfa ilinde 2000 – 2003 yıllarında yaş gruplarına göre Kutanöz Leishmaniasis vaka sayıları ve dağılımı.

Yaş grupları	2000	2001	2002	2003
0 yaş	4	4	3	8
1-4 yaş	49	62	112	233
5-9 yaş	69	101	209	387
10-14 yaş	55	53	148	240
15-24 yaş	36	56	87	218
25-44 yaş	40	50	131	262
45-64 yaş	15	28	38	67
>65 yaş	3	3	5	17
TOPLAM	271	357	733	1432

2.7.2. Klinik Sınıflandırma

Dünya Sağlık Örgütüncel belirlenen klinik tabloya göre, Leishmania kliniği ve etkenlerinin sınıflandırılması tablo 2. 4.'te özetlenmiştir. Leishmania pratik olarak başlıca; Visseral, Kutanöz, Mukokutanöz olmak üzere 3 klinik form oluşturmaktadır.

Leishmania tropica, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica* ve *L. infantum* Eski Dünya Kutanöz Leishmaniasisine yol açarken *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* Yeni Dünya Leishmaniasisine neden olmaktadır. Ayrıca *L. braziliensis* mukozaları da tutabilmekte ve Mukokutanöz Leishmaniasis'a neden olmaktadır (Tablo 2. 5.) (15, 21).

Tablo 2. 4. Leishmaniasis klinik şekilleri ve etkenlerine göre sınıflandırılması (14, 37).

Klinik Şekli	Sinonim Adı	Etken
İç Organ Leishmaniasisi (Visseral Leishmaniasis)		<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i>
Deri Leishmaniasisi (Kutanöz Leishmaniasis)	Şark çıbanı ve Şiklero Pianbiosis Orman çıbanı Uta	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. braziliensis guyanensis</i> <i>L. b. panamensis</i> <i>L. peruviana</i>
Mukokutanöz Leishmaniasis	Espundia	<i>L. b. braziliensis</i>

Tablo 2. 5. Leishmaniasis hastalık etkenlerinin sınıflandırılması ve coğrafik dağılımları (21).

HASTALIK KLİNİĞİ	ETKENLER	COĞRAFİK DAĞILIMI
Kutanöz Leishmaniasis	<i>L. tropica</i> kompleks <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. major</i> <i>L. mexicana</i> kompleks <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. amozonensis</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. braziliensis</i> kompleks <i>L. peruviana</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. colombiensis</i> <i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i>	Eski Dünya Yeni Dünya Yeni Dünya Eski Dünya Yeni Dünya
Mukokutanöz Leishmaniasis	<i>L. braziliensis</i> kompleks <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. tropica</i> <i>L. major</i>	Yeni Dünya Yeni Dünya Eski Dünya Eski Dünya
Visseral Leishmaniasis	<i>L. donovani</i> kompleks <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. tropica</i> <i>L. amazonensis</i>	Eski Dünya Eski Dünya Yeni Dünya Eski Dünya Yeni Dünya

2.7.2.1 Visseral Leishmaniasis

Visseral (iç organ) Leishmaniasis'in (VL) prognozu genelde benzerlik göstermekle beraber hastalığın başlangıcında farklılıklar olabilmektedir. Hastalığın şiddetine ve kronikliğine bağlı olarak klinik bulgular değişebilmektedir (22).

İnkübasyon döneminin 2-3 haftadan 2 yıla kadar değişebildiği, ortalama 2-4 ay sürdüğü, Türkiye’de 2 - 6 yaş arası çocuklarda daha sık olarak gözleendiği, erişkinlerde nadir olarak saptandığı bildirilmektedir. İnfeksiyon, ateşin genellikle sinsi olarak aniden 39-40 °C’e çıkması ile başladığı, bazı vakalarda erken safhalarda halsizlik, baş ağrısı, baş dönmesi, iştahsızlık, öksürük veya diyare gözleendiği açıklanmıştır. Akdeniz Kala Azar’ında tatarcığın ısırdığı yerde bazen bir sertlik oluşmakta, başlangıç dönemindeki subfebril ateş, ortalama 2 hafta içerisinde yerini günde 2 kez yükselen bol terleme ile düşen ateşe bırakmaktadır. Her ateş atağından sonra dalağın biraz daha büyüdüğü ve klinik olarak VL’in akut, subakut ve kronik şekilleri bulunduğu bildirilmektedir (9).

Akut form; şiddetli burun, diş eti, barsak kanamaları ile kemik iliği süpresyonuna bağlı oluşmuş pansitopeni tablosunu daha da ağırlaştırarak ilerler ve tabloya gastrointestinal sisteme ait, özellikle diyare şikâyetlerinin eklenmesi ile hastanın genel durumu daha da bozular. Semptomlar düzelmezse, hastalar 2-3 ay içerisinde kaybedilebilirler.

Subakut form; klinik olarak en sık rastlanan şekildir ve akut forma göre daha iyi seyirlidir. Klinik tablo; ateş, hepatosplenomegali ve pansitopeni ile kendini gösterir. Günde 2 kez inip çıkan ateş tipiktir, fakat hasta genelde kendisini iyi hisseder. Fizik muayenede karaciğerden çok daha büyük olan dalak, sol kosta sınırını 5 - 15 cm aşabilir. Ateş yükselmeleri ile dalağın başlangıçta yumuşak, daha sonraki dönemlerde ise sert olarak fizik muayenede ele gelecek şekilde büyüdüğü gözlenir. Karaciğer, birinci ayın sonundan itibaren büyümeye başlar. Hastalık ilerledikçe kilo kaybı ve anemi belirginleşir, ancak tüm bu belirtiler hastanın normal yaşamını etkileyecek düzeyde değildir. Semptomatik vakalar tedavi edilmediğinde genellikle öldürücü olmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda tedaviye rağmen % 1 - 11 arasında değişen oranlarda hasta kaybedilebildiği bildirilmiştir. Gastrointestinal sistem kanamalar, anemiye bağlı gelişen kalp yetmezliği ve karaciğer yetmezliğinin ölümlere neden olduğu rapor edilmiştir.

I. Lokalize Kutanöz Leishmaniasis

A. Akut Kutanöz Leishmaniasisi: Kuru tip ve yaş tip olarak ayrılır

a. Kuru tip kutanöz leishmaniasis: Etkeni *Leishmania tropica minor* olup özellikle kentsel kesimlerde görülür. İki aydan daha fazla süren kuluçka döneminden sonra phlebotomların ısırıldığı yerlerde küçük, kaşıntılı 2 - 3 mm çapında kahverengi - kırmızı renkte, kenarları düzensiz bir papül oluşur. Papülün zemini biraz kanlıdır. Papül yavaş yavaş büyür, çevresine yayılır, alt dokulara infiltre olarak bir tüberkül veya nodül haline geçer. Bu nodül hafif sert kıvamlı, yüzeyi parlak kırmızı-mor renktedir. Üzerinde hafif bir deskuamasyon olur. Zamanla merkezden başlayan bir ülserasyon gelişir, 3-4 ay içinde bu ülserasyon üzerinde sert bir kurut oluşur ve bu kurutun kaldırılması zordur. Kurut kaldırıldığında alt yüzünde pek ince olmayan uzun çıkıntılar görülür. Buna Hulusi Behçet'in "Çivi belirtisi (Signe de Clou)" adı verilir. Çivi belirtisini meydana getiren epitelyal uzantılardır. Bu uzantılarda paraziti bulmak kolaydır. Çivi belirtisi hastalığın başlangıcından 3-4 ay sonra belirgin olur. Lezyonlar genellikle 1-2 cm çapında olup, bazen daha büyük veya küçük olabilir. Sayıları genellikle tektir, fakat bazı olgularda birkaç tane görülebilir. Ağrısız olan lezyonlarda bol parazit bulunur. Sekonder infeksiyonlar geliştiğinde lezyonlar ağrılı olur. 8-12 ayda ülser lezyon, granülasyon dokusunun ortaya çıkmasıyla skar bırakarak iyileşir. Böylece hastalık bir yıl kadar sürdüğünden bazı yörelerde buna "Yıl Çıbanı" adı da verilmiştir.

b. Yaş tip kutanöz leishmaniasis: Etkeni *Leishmania tropica major*'dür. Hastalığın seyri daha hızlıdır. Daha çok kırsal alanlarda görülür. Lezyonlar 1-2 haftada ülserleşir, lezyonlarda parazit sayısı az olup iyileştiğinde derin skarlar bırakır. Olguların % 70'inde lenf bezleri tutulur. Lezyonlar genellikle ekstremitelerde yerleşmişlerdir. İki aydan az bir kuluçka döneminden sonra enfekte phlebotom'un ısırığı yerde kırmızı, ödemli, ağrılı bir papül oluşur. İnokülasyon yerinin çevresini 5-10 mm çapında papüller sarar. Daha sonra çapı 1-2 cm'e kadar varan bir nodül halini alır. İki hafta sonra bu nodül merkezden ülserleşir ve kızarır. Ülser genişlerken kabarır. 2-3 ay devam eden lezyonlar 3-6 cm çapına ulaşır.

Ülserasyon çevresi konjesyonlu, hafif sert ve ağrılıdır. Kurut kaldırılırsa veya düşerse 1-3 mm derinliğinde bir ülser gözlenir. Kenarları belirgin ve düzensizdir. Lezyon yakınındaki lenflerde lenfanjit gelişir. İyileşme genellikle bir kaç aydan bir yıla kadar sürer ve yerinde skar bırakır.

B. Kronik Kutanöz Leishmaniasis:

Yaşlı insanlarda hastalık kronik bir hal alabilir. Çocuklarda bir yılda iyileşirken, yaşlılarda yıllarca sürebilir. En çok görüldüğü yer yüzdür. Lezyonlar tek veya çok sayıda ve değişik büyüklükte eritemli, infiltrate plaklar halindedir. Bölgesel lenfadenopati, drenaj ve akıntı yoktur. Kronik ağrısız bir seyir gösterir. Histolojik olarak üst ve alt dermiste Langhans dev hücrelerinin bulunduğu tüberküller görülür. Buna ek olarak histiyositik ve mononükleer infiltrasyon vardır.

C. Rezidivan Leishmaniasis (kronik lupoid leishmaniasis):

Leishmaniasis skatrisi çevresinde iyileşme sonrasında ufak, kırmızı-kahverengi, kahverengi-sarı papüller veya tüberküllerin gelişmesi ile karakterizedir. Bunlar birleşerek lupus vulgarise benzer bir görünüm alırlar ve plak oluştururlar. Lezyonlar genellikle yaz aylarında kötüleşir ve ülserleşebilirler. Psöriaziform şekilleri olabilir. Nadiren de keloidal ve verrüköz formları alt ekstremitelerde görülebilir. Lezyonlarda parazit nadir olarak bulunabilir. Kültürde zor da olsa paraziti üretmek mümkündür. Rezidivan lezyonlar parazitin türlerine karşı özel bir reaksiyon değildir. Konağın reaksiyonuna bağlıdır. Bu lezyonlar yıllarca sürerler, genişlerler ve sonunda skatris bırakarak iyileşirler. Histolojik olarak akut ve kronik şekillerdeki özellikler görülür. Epidermal değişiklikler değişken olabilir ve dermiste orta derecede tüberküloid yapı görülür. Parazit ancak çok dikkatli inceleme ile bulunabilir (2, 25).

II. Jeneralize Kutanöz Leishmaniasisleri

Gövdenin çeşitli bölümlerinde lezyon açısından zengin, çok sayıda lezyonlarla karakterizedir. Morfolojik olarak lepromatöz lepraya benzer. Hastalardaki hücrel immünitede spesifik bir yanıt yetersizliği mevcuttur. Çünkü visseral ve sistemik tutulma yoktur. Aşırı sayıda parazite maruz kalmanın lenfosit aktivitesini baskıladığı ve sonuçta azalmış immün yanıtın oluştuğu iddia edilmektedir.

a. Diffüz Deri Leishmaniasisi (Dissemine Anerjik Leishmaniasis, Leishmaniasis Cutis Diffusa):

Deri leishmaniasislerinin lepraya benzeyen jeneralize formu, Orta ve Güney Amerika'da ve son olarak Etiyopya ve Japonya'da görülmüştür. Hastalıkta lezyonlar ülsere olmayan nodüllerdir. Lokal olarak yayılır ve derinin büyük alanlarını kapsar. Lezyonlar yavaş yavaş gelişir ve kronikleşir. Hastalık iç organları tutmaz. Lezyonlarda bol sayıda parazit bulunur. Leishmanın testi negatiftir. Karakteristik histolojik bulgu olarak amastigotlar ile dolu makrofajlar gözlenir.

b. Leishmanid:

Çok seyrek görülen bu tabloda akut kutanöz leishmaniasisli hastalarda jeneralize erüpsiyonlar ortaya çıkar. Leishmanid lezyonları parazit içermezler. İki üç ay sürebilen bu tablo asemptomatiktir (2).

Kutanöz Leishmaniasis'te Bağışıklık

Kutanöz Leishmaniasis iyileştikten sonra kişilerde yaşam boyu süren kalıcı bir bağışıklık gelişir. Bu bağışıklık türe özgüdür ve bir türe bağışık olanlar diğer türe duyarlıdır. Bundan dolayı *L. donovani* enfeksiyonu *L. tropica* enfeksiyonuna karşı bağışıklık vermez, yalnız *L. major*'un *L. tropica*'ya karşı bağışıklık verebildiği, fakat *L. tropica*'nın bunu yapamadığı yine *L. braziliensis* ile *L. mexicana* arasında böyle bir ilişki olduğu kabul edilmektedir (26).

2.7.2.3. Mukokutanöz Leishmaniasis (ML) (Espundia)

Bu hastalığın etkeni *L. Brasiliensis*'dir. Bir veya birkaç deri lezyonu ile başlar. Nadiren kendiliğinden iyileşirse de genellikle düzgün olmayan bir şekilde yayılarak oronazofaringeal mukozaya yerleşir. Burundaki lezyonlar sonucu septumda ve burun kanatlarında doku kaybı ve deformateler oluşur. Destruksiyon ilerlerse burnun, üst dudağın, hatta alt göz kapağının tamamen harabiyeti sonucu çok çirkin bir görünüm oluşur. Lezyonların yumuşak damak, dil, farinks, larinks ve trakeaya yayılması sonucu disfaji, disfoni hatta asfiksi meydana gelebilir (2, 25).

2.7.3. Tanı

Sağlık bakanlığı'nın organizasyonunda Parazitoloji ve Dermatoloji uzmanları tarafından hazırlanan "Kutanöz Leishmaniasis (KL) Olguların'da Tanısal Yaklaşım'ın aşamaları aşağıdaki şekildedir: (4, 27)

1. Genellikle vücudun giysi ile örtülmeyen açık olan kısımlarındaki deriye lokalize,
2. Uzun süredir (en az 1 ay) iyileşmeyen,
3. Sekonder olarak bakterilerle enfekte olmadıkça ağrısız,
4. Eritemli papül, nodül, nodülo-ülseratif, plak, ülsere plak şeklinde lezyon
5. Ülserleşmiş lezyonların üzerinde alta sıkıca yapışık krutlu, kenarları lastik silgi kıvamında endürasyon gösteren (merkezi krateri olan volkan biçiminde) lezyon,
6. Lezyonlar yaz aylarında ve geceleri aktif olan tatarcık sineğinin beslenmek için kan emdiği deri bölgesinde, 4-8 aylık inkübasyon döneminden sonra ortaya çıkan, ağrısız, eritemli bir papül şeklinde başlar. Lezyon, 1-2 ay içerisinde giderek büyüyerek 1-2 cm çaplı nodüle dönüşür. Nodüler lezyon zaman içerisinde merkezden ülserleşerek krutla kaplanır. Tedavisiz olgularda lezyon doğal seyri genellikle 1-1,5 yıllık süreç içerisinde ömür boyu süren depresif skar bırakarak iyileşir. İyileşmeden sonra kişiyi ömür boyu reinfeksiyonlara karşı koruyan doğal bir bağışıklık gelişir.
7. Endemik olmayan bölgelerde de yukarıdaki klinik tanımlamaya uyan lezyona sahip olgularda, özellikle yaz aylarında endemik bölgelere (Örneğin, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz Bölgesine) seyahat öyküsü açısından ayrıntılı anamnez alınmalıdır (4, 27).

Kutanöz Leishmaniasisinin tanısında coğrafik bölge, klinik görünüm ve laboratuvar bulguları önemlidir. En basit tanı yöntemi pastör pipeti ile lezyonun kenar kısmından alınan serözitenin veya alınan biyopsi materyalinin lama sürülmesi ile elde edilen preparatta hücre içinde veya dışında amastigotların gösterilmesidir. Parazitin belirlenmesi direkt smear, kültür ve hayvan inokülasyonları ile mümkündür, Dokudan örnek temini için iğne biyopsisi de kullanılabilir.

Kutanöz Leishmaniasis şüpheli lezyonun kenarından, sağlam deriyle birleştiği sınır çizgisinden alınan örneğin giemsa ile boyama sonrası, mikroskopta 100'lük imersiyon objektifte incelenmesinde hücre dışında veya içinde parazitin görülmesi mümkün olmaktadır.

Leishmaniasisin bütün şekillerinde olduğu gibi Kutanöz Leishmaniasiste de mononükleer fagositik hücrelerin içinde 2–5 µm boyutundaki amastigotların varlığını saptamak oldukça güç olmaktadır. Amastigotların etrafını çeviren plazma membranı, koyu boyanan ve daha büyükçe bir çekirdek ile nisbeten küçük yine koyu boyanan ve DNA içeren çubuk şekilli kinetoplast ile ayırt edilebilmektedir (10).

Kutanöz lezyonlarda lezyon kenarından alınan materyal, kültür ve smear için kullanılışlıdır. Ülser kenarından alınan full thickness materyal kültür ekimi için kullanılabileceği gibi fikse edilerek Giemsa veya hematoksilen eozin (H.E.) ile boyanabilir. Giemsa ile parazitler araştırılır, H.E. yöntemi ile histolojik inceleme yapılabilir. Biyopsi materyalinden hazırlanacak preparatlar yine Giemsa ile boyanabilirler.

Lezyonun bulunduğu bölgeden, lezyonu kanatmadan alınan materyal N.N.N (Novy, Mac Neal, Nicole), RPMI (Media Designed at Roswell Park Memorial Institute) modifikasyonları RPMI 1629, RPMI 1630, RPMI 1640 ve Schneider'in besiyeri başta olmak üzere çeşitli besiyerlerine ekim yapılarak amastigotların promastigotlara dönüşüp dönüşmediği kontrol edilir(4, 6, 12). Genellikle N.N.N (Novy, Mac Neal, Nicole) besiyerinde 21 gün içinde, RPMI ve Schneider'in besiyerinde 4–5 günde üreme gerçekleşmektedir(4, 6). Golden hamster birçok leishmania türüne karşı çok duyarlıdır. İntraperitoneal ve intrakutanöz inokülasyon uygulanabilir.

Hücrel immünite ve geç hipersensitiviteyi Leishmanin veya Montenegro deri testi ile değerlendirmek mümkündür. Humoral antikorların belirlenmesi ise kompleman fiksasyon testi (CFT), haemaglutinasyon testi (HI), indirek floresan antikor testi (IFAT), immün elektroforez ve enzim-linked immunoabsorbent assay (ELISA) yöntemleri ile mümkündür (4, 28).

İn-vitro kültürlerden elde edilen ekzoantijen preparatların intradermal uygulamasıyla yapılan deri testlerinde erken ve geç tipte iki reaksiyon oluşur. Erken reaksiyonun tanıda yeri yoktur. Fenolize edilmiş promastigotların intradermal injeksiyonundan 48-72 saat sonra oluşan geç tipteki reaksiyon (Montenegro deri testi) tanıda oldukça değerlidir. Oluşan endüre nodülün çapına göre skorlama yapılır (2,25). Ancak bu testler eski ve yeni infeksiyonu ayırt edememektedir (4).

Son yıllarda hastalığın tanısında kinetoplast DNA'sının yapısı, antijen incelemeleriyle türlerinin tanımlanması yoluna gidilmiştir. Çeşitli moleküler yöntemler ile infeksiyon tanımı için Leishmania DNA'sını bulma ve türlerin tanımlanması hedeflenmiştir. Birçok araştırmacı tarafından Leishmania'ya özgü olarak belirlenen primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu yapılarak (nükleer veya minicircle kinetoplast DNA, subunit suRNA veya miniekson DNA sekansları) tür tayini tespit edilmektedir.

Leishmania türlerini tiplendirmek için kullanılan metodlar multiplex PCR, rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD), single-strand konformasyon polimorfizimi, restriksiyon fragment length polimorfizm (RFLP) ve DNA dizi analizi kullanılmaktadır. DNA'ya dayalı bu genotipik moleküler teknikler diğer tanı yöntemlerine oranla daha güvenilir ve spesifiktir (6, 29,30).

Kutanöz Leishmaniasis olgularında kullanılan laboratuvar tanı yöntemlerinin karşılaştırılması Tablo 2. 6.'da gösterilmektedir.

Tablo 2. 6. Kutanöz Leishmaniasis'te kullanılan laboratuvar tanı yöntemlerinin karşılaştırılması (41,42).

Yöntem	Avantajlar	Dezavantajlar
Direk mikroskopi	-Basit -Direk yöntem -Maliyeti düşük	-Parazit sayısı yüksek olmadığında düşük duyarlılık göstermesi -Benzer yapıdaki organizmaları ayırt edilememesi -Deneyimli personele gereksinim
Serolojik yöntemler	-Basit ve hızlı -Çok sayıda örneğin incelenmesine elverişli	-Standardize ayraçların gerekliliği -Aktif ve geçirilmiş yada latent infeksiyonun ayırt edilememesi -Düşük özgüllük
Kültür Yöntemleri	-Canlı parazitlerin saptanabilmesi	-Pahalı ve yavaş -Örnekde parazitlerin canlılığının sürdürülmesi gerekli -Türler arasında varyasyonların saptanması
Moleküler Yöntemler	-Doğrudan parazitin türünün araştırılması ve ayrımı -Canlı, cansız her paraziti tanıyabilmesi -Parazit sayısı düşük olduğunda bile yüksek duyarlılık göstermesi	-Çok aşamalı ve pahalı -İnhibitörler ve kontaminasyon nedeniyle olası negatiflik

2.7.4. Tedavi

Kutanöz Leishmaniasis tedavisinde, leishmania türü, leishmaniasisin kliniği, lezyonun yeri, şiddeti, sayısı ve kişinin immun durumuna bağlı olarak, sistemik ilaç tedavisi, intralezyoner tedavi, topikal tedavi veya fiziksel yöntemlerden herhangi biri ya da birkaçı birlikte uygulanmalıdır (29).

Basit KL tedavisiz iyileşir ve kişide o türe karşı immünite gelişir. Bu yüzden Güney-Batı Asya'nın birçok bölgesinde bebeklerin kalçalarında bilerek infeksiyonun gelişmesi sağlanmakta ve dolayısıyla daha sonraki muhtemel infeksiyonlara karşı bağışıklık sağlanmaktadır. Böylece çocuk multipl lezyonlardan ve yüzde gelişecek şekilsiz skarlardan

korunmuş olur. Bu immünite gelişimi daha çok *L. tropica* ve *L. major* 'un etken olduğu kutanöz leishmaniasiste koruyucudur ve tedavi edilmeksizin spontan iyileşme gerçekleşebilir. Bu yüzden bu türlerin infeksiyonlarında ilaç kullanılmaksızın özellikle endemik bölgelerde takibi yeterli olabilmektedir. İyileşmenin bir yıl ya da daha fazla süre alabilmesi nedeni ile özellikle endemik bölgelerde iyileşme süresinin azaltılması amacı ile lezyonun tedavi edilmesi önerilmektedir. *L. mexicana* ve *L. braziliensis*'in neden olduğu kutanöz leishmaniasis daha ciddi ve daha uzun sürelidir. *L. braziliensis* türü mukokütanöz hastalığına neden olduğu için bu türün tespit edildiği hastalara sistemik tedavi başlanılmalıdır (31-34).

Tedaviye dirençli olan *L. aethiopica*'nın neden olduğu leishmaniasis tabloları hariç tüm Leishmania infeksiyonlarında ilk seçenek beş değerli antimon bileşiklerinin kullanımınıdır. Leishmaniasisin diğer türleri, sodyum stiboglukonat (Pentostam®) veya meglumine antimonat (Glucantime®) gibi beş değerli antimon bileşikleriyle uzun süreli günlük enjeksiyonlar şeklinde tedavi edilirler. Antimon ile ilk Kutanöz Leishmania tedavisi 1913 yılında Viyana'da Tartar emetik kullanılarak tedavi edilmiştir. 1937 yılında pentavalan tartar emetikten daha az toksik olan Salustibosan kullanılmıştır. Pentostam ve Glucantime savaş yıllarında İngiltere ve Fransa'da Salustibosan yerine geliştirilmiştir. Halen Leishmania'ya karşı daha etkili ve daha az toksik başka ilaç geliştirilememiş olup Dünya Sağlık Örgütü tarafından Pentostam ve Glucantime halen ilk ilaç olarak önerilmektedir. Antimon kullanılırken elektrokardiografi (EKG) değişiklikleri, karaciğer, böbrek fonksiyonları, aritmi ve akut böbrek yetmezliği yönünden hastalar takip edilmelidir (2, 35-37).

Kutanöz Leishmaniasiste tedaviye başlamadan önce yaranın ikincil bakteri ile enfekte olup olmadığı saptanmalıdır. Eğer varsa antimon bileşiklerine ek olarak antibiyotik ve antifungal ilaçların da tedaviye eklenmesi gereklidir. Kullanılan ilaçlar lezyon içine veya eğer lezyonun yeri içine enjeksiyon yapmaya uygun değilse veya fazla sayıda lezyon varsa kas içine uygulama tercih edilmektedir(31, 38).

Diğer bir grup ilaç ise katekonazol, amfoterisin-B, allopurinol, pentamidin'dir. Ancak bu ilaçlar güçlü toksisiteleri yüzünden diğer tedavilerden yanıt alınamayan olgularda kullanılmaktadır. Bu klasik ilaçların yanı sıra çok çeşitli ilaçlar ve tedavi yöntemleri KL'de kullanım alanı bulmaktadır.

2.7.4.1. İntralezyoner Tedavi

İntralezyoner injeksiyon, enfekte lezyonun içerisine yüksek konsantrasyonda sodyum stiboglukonat veya meglunim antimoniat şeklindeki antimon bileşiklerinin verilmesidir. Eski Dünya Kutanoz Leishmaniasis'un endemik olduğu bölgelerde, lezyonun az sayıda özellikle yeni, basit olduğu durumlarda, lezyonun eklem hareketlerini kısıtlamayacak veya estetik açıdan risk taşımayan vücut bölgelerinde olduğunda ve lokal lenf nodu tutulumunun olmadığı lezyonlarda intralezyoner tedavi tercih edilmektedir (31,32).

2.7.4.2. Sistemik Tedavi

Sistemik tedavide ilk tercih edilen ilaç pentavalan antimoniyallerdir. Yeni Dünya Kutanoz Leishmaniasis'unda 20 mg/kg/gün dozunda 20 gün uygulanan sistemik Salustibosan tedavisi olguların %90'ında iyileşme sağlamaktadır. Antimon bileşiklerinin etkisiz olduğu durumlarda ikinci tercih edilen ilaç amfoterisin B'dir. Bu ilaç dozu 1,5-2 g olacak şekilde gün aşırı 0,5-1 mg/kg olarak uygulanır. Multipl, yaygın dirençli, lenfajitle birlikte sereden veya mukozal tutulumun olduğu lezyonlarda sistemik ilaç tedavisi tercih edilir (39).

2.7.4.3. Lokal Tedavi

Paromomisin pomadın (Beyaz yumuşak parafin içinde %15 paromomisin, %12 metil benzetonyum klorid) 10 gün boyunca günde iki kez uygulandığında L.tropica ve L.mexicana için etkilidir (31,32).

2.7.4.4. Fiziksel Yöntemler

Keskin bir alet veya koterizasyon ile lezyonun kazınması çok eski yıllardan beri uygulanan bir tedavi yöntemidir. Ancak bu metodların tekrarlama olasılıkları yüksektir. Kritoterapi, sıcak uygulama, radyoterapi, lazer, küretaj ve cerrahi eksizyon Kutanöz Leishmaniasis'te uygulanan diğer fiziksel yöntemlerdir (40).

Tablo 2. 7.'de Kutanöz Leishmaniasiste kullanılan ilaçlar veya tedavi yöntemleri sınıflandırılmıştır. Tablo 2. 8'de Leishmaniasisin Kliniğine göre Tedavi seçenekleri verilmiştir.

Tablo 2. 7. Kutanöz Leishmaniasis tedavisinde kullanılan çeşitli ilaçlar veya tedavi yöntemleri

İlaç veya Tedavi Yöntemi	
Antimon Bileşikleri — Stibofen (Fuadin) — Meglumin antimonat (Glucantime) — Sodyum stiboglukonat (Pentostam)	Sistemik Metranidazol
	Dihidroemetin
	Klofazimin
	Nifurtimoks
Antimalaryal ilaçlar — Mepakrin(Quinacrine hydrochloride) — Klorokin	Amfotericin-B
	Monomisin
	Allopurinol
Diamidine Bileşikleri — Pentamidin — Stilbamidin	Paromomisin
	Berberin türevleri
	Bleomisin
Kriyoterapi	Rifampisin
Elektrokoagülasyon	İsoniazid
Fitoterapi	Ketokonazol, Flukonazol
Sarımsak	Itrakonazol, PX 6518
Echinacea	Topikal imidazol
İmmünoterapi — BCG — BCG + Leishmanial antijenler — İnterferon (IFN)- γ — IFN- γ + Antimon bileşiği	Sikloguanil pamoat
	Atebrin
	Miltefosin
	Azitromisin

Tablo 2. 8. Leishmaniasis kliniğine göre tedavi seçenekleri

Kutanöz Leishmaniasis Tedavisi			
Tedavi	Önerilen Doz	Klinik Etkinlik	Yan Etkiler
Meglumin antimonat (Glucantime), Pentavalan Antimonial	10 gün, 20 mg/kg/gün (IM veya IV)	Standart pentavalan antimon bileşikleri, direnç göstermeyen alanlarda % 90 – 100’e varan iyileşme sağlar.	Sb bileşikleri, yüksek seviyede bir toksisite gösterirler. Yorgunluk, bulantı, kas ve eklem ağrıları, artmış transaminaz seviyeleri, EKG değişikliği, kardiyotoksosite siktir. Ayrıca bazen hepatik ve renal disfonksiyon, şok ve nadiren ani ölüm görülür.
Stiboglukonat (Pentostam), Pentavalan Antimonial	10 gün boyunca günde iki kez, 20 mg/kg/gün (IM veya IV)	Meglumin antimonat ile benzer	Meglumin antimonat ile benzer
Pentamidin (aromatik diamidin)	15 doz, 2-4 mg/kg, IM	Surinam’daki bir çalışmada, pentamidinin %90 iyileşme oranı bulunmuştur.	Sık hipotansiyon, diabetes mellitus izleminde izlenen hipoglisemi, renal hasar, enjeksiyon bölgesinde ağrı, G.I. disturbans, kusma
Mukokutanöz Leishmaniasis Tedavisi			
Tedavi	Önerilen Doz	Yan Etkiler	
Stiboglukonat (Pentostam), Pentavalan Antimonial	30 gün boyunca günde iki kez, 20 mg/kg/gün (IM veya IV)	Sb bileşikleri, yüksek seviyede bir toksisite gösterirler. Yorgunluk, bulantı, kas ve eklem ağrıları, artmış transaminaz seviyeleri, EKG değişikliği, kardiyotoksosite siktir. Ayrıca bazen hepatik ve renal disfonksiyon, şok ve nadiren ani ölüm görülür.	
Visceral Leishmaniasis Tedavisi			
Tedavi	Önerilen Doz	Yan Etkiler	
Stiboglukonat (Pentostam), Pentavalan Antimonial	30 gün boyunca günde iki kez, 20 mg/kg/gün (IM veya IV)	Sb bileşikleri, yüksek seviyede bir toksisite gösterirler. Yorgunluk, bulantı, kas ve eklem ağrıları, artmış transaminaz seviyeleri, EKG değişikliği, kardiyotoksosite siktir. Ayrıca bazen hepatik ve renal disfonksiyon, şok ve nadiren ani ölüm görülür	
Antimoniallere direnç olursa: Pentamidin (aromatik diamidin)	5 hafta, haftada 3 kez, 4 mg/kg	Sık hipotansiyon, diabetes mellitus izleminde izlenen hipoglisemi, renal hasar, enjeksiyon bölgesinde ağrı, G.I. disturbans, kusma	
Antimoniallere direnç olursa: Amfoterisin B (polien makrolid antibiyotikler)	20 gün, günde 1 mg/kg, IV	Aşırı toksisite: jeneralize ağrı, konvülziyonlar, anafaksi, flushing, tirmemeler, ateş, flebit, anemi, trombositopeni, nefrotoksosite	

3. HİBRİDOMA TEKNOLOJİSİ

3.1. Monoklonal Antikorlar

Omurgalı bir hayvanın vücuduna yabancı bir madde girdiğinde ya da vücuduna enjekte edildiğinde oluşan immün cevap plazma hücreleri tarafından antikorların salgılanması şeklinde olur. Bağlanma bölgeleri içeren immünoglobulin molekülleri yabancı maddenin yüzeyindeki belirli determinantları ya da antijenini tanır ve bağlanır. Yabancı maddeyi etkisiz hale getiren ve yok eden birçok işlemde antikor ile antijen birleşmesi olur. Antikorların immün cevaptaki doğal işlevinin yanında, belirli molekülleri ya da hücreleri belirlemek ve onları bir kompleks karışımdan ayırt etmek için spesifitelerinden yararlanılması araştırmacılar için önem taşımaktadır (43).

Her bir fare kendi B lenfositleri tarafından sentezlenen on milyon birbirinden farklı antikor sentezleyebilir. Her bir antikor tek bir antijenik determinanı tanıyabilir. Bir determinanta karşı farede oluşan immün yanıt incelendiğinde, yalnızca antijenlerin epitop sayısı kadar antikor tipinin olduğu görülür. Uygun absorpsiyon ya da allojenik immünizasyon teknikleri kullanılarak antikor çeşitliliği tek bir determinanta karşı sınırlandırıldığında, oluşan serumların antikor titreleri düşüktür, sınırlı miktarda antikor elde edilir ve yeni bir hayvanda aynı spesifik antikoru üretmek güçtür (44).

1960'lara kadar myeloma proteinlerinin yapısı araştırmacılar tarafından açıklanamamıştır. Daha sonraki zamanlarda Michael Potter, ilk defa myeloma hücrelerinin fare üzerinde uyarılmasını sağlamış ve böylelikle çok miktarda monoklonal antikor üretebilmiştir. Ancak birçok denemeye rağmen bir antijene karşı oluşturulmuş spesifik antikor sentezleyebilen tümörleri uyarmak mümkün olamamıştır. Daha sonra Leo Sachs ve

arkadaşları doku kültüründe bir fare myeloma hücre dizisi üretmeyi başarmışlar, ama daha sonra bu hücre dizisini koruyamamışlardır. 1973'lerde Richard G. Cotton, David S. Secher ve Cesar Milstein ilk kez kültüre edilmiş hücre dizisi tarafından salgılanan bir fare myelom proteinin yapısal mutantlarını üretmişlerdir. Matthew D. Scharff tarafından yapılan araştırmalar, paralel olarak kültüre alınmış hücrelerdeki spontan mutasyonlar sonucu üretilen proteinlerin yapıları ve ayrıca mutasyon sıklıkları hakkında bilgi vermiştir (43,44).

1975'te C. Milstein ve G. Köhler, hücre füzyonunu sağlayan bir ajanın varlığında, kararlaştırılmış bir antijen ile immünize edilmiş farelerin dalağında alınmış lenfositler ile myeloma hücrelerini birleştirmişlerdir. İlk denemelerde immünojen olarak koyun kırmızı kan hücrelerini kullanmışlardır. Oluşan hibridoma hücreleri B lenfositlerinden antikor salgılama özelliklerini, myeloma hücrelerinden ise ölümsüzlük özelliklerini alarak tek bir antijenik determinanta karşı çok miktarda özgül antikor üreten klonlar kültürde üretilmiştir. İlk kez, spesifitesi önceden tespit edilen bir monoklonal antikor salgılayan füzyon hücresi (hibrit hücre) hücre kültür ortamlarında sürekli olarak geliştirilebilmiştir. Aynı yıllarda Jonathan C. Howard ve Geoffrey W. Butcher fare doku uygunluk antijenlerine karşı bir dizi monoklonal antikor üretmişlerdir (44, 45). Hibrid hücreler tek tek klonlanabilir ve her bir klon tek bir antijenik determinanta karşı çok miktarda benzer antikor üretir. Her bir klon uzun süre saklanabilir. Klon örnekleri kültürde üretilebilirler ya da fazla miktarda monoklonal antikor üretimi için hayvanlara enjekte edilebilirler. Bu genel metotla üretilen yüksek özgünlükteki monoklonal antikorlar birçok biyolojik araştırma ve klinik tıp alanlarında kullanılmaktadır (46).

Köhler ve Milstein'in geliştirdiği hibridoma tekniği, monoklonal antikor üretiminde önemli bir dönüm noktası olmuştur. Bu yöntem ile kararlaştırılan antijene spesifik monoklonal antikor üreten hibrit hücreleri seçmek için geliştirilen hibridomaların deney hayvanlarına enjekte edilmesiyle sınırlı sayıda monoklonal antikor üretmek mümkündür. Bunun dışında çok sayıda hibrit hücre elde etmek için in vitro koşullarda uygulanan çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu üretim sistemlerinin başarısı, hücrelerin çoğalması ve

monoklonal antikor üretme aktivitesi gibi hibridoma yönteminin özelliklerine bağlıdır (47,48).

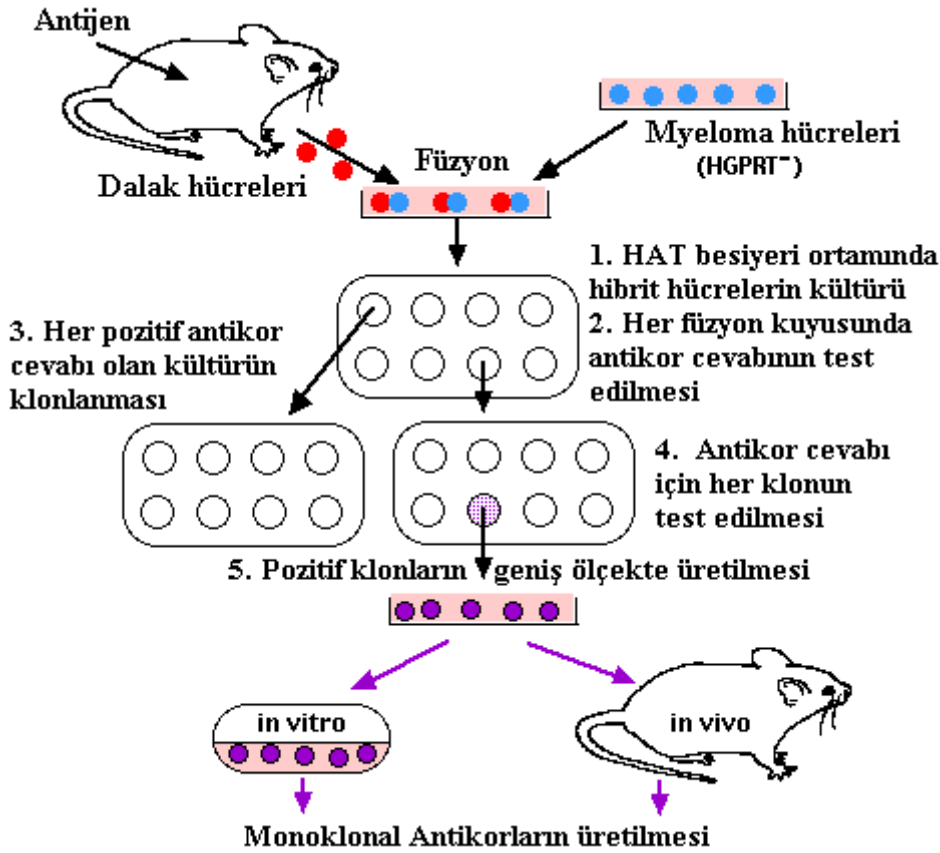
Georges Köhler ve Cesar Milstein somatik mutasyonlar üzerine yaptıkları çalışmalarında, antikor sentezinin genetik kontrolü hakkında daha çok bilgi edinmek amacıyla oldukça farklı bir hücre dizisini incelemişlerdir. Bu amaçla antikor spesifitesinin regülatör bölgesini ve antikor molekülünün hafif ve ağır zincirlerinin değişken bölgesini, diğerinin ise komplemanın bağlanması, antikor molekülünün membranlardan geçişi ve molekülün membranlara bağlanması gibi efektör işlevlerden sorumlu sabit bölgesini kodladığı görülmüştür. Her lenfosit, hücredeki diğer birçok gen dışında tek bir V (variabl, değişken) ve C (constant, sabit) gen çifti ile kodlanan bir antikor sentezler. Hücrenin iki kromozomunun her birinde bulunan V ya da C geninin farklı allelleri ya da varyant formları bulunduğu yalnızca kromozomlardan birinin üzerindeki allel aktiftir (46).

1973'de Cotton ve Milstein, biri fare diğeri de rat dizisinden alınan iki myelom hücrelerini birleştirmişlerdir. Bu hibrid hücrelerin analizi sonucu parental hücreler tarafından sentezlenen farklı zincir kombinasyonlarını içeren yeni sentezlenen moleküllerin salgılandığını görmüşlerdir. Buradan V ve C bölgelerini kodlayan genlerin aynı kromozom üzerinde olduğu sonucu çıkarılmıştır. Tüm DNA kalıbı tamamlayıcı bir nükleer RNA ipliğine transkripte olur. V ve C bölgelerini kodlayan DNA dizileri arasında intronlar bulunur. RNA hücrel enzimlerle muamele edilerek intron bölgeleri kesilip çıkarılırsa V ve C bölgelerini kodlayan diziler yan yana gelirler. Bu işlemler immunoglobulin (Ig) zincir proteinini sentezleyecek mRNA molekülünü oluşturmak amacıyla yapılır. Bu hibrid myelom (translasyon) deneyi V ve C dizilerinin tek bir RNA molekülünde bir araya gelerek birleştiklerini göstermiştir. Bu sonuç, her iki ebeveyn den gelen bilgilerin baskın olarak birleşmiş hücreler tarafından eksprese olan hibridlerde allellik olmadığını da göstermiştir (49).

Bu bulgu, Köhler ve Milstein'de plazma hücresinin sürekli spesifik antikor salgılamasını sağlamak için bir myelom hücresi ile normal bir lenfositin ya da plazma

hücresinin birleştirilebileceği fikrini doğurmuştur. Füzyon işlemi ile terminal hücrede bir antijenle uyarılmış B lenfositten türetilen plazma hücresinde gerçekleşen bir fonksiyonun, elde edilecek olan hücre dizisinde sürekli oluşumu sağlanır. İlk denemeler için immunojen olarak koyun kırmızı kan hücrelerini seçmişler ve hücre füzyonunu sağlayan bir ajan ile bağışık farelerin dalak hücreleri ve fare myelom hücrelerini birleştirmişlerdir (Şekil 3. 1). Hibrid hücreler seçici besiyerinde belirlenmiş ve immünoglobulin salgıladıkları belirlenmiştir. Bunların bazıları kırmızı kan hücrelerine karşı üretilen antikorlardır. Antikorumun tek bir moleküle olan spesifitesi tespit edilmiş klonları izole edilerek kültürde üretilmiştir (43).

1975’de Jonathan C. Howard ve Geoffrey W. Butcher, fare doku uygunluk antijenleri ile hücre doku reaksiyonlarında rol oynayan hücre yüzey belirteçlerine karşı monoklonal antikorların üretildiği başarılı bir füzyon olayını gerçekleştirmişlerdir (43).



Şekil 3. 1. Monoklonal antikor elde edilmesi

Hibridoma tekniği, monoklonal antikor üretiminde bu güne kadar kullanılan en etkili yöntemlerden biridir. Bu yöntem araştırmaya yönelik ve tanısai materyaller olarak kullanılan monoklonal antikorların geliştirilmesinde birçok ticari firma tarafından rutin olarak kullanılmaktadır. 1975'ten beri birçok antijene karşı spesifik reaksiyon gösteren 10.000'den fazla hücre klonu geliştirilmiştir ve yeni ortaya çıkan infeksiyon hastalıklarının hızlı tanıları ve tedavilerinde kullanılmak üzere monoklonal antikor geliştirme çalışmalarına gereksinim duyulmaktadır (50).

Hibridoma tekniğinin dezavantajları arasında; füzyon işleminin çoğunlukla kemirgen hayvanların dalağındaki B hücreleri ile sınırlı kalması, kimyasal füzyon işleminin rastgele meydana gelmesi, kompleks karışımlara karşı antikor üretiminin oldukça zor olması, doku kültürü uygulamaları için gereken besiyeri, fetal bovine serum (FBS) ve bunun gibi malzemelerin pahalı olması sayılabilir (51).

Hibridoma tekniği bu dezavantajlarının yanı sıra uygulanması kolay, oldukça etkili ve güvenilir bir yöntemdir. Hibrit hücreler, epitop haritalama çalışmalarında ve in vivo modellerde kullanılabilecek glikozillenmiş monoklonal antikorlar üretebilirler. Bu hücreler sınırsız sayıda antikor üretme kapasitesindedirler. Homojen preparat elde etmek için basit bir besiyerinde hibrit hücre üretimi ardında antikorun ürettirilmesi ve saflaştırılması işlemine gerek duyulmaktadır. Serum içermeyen kültür kullanılarak da daha düşük maliyette monoklonal antikor üretimi gerçekleştirilebilir (51).

Bir hayvanın bir antijen ile immünizasyonu ile B lenfositler uyarılarak, antijeni tanımak üzere aktif hale gelir ve ardından antijen üzerindeki çok sayıda epitop bölgesinin tanınması sonucunda antikor üretimi gerçekleşir. Her bir memeli hücresinde B lenfositler, genellikle 6-12 aminoasitten oluşan tek bir epitopu tanıyan antikor üretme yeteneğine sahiptir. Tek bir B hücresi yüzlerce antikor üretmesine rağmen, bunların antijen bağlama bölgeleri benzer yapıdadır. Oluşan immün yanıtın derecesi enjekte edilen antijenin immünojenitesine bağlı olarak değişir. Bir ortamda birçok farklı B hücresi tarafından üretilen antikor

toplulukları, farklı antijenlere karşı özelleşmiş B hücre klonlarından köken aldıkları için poliklonal olarak isimlendirilirler. B hücreleri bir hayvandan alınıp in vitro ortamda kültüre edildiklerinde, herhangi bir değişikliğe uğratılmamış ya da ölümsüz hale getirilmemişlerse birkaç gün içinde ölürlür. İzole edilerek ölümsüzleştirilmiş tek bir B hücre klonuna monoklonal denir. Poliklonal antikorlar ile kıyaslandığında monoklonal antikorlar tek bir antijene spesifik ve homojen özellik gösterirler. Bu özellikler, monoklonal antikorların tanı kitlerinin hazırlanmasında ve terapötiklerin geliştirilmesinde ve uygulanmasında çok etkili bir materyal haline getirmiştir (52).

Çoğu kez poliklonal antikorlar, tarama testlerinin geliştirilmesi için yeterli değildir. Patojen üzerindeki çoklu epitop bölgesini ya da antijeni, korunmuş yüzey epitopları ile patojenin birçok serolojik suşunu tanırlar, fakat ilgili suşları birbirinden ayırt edemeyebilirler. Konakçı hayvanda üretilen antikorlar içerisinde polispesifik antikorlar da bulunur. Bu antikorlar, deneyde kullanılan antijen preparatındaki kontaminantlarla istenmeyen reaksiyonlara yol açabilirler. Monoklonal antikorların en önemli özelliklerinden biri son derece spesifik olmalarıdır. Bir hidroma soyu geliştirildiği zaman, antijene spesifik monoklonal antikorlar büyük miktarlarda kolayca üretilirler. Aynı zamanda bu antikorların kullanımıyla, poliklonal antikor preparatlarında görülen çapraz reaksiyonlar da önlenir ve bağışıklanmış hayvanlardan yüksek afiniteli monoklonal antikorlar kolayca üretilir (53).

3.2. Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları

Uzun yıllardır antijenlerin tanımlanması, saflaştırılması, miktarlarının tespit edilmesi, genetik haritalarının çıkarılması, modifiye edilmeleri, seçilmeleri ve yerlerinin belirlenmesi amacıyla ticari serumlar kullanılmıştır. Monoklonal antikorlar sınırsız sayıda elde edilebilen saf maddeler oldukları için zamanla bu ticari serumların yerini almışlardır ve antikor reaksiyonlarında kullanılmışlardır (44).

1975'te Köhler ve Milstein tarafından myeloma hücreleri ile yapılan füzyon işlemiyle normal antikor salgılayan B lenfositleri ölümsüz hale getirilmiştir. Böylece antikor spesifikliğı ve üretimindeki sorunlar giderilebilmiştir (53). Son yıllarda hibridoma hücreleri tarafından üretilen monoklonal antikorların kullanımı biyolojideki bütün alanlara yayılmış ve bu antikorlar serolojik uygulamalarda da kullanılmaya başlanmıştır (54-58).

Monoklonal antikorlar çok yüksek spesifiteye ve etkinliğe sahip olmaları nedeniyle tıp, veterinerlik alanlarında çok fazla kullanılmaktadırlar. Monoklonal antikorlar infeksiyon hastalıklarının araştırılmasında, tanılarında ve tedavilerinde kullanılabilirler. İnfeksiyon etkenlerinin (bakteri, virüs, mantar, parazit, vs.) alt gruplarının belirlenmesinde, hücrelerin hücre yüzey proteinlerinin saptanmasında ve salgılanan moleküllerin fonksiyonel analizlerinde, çeşitli hücrelerin yüzey antijenik moleküllerine göre birbirinden ayrılmasında ve antijenik haritalarının çıkarılmasında, özel hücre tiplerine karşı tek tip fenotipik belirteçlerin belirlenmesinde, moleküllerin afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmasında, iyi bir protein yapısı elde edebilmek için prob olarak kullanılmasında, hormon ve ilaçların RIA tekniğı ile belirlenmesinde, hormon ve ilaç üretiminde, immünoterapide, aşı üretiminde kullanılacak uygunlukta immünojenlerin seçilmesinde ve koruyucu antijen / epitoplarn tanımlanmasında, tümör lokalizasyonu ve sınıflandırılmasında, organ transplantasyonunda, histokompabilite testlerinde, doku tiplendirilmesinde, kan hücrelerinin yüzey moleküllerinin ve kan gruplarının belirlenmesinde, nörokimya ve embriyoloji alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca immüoglobulinlerin sentezlenmesinde, yapı ve fonksiyonlarının incelenmesinde, fonksiyonel hücre dizileri oluşturmak amacıyla da somatik hücre hibridizasyon tekniğı kullanılmıştır (53, 58,59).

Günümüze kadar bakteri, virüs, parazit, maya, bitki, kuş ve memeli türlerini kapsayan birçok kaynaktan alınan enzim ya da izoenzim sistemleri, büyük doku uygunluk antijenleri (MHC), hücre yüzeyi, tümör ve farklılaşma antijenleri, reseptörler ve hormonlar, enzimler ve izoenzimler, kompleks karbonhidratlar, nükleik asitler ve glikolipitler gibi antijenlere özgü monoklonal antikorlar üretilmiştir. En fazla üretilen monoklonal antikorlar memeli enzimlerine karşı yapılmıştır (45, 60-66).

Monoklonal antikorlar, somatik hücre ve enzim moleküler genetiği alanlarında spesifik problemlerin enzimleri tanımlanmasında, enzim genlerinin moleküler klonlanmasında, moleküler spesifik mRNA moleküllerini zenginleştirmek amacıyla polizom presipitasyonu ve enzimlerin immünopresipitasyonu için kullanılabilirler. Ayrıca monoklonal antikorlar bir ekspresyon vektör kütüphanesinden elde edilen enzim spesifik cDNA klonlarının izolasyonu için de kullanılabilir. Monoklonal antikorlar, enzimlerin ve izoenzimlerin evlasyonel biyolojilerinin belirlenmesinde de yardımcı olabilirler (58, 63).

Klinik alanda monoklonal antikorlar PLAP (Plasental alkalen fosfataz), PAP (Prostatik asit fosfataz), ürokinaz, ksantin oksidaz, alfa-cystohionaz ve terminal deoksinükleotid transferaz gibi tümör belirteçleri olarak kullanılabilen enzimlerin ortaya çıkarılması ve miktarlarının hesap edilmesinde, diğer belirteç enzimlerinde birçok organ fonksiyonlarının izlenmesinde kullanılırlar. Bu enzimler için kullanılan immün yöntemlerin ve immünotokimyasal yöntemlerin yeniden düzenlenmesinde, immünolojik saflaştırılmalarında yararlı olabilirler. Örnek olarak ksantin oksidaza yönelik monoklonal antikorlar, göğüs kansinomasında kullanılan kemoterapik bir sitotoksik ajanla etkilenebilirler. Nöraminidaz gibi mikrobiyal ve viral enzimlere özgü monoklonal antikorlar yalnızca epidemiyolojik araştırmalarda değil ayrıca tedavide de önemli yer tutarlar (63, 67,68).

Tümör tedavisinde kullanılan monoklonal antikorlar, toksik ilaçlara yönelik olarak belirli bir organın dokularına ya da spesifik tümör antijenlerine karşı oluşturulmuş antikorlardır ve bu antikorlar ilacın etkisini yoğunlaştırmak için ilaç moleküllerine bağlanabilirler ya da tümör hücrelerine karşı antitümör antikorları üretmek için kullanılabilirler (43).

Monoklonal antikorlar, benzer histolojik görünümde olan tümörlerin yüzey antijenik moleküllerinin belirlenmesinde, kanda bulunan veya hücrelere bağlanmış olan tümör antijenlerinin ve alt tiplerinin tayininde, immünotoksinlerin hazırlanmasında, anti-tümör

spesifik antikorlara bağlantılı sitotoksik ajanlarla terapide ve tümörle ilgili teşhise yönelik çalışmalarda kullanılmaktadırlar (69).

Teorik olarak, herhangi bir enfeksiyöz ya da ateşli bir hastalığın klinik seyrini değiştiren bir monoklonal antikor üretilebilir. Bu hipotez, monoklonal antikorların çeşitli klinik hastalıklarda özellikle alloimmün ve otoimmün hastalıklarda kullanımına ilişkin çok sayıda çalışmanın yapılmasına öncülük etmiştir. Monoklonal antikorlar, romatoid artrit hastalığında ateşin düzeltilmesinde, Rh uyuşmazlığı, doku uyuşmazlığı reaksiyonu ve kronik iltihabi barsak hastalığı (Crohn hastalığı), kronik astım, lenfoma, miyokardiyal enfarktüs ve ülseratif kolit gibi birçok hastalığın önlenmesinde başarıyla kullanılmışlardır. Son yıllarda monoklonal antikorların sepsisin ve septik şokun patogenezinin değişiminde kullanılması deneysel ve klinik alanda büyük ilgi uyandırmıştır (70).

Monoklonal antikorların ve türevlerinin kanser tedavisinde kullanımına yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Öncül B ve olgun B lenfositlerinin yüzeylerinde yer alan bir transmembran proteini olan CD20 molekülüne karşı üretilen bir kimerik IgG₁ olan Rituximab kanser tedavileri için geliştirilmiş ilk monoklonal antikordur. Günümüzde sadece insan kökenli bir monoklonal antikor olan polivizumab, respiratuvar sinsityal virüse yönelik olarak geliştirilmiş, prematüre bebeklerde bronşlarda ve akciğerlerde görülen displazinin tedavisinde başarıyla kullanılmıştır (48). Günümüzde ilaç olarak kullanılan monoklonal antikorlar ve hedef molekülleri tablo 3. 1.'de verilmiştir.

Monoklonal antikorların kanser tedavisindeki kullanımına ilişkin bir diğer yöntem, tümör hücrelerinin etrafına zararlı radyasyon ışını yayabilen radyoaktif maddeleri antikorlara bağlayarak onları daha etkili hale getirmektir. Bu yöntemin avantajı, yalnızca tümör hücrelerinin öldürülmesi ve ilaç yan etkilerin azaltılmasıdır. Tümör hücreleri için toksik olduğu bilinen kemoterapötik ilaçlar da tümör hücrelerinin yüzey antijenlerine spesifik monoklonal antikorlar bu amaçla kullanılabilir. Bu yöntemde sitotoksik ajanlar tümör hücrelerine özgü antikorlar kullanılarak, sistemik ilaç uygulamalarının doz sınırlayıcı yan

etkileri olmaksızın tümör bölgelerinde yüksek konsantrasyonlarda etki edebilirler. Doksorubisin ve Calicheamisin gibi ilaçlar doğrudan monoklonal antikora bağlanabilirler. Calicheamisinin bu şekilde vücuda verilmesi klinik alanda kullanımını sağlarken tek başına uygulanmasının ise tüm vücuda toksik etki yaptığı belirlenmiştir. Diğer yaklaşımlardan birisi de risin, difteri ya da pseudomonas toksini gibi bitki ve bakteriyel biyolojik toksinlerin doğrudan monoklonal antikora bağlanarak kullanılmalarıdır. Bunlar hücre içine girdiklerinde düşük konsantrasyonlarda protein sentezini inhibe ederler ve insanlarda güçlü immün yanıt oluştururlar. Bu durum toksinlerin devamlı olarak kullanımını kısıtlamaktadır (71,72).

Tablo 3. 1. Günümüzde kullanılan monoklonal antikor ve füzyon moleküllerinin listesi

Antikor Adı	Ticari İsmi	Kökeni	Hedef Molekül	Kullanılan Alan
OKT [®] 3 (Orthoclone)	Muromonab	Fare	CD3	Transplantasyon
Panorex [®]	Edrecolomab	Fare	EpCAM	Onkoloji
Reopro [®]	Rituximab	Kimerik	gpIIb/IIIa	Kardiyovasküler Hastalıklar
Mabthera [®] /Rituxan [®]	Rituximab	Kimerik	CD20	Onkoloji
Simulect [®]	Baziliximab	Kimerik	CD25	Transplantasyon
Remicade [®]	Infliximab	Kimerik	TNF- α	İnflamasyon
Zenapax [®]	Daclizumab	Humanize	CD25	Transplantasyon
Synagis [®]	Palivizumab	Humanize	RSV	İnfeziyöz Hastalık
Herceptin [®]	Transtuzumab	Humanize	HER2/Neu	Onkoloji
Mylotarg [®]	Gemtuzumab	Humanize	CD33	Onkoloji
MabCampath [®] / Campath [®]	Alemtuzumab	Humanize	CD52	Onkoloji
Zevalin [®]	Ibritumomab	⁹⁰ Y/ ¹¹¹ I-Fare	CD20	Onkoloji
Humira [®]	Adalimumab	İnsan	TNF- α	İnflamasyon
Xolair [®]	Omalizumab	Humanize	IgE	Allerjik Astım
Bexxar [®]	Tositumomab	¹³¹ I Fare	CD20	Onkoloji
Erbitux [®] , IMC-C225	Cetuximab	Kimerik	EGF-R	Onkoloji
Avastin [®]	Bevacizumab	Humanize	VEGF	Onkoloji
HuMax-CD4 TM	Zanolilumab	İnsan	CD4	Onkoloji
Amevive [®]	Alefacept	LFA-3/İnsan Fc	CD2	Dermatoloji
Enbrel [®]	Etanercept	TNF-RII/İnsanFc	TNF- α	İnflamasyon

İlk klinik uygulamalarda fare monoklonal antikoları kullanılmıştır. Bu antikoların insanlarda tedavi amaçlı kullanılmaları üç temel nedenden dolayı kısıtlanmıştır. (1) Spesifik

efektör fonksiyonu yerine getirmek üzere farenin Fc domaininin, insan hücrel Fc reseptörleri ile etkileşiminde değişken özellik göstermesi, (2) monoklonal antikorların insan vücudundaki yarı ömürlerinin oldukça düşük olması ve (3) bu antikorlar ile tedavi edilen hastaların yaklaşık %80'inde tekrarlanan dozlar sonrasında fare antikorlarına karşı immün yanıtın gelişmesidir. İnsan anti-fare antikor (HAMA) yanıtlarının oluşması, monoklonal antikorların tedavideki kullanımlarını kısıtlayan en önemli engellerden biridir. Fare kökenli monoklonal antikor ile yapılan tedavi sonrasında anafilaksi ve alerji oluşumu görülebilir ve bu şekilde uygulanan tedavi yönteminin etkisi önceki tedaviden daha az olabilir (48, 73).

Son yıllarda genetik mühendisliği kullanılmasıyla kimerik ya da bütünüyle insansı antikorların üretilmesi ve diğer tedavi uygulamalarının geliştirilmesiyle immün yanıtın baskılanması karşılaşılan bu sorunların çözümünde etkili olunabilir. Kimerik antikor yapılarının %65-90'ı insan kökenlidir ve antijenin tanınmasından sorumlu fare değişken bölgeleri ile insan antikorunun sabit ya da efektör bölgeleri ile birleşmelerinden oluşurlar. İnsansı antikorların yaklaşık %95'i insan kökenlidir ve antikor spesifitesini belirleyen fare antikorlarının çok değişken bölgesinin ya da tamamlayıcı determinant bölgelerinin, insan antikorlarına bağlanmasıyla elde edilirler. İnsan kökenli antikorlar fare antikorlarından daha düşük immünojenite gösterirler ve Fc kısmına bağlı fonksiyonların yerine getirilmesinde daha etkili fonksiyon görürler. Fare monoklonal antikorlarının insan kan dolaşımındaki yarı ömrü iki gün iken kimerik monoklonal antikorların yarı ömrü yaklaşık iki haftadan fazladır. Genetik yapısı değiştirilmiş transgenik fare üretiminin gelişmesi ve sentetik antikor kütüphanelerinin oluşturulmasındaki ilerlemeler bütünüyle insansı antikorların ticari ölçekte üretimini mümkün kılmıştır (74).

Hibridoma hücre DNA'sında bir antikorun ağır ve hafif zincirleri kodlayan gen bölgelerinin gen kütüphanelerini oluşturmak amacıyla PCR'dan yararlanır. Bu yöntemde birçok ağır ve hafif zincir rastgele bir şekilde birleştirilerek oluşan Fab klonlarının istenilen antijene karşı antikor aktivitesi tespit edilir. Bu teknoloji ile immünizasyon yapılmaksızın ve özellikle insan monoklonal antikorlarında olduğu gibi üretim güçlükleri ile karşılaşmadan farklı spesifitede milyonlarca hücre klonu üretmek, bunların istenilen spesifitede olup

olmadıklarını hızla belirlemek ve istenilen monoklonal Fab yapılarını oluşturmak mümkündür (48, 75).

3.3. Monoklonal Antikorların Üretilmesi

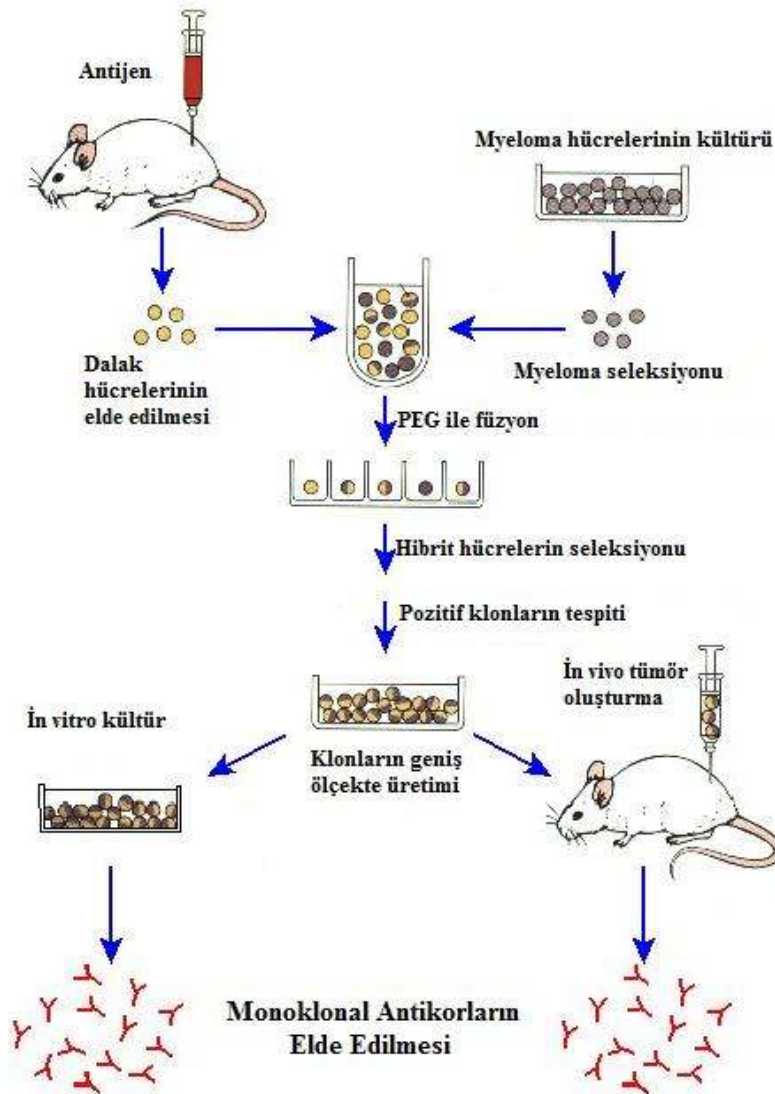
Günümüzde monoklonal antikor üretiminde; hibridoma teknolojisi ve immün antikor kütüphaneleri olmak üzere iki temel yöntem kullanılmaktadır. Monoklonal antikor salgılayan hibridomaların üretimi için uygun olduklarından fareler yaygın olarak kullanılırlar. Monoklonal antikor kütüphanelerinin üretiminde ise insan, fare, tavşan ve kuşlar kullanılır. Bir monoklonal antikorun tanı, araştırma ya da tedavi amacıyla kullanımı, monoklonal antikor üretiminde uygulanması gereken yöntemin seçilmesinde etkilidir. Tanı yöntemlerinde kullanılacak bir monoklonal antikor üretilmek isteniyorsa ve bol miktarda saf antijen varsa, en uygun yöntem bağışıklanmış fareler kullanılarak hibrit hücreler üretmektir. Ancak antijen saflaştırılamıyorsa antikor kütüphane tekniği kullanılabilir (59).

Diğer türlere uygun myeloma hücre soylarının bulunmaması, hibridoma tekniğinin kemirgenler dışındaki türlerde yaygın olarak kullanımını engellemiştir. Birçok laboratuarda tavşan, koyun, sığır gibi kemirgen olmayan türler için hibridoma füzyonlarının kullanımı heteromyeloma füzyon eşleri ile mümkündür ve oluşan klonlar düşük kararlılık gösterdiklerinden bu yöntem yaygın olarak kullanılmamıştır (59).

Monoklonal antikor üretme basamaklarını; 1. İmmünizasyonda kullanılacak antijen kaynağının, besiyerlerinin, mutant hücre soyunun ve hücre seçim metodunun belirlenmesi, 2. Hayvanların bağışıklanması ve immün yanıtın izlenmesi, 3. Füzyon, 4. Hibrit süpernatantların taranması, klonlanması ve dondurularak saklanması oluşturmaktadır (52).

Monoklonal antikor üretiminde doku kaynağı önemli yer tutar. Bağışıklanmış bir farede kompleks bir antijene yanıt olarak 1000-10.000 arasında antijene spesifik B hücreleri

oluşur. Başarılı bir monoklonal antikor üretimi, bu B hücrelerinin yeterli miktarda seçilmesine ve üretilen antikorların etkili bir test yöntemi ile taranmasına bağlıdır. Bağışıklanmış hayvanlarda, immün yanıt oluşumu artmaya başladığında B hücre havuzunun seçimi önemlidir. Kanda sınırlı sayıda aktif B hücreleri bulunur. Bu nedenle, rekombinat antikor kütüphanelerinin ya da hibridomaların üretimi için kan uygun bir lenfosit kaynağı değildir. Farelerdeki en iyi aktif B hücre kaynağı dalak %54'ünü içerir. Kemik iliği ve lenf nodülleri gibi antijene spesifik plazmablastlarca zengin dokular da bu işlemler için uygundur (51, 76) (Şekil 3. 2.).



Şekil 3. 2. Monoklonal antikor üretimi.

3.4. Hibridoma Yönteminde Önemli Faktörler

3.4.1. Deney Hayvanı

Monoklonal antikor üretiminde fare, sıçan, hamster ve tavşan gibi hayvan türleri kullanılabilir. Seçilen bir deney hayvanının dalak hücreleri, kullanılacak olan myeloma hücre soyu ile kararlı monoklonal antikor oluşturan hibrid hücreleri üretebilmelidir. Filogenetik olarak fareden farklı hayvanlar kullanılarak kararlı monoklonal antikor üreten hibrid hücreler elde etmek oldukça zordur. İnsan antijenleri gibi pek çoğu ksenogenetik antijenler için fareler en iyi seçimdir. Bunların bakımı daha kolaydır. Genellikle fare monoklonal antikorunu saf olarak elde etmek, sıçan monoklonal antikorundan daha kolaydır. İmmünizasyon için en uygun fareler ise BALB/c türü farelerdir. Bu farelerin dalakları genelde diğer fare suşlarının dalaklarından daha büyüktür. Ayrıca füzyon sonucu oluşan hibrid hücreler tamamen BALB/c genetik kökenli olacağı için asit sıvı üretimi yapılacaksa hibrit hücreler bu farelerde üretilmelidir (59).

Farelerin farklı inbred soyları arasında immün yanıtın oluşumu bakımından önemli derecede bir değişkenlik söz konusudur. Özellikle SJL fareleri genellikle güçlü bir immün yanıt oluşumuna neden olurlar. Aktif hibrid hücrelerin üretilmesinde bir güçlük ile karşılaşılırsa farklı fare suşları kullanılabilir (77).

Son zamanlarda dalak hücre vericisi olarak farelerden ziyade sıçanların kullanımı önem kazanmıştır. Bir avantaj olarak sıçanlarda hibridomalar in vivo üretildiklerinde daha fazla hacimlerde asit sıvı ya da serum salgırlar. Sıçan IgG moleküllerinin stafilokokal protein A'ya bağlanması ise bir dezavantajdır. Bu durumda farklı antikor saflaştırma yöntemleri kullanılmalıdır (53, 77).

Normal donör ile myeloma hücresi arasında ne kadar büyük bir filogenetik fark varsa, o kadar kararsız hibrid hücreler elde edilir. Sıçan-fare hibrid hücreleri oldukça başarılı sonuçlar verirken, tavşan-fare hibrid hücrelerinde aynı başarı elde edilememiştir (53).

3.4.2. Antijenin Özellikleri

Hibridoma tekniğinin önemli bir avantajı, saf antijen ile bağışıklama yapılabilmesi ve bu antijene has spesifitenin belirlenebilmesidir. Yüksek derecede saf olan bir antijen ile bağışıklık yapılması hibridoma tekniğini daha başarılı kılar. Bu yalnızca başarı şansını arttırmaz, aynı zamanda immün yanıtın belirlenmesinde karşılaşılan sorunların ve harcanan zamanın da önemli oranda azalmasını sağlar (52).

Monoklonal antikolar bir hayvanın immün sistemindeki hücreler tarafından antijen olarak kabul edilen herhangi bir maddeye karşı oluşturulabilirler. Yalnız bir madde karışımı bir hayvana enjekte edildiğinde, antijendeki belirli bölgeleri tanıyan birçok antikor oluşur. Antijenler üzerindeki bu bölgelere antijenik determinantlar ya da epitoplar denir. Üretilen poliklonal antikolar, antijen üzerindeki birçok farklı epitopu tanıyan bir dizi kompleks immünoglobulinlerdir. Daha önceden bilinen bir antijene karşı monoklonal antikor üretiminde ilk basamak antijeni immünizasyon işlemi için uygun bir şekilde hazırlamaktır. Kimyasal teknikler sonrası yapılan saflaştırmaların ardından immünizasyon işlemi yapılmalıdır (46).

Tipik bir antijene karşı oluşan antikor cevabı oldukça heterojendir. Bir fare ya da insan dalağında yaklaşık bir milyon farklı B lenfosit dizisi ve öncü plazma hücreleri bulunur. Bunların tümü ortak bir kök hücreden türetilmiştir fakat her bir dizi, farklı bir antijenik determinantı tanıyan antikor yapma yeteneğine sahiptir. Bir hayvan bir antijenle enjekte edildiğinde, enjekte edilen madde üzerindeki farklı antijen moleküllerine, tek bir antijen üzerindeki farklı determinantlara ve hatta tek bir determinanta özgü çeşitli antikolar sentezlenerek immün cevap oluşturulur (43).

Saf lenfokin ve sitokinleri, çözülmüş hücre membranları, SDS-poliakrilamid jellerden elde edilmiş protein bantları ve tüm hücreleri içeren birçok antijen preparatları monoklonal antikor üretilmesinde başarıyla kullanılmıştır. İmmünizasyonda kullanılacak antijen preparatının yapısı; antijenin hazırlanışındaki kolaylık, uygulanılacak tarama testi, istenilen özellikte monoklonal antikor üretimi gibi birçok faktöre bağlıdır. Özgün monoklonal antikor salgılayan hibrid hücrelerin bu yönde özelleştirilmesi için kararlaştırılmış saf antijenle bağışıklama yapılması uygundur. Protein saflaştırma yöntemleri ile moleküller çoğunlukla denatüre olurlar ve doğal formlarını kaybederler. Bu nedenle bunlar, immünojen olarak kullanıldığında immünizasyon sonucu, bir dezavantaj olarak ancak antijenin denatüre formunu tanıyabilen monoklonal antikorlar üretilmiş olur. Bu tür monoklonal antikorlar immün presipitasyon ve immün blot çalışmalarında kullanılabilirlerken, hücre yüzey antijenlerinin flow sitometri testlerinde ve ya antijenin doğal formunun kullanıldığı fonksiyonel testlerde kullanılamazlar (59).

İmmünojen preparat içeriklerinde bulunan kontaminant maddeler istenmeyen antikor yanıtlarına neden olurlar. Hücre artıkları, BSA stabilizatörleri ya da doku kültüründeki kullanılan FBS gibi kontaminant maddeler deney hayvanlarında antikor yanıtının oluşmasına neden olabilirler. Saf virüs preparatları ve rekombinant proteinler gibi saf antijenler ideal immünojenlerdir ve yüksek kaliteli monoklonal antikor üretiminde etkin bir şekilde kullanılabilirler (51).

3.4.3. İmmünizasyonun Özellikleri

Normal dalak vericisinin immünizasyonu iki temel amaca yönelik olarak gerçekleştirilir. İmmünizasyonun ana fonksiyonu, B hücrelerinin bölünmesini ve hibrit oluşturabilecek hücrelere farklılaşmasını sağlamaktır. Diğer amacı ise, istenilen klonları çoğaltmak ve böylece uygun hibridin elde edilme şansını arttırmaktır (53).

İmmünizasyon deney hayvanlarının ya deri altına ya da bağırsağı çevreleyen peritoneal (karın zarı) boşluğuna yapılır. İmmünizasyonda ayrıca birçok adjuvan immün cevabı arttırmak amacıyla kullanılır. Genel olarak, bozulmamış hücreler üzerinde yer alan hücre yüzey antijenleri oldukça immünojenik olduğundan pek çok araştırmacı bunlarla birlikte adjuvan kullanımına gerek duymamıştır. Kullanılan adjuvanlar arasında en çok kullanılanı Freund's adjuvanıdır. Ölü tüberküloz basilini içeren karışım immün sistemin herhangi bir antijeni tanımasında etkilidir. İyi bir immün cevap oluşturulmak amacıyla hayvanlar belirli aralıklarla enjekte edilirler. Her bir başarılı immünizasyonla, antijene cevap olarak hayvanda antijene özgü B lenfosit klonlarının uyarılmasında artış olur. İlgili B hücre klonlarının maksimum uyarımını sağlamak amacıyla dalak hücrelerinin toplanmasından 3 gün önce antijen intravenöz olarak verilir. İntravenöz enjeksiyonun nedeni uyarılmış hücrelerin dalakta toplanmasını sağlamaktır (46, 53).

İmmünizasyonun çoğu intraperitoneal olarak uygulandığında iyi sonuçlar elde edilebilir. Birçok araştırmacı son immünizasyonun adjuvansız intravenöz olarak uygulanmasını önermektedirler. Bu işlem farede kuyruk veninden olurken, sıçanda ya da hamster da genellikle intravenöz enjeksiyonlar uygulanmaz. Bu tür intravenöz immünizasyonların öldürücü sistemik reaksiyonlara neden olabileceği unutulmamalıdır (59).

Ard arda uygulanan immünizasyon işlemleri arasında geçen zaman, üretilen antikorun affinitesini büyük ölçüde etkiler. İki immünizasyon arasında geçen zaman arttıkça, antijen seviyeleri azalır ve sadece yüksek affiniteli B hücreleri son immünizasyona yanıt verir. Oluşan yanıt çoğunlukla daha immünojenik antijene karşı gerçekleşir. Bu olayın büyük bir kısmı antijenle aktif hale gelmiş B hücreleri ve foliküler dendritik hücreler tarafından oluşturulan germinal merkezlerde meydana gelir (52).

Sekonder bir immün yanıt sırasında ortalama antikor afinitesinin artması ve izotip sınıf dönüşümünün olabilmesi için 4-5 günlük zamana ihtiyaç vardır. İmmün sistemin spesifik bir immünojene karşı ilk yanıtı IgM antikor üretimi şeklinde gerçekleşir. Bu yanıtın oluşumundan

sonra, her bir B hücresi kendi immünoglobulin izotipinden bir sınıf değişimi geçirebilir. Son olarak bilinen immünizasyon işleminden önce en az 3 haftalık bir dinlenme periyodu izlenirse, oluşan ürünlerin IgG ve IgA alt sınıfı antikorlar oldukları görülür. ELISA testi ile antikorun belirlenmesi, antijenin immün afinite kromatografi yöntemiyle saflaştırılması gibi birçok antikor kullanım alanlarında, stabilite ve fiziksel avantajları bakımından IgM izotipinden üstün olduklarından genellikle IgG antikorları tercih edilir (52).

3.4.4. Besleyici Hücreler ve Özellikleri

Besleyici hücreler genellikle timositler, makrofajlar ya da fibroblastlardır. Füzyon ürünlerinin çoğalmalarını sağlamak amacıyla birlikte kültüre edilirler. Bu hücreler kültür ortamında zamanla ölürler fakat fibroblastların bölünmelerini ve hibritlerden daha fazla çoğalmalarını önlemek amacıyla bu hücreler radyasyona maruz bırakılmalıdırlar. Besleyici hücrelerin eklenmesi kültür için her zaman avantaj sağlar ve birçok araştırmacı tarafından bunun gerekli olduğu düşünülmektedir (52).

3.4.5. Hücre Hatları ve Myeloma Hücrelerinin Seçimi

Tümör, tek bir progenitör hücreden türetilmiş ölümsüz hücrelerden oluşan bir klondur. Hızla çoğalan myelom hücreleri, “myelom proteinleri” denilen çok miktarda anormal immünoglobulinler üretirler. Bu nedenle myelom hücreleri kültüre edilebilir ve salgıladıkları immünoglobulinlerin tümü kimyasal yapıları bakımından benzerdir. Bunlar da aslında monoklonal antikorlar olarak adlandırılır fakat hangi antijeni etkiledikleri ya da spesifik bir antijene karşı antikor üreten myelomların nasıl indüklendiği belirgin değildir.

Günümüzde daha çok tercih edilen myelom hücre soyları P3X63-Ag8.653, SP2/0-Ag 14, S194/5.XXO ve FO'dır (78). Bu hücre soylarının tamamı BALB/c genetik orjinlidir ve

avantaj olarak immünoglobulin salgılamadıkları için füzyon işleminde kullanılırlar. Bu hücre soyları %5 CO₂ , %96 nem ve 37°C ortam koşullarını sağlayan steril bir inkübatörde muhafaza edilmelidir ve 3-6.10⁵ hücre/ml'de log fazında üremeye bırakılmalıdır (52). Birçok sıçan ve fare tümör hücre soyu başarıyla kullanıldığı gibi SP2/0-Ag-14 fare hücre soyu hafif ya da ağır zincir içermeyen bir myeloma hücresi olduğundan monoklonal antikor üretiminde tercih edilir (59).

Hibridoma üretiminde kullanılan en yaygın hücre dizileri, IgG₁ moleküllerini salgılayan bir BALB/c myeloma hücresi olan MOPC-21'dir. Bu hücre dizisi Horibata ve Haris (1970) tarafından doku kültüründe çalışılmış ve P3K olarak yeniden isimlendirilmiştir. P3K'nın azaguanine dirençli bir alt dizisi Milstein'in laboratuvarında tespit edilmiş ve P3-X63-Ag-8 olarak adlandırılmıştır. Bu hücre dizisine kısaca X63 denilmektedir ve ilk kez dalak-myeloma füzyonlarında kullanılmıştır. Bu füzyonlar sonucunda X63'ün γ_1 ve κ zincirlerinin yanı sıra dalak hücreleri ile birlikte immünoglobulinlerin salgılandığı görülmüştür. Daha sonra γ_1 ağır zincirini içermeyen ve P3-NS1-Ag4-1 olarak isimlendirilen bir hücre dizisi monoklonal antikor üretiminde yaygın olarak kullanılmıştır (53).

IR 983F ve YB2/O adı verilen sıçan myeloma hücreleri, sıçan hibrit hücrelerinin üretimi için geliştirilmiştir. Ayrıca sıçanların Lou suşundan köken alan ve ağır zincirler yerine κ zincirlerini salgılayan 210-RCY3-AG1 sıçan myeloma dizisi de elde edilmiştir (52,78). GM4672 gibi lenfoblastoid hücre soyları ile füzyon sonucunda insan-insan hibrit hücreleri başarıyla üretilmiştir (79).

Normal hücreler hem de novo hem de salvage sentez yolunu kullanarak nükleotid sentezlerler. Bu hücrelerin bulunduğu ortama 8-Azaguanin eklendiğinde, hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) enzimi ile katalizlenen salvage yoluyla 8-azaguanin, hücrelerin DNA'sına girer. Baz değişikliği nedeniyle fonksiyon göstermeyen bu tür hücreler HGPRT içermedikleri için salvage yolu kullanmayan hücreler, 8-azaguanine dirençlidirler ve ölmezler. Bu tür HGPRT(-) mutantlar, 8-azaguanin kullanılarak seçilebilir ve

immünoglobulinin ağır ve hafif zincirlerini üretme yeteneğine sahip olmadıklarından füzyon için myeloma hücreleri olarak kullanılabilirler (46, 80).

3.4.6. Füzyon İşlemi

1970'li yılların başından itibaren iki somatik hücrenin birleştirilmesi ile heterokaryon adı verilen bir hibrit hücre elde etmek mümkündür. Füzyon işlemi, iki hücrenin Sendai virüs denilen aktif olmayan zarflı virüs ya da polietilen glikol (PEG) ile inkübe edilmesi ile gerçekleştirilebilir. Bu yöntemlerle plazma membranları birleştirilerek iki ayrı hücrenin sitoplâzma ve çekirdeği tek bir hibrit hücrede bir araya getirilir (52, 81).

Füzyon protokolleri için yaklaşık 10^8 myeloma hücresine ihtiyaç duyulur. Myeloma hücreleri ekspansiyonel büyüme fazında olmalıdırlar. Eğer hücreler aşırı çoğalmışlarsa ya da canlılıkları %98-99'dan az ise başarılı bir füzyonun gerçekleşme olasılığı düşüktür. Füzyon sırasında dalak hücreleri ile myeloma hücrelerinin birleşme oranı önemli olmamakla birlikte en iyi sonuçlar 1:1-10:1 (dalak:myeloma) arasındaki oranlarda elde edilmiştir (53).

Hibrid hücrelerin canlı kalabilmeleri için füzyondan sonraki ilk 10 gün en kritik dönemdir. Diploid bir fare hücresi 40 kromozom içerdiğinden bir hibrit hücre ortalama 80 kromozom içerir. Fakat ilk birkaç gün içinde bu kromozomların birçoğu travmatik ve kararsız membran füzyon olaylarından dolayı kaybolurlar. Sonuç olarak belirli kromozomların kaybolması; hücre ölümüne, hücre üremesinin durmasına, immünoglobulin sentezleme yeteneğinin kaybolması ve buna bağlı olarak monoklonal antikor üretmeyen hibridlerin oluşmasına neden olur (52).

Füzyon işleminden sonra kültür ortamında birçok hücre tipi bulunur. Fakat hibrid ve birleşmemiş myeloma hücreleri dışındaki hücrelerin tümü ölür. Myeloma hücreleri, hibrid

hücrelerden daha fazla çoğalacağı için hibridomaları spesifik olarak seçmek gerekir. Bu amaçla en yaygın kullanılan yöntem HGPRT enziminden yoksun myeloma hücre soylarını kullanmak ve hücreleri hipoksantin, aminopterin ve timidin (HAT) içeren seçici bir besiyerinde kültüre etmektir. Aminopterin pürin ve primidin sentez yolunu bloke ettiğinden dolayı hücreler de novo yolu ile DNA sentezi yapamazlar. HGPRT'ye sahip normal hücreler diğer bir yol olan salvage yolunu kullanarak pürinleri yapmak için hipoksantini, primidinleri yapmak için timidini kullanabilirler. İmmünize hayvanın dalağındaki normal lenfositler doku kültüründe birkaç günden fazla çoğalamaz ve ölürlür. Ancak füzyon sonrasında HGPRT içermeyen myelom hücreleri birleştiği lenfositlerden HGPRT genlerini kullanabilirler ve salvage sentez yolu ile DNA sentezini gerçekleştirebilirler. Bu nedenle hibridomalar HAT besiyerinde ürerler (46, 52, 81) (Şekil 3. 3).

İlk kez 1964 yılında Littlefield tarafından pürin ve primidinlerin temel biyosentetik yolunun folik asit antagonisti olan aminopterin tarafından bloke edilebileceği öne sürülmüştür. Aminopterin bir seri karbon transferini önler ve dihidrofolatın tetrahidrofolata dönüşümünü sağlayarak temel sentetik yolda önemli rol oynar. Aminopterin varlığında hücre de novo yolu ile nükleotid sentezi yapamaz ve bu nedenle salvage yolunu kullanmak zorunda kalır. Normal bir hücre aminopterin varlığında canlılığını korurken bir HGPRT⁽⁻⁾ hücresi üreyemez. B hücreleri HGPRT enzimine sahip olduğundan HGPRT⁽⁻⁾ myeloma hücreleri ile birleştiğinde oluşan hibritler aminopterin varlığında üreyebilirler (Tablo 3. 2.) (52).

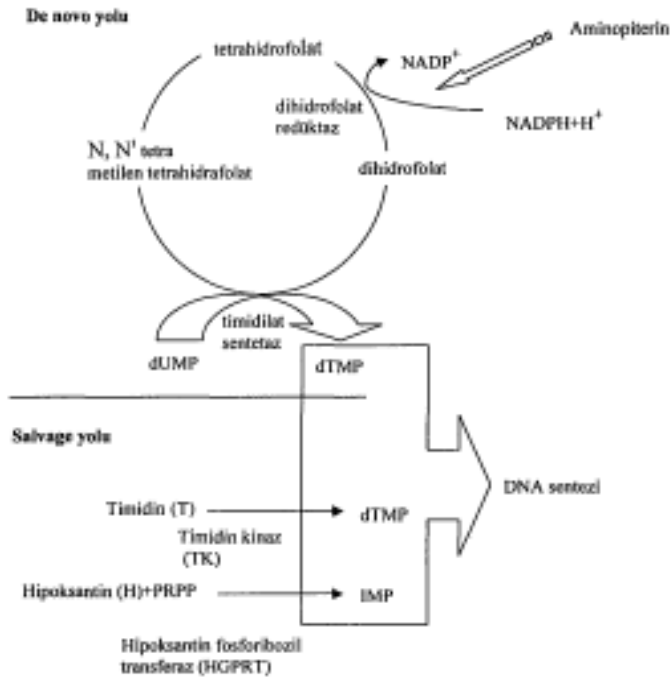
Tablo 3. 2. HAT besiyerinde hücreler ve canlılıkları

Hücre Tipi	DNA Sentezi		HAT Besiyerinde Canlılık Durumu
	Salvage Sentez Yolu	Denovo Sentez Yolu	
Myeloma	HGPRT ⁽⁻⁾	Aminopterin duyarlı	Ölür ¹
Dalak	HGPRT ⁽⁺⁾	Aminopterin duyarlı	Ölür ²
Myeloma-Dalak Hibrit	HGPRT ⁽⁻⁾	Aminopterin duyarlı	YAŞAR
Myeloma-Myeloma Hibrit	HGPRT ⁽⁻⁾	Aminopterin duyarlı	Ölür ¹
Dalak-Dalak Hibrit	HGPRT ⁽⁻⁾	Aminopterin duyarlı	Ölür ²

1. DNA sentezi yok

2. İn vitro ortamdaki yaşamı sınırlı

Bir hibrid hücre klonunun salgıladığı tüm antikorlar genetik olarak tek bir hücreden türetilir. Ancak her bir hibrid hücre, myelom hücresinden ve dalak hücresinden gelen kromozomlara sahiptir ve her iki kromozom grubunu da eksprese eder. Bir hibrid hücre, monoklonal antikorun iki komponentini üretmek yerine (bir hafif ve bir ağır zincir) iki ağır zincir ile iki hafif zincir üretir. Dalak hücresinin ağır ve hafif zinciri ile myelom hücresinin gamma (γ) ve kapa (κ) zincirlerini salgıladığı için böyle bir hücre HLGK şeklinde ifade edilir. Kromozomların hızlı bir şekilde kaybedilmesi açısından yapı bakımından özellikle çoğalmanın erken safhalarında hibrid hücrelere benzer. Bu durumda oluşan kayıp tesadüfi değildir: Ağır zincirler genellikle ilk olarak kaybolur (H ya da G) ve sonra hafif zincirlerden biri (L ya da K) kaybolur. Bu nedenle HLGK hibridi sekresyon örneği HLK ya da GLK şeklinde olan varyantların oluşumuna neden olur. Bunlarda sıra ile HL-HK-LK-L ve K şeklinde varyantlar oluştururlar. Spesifik olarak immün dalak hücresinin sadece ağır zincir ile hafif zinciri tanımlayan HL klonu istenen hücre klonudur (43).



Şekil 3. 3. HAT kültür ortamında de novo yolunun inhibe edilerek salvage yolunun kullanılması

Hibridoma teknolojisi ile herhangi bir antijen ile bağışıklanan canlıdan elde edilen ilgili antijene özgü antikorlar üreten in vitro ortamda sınırlı ömürlü olan B lenfositleri ile

sürekli bölünme özelliğine sahip myeloma hücrelerinin bir araya getirilmesini sağlar. Bu yolla antikor üreten B lenfositleri ölümsüzleştirilir.

Biyoteknolojik yöntemlerle elde edilen monoklonal antikorlar diğer antikorlara göre bazı farklı özellikler taşımaktadır:

1. Her bir hibrid sadece tek bir tip antikor ürettiğinden spesifik özelliktedir.
2. Hibridler tümör hücreleri gibi ölümsüzdürler, kültür sıvısına 10-50 µg/ml antikor salgırlar ve farelere enjekte edilerek periton sıvısına 1-10 mg/ml kadar yüksek antikor titreleri üreterek daha çok miktarda saf antikor elde edilebilir.
3. Spesifik B hücreleri bağışık bir farenin dalak hücrelerinde az sayıda bulunurken uygun hibridoma popülasyonunda 10-100 kat daha fazla sayıda bulunurlar.
4. Hibridoma hücre dizileri önceden var olmayan antikorları üretecek şekilde mutasyon geçirebilirler (44).

3.4.7. Klonlama İşlemi

Spesifik olarak monoklonal antikor ürettiği tespit edilen hibrit hücreler klonlanabilir. Hücreler oluşan hibritlerin gerçekten monoklonal özellikte olup olmadıklarından emin olmak ve onları ortamdaki monoklonal antikor üreticisi olmayan hibridlerden ayırmak amacıyla klonlanırlar. Klonlama işlemi ile tek tip hibrid hücresinin izolasyonu ve çoğaltılması amaçlanır (52, 53).

Pratikte hücre klonlanmasında kullanılan iki yöntem vardır. En yaygın kullanılan klonlama yöntemi olan alt klonlamada temel amaç hücreleri plaklarındaki her bir kuyucukta tek bir hücre bulununcaya kadar seyreltmektir. Füzyondan sonra hücrelerde sıklıkla kromozom kaybı görülür ve bu nedenle ilk klonlama ile sadece az miktarda aktif hücre elde edilebilir. İlk klonlama işlemi birkaç kez tekrarlanmalı ve her bir klonlama sonrasında klonlama verimliliği ve aktif hücre sayısı artmış olmalıdır. Sonunda hücreler kısmen kararlı

hale geleceklerdir. Klonlama için kullanılan ikinci yöntem ise agaroz jel gibi katı bir besiyerinde hücreleri üretmektir. Çeşitli jel sistemlerine serum, aminoasit ve antibiyotik eklenerek hücrelerin üremesi sağlanır. Oluşan hücre kümeleri pastör pipeti yardımıyla besiyerinden toplanıp füzyon plaklara konularak çoğaltılabilirler (43).

3.4.8. Monokonal Antikorların Saklanması

Hibrid hücrelerin ölümsüzlük özelliklerinin korunması amacıyla dondurularak saklanmaları gerekir. Antikorların genelde oldukça dayanıklı moleküller olmalarına rağmen doğru şekilde saklanmazlarsa aktivitelerini kaybedebilirler. Özellikle immünoglobulin konsantrasyonu düşük ise, hücreyi sürekli dondurma ve yeniden çözme işlemleri denatürasyona neden olur. Kültür sıvısının, serumun ya da saflaştırılmış hibridoma proteinlerinin liyofilizasyonu genelde aktivite kaybına yol açar. Hücreler dondurulmadan saklanırlarsa kontaminasyon ve mutasyon riski taşırlar. Antikor üreten hibridler -196°C 'de sıvı azot içerisinde dondurularak saklanabilirler. -80°C 'de dondurma işlemi memeli hücrelerinin uzun süreli muhafazası için yeterli değildir. Dondurma öncesi hücreler dimetil sülfoksit (DMSO) içeren besiyerine konurlar. DMSO dondurma işlemi sırasında oluşan buz kristallerinin oluşumunu ve hücre içi organellerin zarara uğramalarını önler (43, 52).

3.4.9. Hibrit Hücre Üretiminde Karşılaşılan Zorluklar

A. İnfeksiyon: İyi bir doku kültür tekniği kullanıldığında bakteriyel infeksiyon oluşma riski azalır. Birçok araştırmacı güvenlik ajanı olarak penisilini ve streptomisini (100 $\mu\text{g/ml}$) tercih etmektedir.

B. Üretim Kaybı: Bazı hibrid hücreler doğal olarak diğerlerinden daha kararlı olsalarda, hibrid hücreler genellikle kromozom kaybetme eğilimine sahiptirler. Bu nedenle,

tekrarlı klonlama işlemlerine rağmen, bazı hücre dizilerinde üretim kaybı gözlenir. Başlangıçta pozitif sonuç veren kültürlerin %50-70'inde aktivite kaybı olacaktır. Sağlıklı bir kültürde antikor üretiminin düşmesi, üretici olmayan varyantların aşırı ürediğinin bir göstergesidir. Hibridoma üretiminde hücre gelişiminin invert faz mikroskobu kullanılarak sürekli izlenmesi çok önemlidir.

C. HAT Seçiminin Hatalı Olması: Hücreler iyi üreme gösterdikleri halde tüm süpernatantlar antikor bakımından negatif sonuçlar veriyorsa, bu durum HAT seçiminde bir hata olduğunu gösterir. Aminopterin bozulması da bu duruma neden olabilir. HAT seçimini etkinliği, myeloma hücrelerinin birkaç gün HAT besiyerinde üretilmesi ile test edilebilir (53)

3.5. Monoklonal Antikor Tayini

3.5.1. Monoklonal Antikorların İşaretlenmesi

Antikorların işaretlenmesi onların deneylerdeki spesifitelerini artırır ve deney süresini kısaltır. İmkânlara, antikorların affinitelerine, karşılaştırılan test sisteminin tipine bağlı olarak farklı ajanlarla antikorları işaretlemek mümkündür.

3.5.1.1. Radyoaktif İşaretleme

Antikorlar ^{125}I chloramin, ^{125}I lactoperoksidaz, ^{125}I iodogen, ^3H gibi pekçok yöntemle işaretlenebilir. İzotop olarak ^{125}I yaygınca kullanılır. Bu, çözünür proteinlerin işaretlenmesi için uygundur. Yarılanma ömrü 60 gündür.

3.5.1.2. Floresan İşaretleme

İmmünokimyada en çok kullanılan florokromlar; floresan izotiyosiyanat (FITC) ve tetrametil rodamin izotiyosiyanat (TRITCH)'tır. FITC, flow sitometri yönteminde kullanılırken, TRITCH daha az kullanılır.

3.5.1.3. Enzimle İşaretleme

Antikorların enzimlerle konjugasyonları için pek çok yöntem vardır. ELISA adı verilen deney sistemlerinde enzimle işaretli birinci veya ikinci antikorlar kullanılmaktadır. En yaygın olarak Alkalen fosfataz ve Horseshoe peroksidaz enzimleri kullanılmaktadır.

3.5.1.4. Kemilüminesan İşaretleme

İzotopik olmayan immün deneyler antikorların lüminol veya akridinyum gibi kemilüminesan moleküllerle işaretlenmesi temeline dayanırlar. Radyoaktif immün deneylere hassasiyet açısından alternatif olarak kullanılırlar.

3.5.1.5. Gold İşaretler

Kolloidal gold problemlerinin kullanımı Faulk ve Taylor tarafından immünelektroskopi alanında başlatılmıştır. Daha sonra birçok kullanım alanı oluşturulmuş ve ışık mikroskopunun yanısıra gözle algılanabilecek metotlar geliştirilmiştir. Elektron mikroskopik incelemede kullanılırlar. İmmunblotlamada direk antikor-gold problemleri ek bir geliştiriciye gerek olmadan kırmızı bir renk oluştururlar. Direk olarak antikora ya da Protein A'ya bağlanarak işaretleme

yapılır. Kolloidal gold non-kovalen olarak elektrostatik adsorbsiyon ile makromoleküllere bağlanır. Çok stabildirler ve hazırlanmaları kolaydır. Optimal şartlar; gold partikülünün büyüklüğüne, iyon konsantrasyonuna, protein konsantrasyonuna, proteinin molekül ağırlığına ve izoelektrik noktasına bağlıdır.

3.5.1.6. Biotin ile İşaretleme

Biotin, biotinil-N-hidroksi süksinimid ester veya biotinil-E-aminokapronik asit N-hidroksisüksinimid ester formunda sentez edilir. Biotin avidin veya streptavidin ile tanımlanabilen antikora konjuge edilirler. Avidin, biotin için yüksek afiniteye sahip, yumurta albümininden elde edilen bir glikoproteindir. Biotin IgG antikora bağlanır ve florokomlar, enzimler veya radyoaktif kimyasallarla işaretlenebilir. Test sistemlerinde kullanılacak ikinci antikora bağlandığında, indirekt immün floresan, ELISA ve radyoimmünoassay (RIA) testlerinde etkili bir şekilde çalışılabilirler.

3.5.1.7. Biyosensörler

Biyosensörler, ortamdaki spesifik organik veya inorganik maddelerin varlığını veya konsantrasyonunu ölçebilen aygıtlardır. Bu sistemde biyolojik bir algılayıcı ve fiziksel bir transdüser bulunur. Bu hedef analite dair sinyal üretir. Biyolojik algılayıcılar enzimler, antikolar, mikroorganizmalar veya reseptörler olabilir. Fiziksel transdüserler ise elektrokimyasal, optik-elektronik, optik, elektronik, akustik veya kalorimetrik olabilmektedir. Biyosensörleri diğer biyoanalitik yöntemlerden ayıran özellik, analit izlerinin veya katalitik ürünün direk olarak veya bir anda ölçülmesidir. Biyoanalitlerin bir diğer üstünlüğü rejenere olmaları ve immobilize edilmiş biyolojik algılayıcının tekrar kullanılabilmesidir (88-90).

3.5.2. ELISA (Enzyme Linked İmmuno-Sorbent Assay) Testi

ELISA, çeşitli peptit, protein, antikor, toksin, virüs ve hormonların belirlenmesinde antikor-antijen ilişkisini temel alan (82) ve antijen ya da antikora bağlı bir enzim tarafından enzime özgü substratın ürüne çevrilmesiyle spektrofotometrik olarak ölçüm yapan bir tekniktir.

ELISA yönteminde 1960'lı yıllardan bugüne kadar gidecek artan bir şekilde birçok gelişmelere kaydedilmektedir. ELISA yöntemi, immünolojik belirleme ve hasta serum örneklerindeki tek ya da çok sayıda antijen, antikor ve haptenlerin miktarının belirlenmesi prensibini oluşturmaktadır. Bu ölçüm yolu ile örneğin; insan korion gonadotropinin, IgG, IgE, ve insülin ve östrojen gibi hormonların miktarı belirlenebilmektedir. Hepatit B yüzeyel antijenleri, bakteriyel toksinler, kandidiazis etkenleri, rotaviruslar, herpesviruslar da bu yöntem ile tesbit edilebilir. Ayrıca infeksiyonların yanı sıra antikor titreleri de belirlenmekte ve virüslere, bakterilere, maya ve mantarlara, parazitlere, DNA ve tiroglobuline karşı oluşan antikorların tespit edilmesinde bu yöntem kullanılmaktadır (83,84).

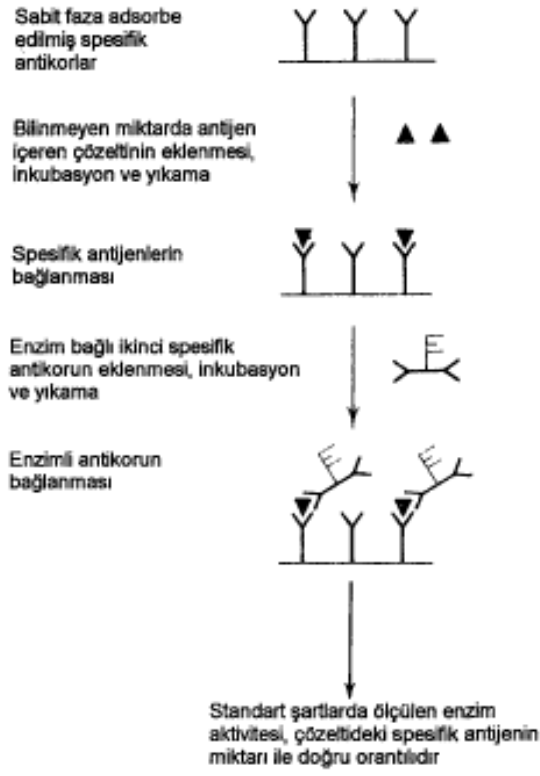
ELISA, antikorların veya antijenlerin spektrofotometrik olarak belirlendiği bir enzim testidir. Örnek içerisinde belirlenecek olan antikor ve antijenler, bu yöntem için seçilmiş olan enzime kovalent olarak bağlanırlar.

3.5.2.1. Sandwich ELISA Yöntemi: Bu yöntem ile hormonlar, tümör markırları ve serum proteinlerinin miktar tayinleri yapılabilmektedir. Katı faza sabitlendirilmiş spesifik antikorlar, miktarı bilinmeyen antijen olduğu örnek çözelti ile inkübe edilir. Antijen antikor birleşmesi sonrası yıkama işleminin ardından bir enzimle bağlanmış ikinci bir antikor (konjugat) ile inkübe edilerek immobilize bağlı antijenler ile bağlanması sağlanır. Standart şartlar altında ölçülmüş enzim aktivitesinin miktarı, bağlı antijen miktarı ile direkt olarak doğru orantılıdır.

Ayrıca bu yöntem hastalık durumunun (örneğin; infeksiyon hastalıkları) belirlenmesinde spesifik serum antikorların tespitinde kullanılmaktadır. Bunun için ilgili antijen ile kaplı olan mikropleyte örnek eklenir. Örnek içerisindeki antikor, antijen ile bağlanır ve immobilize hale gelir. Yıkama sonrası Sandwich formu oluşturmak için enzim bağlı antikor konjugatı eklenir. Tekrar yıkama sonrası kromojenik enzim substratı eklenerek bir renk reaksiyonu meydana getirilir. Oluşan rengin absorbands değeri spektrofotometrik okuyucu ile belirlenerek standartların absorbandsına göre miktar tayinleri yapılır. Mikropleyte bağlanan enzimin miktarı direkt olarak örnekteki antikor miktarı ile doğru orantılıdır (Şekil 3. 4.).

3.5.2.2. Kompetitif ELISA Yöntemi: T₃, T₄, progesteron gibi küçük molekül yapısına sahip antijenlerin tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Bilinen konsantrasyonda enzimle bağlanmış antijenler ve bilinmeyen konsantrasyondaki serbest antijenlerden oluşan karışım, sabit bir faza tutunmuş antikorlarla reaksiyona sokulur. Örnek içindeki antijen ve enzim bağlı antijen konjugatı sınırlı miktarda olan immobilize antikor için yarışım içerisine girerler. Yıkama sonrası kromojenik enzim substratı içeren çözelti ilave edilerek inkübasyona tabi tutulurlar ve bağlı enzimin aktivitesi ölçülür. Antikor-antijen-enzim kompleksi miktarı, örnek içerisinde bulunan antijen konsantrasyonu ile ters orantılı olarak ilişkilidir. Artan serum antijen miktarı daha az renk oluşumuna sebep olur ve enzim aktivitesinin oluşmasının sağlayan tutuklayıcı antikor ile antijen-enzim konjugatın düşük miktarda bağlanmasına yol açar.

Kontrol değerleri olarak serbest antijen içermeyen (antijensiz, antikorlu katı faz) ve sabit faza tutunmuş antikoru bulunmayan (antijenli, antikorsuz katı faz) numuneler kullanılır. Standart şartlarda ölçülen enzim aktivitesi, karışımdaki antijen konsantrasyonu veya enzim bağlanma ürünlerinin miktarı ile doğru orantılıdır (Şekil 3. 5.).



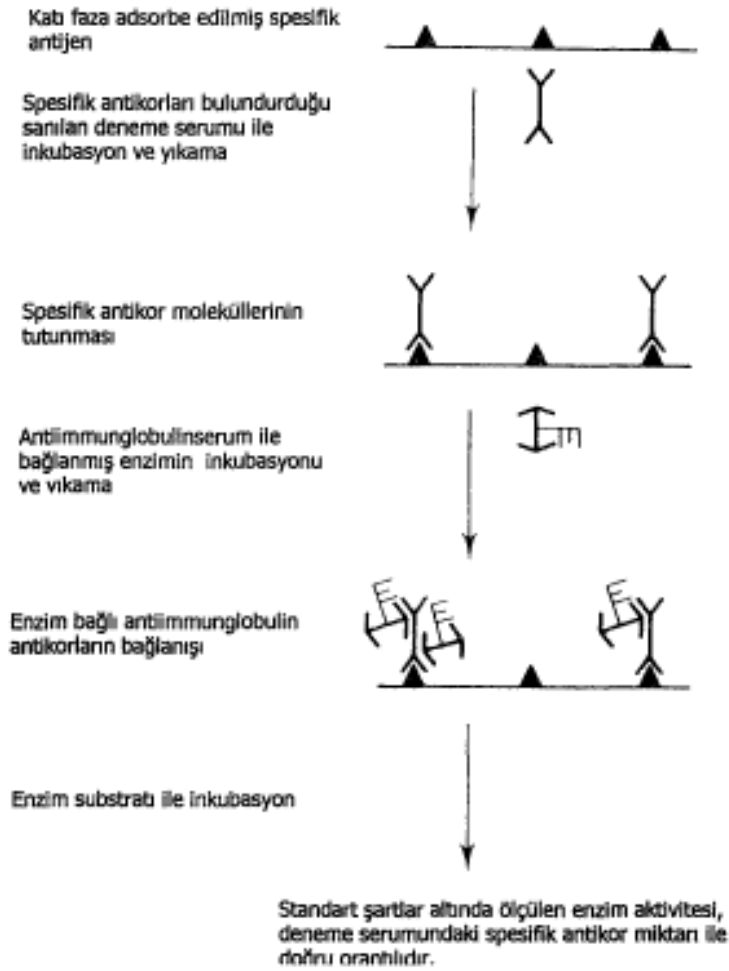
Şekil 3. 4. Sandwich Metodu (85).



Şekil 3. 5. Yarışmalı (kompetitif) ELISA (85).

3.5.2.3. İndirekt ELISA Testi

Dolaylı ELISA, antikor titrelerinin ölçülebildiği bir yöntemdir. Spesifik antijenler katı faza adsorbe edilirler. Antikorları içeren serum ilave edildiğinde antikorlar antijenlere bağlanırlar ve diğer bağlanmayan komponentler yıkanılır. Anti-immüoglobulin antikorlarla immün kompleksler oluşur. Yıkama işleminden sonra substrat ilave edilir ve enzim aktivitesi ölçülür. Elde edilen absorbans değeri örnek serumdaki spesifik antikor miktarı ile doğru orantılıdır (Şekil 3. 6.)



Şekil 3. 6. Dolaylı (İndirekt) ELISA (85).

3.5.2.4. Capture (Tutucu) ELISA Testi

Capture (tutucu) antikor katı bir faz üzerine adsorbe edilir. Bu şekilde belirli bir antijene karşı gelişen immün cevabın hastadaki titresini görülebilmektedir. Buna karşın, bu antikor standart bir belirteç olabilmektedir. Antikörün antijenin yokluğunda çapraz reaksiyon vermediği ve katı faza spesifik olarak bağlandığı bilinmelidir. Antijenin tespit edilmesi durumunda aynı tür antikörün bağlanmasını engellemek için farklı hayvanlardan elde edilmiş antikörlerin kullanımı diğer önemli bir durumdur (86).

3.5.3. ELISA Testinde Önemli Faktörler

3.5.3.1. Antijen veya Antikörün Katı Faza Bağlanması

Antijen veya antikörün katı faza bağlanmasında bulunan şartlar önemli ölçüde metodun sonuçlarını etkilemektedir.

3.5.3.2. Sıcaklık

Bazı antijenler için gece boyu 4°C'de inkübasyonunun 37°C'de bir inkübasyon periyodunun takip etmesinin daha iyi sonuçlar oluşturacağı belirtilmektedir. Daha yüksek inkübasyon sıcaklıkları (56°C'ye kadar) bazı hidrofobik antijenlerin daha iyi adsorbe olabilmelerini sağlayabilir. Bunun yanında daha yüksek sıcaklıklarda protein yapının denatüre olması söz konusudur. 4°C'de gece boyu inkübasyon yaygın olarak kullanılmaktadır ve genellikle ticari amaç taşımayan deneylerde yeterli bağlanmayı sağlamaktadır. Hızlı testler için 37°C'de 2 saat kaplama süresi sağlanması sonucun alınması için uygun olabilmektedir.

3.5.3.3. Antijen Konsantrasyonu

Yöntemin uygulanabilir olması için katı faz üzerindeki bağlama bölgelerinin antikor maksimum düzeyde bağlayacak olan doğru konsantrasyondaki antijen ile kaplı olması sağlanmalıdır. Buna karşın kaplama için kullanılan tampon içindeki antijen konsantrasyonu da yüksek antijen konsantrasyonlarında değişebilmektedir ve bu yüzden uygulama süresince antijen bağlanması oranının düşmesine neden olabilmektedir. Optimal antijen konsantrasyonu, bilinen pozitif ve negatif referans serumlar kullanılarak seyreltilmiş olan antijen titrasyonu ile karşılaştırılarak belirlenebilir.

3.5.3.4. Kullanılan Tamponun İçeriği

Tampon içeriği genellikle bikarbonat tamponu temeline dayanır ve tampon, ELISA'da kullanılan enzimin maksimum hızla çalıştığı tamponlama kapasitesine sahip olmalıdır.

3.5.3.5. Enzim Konjugatları

ELISA'da horseradish peroxidase (HRPO) enzimi, antikorlarla konjugasyonu sağlamak için kullanılan en yaygın enzimlerden birisidir. Bunun dışında alkalen fosfataz (AP)'da yaygın olarak kullanılmaktadır. B-galaktozidaz, üreaz ve glukoz oksidaz enzimleri ise konjugat elde edilmesinde daha az yaygınlıkta kullanılan enzimlerdir.

3.5.3.6. Substratlar

İdeal bir substrat belirli bir absorbans pik değerine sahip olmalı ve ayrıca karsinojenik özellikte olmamalıdır. Dakikalar içerisinde yüksek miktarda renk oluşturma özelliği gösterebilmelidir. Özellikle ticari kitlerde kullanım süresi boyunca stabil halde kalabilmelidir. 3,3,5,5, tetrametil benzidin (TMB), p-nitrofenil fosfat, 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate] diammonium salt (ABTS), o-toluidin, OPD ELISA enzim substratlarından bazılarıdır (86).

4. MATERİYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Kullanılan Cihazlar

1. Laminar akım kabin (Heraeus)
2. CO₂ inkübatörü (%5 CO₂, %95 nem ve 37°C) (LaboTect)
3. ELISA okuyucusu (Bio-Tek)
4. Soğutmalı santrifüj (Hettich)
5. Ultrasantrifüj (Beckman Coulter)
6. Floresan invert mikroskop (Olympus)
7. Işık mikroskobu (Olympus)
6. Sıcak su banyosu (20-55°C) (Nüve BM 402)
7. Buzdolabı (Profilo)
8. -20°C derin dondurucu (Uğur)
9. -80°C derin dondurucu (Revco)
10. Peristaltik pompa (Rainin)
11. Manyetik karıştırıcı (Hangping, Variomag)
12. Vorteks (Nüve NM 110)
13. Pipet tabancası (Boeco)
14. 8 kanallı pipet (Gilson)
15. Pipetler (0,5-2 µl, 0,5-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml) (Gilson)
16. Pleyt washer (Sigma)
17. Otoklav (Nüve ot 032)
18. Fraksiyon toplayıcı (Bio-Rad)

4.1.2. Antijen

Leishmania cell surface antijen: Bu çalışmada, Aksoy N. ve arkadaşları tarafından yapılan “A preliminary approach to the separation of Leishmania cell-surface antigens” adlı çalışmada leishmania cell surface antijenleri tespit edildikten sonra izole edilip saflaştırılan glikoprotein tabiatındaki proteinler içinden gp63 proteini antijen olarak kullanıldı (87).

4.1.3. Hücreler

Çalışmamızda kullanılan hücre soyları Tablo 4. 1.’de gösterilmiştir. TÜBİTAK, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsünün 4-9 Haziran 2008 tarihlerinde düzenlediği “Hücre Füzyon Yöntemi ile Monoklonal Antikor Üretimi” adlı kurstan, FO myeloma hücreleri temin edildi. TÜBİTAK bu hücreleri Amerika’daki ATCC (www.atcc.org) firmasından temin etmiştir.

Tablo 4. 1. Hibridoma Teknolojisinde kullanılan hücre örnekleri

Hücre	Özellik	Kaynak
Myeloma Hücreleri	FO	ATCC
Besleyici Hücre	Makrofaj	Balb/C fare periton yüzeyi
Dalak Hücreleri		Balb/C fare

4.1.4. Besiyerleri

DMEM Besiyeri: 13,4 gr/ml DMEM, 0,37 gr/ml sodyum bikarbonat (NaHCO₃) deiyonize su içinde çözüldü, 0,1 M sodyum hidroksit (NaOH) ile pH: 7,2 olacak şekilde hazırlandı. 0,22 µm’lik filtreden geçirilerek sterilizasyon sağlandı.

Normal Besiyeri: 1/100 dilüsyonlu penisilin (10000 u/ml) ve streptomisin (10 mg/ml) (Sigma) antibiyotik kombinasyonu ve %20 ısı ile inaktive edilmiş fetal bovin serum %80 DMEM besiyeri ile birleştirilerek hazırlandı.

Dondurma Besiyeri: %20 FCS, %70 DMEM %10 DMSO olacak şekilde kullanım esnasında hazırlandı.

Myeloma Seçici Besiyeri: Yalnızca HGPR^{T(-)} myeloma hücrelerini elde etmek için Füzyondan 7 gün önce içerisinde myeloma hücrelerinin bulunduğu normal besiyeri ortamına 20 µg/ml 8-Azaguanin eklendi. Steril akımlı kabinde, her şişesinde 100 g 8-Azaguanin bulunan bir şişeye 10 ml steril yalnız DMEM içeren besiyeri eklenerek çözdürüldü. Bu, $6,6 \times 10^{-3}$ M 8-Azaguanin içeren stok solüsyonu idi. Bu stok solüsyonu kullanım anında 50 kat steril yalnız DMEM içeren solüsyon ile dilüe edilerek kullanıldı.

Füzyon Sonrası Kullanılan Seçici Besi Yerleri: Füzyon sonrası yalnızca hibrit hücreleri üretmek için ilk 10-12 gün seçici HAT besiyeri, daha sonrasında seçici HT besiyeri kullanıldı.

Seçici HAT besiyeri: Normal besiyeri içerisine litreye 20 ml hipoksantin, aminopterin ve thymidine içeren (50 X HAT) çözelti eklenerek hazırlandı.

Seçici HT besiyeri: Normal besiyeri içerisine litreye 20 ml hipoksantin ve thymidine içeren (50 X HT) çözelti eklenerek hazırlandı.

4.1.5. Kimyasal Maddeler

1. Freund's Complete Adjuvant (FCA) (Sigma)
2. Freund's Incomplete Adjuvant (IFA) (Sigma)
3. Glisin (Merck)
4. MgCl₂ (Merck)
5. ZnCl₂ (Merck)
6. Para-nitro-phenyl-phosphate (PNPP) (Sigma)
7. 8-Azaguanin (Sigma)
8. Polyethylene glycol (PEG-4000) (Merck)
9. Hypoxanthine aminopterin thymidine (HAT) (Gibco)
10. Hypoxanthine thymidine (HT) (Gibco)
11. NaHCO₃ (Merck)
12. Süt tozu (Pınar)
13. Fetal calf serum (FCS) (Biological industries)
14. DMEM (Sigma)
15. Penisilin/Streptomisin (Sigma)
16. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Carlo Erba)
17. Tween 20 (Merck)
18. NaOH (Merck)
19. KOH (Merck)
20. Amonyum sülfat (Carlo Erba)
21. HCl (Merck)
22. K₂HPO₄ (Carlo Erba)
23. KH₂PO₄ (Riedel-de Haen)
24. Sitrik Asit (Merck)
25. Sodyum asetat (Merck)
26. Trypane blue (Biological industries)

4.1.6. Tamponlar

PBS (Fosfat) Tamponu: 10 mM KH_2PO_4 ve 10 mM K_2HPO_4 solüsyonları hazırlandıktan sonra bir beher içinde pH= 7,2 olacak şekilde birleştirildi. Hazırlanan tampon solüsyonuna 0,15 M NaCl eklendi.

PBS-Tween 20 Yıkama Tamponu: Normal PBS tamponu içerisine % 0,05 olacak şekilde Tween 20 eklendi.

Substrat Tamponu: 0,1 M glisin çözeltisi içine 1 mM MgCl_2 ve 1mM ZnCl_2 konuldu. Daha sonra pH metre eşliğinde konsantre KOH çözeltisi ile pH 10.4'e çıkarılarak saklandı. Hazırlanan çözelti içerisine kullanımdan 10 dakika önce 1 mg/ml PNPP ilave edildi.

Antikor saklama Tamponu: 1 M Tris pH: 8,0 tamponu içerisine %0,02 gr sodyum azid ilave edildi. +4 derecede saklandı.

Protein A Afinite Kolon Bağlama (Binding) Tamponu: 20 mM fosfat tamponu pH:7'de hazırlandı.

Antikor Elution Tamponu: 0,1 M Glisin, HCl ile PH:2.7 getirilerek hazırlandı.

Tris Nötralizasyon Tamponu: 1M Tris tamponu PH:9'da hazırlandı.

Sitrat-Asetat Tamponu: 500 ml 0.1 M sodyum asetat ve 100 ml 0.1 M sitrik asit hazırlanır. Sodyum asetat üzerine sitrik asit eklenerek pH: 6'ya tamamlanır. -20C'de saklanır.

PEG Çözeltisi: Kullanım anında 0,5 gr PEG (molekül ağırlığı: 4000) 1 ml PBS içinde çözüldü. Otoklav ile 30 dakika 121°C'de steril edildi. 37°C'ye getirilerek füzyon kullanıldı.

4.1.7. Steril Malzemeler

1. 6, 24 ve 96 kuyulu füzyon plak (Corning)
2. 96 kuyulu ELISA plak (TPP)
3. 4,6 ve 24 kuyulu kostar (Corning)
5. Kültür flakları (25 cm², 150 cm²) (Corning)
6. Petri kapları (Fıratmed)
7. Enjektör (1, 5 ve 50 cc) (Hayat)
8. Dondurma tüpleri (TPP)
9. Hücre spatülü (TPP)
10. Cam baget (IsoLab)
11. Cam pipet (1-25 cc) (IsoLab)
12. 0.22 mikrofiltre (Corning)
13. Ependorf tüp (0,5 - 2 ml)
14. Otoklavlanabilir cam şişe (100, 250, 500, 1000 cc) (IsoLab)
15. Thoma lamı (IsoLab)
16. Makas, pens, süzgeç
17. Diyaliz membranı (Sigma)

4.2. Yöntem

Bu uzmanlık tezi, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Etik kurulu tarafından 10.05.2007 tarih, 03 nolu oturum ve 03 sayılı karar ile onaylanmıştır ve Harran Üniversitesi Bilimsel Akademik Kurulu kurumu tarafından 825 nolu karar ile desteklenmiştir.

4.2.1. Leishmania Cell Surface Antijeni ile İmmünizasyon

Hibridoma çalışmalarında immünizasyon için 6-8 haftalık altı adet BALB/c türü fare kullanıldı. Bu farelerden biri negatif kontrol olarak seçildi ve Leishmania cell surface antijeni enjekte edilmedi. İmmünizasyona alınacak fareler belirlendikten sonra ilk gün ELISA testi için tüm farelerin kuyruk ucundan kan alındı. Bağışıklama işleminde ilk önce antijen farelere verilebilecek şekilde hazırlandı. Leishmania cell surface antijeni 4 M guanidin içeren bir çözelti içerisinde stabil halde tutuluyordu. Toksik olan guanidinin uzaklaştırılması amacıyla 2 cc'lik ependorf içerisine alınan antijen çözeltisi 7 kez 1 saat ara ile her seferinde yenilenen 100 ml PBS'ye karşı diyaliz edildi. Elde edilen toksik olmayan antijen çözeltisi 1/1 (v/v) FCA (Freund's Complete Adjuvan) ile birleştirildi. Her bir fareye 0,2 ml intraperitoneal olarak FCA içeren antijen çözeltisi enjekte edildi. Üç gün sonra ELISA testi için farelerin kuyruk ucundan kan alındı. 20 gün sonra ikinci doz immünizasyon 1/1 (v/v) oranında antijen çözeltisi ve IFA (Incomplete Freund's Adjuvan) ile yapıldı ve her fareye 0,2 ml intraperitoneal olarak enjekte edildi. Üç gün sonra ELISA testi için farelerin kuyruk ucundan kan alındı. Aynı işlemler 3. immünizasyon için 20 gün sonra tekrarlandı ve üç gün sonra ELISA testi için farelerin kuyruk ucundan kan alındı. Farelerin antikor yanıtını göstermek için ELISA testleri yapılarak immünizasyon için en ideal fare seçildi. Bu fareye 1 hafta sonra hem subkutan hemde intraperitoneal olarak 1/1 (v/v) oranında birleştirilmiş IFA ve antijen çözeltisi ve özelleşmiş B

lenfositlerinin dalakta toplanması amacıyla fare kuyruk veninden 0.02 ml yalnızca antijen çözeltisi enjekte edildi.

4.2.2. İmmün Yanıtının ELISA ile kontrolü

İmmün yanıt kontrolü için enzime dayalı immünolojik deneyler (ELISA) yapıldı. İlk işlemde 100 µl Leishmania cell surface antijen çözeltisi daha önce belirlenen ELISA kuyularına bir pipet yardımıyla konularak +4°C'de 1 gece ve sonra 37°C'de 1 saat tutuldu. Bağlanmayan antijenler PBS-Tween-20 tamponu ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırıldı. Kuyulara 150 µl % 0,4'lük yağı alınmış süt tozu çözeltisi bir pipet yardımıyla konuldu ve 1 saat 37°C'de tutularak ELISA kuyucuklarının tabanındaki antijen bağlayabilecek kısımlar bloke edildi. Pleyt kuyularındaki bağlanmayan süt tozu çözeltisi kısımları döküldükten sonra PBS-Tween 20 tamponu ile 3 kez yıkandı. Antijen-antikor reaksiyonlarının ilk basamağında 1/50 ve 1/1000 oranlarında seyreltilmiş fare serumları belirlenmiş kuyulara 100 µl eklendi ve 37°C'de 1 saat bekletildi. Kompleks oluşturmayan kalan serum kısımları döküldükten sonra PBS-Tween 20 tamponu ile 3 kez yıkama yapıldı. Antijen-antikor reaksiyonlarının ikincisi için daha önce kompleks oluşturmuş serumlardan gelen bağlı antikorlara spesifik olarak bağlanan 1/1000 dilüsyonda alkalin fosfatazla konjuge edilmiş anti-fare IgG antikor solüsyonu her kuyuya 100 µl eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübasyondan sonra kuyular PBS-Tween 20 tamponu ile 5 kez yıkandı. 1 mg/ml PNPP substrat tamponu hazırlamak üzere daha önce hazırlanmış solüsyona (0,1 M glisin, 1 mM MgCl₂ ve 1 mM ZnCl₂) eklendi. Her kuyuya 100 µl substrat çözeltisi eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Bio-Tek ELISA okuyucusu ile 450 nm'de optik dansiteler (OD) ölçüldü.

4.2.3. Füzyon

4.2.3.1. Besleyici Hücrelerin Hazırlanması

Füzyon gününden bir gün önce immünize olmamış bir fare bu işlem için kullanıldı. Fare dislokasyon yolu ile öldürüldükten sonra %70'lik etanol içerisinde bekletilerek sterilize edildi. laminar akımlı kabin içerisinde sırt üstü yatırılan fare dört ekstremitelerinden sabitleştirildi ve steril makas ve pens yardımıyla karın alt orta bölgesinden küçük bir kesi yapıldı ve yanlara doğru açıldı, bir elle kuyruk tutulurken üst deri pens yardımıyla boyuna doğru yavaşça çekilerek ön periton açığa çıkarıldı. Yağsız bir bölgeden organlara değmeden periton içerisine 5 ml DMEM (FBS içermeyen) enjekte edildikten sonra periton içerisine verilen besiyeri tekrar geri çekildi. Böylece periton iç yüzeyindeki besleyici hücreler alınmış oldu. Enjektör içerisindeki hücreler 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne alındı ve hücre sayımı yapıldı. Çalışılacak hücre kültür plağı sayısına göre her kuyuya yaklaşık 6000 hücre ve normal besi yeri karışımı 100 µl olacak şekilde dağıtıldı.

4.2.3.2. İmmünize Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi

İmmünizasyon işleminde kullanılan fareler arasında ELISA testinde en yüksek mutlak optik dansite değerlerini veren fare füzyon işlemine alındı. Füzyondan 12 gün önce son immünizasyon işlemi yapıldı. Leishmania cell surface antijeni, incomplete Freund's adjuvan ile birlikte farenin el ve ayak içlerine, periton boşluğuna ve ense bölgesi deri altına verildi ve tek başına Leishmania cell surface antijeni, farenin kuyruk venine enjekte edildi. Bu fare dislokasyon yöntemi ile öldürüldü ve %70'lik alkol içerisinde sterilize edilerek laminar akım kabinine alındı. Farenin sol yan karın üst deri bölgesinden steril bir makas ve pens yardımıyla küçük bir kesi yapıldı ve periton kesilerek dalağa ulaşıldı. Dalak çevre dokudan ayrılarak bir pens yardımı ile 10 ml PBS tamponu bulunan petri kabına alındı. Dalak burada çevre yağ dokusundan ayrıldıktan sonra başka bir 10 ml PBS tamponu içeren farklı petri kabına alındı.

Dalak petri kabı içinde küçük steril bir süzgeç içerisinde steril bir cam baget ile ezildi ve bir pipet yardımı ile geri çekip tekrar verme işlemi ile hücre süspansiyonu haline getirildi. Hücre, PBS tamponunda 900 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Çöken hücreler 45 ml PBS içerisine alınarak hücre sayımı yapıldı.

4.2.3.3. Myeloma Hücrelerinin Hazırlanması

Füzyondan 7 gün önce % 10 FBS içeren daha önce DMEM besiyeri içinde çoğaltılmaya alınan FO myeloma hücrelerinin bulunduğu ortama 8-Azaguanin (20 µg/ml) eklenerek HGPR⁽⁺⁾ myeloma hücreleri ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Füzyon günü kültür şişelerinin içindeki kullanılmış besi yeri steril bir beher içine döküldü ve kültür şişe yüzeyine yapışmış hücreler yüzeyden alınarak 50 ml'lik santrifüj tüpü içerisine alındı ve 900 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Çöken hücreler 10 ml PBS içerisine alınarak hücre sayımı yapıldı.

4.2.3.4. Hücrelerin Sayımı

Thoma lamı üzerine uygun lamel konulduktan sonra bir damla belirli hücre süspansiyonu lamın yan kenarlarından thoma lamı üzerine yaydırılarak hücre süspansiyonunun lam ve lamel arasına yayılması sağlandı. Bu işlem yapılırken lam ve lamel arasında kabarcık olmamasına özen gösterildi. Hemositometre üzerinde 25 mm²'ye düşen hücreler sayıldı. Aşağıdaki formülden füzyona girecek toplam hücre sayıları belirlendi. Bu işlem dalak, myeloma, besleyici hücrelerin sayımında kullanıldı.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = \frac{10^4}{\text{(Sabit katsayı)}} \times \text{ml} \times \text{lamdaki hücre sayısı} \times \text{dilüsyon katsayısı}$$

4.2.3.5. PEG ile Hücrelerin Birleştirilmesi (Füzyon)

Hücre sayımı yapılan FO myeloma hücreleri ve dalak hücreleri 1/5 oranı olacak şekilde birleştirildi ve 900 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atılarak çöken hücre karışımına 37°C'de ısıtılmış %50'lik 1 ml polietilen glikol (PEG) 4000, 1 dakika içerisinde yavaş yavaş tüp alt kenarına, aynı anda tüpün döndürülerek hücrelerin ve polietilen glikolün karışması sağlanarak eklendi. Hücrelerin hücre membranları ve stoplazmalarının iyice kaynaşması için 1 dakika beklendi. PEG ile hücre temasının toksik etkisinden dolayı bu süre 1 dakika ile sınırlandırıldı. PEG'in toksik etkisini önlemek için 4 ml yalnız DMEM besiyeri tüp kenarlarından eş zamanlı tüpün avuç içinde döndürülmesi ile 2 dakika içerisinde yavaş yavaş verildi. Ardından 20 ml yalnız DMEM besiyeri 2 dakika içinde tüp kenarlarından eş zamanlı tüpün döndürülmesi ile verildi. En son 20 ml %15 FCS içeren DMEM 2 dakika içinde eş zamanlı tüpün döndürülmesiyle tüp kenarlarından yavaşça hücrelerin üzerine ilave edildi. Karışım 1 saat, 37°C'de karbondioksit etüvde bekletildikten sonra santrifüj edildi. Üst kısım atıldıktan sonra çöken hücreler seçici kültür ortamına alındı. Bunun için %2 HAT ve %20 FCS içeren DMEM besiyeri ilave edildi. Bir gün önceden füzyon kuyularına alınmış besleyici hücre kültürü üzerine kuyu başına 150 µl olacak şekilde dağıtıldı. 12 gün sonra hücrelerin üzerine 100 µl %10 FCS içeren seçici HAT medyumunu ilave edildi. Hibrid hücreler HAT seçici besi yerinde canlı, belirgin ve büyük hücreler olarak geliştiler ve bölünerek klon oluşturdular. Füzyon plaklarındaki kuyular invert mikroskopta tek tek taranarak klon oluşturan kuyular belirlendi ve işaretlendi. Klon oluşturan kuyulardaki üst sıvılar antikor üreten hibrit hücrelerin belirlendiği ELİSA testi için toplandı. 15 gün sonra bu besiyerinde gelişen hücreler iki hafta süre ile HT besi yerinde geliştirildi.

4.2.3.6. Spesifik Antikor İçeren Kuyuların ELISA Testi ile Belirlenmesi

Füzyon sonrası elde edilen hibrit klonların spesifik antikor düzeyinin belirlenmesi için ELISA yöntemi uygulandı. Daha önce belirlenen kuyulara bir pipet yardımıyla 100 µl daha önce diyaliz ile 4M guanidin hidrokloritten uzaklaştırılmış Leishmania cell surface antijen

çözeltisi konuldu. +4°C’de 1 gece ve sonra 37°C’de 1 saat tutuldu. Bağlanmayan antijenler PBS Tween-20 tamponu ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırıldı. Kuyulara 150 µl % 0,4’lük yağı alınmış süt tozu çözeltisi bir pipet yardımıyla konuldu ve 1 saat 37°C’de tutularak ELISA kuyucuklarının tabanındaki antijen bağlayabilecek kısımlar bloke edildi. Pleyt kuyularındaki bağlanmayan süt tozu çözeltisi kısımları döküldükten sonra PBS-Tween 20 tamponu ile 3 kez yıkandı. Daha önce klon oluşturan kuyulardan toplanmış kültür üst sıvıları her kuyuya 100 µl eklendi ve 37°C’de 1 saat bekletildi. Böylece daha önce pleyt yüzeyine yapışmış olan Leishmania cell surface antijenleri, kültür üst sıvılarından gelen spesifik antikolarla birleştirilmiş oldu. Bağlanmayan kalan kültür üst sıvı kesimleri döküldükten sonra PBS-Tween 20 tamponu ile 3 kez yıkama yapıldı. Daha önce pleyt yüzeyine bağlı antijen-spesifik antikor birleşmesine spesifik olarak bağlanacak olan 1/1000 dilüsyonda alkalin fosfatazla konjuge edilmiş anti-fare IgG antikor solüsyonu her kuyuya 100 µl eklendi ve 37°C’de 1 saat inkübasyondan sonra kuyular PBS-Tween 20 tamponu ile 5 kez yıkandı. 1 mg/ml PNPP substrat tamponu hazırlamak üzere daha önce hazırlanmış solüsyona (0,1 M glisin, 1 mM MgCl₂ ve 1 mM ZnCl₂) eklendikten sonra Her kuyuya 100 µl substrat çözeltisi eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Bio-Tek ELISA okuyucusu ile 450 nm’de optik dansiteler (OD) ölçüldü.

4.2.3.7. Hücre Kültür Plağında Alt Klonlama İşleminin Uygulanması

Monoklonallık için gerekli olan en önemli adımlardan biri füzyon sonrasında klon oluşturan ve ELISA testinde spesifik antikor ürettiği saptanan kuyulardaki hibritlerin her bir kuyuya tek hücre gelecek şekilde monoklon oluşturma safhasıdır. Bunun için tek klondan oluşan hibrit soyunu oluşturmak için sınırlı seyreltme (limiting dilution) işlemi yapıldı. Yaklaşık olarak füzyonun 25. gününde ELISA yöntemi ile pozitif reaksiyon verdiği tespit edilen hibrid klon kuyuları kullanıldı. Bu hücrelerin bulunduğu kuyunun içi, hücreler homojen olarak kuyu içindeki besiyerine dağılacak şekilde pipeti çekip bırakma ile dağıtıldı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyuluk kültür plaklarının her kuyusuna bir hücre gelecek şekilde normal DMEM besiyeri ile seyreltme yapıldıktan sonra her kuyuya tek hücre olacak şekilde 100 µl sınırlı seyreltme solüsyonu konuldu. Üzerine 100 µl normal DMEM besiyeri

eklendi. Hücreler, klon oluşturmak üzere 15 gün normal besiyeri içinde bekletildi. Bu arada spesifik antikor üreten hibrit hücre kuyularını belirlemek için ELISA testine gerekli olacak olan üst sıvılar toplandı.

4.2.3.8. Alt Klonlama İşleminde Sonra Spesifik Antikor İçeren Kuyuların ELISA Testi ile Belirlenmesi

Sınırlı seyreltme sonrası oluşturulan klonlu kuyularda ELISA testiyle spesifik antikor sentezinin olduğu kuyulardaki hibrit hücrelerin belirlenmesi işlemine geçildi. Daha önce belirlenen ELISA kuyularına bir pipet yardımıyla 100 µl daha önce diyaliz ile 4M guanidin hidrokloritten uzaklaştırılmış Leishmania cell surface antijen çözeltisi konuldu ve +4°C’de 1 gece ve sonra 37°C’de 1 saat tutuldu. Bağlanmayan antijenler PBS-Tween-20 tamponu ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırıldı. Kuyulara 150 µl % 0,4’lük yağı alınmış süt tozu çözeltisi bir pipet yardımıyla konuldu ve 1 saat 37°C’de tutularak ELISA kuyucuklarının tabanındaki antijen bağlayabilecek kısımlar bloke edildi. Pleyt kuyularındaki bağlanmayan süt tozu çözeltisi kısımları döküldükten sonra PBS-Tween 20 tamponu ile 3 kez yıkandı. Daha önce klon oluşturan kuyulardan toplanmış kültür üst sıvıları her kuyuya 100 µl eklendi ve 37°C’de 1 saat bekletildi. Böylece daha önce pleyt yüzeyine yapışmış olan Leishmania cell surface antijenleri, kültür üst sıvılarından gelen spesifik antikorlarla birleştirilmiş oldu. Bağlanmayan kalan kültür üst sıvı kesimleri döküldükten sonra PBS-Tween 20 tamponu ile 3 kez yıkama yapıldı. Daha önce pleyt yüzeyine bağlı antijen-spesifik antikor birleşmesine spesifik olarak bağlanacak olan 1/1000 dilüsyonda alkalin fosfatla konjuge edilmiş anti-fare IgG antikor solüsyonu her kuyuya 100 µl eklendi ve 37°C’de 1 saat inkübasyondan sonra kuyular PBS-Tween 20 tamponu ile 5 kez yıkandı. 1 mg/ml PNPP substrat tamponu hazırlamak üzere daha önce hazırlanmış solüsyona (0,1 M glisin, 1 mM MgCl₂ ve 1 mM ZnCl₂) eklendikten sonra Her kuyuya 100 µl substrat çözeltisi eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Bio-Tek ELISA okuyucusu ile 450 nm’de optik dansiteler (OD) ölçüldü.

4.2.3.9. Monoklonal Antikorların Geniş Ölçekte Üretilmesi

ELISA testi ile spesifik antikor tespit edilen hibrit hücre klonları, anti-Leishmania cell surface monoklonal antikorunu geniş ölçekte üretmek için normal DMEM besi yeri içeren 75 cm²'lik kültür kaplarına alındılar. Bu besi yerinde üretilen hücrelerden elde edilen monoklonal antikor içeren kültür üst sıvıları ölü hücre artıklarını ortamdaki uzaklaştırmak için 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvıları 4°C'de saklandı.

4.2.3.10. Hibrit Hücrelerin Dondurulması

75 cm²'lik kültür kabındaki hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. %20 FBS ve %10 DMSO içeren %70 DMEM'li dondurma besiyerine alınan hibrit hücreler -80°C'ye bırakıldı.

4.2.4. Anti-Leishmania Cell Surface Monoklonal Antikorlarının Saflaştırılması

4.2.4.1. Hibridoma Kültür Üst Sıvısındaki Protein İçeriğinin Amonyum ile Sülfat Çöktürülmesi ve Diyalizi

Amonyum sülfat, iyonik yapısı nedeniyle proteinlerle aynı ortamda bulunduğu, proteinler ile bağ etkileşimi yapmada su molekülleri ile yarışarak proteinlerin sıvı ortamdaki doygunluğunu arttırarak çökmelerini sağlar.

Toplanan kültür üst sıvısı 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kullanıma alınırken ölü hücre ve artıklarını içeren pellet atıldı. 35 ml üst sıvıya 11,97 gr amonyum sülfat

+4°C'lik soğutma ortamında bir manyetik karıştırıcı üzerindeki bir beherde 30 dakikada azar azar yavaşça karıştırılarak eklendi. Gece boyu +4°C'de bekletildi. Amonyum sülfat ile doymuş üst sıvı, ultrasantrifüj cihazı kullanılarak 10000 rpm'de, 40 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Çöken proteinler 2 ml PBS ile çözülerek amonyum sülfatın uzaklaştırılması için diyaliz membranına alındı. Diyaliz membranı önce saf su ile yıkandı. PBS ile çözülen protein çözeltisi membrana alındı ve bir miktar hava bırakılarak membranın iki ucu bağlandı. 1 L PBS (diyaliz tamponu) içinde +4°C'de 1 gece bekletildi.

4.2.4.2. Protein A Kolon Kromatografisi Kullanılarak Proteinlerin Fraksiyonlarına Ayrılması.

Kolondan ilk olarak kolon içindeki %20'lik etanolü uzaklaştırmak amacıyla 1 ml/dakika olacak şekilde 20 mM PO₄ yıkama tamponu (pH:7) kolondan geçirildi. Diyaliz sonrası elde edilen protein çözeltisi 1:1 oranında PBS tamponu ile seyreltilerek protein partiküllerinin kolonu tıkamaması amacıyla 0,22 µm'lik mikrofiltreden geçirildi ve kolona (8 ml) yüklendi. Daha sonra protein A elüsyon tamponu (pH: 2,7) kolona verildi. Bu sırada örneklerin toplandığı ependorf tüplerin içerisine 75 µl 1 M tris (pH:9) tamponu konularak tüp içeriklerinin pH değerlerinin nötralize edilmesi sağlandı. Elde edilen örneklerin spektrofotometrede OD280 değerleri ölçüldü.

4.2.4.3. Anti-Leishmania Cell Surface Antijenin ELISA ile Belirlenmesi.

Abzorbans pikleri alınan fraksiyonların hangisinde anti-leishmania cell surface antijeninin olduğunu tespit etmek için ELISA testine geçildi. Daha önce belirlenen ELISA kuyularına bir pipet yardımıyla 100 µl daha önce diyaliz ile 4M guanidin hidrokloritten uzaklaştırılmış Leishmania cell surface antijen çözeltisi konuldu ve +4°C'de 1 gece ve sonra 37°C'de 1 saat tutuldu. Bağlanmayan antijenler PBS-Tween-20 tamponu ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırıldı. Kuyulara 150 µl % 0,4'lük yağı alınmış süt tozu çözeltisi bir pipet yardımıyla

konuldu ve 1 saat 37°C'de tutularak ELISA kuyucuklarının tabanındaki antijen bağlayabilecek kısımlar bloke edildi. Pleyt kuyularındaki bağlanmayan süt tozu çözeltisi kısımları döküldükten sonra PBS-Tween 20 tamponu ile 3 kez yıkandı. Fraksiyon solüsyonlarından her kuyuya 100 µl eklendi ve 37°C'de 1 saat bekletildi. Böylece daha önce pleyt yüzeyine yapışmış olan Leishmania cell surface antijenleri, fraksiyon solüsyonlarından gelen spesifik antikorlarla birleştirilmiş oldu. Bağlanmayan protein solüsyon kesimleri döküldükten sonra PBS-Tween 20 tamponu ile 3 kez yıkama yapıldı. Daha önce pleyt yüzeyine bağlı antijen-spesifik antikor birleşmesine spesifik olarak bağlanacak olan 1/1000 dilüsyonda alkalın fosfatazla konjuge edilmiş anti-fare IgG antikor solüsyonu her kuyuya 100 µl eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübasyondan sonra kuyular PBS-Tween 20 tamponu ile 5 kez yıkandı. 1 mg/ml PNPP substrat tamponu hazırlamak üzere daha önce hazırlanmış solüsyona (0,1 M glisin, 1 mM MgCl₂ ve 1 mM ZnCl₂) eklendikten sonra her kuyuya 100 µl substrat çözeltisi eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Bio-Tek ELISA okuyucusu ile 450 nm'de optik dansiteler (OD) ölçüldü.

4.2.5. Hasta ve Kontrol Gruplarında Elde Edilen Antikorların ELISA Testi ile Denenmesi.

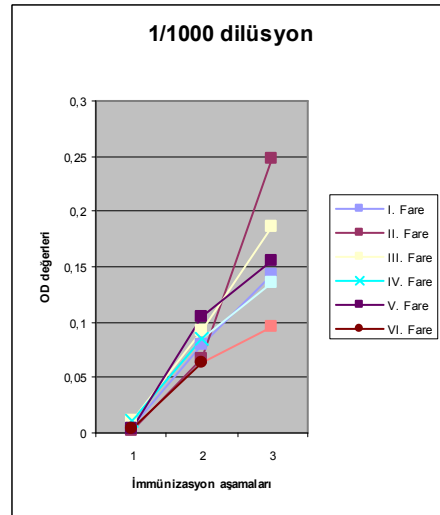
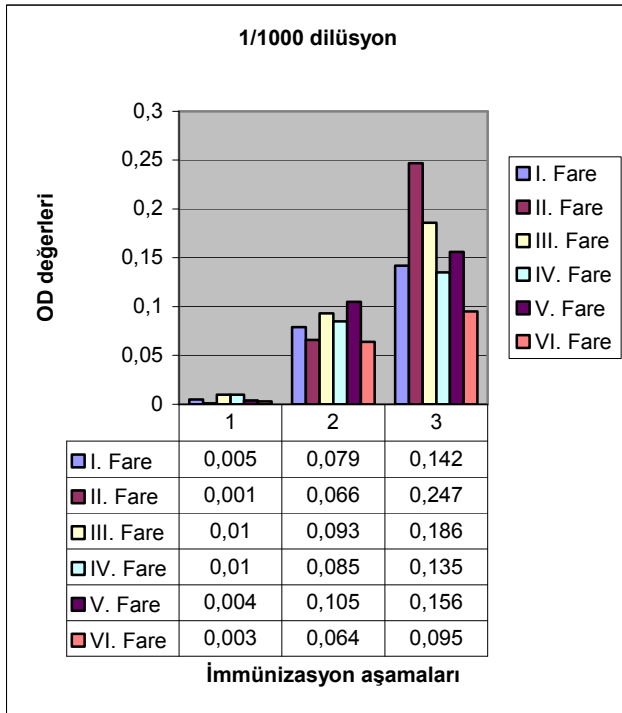
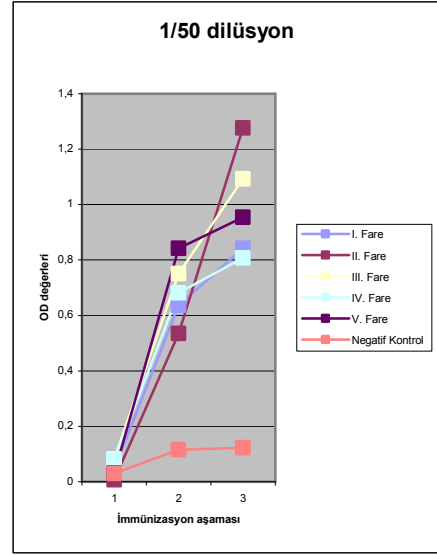
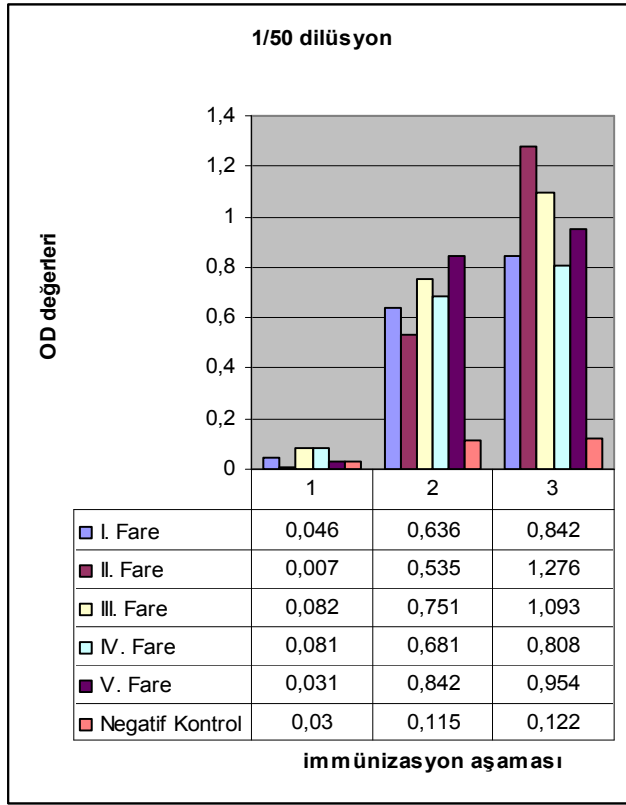
Elde edilen antikorlar, 12 hasta ve 12 kontrol grubunda bir ELISA sistemi yapılarak denendi. Önce Saf olarak elde edilen antikor çözeltisi 1/100 PBS dilüsyonuyla 24 kuyuya 100 µl eklendi ve 37°C'de 1 saat tutuldu. Bağlanmayan antikorlar PBS-Tween-20 tamponu ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırıldı. Kuyulara 150 µl % 0,4'lük yağı alınmış süt tozu çözeltisi bir pipet yardımıyla konuldu ve 1 saat 37°C'de tutularak ELISA kuyucuklarının tabanındaki antijen bağlayabilecek kısımlar bloke edildi. Pleyt kuyularındaki bağlanmayan süt tozu çözeltisi kısımları döküldükten sonra PBS-Tween 20 tamponu ile 3 kez yıkandı. Bir pipet yardımıyla 100 µl daha önce diyaliz ile 4M guanidin hidrokloritten uzaklaştırılmış Leishmania cell surface antijen çözeltisi konuldu ve +4°C'de 1 gece ve sonra 37°C'de 1 saat tutuldu. Böylece spesifik antikor-antijen bağlanması gerçekleştirildi. Pleyt kuyularında bağlanmayan antijenleri uzaklaştırmak için PBS-Tween 20 tamponu ile 3 kez yıkama yapıldı. Daha önce pleyt yüzeyine bağlı antijen-spesifik antikor birleşmesine spesifik olarak

bağlanacak olan 1/1000 dilüsyonda alkalın fosfatazla konjuge edilmiş anti-fare IgG antikor solüsyonu her kuyuya 100 µl eklendi ve 37°C’de 1 saat inkübasyondan sonra kuyular PBS-Tween 20 tamponu ile 5 kez yıkandı. 1 mg/ml PNPP substrat tamponu hazırlamak üzere daha önce hazırlanmış solüsyona (0,1 M glisin, 1 mM MgCl₂ ve 1 mM ZnCl₂) eklendikten sonra her kuyuya 100 µl substrat çözeltisi eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Bio-Tek ELISA okuyucusu ile 450 nm’de optik dansiteler (OD) ölçüldü.

5. BULGULAR

5.1. İmmünizasyon Yanıtta ELISA Testinin Bulguları.

ELISA testine, 6-8 haftalık altı adet BALB/c türü fareden, immünizasyonun 3. günü (ilk doz aşılama sonrası), 26. günü (ilk destek dozu sonrası) ve 49. günü (ikinci destek dozu sonrası) kan örnekleri kuyruk venlerinden alındı. Bu farelerden birine negatif kontrol olması amacıyla immünizasyon yapılmadı. Serum örnekleri, 1/50 ve 1/500 dilüsyon ile ELISA testinde kullanıldı. Bu test sisteminde konjugat enzimi olarak Alkalen Fosfataz ve substrat olarak PNPP kullanıldı. Leishmania cell surface antijenine karşı gelişen immün cevap yanıtları grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 5. 1.).



Şekil 5. 1. İmmünizasyon periyodu boyunca antikor titrelerinin histogramları, çizgisel grafikleri ve tablosu.

5.2. Besleyici Hücre Bulguları

Füzyon öncesi non-immünize bir Balb/c faresinin periton boşluğuna 5 ml yalnız DMEM içeren besiyeri verilip geri çekildi. Bu sıvı içerisine alınan besleyici hücreler bir thoma lamı kullanılarak sayıldı. Besleyici hücre süspansiyonunun her mililitresinde 5×10^5 hücre sayıldı. Bu her kuyuya (100 µl'ye) 6000 hücre olacak şekilde $6 \times 10^4 / 5 \times 10^5$ (0,12:1) oranında normal DMEM besiyeri ile seyreltildi.

5.3. İmmünize Dalak Hücre Bulguları

Füzyon günü en iyi immün yanıt veren farenin dalak hücreleri füzyon işleminde kullanılmak üzere 10 ml PBS tamponu içine süspansiyon edildi. Thoma lamı kullanılarak yapılan hücre sayımında süspansiyonunun her mililitresinde 5×10^7 hücre sayıldı. 10 ml süspansiyonda toplam hücre sayısı 5×10^8 olarak hesaplandı. Daha sonra $1 \times 10^8 / 10$ ml myeloma hücresi ile birleştirilerek füzyon işlemine alındılar.

5.4. Füzyon öncesi Myeloma Hücre Bulguları

Füzyon gününden önce çoğaltılmak üzere karbondioksit inkübatörde 8-Azaguanin içeren ortamda bekletilen myeloma hücreleri füzyondan önce füzyon işleminde kullanılmak üzere yıkama sonrası 10 ml PBS tamponu içine süspansiyon edildi. Thoma lamı kullanılarak yapılan hücre sayımında süspansiyonunun her mililitresinde 1×10^7 hücre sayıldı. Toplam hücre sayısı 1×10^8 olarak hesaplandı. Daha sonra $5 \times 10^8 / 10$ ml dalak hücreleri ile 1:5 oranında birleştirilerek füzyon işlemine alındılar.

5.5. Füzyon Pleytinde Klonların Gözlenmesi

Füzyon sonrasında, füzyon pleytinin 96 kuyusuna ekilen hücrelerin yaklaşık 15 gün sonra makroskobik olarak klon oluşturdıkları gözlemlendi. Tüm kuyular tek tek incelenerek klon oluşturan 23 kuyu tespit edildi. Bu kuyulardan A₂, B₈, B₁₀, D₄, E₁, E₃, F₁₀, F₁₁ ve H₁ kuyularında iki ayrı noktada; A₇, B₇ ve H₂ kuyularında üç ayrı noktada; G₁₀ pleytinde beş ayrı noktada klon var iken B₂, B₁₁, C₂, C₁₁, C₁₂, D₁, E₁₀, F₁, G₃, ve H₁₁ kuyularında tek klon gözlemlendi. Bu klonların dışındaki kuyular boşaltıldı. Klon oluşturan kuyulardan 3-4 gün aralıklarla üst sıvılar alınarak antikor oluşumunu göstermek (ELISA) için toplandı.

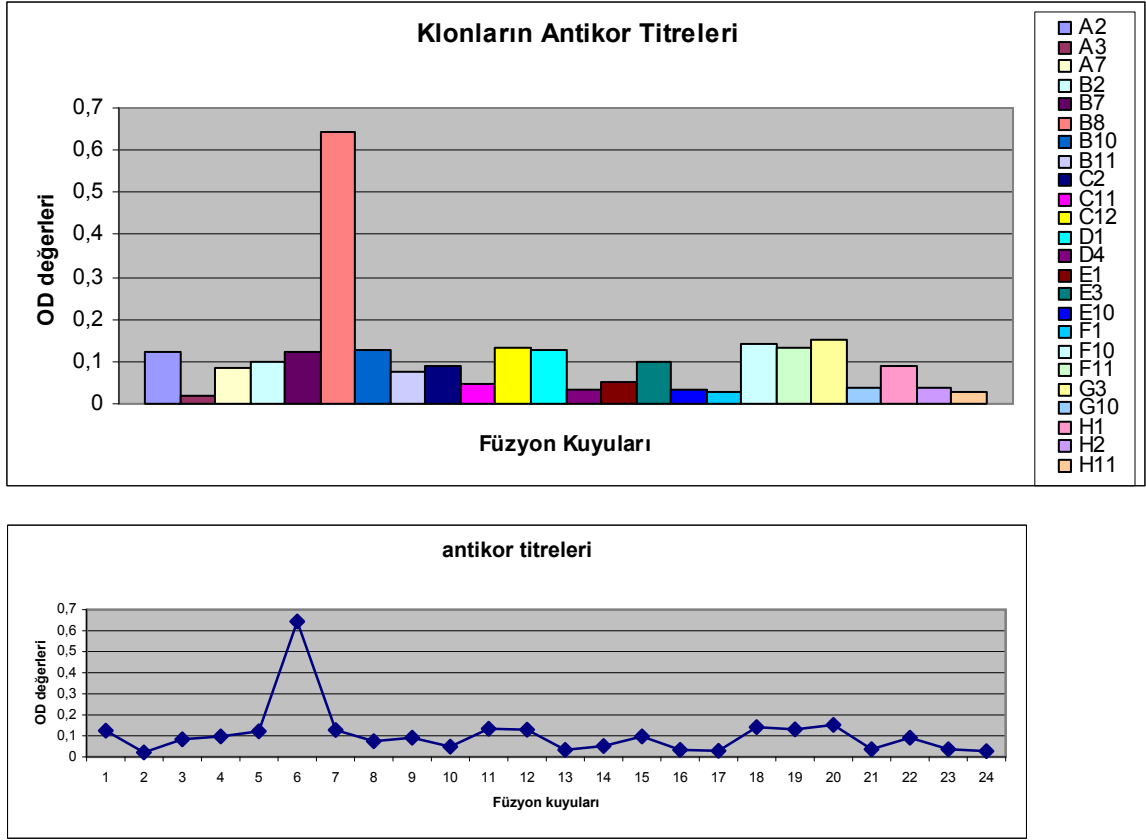
5.6. Füzyon Sonrası Klonların Antikor Cevabı

Klon oluşturan 23 kuyuda, Leishmania cell surface antijeni ile spesifik olarak bağlanan antikorların tespiti için ELISA testi yapıldı. Negatif kontrol olarak klon oluşturmeyen bir kuyudan (A₃) alınan üst sıvılar kullanıldı. Antikor yanıtları ve abzorban değerleri şekil 5. 2.'de ve tablo 5. 1.'de verilmiştir. Bu klon oluşturan 23 kuyudan yalnızca iki klonun olduğu B₈ kuyusundan toplanan üst sıvılarda antikor cevabı vardı. Bu kuyuda iki klon olduğu için antikor cevabının bu klonlardan hangisine (veya her ikisine de) ait olduğunu anlamak amacıyla bu kuyu limiting dilüsyon işlemine tabi tutuldu.

Tablo 5. 1. Klon oluşturan füzyon kuyuları ve ELISA testinde elde edilen OD değerleri

Kuyu No	A ₂	A ₃ *	A ₇	B ₂	B ₇	B ₈	B ₁₀	B ₁₁	C ₂	C ₁₁	C ₁₂	D ₁
Kuyu No	D ₄	E ₁	E ₃	E ₁₀	F ₁	F ₁₀	F ₁₁	G ₃	G ₁₀	H ₁	H ₂	H ₁₁
OD	0,125	0,021	0,083	0,098	0,122	0,643	0,128	0,075	0,092	0,048	0,134	0,129
OD	0,033	0,052	0,098	0,034	0,029	0,141	0,131	0,152	0,036	0,091	0,036	0,028

* Negatif kontrol



Şekil 5. 2. Klon oluşturan füzyon kuyularına ait antikor yanıtları

5.7. Alt Klonlama İşlemi Bulguları

Antikor yanıtı veren B₈ kuyusundaki hücreler süspansiyon edildikten sonra toplam hücre hacimleri sayıldı. Toplam $2,4 \times 10^4$ /100 µl hücre sayıldı. Bu süspansiyon içindeki hücreler, monoklonallik ilkesini sağlamak amacıyla 96 kuyudan her kuyuya tek hücre düşecek şekilde $96 / 2,4 \times 10^4$ oranında normal DMEM besiyeri (25 ml) kullanılarak sulandırıldı. Her kuyuya 100 µl eklendikten sonra tüm kuyular floresan mikroskop altında incelendi. Boş olan kuyular ve birden fazla hücre içeren kuyular boşaltılıp yerine tekrar dilüe hücre süspansiyonu eklenerek her kuyuda bir hücre olması sağlandı. Bir yandan spesifik monoklonal antikor yanıtı için kültür üst sıvıları toplandı, bir yandan klon oluşturan 47 kuyu gözlemlendi. Bu kuyular; A₁, A₅, A₈, A₉, B₄, B₆, B₈, B₉, B₁₁, B₁₂, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₁₀, C₁₂, D₁, D₂, D₃, D₄, D₇, D₉, D₁₂, E₂, E₄, E₈, E₉, F₂, F₃, F₇, F₁₁, G₁, G₄, G₅, G₈, G₉, G₁₀, H₂, H₃, H₅, H₇, H₈, H₉, H₁₀,

H₁₁ ve H₁₂ kuyuları idi ve her kuyuda tek klon vardı. Bu kuyulardaki antikor sentezini göstermek için yeterince kültür üst sıvısı toplandıktan sonra ELISA testine geçildi.

5.8. Alt Klonlama İşleminde Sonra Spesifik Antikor Cevaplarının Belirlenmesi

Tek klonlu 47 kuyuda, spesifik antikor oluşturan klonların tespiti için ELISA testi yapıldı. Negatif kontrol olarak klon oluşturmayan bir kuyudan (A₂) alınan üst sıvılar kullanıldı. Antikor yanıtları ve Abzorbans değerleri Tablo 5. 2.'de verilmiştir. Bu klon oluşturan 47 kuyudan 12 tanesinde yalnızca pozitif antikor cevabı vardı. Bunlar: A₅, B₈, B₉, C₆, C₁₀, C₁₂, D₁, D₇, D₁₂, E₉, G₈ ve H₃ kuyuları idi. Bu klonlar geniş ölçekte üretim için 25 cm²'lik kültür şişelerine alınırken diğer kuyular çalışmadan çıkarıldı.

Tablo 5. 2. Alt klonlama sonrası klon oluşturan füzyon kuyuları ve ELISA testinde elde edilen OD değerleri

Kuyu No	A₁	A₂**	A₅*	A₈	A₉	B₄	B₆	B₈*	B₉*	B₁₁	B₁₂	C₄
OD	0,125	0,011	0,835	0,094	0,111	0,046	0,021	1,715	0,912	0,143	0,031	0,093
Kuyu No	C₅	C₆*	C₇	C₈	C₁₀*	C₁₂*	D₁*	D₂	D₃	D₄	D₇*	D₉
OD	0,128	0,524	0,084	0,014	0,920	0,714	0,833	0,012	0,036	0,091	0,936	0,018
Kuyu No	D₁₂*	E₂	E₄	E₈	E₉*	F₂	F₃	F₇	F₁₁	G₁	G₄	G₅
OD	1,012	0,081	0,035	0,118	0,823	0,143	0,126	0,072	0,062	0,098	0,034	0,012
Kuyu No	G₈*	G₉	G₁₀	H₂	H₃*	H₅	H₇	H₈	H₉	H₁₀	H₁₁	H₁₂
OD	0,833	0,025	0,078	0,054	0,802	0,135	0,101	0,025	0,067	0,119	0,086	0,025

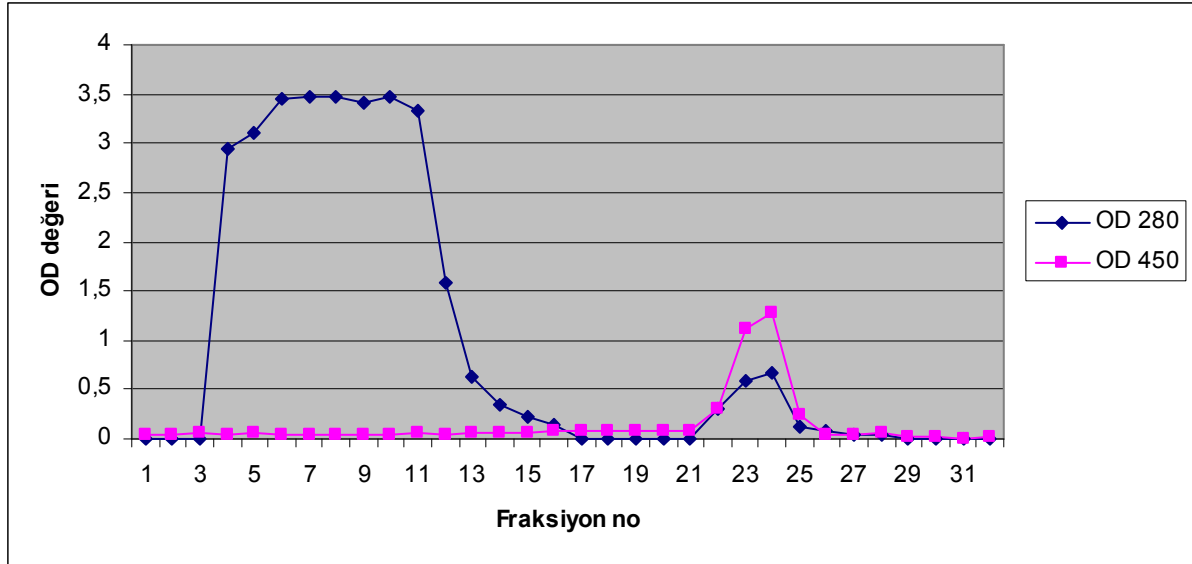
* Spesifik Antikor yanıtı olan kuyular

** Negatif Kontrol

5.9. Anti-Leishmania Cell Surface Monoklonal Antikorlarının Protein A Kolon Kromatografisi ve Elde Edilen Fraksiyonların ELISA Test Sonuçları

Toplanan kültür şişelerindeki hibrid hücre üst sıvıları amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz işlemlerinden sonra Protein A kolonu kullanılarak kromatografik olarak 32 fraksiyona ayrıldı. Bu fraksiyonlardaki optik dansite aktiviteleri 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. 35 ml hibrid hücre üst sıvısındaki antikor miktarı yaklaşık

olarak 100 mg kadardı ve bu antikorlar, IgG tipinde idi. Elde edilen bu fraksiyonlara ELISA testi uygulandı. Spesifik olarak reaksiyon veren 4 kuyu belirlendi. Saflaştırılan antikorların kromatografik aktiviteleri ve ELISA sonuçları Şekil 5. 3.'te verilmiştir.



Şekil 5. 3. Saflaştırılan Antikorların 280 nm’de kromatografik, 450 nm’de ELISA optik dansite değerleri.

5.10 Hasta ve Konrol Gruplarında Elde Edilen Antikorların ELISA Testi ile Denenmesi.

Elde edilen antikorlar, 12 hasta ve 12 kontrol grubunda bir ELISA sistemi yapılarak denendi.

ELISA testi negatif olan hastaların analizi yapıldığında;

1. hasta: 45 yaşında, 1 hafta önce enfekte olan sol alt bacakta 1 adet ülsere lezyon mevcut.

2. hasta: 18 yaşında, 1 hafta önce enfekte sağ el tenar bölgesinde ve sağ dizinde toplam 2 adet lezyon mevcut.

3. hasta: 56 yaşında, 12 gün önce enfekte sol el ve sol ayakta 2 adet lezyon mevcut.

4. hasta: 10 yaşında, 14 gün önce sol yanakta papül ile karakterize 1 adet lezyon mevcut.

5. hasta: 10 yaşında, 15 gün önce vücudunun çeşitli yerlerinde toplam 8 adet lezyon mevcut.

6. hasta: 27 yaşında, 20 gün önce sağ bilek ülserine 2 adet lezyon mevcut idi.

ELİSA testi negatif olan hastaların analizi yapıldığında;

1. hasta: 51 yaşında, 3 ay önce enfekte olmuş sağ elde bir adet nodül mevcut.

2. hasta: 27 yaşında, 4 ay önce enfekte olan 4 adet lezyon mevcut

3. hasta: 14 yaşında, 3 ay önce enfekte olmuş tek lezyon mevcut.

4. hasta: 44 yaşında, 3 ay önce enfekte olmuş, 3 adet lezyon mevcut.

5. hasta: 33 yaşında, 5 ay önce enfekte olmuş 4 adet lezyon mevcut.

6. hasta: 10 yaşında, sağ ve sol yanakta 5 yıldır devam eden nüks etmiş 2 adet lezyon mevcut idi.

Tüm kontrol grubunda antikor yanıtları negatif idi ve 12 hastanın 6'sında antikor cevabı vardı. Sonuçlar tablo 5. 3.'te verilmiştir.

Tablo 5. 3. ELISA testinde pozitif ve negatifliğin kontrol ve hasta gruplarındaki dağılımı.

		Grup		Toplam
		Kontrol	Hasta	
ELISA Testi	(-) sonuç	12	6	18
	(+) sonuç	0	6	6
Toplam		12	12	24

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiyede kutanöz leishmaniasis enfeksiyonu 19. yüzyılın başlarından beri bildirilmekte ve günümüze kadar Türkiye coğrafyasını tehdit etmektedir. Enfeksiyon en çok Şanlıurfa ve çevresinde etkili olurken daha önce enfeksiyonun hiç görülmediği bölgelerde de bildirilmeye başlanmıştır. Bu da enfeksiyonun tüm Türkiye coğrafyasına yayılabileceğini göstermektedir. Enfeksiyon, deri üzerinde hafif bir lezyon ile atlatılabilirken çoğu zaman deride kalıcı hasar bırakıp skarlaşarak iyileşmektedir. Bazı durumlarda enfeksiyon nüks etmekte ve cilt kanserleri gibi daha büyük boyutta hasarlar oluşmaktadır. Leishmania parazitleri, flagellalı promastigotlar olarak tatarcık vektörlerinde ve intrasellüler flagellasız amastigotlar olarak kaynak makrofajlarında bulunan rölatif olarak basit bir digenetik hayat evresine sahiptirler (91-93). Yaşamları süresince dış çevredeki zorlayıcı değişikliklere parazitin adaptasyonu, differasyon süresince metabolizma ve morfoloji değişiklikleri ile sonuçlanır. Promastigotların rölatif olarak daha kolay kültüre edilmelerinden dolayı, promastigot antijenlerinin biyokimyasal ve immünolojik karakteristikleri üzerinde çok fazla çalışma yapılmıştır (91-94). Bu antijenler arasında yüzey proteazı gp63 (promastigot yüzey antijen kompleks-1), parazit yüzey antijeni-2 (PSA-2) ve lipofosfoglikan gibi antijenler yer almaktadır (94,95).

Bu tez çalışmasında Leishmania cell surface antijenlerinin major komponentlerinden biri olan gp63 antijeni kullanılmıştır. Gp63 glikoproteini, non anyonik bir deterjan olan Triton X-114 kullanılarak Leishmania major proteinlerinin saflaştırılması sırasında belirlenmiştir (97). Gp63; leishmania membranlarında tanımlanan en önde gelen bir protein ailesidir. Okong'O-odera ve diğer araştırmacılar doğal gp63'ün oldukça immünojenik olduğunu ve visseral leishmaniasis için çok iyi tanı koyucu antijen olduğunu göstermişlerdir (98,99). Biz bu antijeni, Aksoy N. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada elde edilen antijenler arasından seçtik. Araştırmacılar bu antijenleri jel filtrasyon kromatografisi ve izopiknik

dansite gradient santrifügasyonu yöntemleri ile izole edip ayırmışlar ve bu ayırma işleminde kullanılan kültür ortamında bulunan spesifik olmayan proteinlerin varlığından dolayı bu yöntemlerin tek başına kullanımının yeterli olmayacağını ve bu metotların kombinasyonlarının kullanımının antijenlerin daha ayrıntılı olarak ayırımını sağladığını vurgulamışlardır. Bu yöntemlerin ardından N-glikozilatin içeren karbonhidrat yapılarının Perodik asit-shift (PAS) ve Con A lectin boyası ile boyanması için Slot blotlama ile bir membrana aktarılan antijenler görüntülenmiştir. Elde ettikleri diğer antijenler ise gp50, gp46/M-2 ve gp27'dir ve bu antijenlerin stabilitesinde 6M Guanidin kullanmışlardır (87). Antijenlerin saf olarak elde edilmesi için canlı hayvanlarda toksik olan guanidinin uzaklaştırılmasını, biz PBS'ye karşı bir diyaliz işlemi ile yaptık.

İmmünizasyon işleminde kullanılmak üzere canlı hayvan kaynağı olarak farelerden yararlandık. Fareler Sütçü İmam Üniversitesinin, Hayvan Laboratuvarından elde edildi. Tüm farelerin genetik kökeni Balb/c idi ve deney için altı adet fare kullandık. Zamana karşı immünizasyon grafiklerini görmek ve en iyi immünite yanıtı veren fareyi seçebilmek için tüm farelerden immünizasyondan önce, imünizasyonun 3. günü (ilk doz), 26. günü (ilk destek dozu) ve 49. günü (ikinci destek dozu) olmak üzere toplam dört adet kan örneği alındı. Elde edilen serum örnekleri iki farklı dilüsyonlarda (1/50 ve 1/1000) bir ELISA testi ile gp63 antijenleri kullanılarak uygulanmıştır. Antijenler polistren pleyt kuyularına sabitlenerek serum antikor miktarları belirlendi. Zamana karşı immünizasyon grafiklerinde en iyi immünizasyonu gösteren II numaralı fare olduğundan bundan sonraki deneyler bu fare üzerinden gerçekleştirilmiştir.

En iyi immün yanıt veren fareden elde edilen dalak hücrelerinin kültür ortamında füzyon sonrası daha kararlı bir şekilde kalması amacıyla immünizasyon programına alınmayan bir farenin periton kavitesinden elde edilen besleyici hücreler (fibroblast, makrofaj vb.) kullanıldı. Bu hücrelerin çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerini salgılayarak hibrid hücrelerin kültür ortamına uyumunu arttırdığı bilinmektedir (100). Hücrelerin yaşam ömürleri sınırlı olduğundan belli bir zaman sonunda bu hücrelerin öldüğü gözlemlendi. Tüm çalışmalarda füzyon işlemine alınacak olan dalak ve myeloma hücreleri belirli bir orana (5:1 – 10:1 dalak

hücre üstünlüğü) göre birleştirilmektedir (100). Biz bu oranı 5:1 oranında dalak hücreleri üstünlüğüne göre uyguladık.

Farenin dalağının çıkarılması esnasında steril çalışmaya dikkat edilmelidir. Çünkü bu aşamadaki bir kontaminasyon tüm çalışmanızı yeniden yapmanızı gerektirir. Ayrıca dalağın çıkarılması esnasında farenin karın cildi kesilirken iç organlara zarar verilmesi de bir kontaminasyon kaynağı olabilir. Dalağın parçalanarak dalak hücrelerinin süspansede edilmesinde mekanik olarak ezme işlemlerinin yanında dalak dış kapsülünden dalak içine bir şırınga yardımıyla kültür ortamını ya da PBS tamponunu basınçlı bir şekilde verip tekrar çekip verme işlemleri de kullanılmaktadır. Basınçlı çekip verme işlemi sterilite açısından diğer mekanik ezme yöntemlerine göre daha etkindir. Çünkü mekanik ezme yöntemlerinde kullanılan tel süzgeç, havan gibi malzemelerin de sterilizasyonu gereklidir. Bizim deneylerimizde dalak steril olarak fareden alındı ve basınçlı çekip verme işlemi ile dalak hücreleri süspansede edildi. Hibrid hücre kültürü sırasında da herhangi bir kontaminasyon gözlenmemiştir.

HGPRT enzimini bulandıran myeloma hücrelerin eliminasyonu için myeloma hücre kültür ortamına eklenen 8-Azaguanin, HGPRT enziminin olmadığı myeloma hücre dizileri kullanılması nedeniyle birçok çalışmada kullanılmamaktadır. Bizim myeloma hücre dizimiz HGPRT enzimini içermeyen FO hücre dizisi olmasına rağmen yine de işimizi sağlama almak amacıyla 8-Azaguanin kullandık. Çünkü HGPRT enziminin bir grup hücrede bulunması, deneyin füzyon sonrasında hibrid hücreler dışında myeloma-myeloma birleşmelerini ya da tek başına birleşmeyen myelomaları da içine alacaktır ve hücre kültür ortamında istenmeyen bir çok ürünün de oluşmasına yol açacaktır. Ayrıca tek başına myeloma hücreleri diğer hücre gruplarına (hibrid hücreleri ve myeloma-myeloma birleşmeleri) göre daha hızlı bölündüklerinden dolayı hücre kültür ortamına hibrid hücrelerinin uyumunu da azaltacaktır.

Füzyon sonrası füzyon kuyucuklarında besleyici hücrelerin de yardımıyla kararlı bir duruma ulaşan hibrid hücrelerin pek çok klon oluşturduğu gözlenmektedir. Hibridoma

yöntemi monoklonallik ilkesinde asıl amaç füzyon kuyularında tek bir klonu oluşturup ve bu klonlardan tek bir immün yanıt alımını sağlamaktır. Bunun için çok klonlu klonlardan antikor cevabı veren kuyular tek hücre düşürme (sınırlı seyretme) işlemi ile monoklonlar oluşturulur. Sınırlı seyreltme işlemine alınan çok klonlu bir kuyuda antikor cevabı varsa bu cevap tek bir klona ait olabileceği gibi birçok klona da bağlı olabilir. Sınırlı seyreltme işleminden sonra tüm kuyulardaki antikor cevabı belirlenerek monoklonallik ilkesi yerine getirilmiş olur. Ancak İmmün yanıtın alındığı kuyulardaki her immün birleşim kararlaştırılmış antijenin aynı epitopundan kaynaklanmıyor olabilir. Bu epitopun ya da epitopların belirlenmesi ileri teknikler gerektirir. Bizim çalışmamızda füzyon sonrasında 23 kuyuda klon gözlendi. Bu kuyulardan 9 kuyuda iki, 3 kuyuda üç ayrı noktada klonlar mevcuttu ve 11'inde tek klon mevcuttu. Bu yirmi üç kuyudan alınan örneklerde yalnızca tek bir kuyuda (B8) spesifik antikor yanıtının olması deneyin başarı şansını azaltmış olsa da deneyin devamında bu sonuç deneyden önemli anlamlar çıkarılmasına neden oldu. Şöyle ki, bu kuyuda iki ayrı noktada klonların olması, *Leishmania tropica major* parazitinin, major proteinlerinden olan gp63 antijeni üzerinde bulunan en fazla iki epitopun güçlü antijenik yanıt oluşturduğunu ortaya koydu. B8 kuyusundan elde edilen hücre süspansiyonu daha sonra yapılan alt klonlama işleminden sonra 96 kuyudan yalnız 47 kuyuda klon varlığı gözlenmiştir ve bu kuyuların hepsinde tek klon olduğu gözlenmiştir. Buradan çıkarılan sonuç alt klonlama işleminin başarıyla gerçekleştirildiği ve her kuyuya tek bir hücrenin düşürüldüğüdür. Ayrıca her kuyuda klon olmaması hibrid hücrelerinin hepsinin henüz kararlı bir yapıya ulaşamadıklarını veya işlem süreci içinde bir takım kromozom kayıplarının olduğunu gösterir. Klon oluşturan bu 47 kuyudan alınan örneklerden yalnızca 12'sinde spesifik antikor cevabının olması, bu antikor cevabının alt klonlama öncesi temel klon olan B8 kuyusundaki iki klondan yalnızca birinde antikor cevabının olduğudur. Böylece denilebilir ki, gp63 proteini üzerinde güçlü antijenik uyarı yapan bir epitop vardır. Bu 47 kuyunun yarısından daha az (12 adet) klonda antikor cevabının olması, ya hibrid hücrelerin kararlı durumunun hala sağlanmadığını ve kromozom kayıplarının devam ettiğini ya da alt klonlama işlemi sırasında spesifik immün yanıt vermeyen klondan daha fazla hücrenin tek hücre düşürme işlemi sırasında kuyulara ekilmesidir.

Hibrid hücrelerin ürettiği antikorların saflaştırılmasında birçok spesifik ve spesifik olmayan yöntem kullanılmaktadır. Bunlar arasında Amonyum sülfat ile çöktürme, di etil

amino etil (DEAE) kolonu ile pozitif yüklü iyonik matriks kullanımı, jel filtrasyon yöntemleri, Protein A ve G sefaroze yöntemleri, antijen afinite kolon ve Anti-antikor afinite kolon yöntemleri kullanılmaktadır. Tüm yöntemlerin avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Özellikle spesifik olmayan yöntemler spesifik antikor ayırım yöntemlerine göre daha ucuz iken, antikor saflaştırma kapasiteleri daha kötüdür ve tek başlarına yeterli değildir (100). Biz kendi çalışmamızda proteinlerin bir tuz çöktürme yöntemi olan amonyum sülfat çöktürme yöntemine ek olarak bir immün afinite yöntemi olan Protein A immün afinite kolon yöntemini uyguladık. Yaklaşık 100 mg kadar IgG karakterinde antikor saflaştırdık. Protein A kolonu daha çok IgG karakterindeki antikorlara spesifik olduğundan sonucun bu şekilde olduğunu düşündük.

Hibridoma teknolojilerinde spesifik antikor üretimleri belli amaçları içerir. Bu amaçların başında tanı amaçlı olarak birçok antijen – antikor yöntemine dayanan immün tetkikler gelir. Bu tekniği uygulayan bir çok firma hibridoma bankaları kurarak spesifik antikor üreten fabrikalar ve bunları kullanarak çeşitli immün teknik yöntemlere dayalı tanı kitlerini geliştirmişlerdir. Bunların dışında tedavi amaçlı olarak günümüzde sürekli geliştirilen ilaçlar piyasalarda pazarlanmaktadır. Bunlar arasında son zamanlarda popüler olan kanser hücrelerine karşı geliştirilen antikor tabiatındaki ilaçlar olmuştur (100). Biz çalışmamızda tanı amaçlı olarak kullanılacak bir antikor ürettik. Klinik olarak önemli insan antijenlerine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorların bir listesi ve referansları Dale E. ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir (101).

Biz fare myeloma hücrelerinden yararlanarak spesifik bir hibrid hücre klonu bulduk. Ama daha güncel olarak kullanılan iki insan myeloma hücre dizisi kullanılmaktadır. Böylece insansı antikorlar pratikte kullanıma girmiştir (101). Bizim ürettiğimiz antikorlar fare kökenli olduğundan immün terapi ve immün diagnostikte bazı dezavantajları da birlikte getirir. Ayrıca onlar insansı monoklonal antikorlara yer vermişler ve bunların insan immüno-terapisinde daha iyi tolere edildiğini ve insansı tümör spesifik antikorların kullanıma daha elverişli olduğunu belirtmişlerdir. İnsansı myeloma hücre füzyonlarının fare myeloma hücrelerine göre daha fazla hibrid hücre oluşturduğunu vurgulamışlardır (101).

Elde ettiğimiz bu spesifik antikor, Şanlıurfa ve çevresinde hastalık etkeni olan *Leishmania tropica major* paraziti üzerinde tanısıl amaçlı olarak kullanılabilir. Biz bunun için çift katlı bir sandviç ELISA test sistemi geliştirdik. Bu test sisteminde polistren pleyt yüzeyine spesifik antikorlar döşendi. Bu antikorlar arasında kalan ve antijen bağlayabilen polistren alanlar nötralize edildikten sonra spesifik gp63 antijenini tutan bir yüzey oluşturuldu. Antijenler bu antikora bağlandıktan sonra hasta serumlarında bulunan antikorlar bu antijenler ile bağlanacak hale getirildi. Enzim bağlı antikorlar ise bu komplekslere bağlanarak bir çift katlı immün kolorimetrik sistem (ELISA) kuruldu. Bunun için biz 12 sağlıklı gönüllüden (kontrol) ve çeşitli şekillerde enfekte olan 12 hastadan alınan kan örneklerini bu sistem içinde kullandık. Bu test sisteminde tüm kontrol grubu negatif sonuç verir iken hastaların altısında pozitif sonuç vardı. Buradan varılacak sonuç bu test sisteminin düzgün olarak çalıştığını ve sağlıklı bireyleri doğru olarak ölçtüğünü, fakat hastaların hepsini doğrulamadığını göstermektedir.

Çalışmamızda yer alan kontrol grubu ve hasta verilerine bakarak, ELISA testi pozitifliği ve lezyonun yeri, hastaların yaşı ve lezyon adedi arasında bir korelasyon olmadığı görülmektedir. Ancak hastaların enfekte olma zamanı ile ELISA test pozitifliği arasında bir korelasyonun var olduğu gözlenmektedir. Özellikle hastalığı daha yeni geçiren hastalarda bizim test sistemimiz negatif bulunur iken, hastalığın daha fazla sürdüğü hastalarda bu test pozitif sonuç vermiştir. Bu da bizim test sistemimize spesifik antikorların IgG karakterinde olduğunu desteklemektedir. Muhtemelen testimizin negatif geldiği hastaların kanlarında ya hastalığa özgü IgM türü antikorlar mevcuttur ya da antikor oluşum safhasına henüz geçilmeme ihtimali vardır. Bu ise bizim test sistemimizin, hastalığın erken safhalarında saptanma şansının az olduğunu göstermektedir. Eğer bu test için hasta popülasyonu daha da genişletilseydi daha kesin bilgiler elde edilebilirdi. Bunun yanında bizim elimizde bulunan gp63 proteini ile hızlı tanı koyan tanı kitlerinin yapılmasının zor olduğunu göstermektedir. Ama bunların tam olarak gösterilmesi için daha ileri tekniklere ihtiyaç vardır.

Bilindiği gibi Kutanöz Leishmaniasis deri üzerinde zaman içinde papüler, nodüler ve ülserle lezyonlarla ortaya çıktıktan uzun bir zaman sonra skarlaşarak iyileşmektedir. Bu zaman

periyodu içinde oluşan lezyonların hiçbirisi leishmania türlerine karşı spesifik lezyonlar değildir. Önceleri hasta ve yakınları tarafından basit bir yara olarak düşünülen lezyonların iyileşmediği takdirde bir sağlık kuruluşuna götürüldüğü görülmektedir. Bu lezyonları tanımada deneyimli olmayan sağlık çalışanları bu leishmaniasis enfeksiyonunu farkedemeyebilirler. Çünkü spesifik olmayan lezyonlardan dolayı ayırıcı tanıda bir çok neden düşünülebilir. Bu nedenle özellikle bu enfeksiyonun endemik olduğu bölgelerde uzun süre geçmeyen lezyonlarda ilk akla gelen hastalık olmalıdır. Tanı için en çok kullanılan yöntem lezyon bölgesinden alınan sürüntünün direk mikroskopisidir. Ama bu tanı yöntemi çok hızlı bir tanı yöntemi olmadığından lezyonların skarlaşma oranı yüksektir. Bu skarlaşma oranını düşürmek için daha hızlı tanı yöntemlerine ihtiyaç vardır. Bunlar arasında humoral antikorları belirleyen kompleman fiksasyon testi, haemaglutinasyon testi, indirek floresan antikor testi, immün elektroforez ve enzim-linked immunoabsorbent assay yöntemleri ile mümkündür (4, 28). Bu yöntemlerin bir kısmı dünyanın bazı bölgelerinde kullanılmaktadır. Bilindiği gibi Leishmania enfeksiyonları farklı coğrafi bölgelerde birbirlerine benzerlik gösterebilen farklı leishmania türlerini içermektedir. Aynı lezyonu yapabilen iki farklı bölgedeki Leishmania tiplerinin genetik özellikleri ve hücre yüzey antijenleri çoğunlukla farklı olmaktadır. Bu yüzden bir bölgede kullanılan immün diagnostik hızlı tanı kitleri başka bölgelerde tanı koymada yetersiz kalabilmektedir. Bu yüzden biz kendi coğrafik bölgemizde endemiler yapan *Leishmania tropica major* türünü seçtik ve gp63 antijenine karşı antikor üretmeyi başardık. İmmün tanı koyan parsiyel bir ELISA testi gerçekleştirdik. Türkiye’de Hibridoma teknolojisi kullanılarak yapılan sayılı bir kaç çalışma vardır ve bu çalışmalardan bir kısmında elde edilen antikorlar immündaagnostik için düşünülmüştür. Ama yapılan bu çalışmaların hiçbiri bir parazit antijenine karşı yapılmamıştır. Bu nedenle bizim çalışmamız bir parazit olan Leishmania türü için Türkiyede yapılan ilk Hibridoma çalışmasıdır.

Gp63 antijenine karşı yaptığımız ELISA testinin daha erken tanı koymadaki verimliliği artırmak için daha ileri çalışmaların yapılması gereklidir. Biz bu çalışmayla gp63 antijeni kullanılarak tanı kitleri için glikoprotein tabiatında bir antikor üretmeye çalıştık. Bu antikor ELISA testinin yanında enzim dışında kullanılabilen diğer işaretleyicilerinin kullanıldığı immün ölçümlerde de kullanılabilir.

Biz bu çalışmaya başlarken Şanlıurfa bölgesinde daha önce yapılmış bir çalışmadan elde edilen gp63 antijenini kullandık. Bizim çalışmamızda bu antijene karşı spesifik antikor sentezi yapılmış olsa da tanı koymadaki verimlilik yeterli değildir. Bundan sonra yapılacak iki şey vardır. Birincisi gp63 antijeni üzerinde daha fazla deneysel hibridoma çalışması yaparak hasta vücudunda en erken fazda oluşan humoral antikorları tanıyan antikor sentezini üreterek immün diagnostik testlere uygulamaktır. İkincisi ise Şanlıurfa ve çevresinde enfeksiyonlara neden olan *Leishmania tropica major* paraziti üzerinde bulunan antijenlerin tespit edilmesi ve elde edilmesinin sağlanması ile hibridoma çalışmalarının bu antijenler üzerinde yoğunlaşmasını sağlamaktır. Çünkü kutanöz lezyonlara neden olan parazitin birçok antijeni üzerindeki epitoplara karşı antikor üretimi hasta vücudunda meydana gelmektedir. Burdaki asıl amaç hasta vücudunda en hızlı antikor oluşumuna neden olan epitopun yer aldığı antijenin bulunmasıdır.

Gp63 antijenine karşı üretilen bu antikor kutanöz leishmaniasis profilaksisinde pasif aşı olarak kullanılabilir. Ama bunun için birçok hayvan ve insan deneylerine ihtiyaç vardır. Yapılacak olan bu pasif aşı çalışmalarından birisi elde ettiğimiz bu antikorum fare orjinli olmasıdır. Günümüzde sayılı aktif aşı stratejileri, leishmania aşıları üzerinde araştırmalara yol açmıştır (102-104) ve tropical hastalık araştırmaları leishmaniasise karşı uygun bir aşı yapmayı kararlaştırmıştır. Aşıların dizayn edilmesi ve geliştirilmesi için pragmatik ve sistematik iki yol vardır. Pragmatik yol; insanlarda ve hayvanlarda güvenli bir adjuvanla ya da adjuvansız olarak işlenmemiş antijenik materyallerin incelenmesidir. Son yıllarda leishmania ham antijenleri yeterli bir şekilde standardize edilmiştir, fakat onların belirlenmesi için verilerin çokça toplanmasına gerek duyulur. Sistematik yol, immünojenik materyallerin belirlenmesi ve saflaştırılmasını içerir (105). Bizim bu çalışmamız aşı stratejilerine bir katkıda bulunabilir.

Bizim ürettiğimiz anti-gp63 antikoru parazitin promastigot formuna karşı gelişmiştir. Çünkü gp63 antijeni elde edilirken hasta lezyon bölgelerinden elde edilen sürüntü örneklerinin kültürü sonrası elde edilmiş olup bu parazit formları promastigot formudur. Eğer lezyon bölgelerini drene eden lenf nodu örnekleri alınmış olsaydı amastigot formlarının elde

edilmesi mümkün olabilirdi. Parazit formlarına spesifik bir çok çalışma yapılmıştır. Pan ve McMahon-Pratt'ın bir çalışmasında (106), *Leishmania mexicana pfanoi*'nin amastigot benzeri bir hücrenin, bu *Leishmania* türlerinde amastigot evresine spesifik monoklonal antikor üretimi için kullanılabilceğini göstermişlerdir. Son yıllarda Balb/c farelerinden izole edilen *L. major* amastigotlarında amastigot evresine spesifik monoklonal antikor üretimi ve karakterizasyonu üzerinde yayınlar yapılmıştır (107).

Yine Jaffe C.L. ve arkadaşı tarafından yapılan bir çalışmada *L. tropica major* promastigotlarına karşı dört monoklonal antikorun (T-1 – T-4) *L. tropica* ailesinin üyeleri ile spesifik olarak bağlandığını göstermişlerdir. T-1 ve T-4 antikorlarının ayrıca *L. tropica minor* ile çapraz reaksiyon verdiğini göstermişlerdir. Diğer iki antikorun ise *L. mexicana amazonensis* ile zayıf ve *L. aethiopica* ile çapraz reaksiyon verdiğini vurgulamışlardır. Bu antikorların *L. donovani*, *L. braziliensis* ve *Tripanosoma cruzi* ile hiç bir çapraz reaksiyon vermediğini belirtmişlerdir (94). Bizim bu çalışmamızda anti-gp63 antikoru *L. major* hastalarında tanısal olarak kullanılabilceği gibi diğer leishmania türlerini de tanıyabilirliğini gösteren daha ileri çalışmalar yapılabilir. Çünkü bilindiği gibi leishmania türlerinin antijenleri arasında bir çok yapısal benzerlik bulunmaktadır. Bu yüzden elde ettiğimiz bu antikor diğer dünya leishmania türleri ile çapraz reaksiyon verebilir ve spesifitesinin azalmasının yanısıra tanısal genişliği artabilir.

Pan AA. ve arkadaşları *Leishmania pfanoi*'nin formlarına ve türlerine spesifik determinantları ile ilişkili antijenleri karakterize etmek için bir dizi antikor üretmişlerdir (108). Biz de Pan AA. ve arkadaşları gibi elde ettiğimiz anti-gp63 antikoru ile immün kromatografik yöntemler ile *L. tropica* promastigotları yüzey antijenlerinden olan gp63'ü bir çok karmaşık işlemi yapmadan daha saf bir şekilde elde edebiliriz. Elde ettiğimiz bu antijenler çeşitli şekillerde kullanılabilir. Bunlardan biri aktif aşı çalışmalarında denenebilir.

Ülkemizde monoklonal antikor üretim çalışmaları son yıllarda artmaya başlamaktadır. Bizim elde ettiğimiz bu antikor ile ileri çalışmalar yapılabilir. Özellikle ülkemizdeki kutanöz

Leishmaniasis başta olmak üzere Leishmaniasis tanısını koymada bir adım atılmış olabilir. Bu antikörlara aynı yöntemle anti-antikörlar oluşturularak ve çeşitli işaretleyiciler bağlanarak çeşitli tanı kitleri de yapılabilir. Ayrıca bu antikörlar, spesifik immün afinite kolon matrikslerinde bir ligand rolünü alarak leishmania ailesinin major bir proteini olan gp63'ün daha kolay bir şekilde saflaştırılması için kullanılabilir. İleri çalışmalarla Leishmaniasis daha erken tanısı da konabilir. Leishmaniasis erken tanısını konmasıyla belki de yıllardır Türkiyede yıllarca iyileşme göstermeyen, kalıcı skar dokusu bırakan bu hastalığın önüne geçilecektir. Belki de bu hastalığın giderek yok olmasına katkıda bulunulacaktır.

Bunun yanında bu antikörların pasif bağışıklık oluşturup oluşturmadıkları test edilerek pasif aşısı olarak kullanılabilirler. Bu, bu alanda ülkenin dışa bağımlılığını da azaltacaktır. Ülkemizde birçok antijenin belirlenmesinde bu ve bunun gibi çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- 1- Lehninger AL, Nelson AL. Cox mm Principles of Biochemistry. New York. Worth Publ, 1993.517-519.
- 2- Memiřođlu HR, Kotođyan A, Acar MA, Özpoyraz M: Leishmaniasis. Dermatoloji. (Eds Tüzün Y, Kotođyan A, Aydemir EH, Baransü O). İstanbul, 1994.
3. Marquard WC, Dermaree RS, Grieve RB. Leishmania and Leishmaniasis. Parasitology and Vector Biology. Harcourt-Academic Pres. 2000: 57-71.
4. Özbel Y, Töz ÖS, Leishmaniasis, Özcel MA. Tıbbi Parazit Hastalıkları.1.Baskı, İzmir: Meta Basım Matbacılık Hizmetleri, 2007: 198-230.
5. World Health Organization web sayfası. <http://www.who.int/dr/diseases/leish/default.html>.
6. Unat EK, Yücel A, Atlas K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi 5. Baskı, İstanbul: Doyuran Matbası, 1995: 564-586.
7. Weigle KA, Valderlama L, Arias AL, Santrica C, Saravia NG. Leishmnanin standardization and evaluation af safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. Am Journal tropica Medical Hyeneg. 1991:44:260-271.
8. Gadisa E, Genetu A, Kuru T, Jirata D, Dagne K, AseVa A, Gedamu L, Leishmania (Kinetoplastida): Species typing with isoenzyme and PCR-RFLP from cutaneous leishmaniasis patients in Ethiopia. Experimental Parasitology.2007:115:339-343.
- 9- Unat EK, Yücel A, Altas K, Samastı M. "Unat'ın Tıp Parazitolojisi" İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları. 5. Baskı İ.Ü. Cerrahpařa Tıp Fakültesi Yayınları. 1995, 564-590.
10. Gerlind A. PCR Diagnosis of Leishmaniasis in Israel and West Bank Development of a field applicable procedure useful for epidemiological studies, The Kuvın Center fort the study of Infectious and tropical Disesaes, The Hebrew University.1999.
11. Unat EK, Yařarol ř. Leishmaniasis: Kala-azar ve şark Çıbanı Ege Üniversitesi Matbaası Bornova-İzmir, 1981: 1-45.
12. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji, Sivas: Esnaf Ofset Matbaacılık, 1998: 47-55.

- 13-Lewis DJ, Ward RD: Transmission and vektors. The Leishmaniasis in Biology and Medicine (Eds, Peters W, Killick-Kendrick R). Academic Pres, 1987; 235-262.
- 14-Turgay N, T lenfositlerinin Leishmania antijenleri ile invitro eğitimi üzerine çalışmalar, Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 1998.
15. Antinori S. Cutaneous leishmaniasis: an increasing threat for travellers. Clinical Microbiology Infection. 2005; 11: 343–346.
16. Ashford RW, Desjeux P, de Raadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniosis. Parasitology Today. 1992.8:104-105.
17. Desjerux P. The increase in risk factors for leishmaniosis world wide. Trans R Soc tropica Medicine Hygene. 1991.85(2):212-213.
18. Davidson NR, Leishmaniasis, Cohen J, Powderly GW. Infectious Diseases, 8th, Edinburgh, Mosby, 2004, 1621-1626.
- 19- Sağlık Bakanlığı Şanlıurfa İl Sağlık Hizmetleri İl İcmali 2000-2004,92.
- 20- Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü çalışma yıllığı 2002, Ankara, 2003; 115-116.
21. Krotoski MJ. Medical Parasitology.8th .Ed.,W.B.Saunders company-London.1999: 147-154.
- 22-Bryceson ADM: Leishmaniosis. Manson's tropical Diseases (Eds Cook GC) ed 20 Saunders, 1996, 1213-1245.
- 23-Berman JD, Human leishmaniosis: Clinical diagnosis and chemotherapeutic developments in the last 10 years, KLin Infec Dis, 1997; 24, 684-703.
- 24- Seaman J, Mercer J, Phill M, Sondorp HE, Herwalt BL, Epidemic visceral leishmaniosis in Southern Sudan: Treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources, Ann Intern Med, 1996; 124, 664-672.
- 25- Silva TMC, Barral A, Pompeu MML, et. al., In situ inflammatory-immune response in human tegumentary leishmaniasis: morphologic evidence for a pathogenic role of TNF- α , Mem Inst Oswaldo Cruz, 1998; 93:2, 49–50.
26. Soulsby E.J.L, Immune responses in parasitic infections: immunology, immunopatology and immunoprophylaxis, vol.3,CRC Pres, Florida.1987: 126-130.
27. www.saglik.gov.tr.
28. Özcel MA, Özbilgin A. Güney Doğu Anadolu Projesini Tehdit Eden Parazit Hastalıkları. Altıntaş N. Leishmaniosis. Bornova-İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1995: 97-127.

29. Piarroux R, Gambarelli F, Duman H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Qulici M. Comparison of PCR with Direct Examination of Bone Marrow Aspiration, Myeloculture and Serology for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Immunocompromised Patients. *Journal of Clinical Microbiology*.1994;746-749.
30. Gangneux JP, Menotti J, Lorenzo F, Sarfati C, Blanche H, Bui H, Pratlong F, Garin YJF, Derouin F. Prospective Value of PCR Amplification and Sequencing for Diagnosis and Typing of Old World Leishmania Infections in an Area of Nonendemicity. *Journal of Clinical Microbiology*.2003;1419-1422.
31. Hepburn NC, Omer AHS. Old world cutaneous leishmaniasis: pathology, clinical features, differential diagnosis and therapy. In: Gilles Hm (ed). *Protozoal Diseases 10thEd*. London Oxford unv. Press.1999.471-480.
32. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clinical Exp. Dermatology*. 2000.25: 363-370.
33. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis an overview. *Journal Postgrad Medicine*.2003: 49: 50-54.
34. Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr. Opin. Infection Dis*. 2003;16:397-401.
- 35-Berman JD, Waddell D, Hanson BD, Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1985; 27, 916.
- 36-Heart D, Langridge A, Barlow D, Sutton B: Molecular strategies for antileishmanial drug design. *Nato ASI on Leishmaniasis: the first centenary (1885-1985) the current status and new strategies for control*. Greece-Zakinthos, 1987; 693-697.
- 37- Kikuth W, Schmith H: Contribution to the progress of antimony therapy of kala azar, *Chinese Med J* 1937; 52, 425.
38. Herwaldt BL.,Leishmaniasis.*Lancet* 1999: 354 : 1191-1199.
39. Ramos E, Silva M, DeMoura Castro Jacques C,Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil. *Clinic Dermatology*. 2002: 20: 122-134.
40. Akisu Ç, Korkmaz M. Tıbbi Parazitolojide Tedavi, Türkiye Parazitoloji Derneği. 2003: 20: 56-58.
41. Alkan Z, Özbel Y, Özensoy S, Atambay M,Moleküler biyolojik yöntemler. Ed Özcel MA, Altıntaş N, Parazit Hastalıklarında Tanı. Tıbbi Parazitoloji Derneği, Ege Üniversitesi, Yayın No:15.
42. www.inonu.edu.tr.
43. Milstein C., Monoclonal antibodies, *Sci Am.*, 1980, 243 (4): 66-74.

44. Köhler G., Derivation and diversification of monoclonal antibodies, *The EMBO Journal*, 1985, 4(6): 1359-1365.
45. Köhler G., Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 1975, 256: 495-497.
46. Delpinho R.A., Feldman L.B., and Scharff M.D., Tailor made monoclonal antibodies. *Annals of Internal Medicine*, 1986, 104(2); 225-233.
47. Geus B.D., Hendriksen C.F.M., In vivo and in vitro production of monoclonal antibodies: current possibilities and future perspectives, *Res. Immunol.*, 1998, 149: 533-620.
48. Breedveld F.C., Therapeutic monoclonal antibodies, *The Lancet*, 2000, 355: 735-740.
49. Milstein C, Monoclonal antibodies In: Immunology recognition and response. Paul WE (Ed.). WH Freeman and Company, New York, 1991, 124-134.
50. Michaud G., Salcius M., Zhou F., Bangham R., Bonin J., Guo H., Snyder M., Predki P., Schweitzer B., Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays, *Nature Biotechnology*, 2003, 21: 1509-1512.
51. Berry J.D., Rational monoclonal antibody development to emerging pathogens, biothreat agents and agents of foreign animal disease: the antigen scale, *The Veterinary Journal*, 2004: 1-12.
52. Stewart S.J., Monoclonal antibody production, In: Basic methods in antibody production and characterization, Howard G.C., Bethell D.R. (Eds.), CRC Press, LLC. USA, 2001: 51-67.
53. Goding J.W., Antibody production by hybridomas, *Immunol. Methods*, 1980, 39(4): 285-308.
54. Melchers F., Potter M., Warner N.L., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1978, 81.
55. Kennet R.H., McKearn T.J., Bechtol K.B., *Monoclonal antibodies*, Plenum Press, New York, 1980.
56. Secher D.S., *Immunology Today*, 1980, 1, 22.
57. Staines N.A., Lew A.M., *Immunology*, 1980, 40, 487.
58. Gavilando J.V., and Larrick J.W., Antibody engineering at the millennium, *Biotechniques*, 2000, 29: 128-145.
59. Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M., Strober W., Antibody detection and preparation, In: *Current Protocols in Immunology*, Vol 2, Suppl 1, John Wiley and Sons Ltd., USA, 1991: 1-16.

60. Mitchell M.S., Oettgen, H.F., In Progress in cancer research and therapy, (Eds.) Mitchell M.S., Oettgen H.F., Raven Press, New York, 1982, 1.
61. McMichael A., Fabre J., In Monoclonal antibodies in Clinical Medicinei (Eds.) McMichael A., Fabre J., Academic Press, New York, 1983, 672.
62. Teillaud J.L., Desaymard C., Giusti A.M., Haseltine B., Pollock R.R., Yelton D.E., Zack D.J., Scharff M.D., Science, 1983, 222:721.
63. Vora S., Monoclonal antibodies in enzyme research: present and potential applications. Analytical Biochemistry 1985, 144: 307-318.
64. McNeilly F., McNair I., Mackie D.P., Meehan B.M., Kennedy S., Moffett D., Ellis J., Krakowka S., Allan G.M., Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2, Arch Virol, 2001, 146: 909-922.
65. Waritani T., Okuno Y., Ashida Y., Tsuchiya R., Kobayashi K., Yamada T., Development and characterization of monoclonal antibodies against canine trypsin, Veterinary Immunology and Immunopathology, 2001, 80: 333-338.
66. Marx A., Shery J., Hansen P.D., Hock B., A new monoclonal antibody against vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Chemosphere, 2001, 44: 393-399.
67. Lennon V.A., Lambert E.H., Nature, London, 1980, 285: 238.
68. Richman D.P., Gomez C.M., Berman P.W., Burres S.A., Fitch F.W., Arnason B.G.W., Nature, London, 1980, 286: 738.
69. Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K., Tumour Immunology, In: Immunology, 6th ed., Roitt I.M. Brostoff J., Male D. (Eds.), Edinburgh ; New York : Mosby, 2001: 294-300.
70. Pine La R.T., Hill R.H., Monoclonal antibodies, Seminars in Pediatric Infectious Diseases, 2001, 12(1): 64-70.
71. Horig H., Medina A.F., Conkright A.W., Kaufman H.L., Strategies for cancer therapy using carcinoembryonic antigen vaccines, Expert Reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Press ISSN, 2000: 1462-3994.
72. Haris M., Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer, Lancet Oncol., 2004, 5: 292-302.
73. Dijk M.A., Winkel J.G.J., Human antibodies as next generation therapeutics, Curr. Opin. Chem. Biotech, 2001, 5: 368-374.
74. Bodey B., Siegel S.E., Kaiser H.E., Genetically engineered monoclonal antibodies for direct anti-neoplastic treatment and cancer cell specific delivery of chemotherapeutic agents, Current Pharmaceutical Design, 2000, 6: 261-276.

75. Benjamini E., Coico R., Sunshine G., Monoclonal and genetically engineered antibodies, In: Immunology a short course, 4th Ed., John Wiley and Sons Ltd., USA, 2000, pp. 107-110.
76. Thompson M.A., Cancro M.P., Dynamics of B cell repertoire formation: normal patterns of clonal turnover are altered by ligand interaction, *J. Immunol.*, 1982, 129: 2372-2376.
77. Ledbetter, J.A., Herzenberg L.A., Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens, *Immunol. Rev.*, 1979, 47: 63-90.
78. Delves P.J., Preparing immunogens, In: Antibody Production Essential Techniques, Rickwood D. (Ed.), John Wiley and Sons Ltd., UK., 1997, pp. 18-26.
79. Newkirk M.M., Rauch J., Mageed R.A., Jefferis R., Posnett D.N., Silverman G.J., factors from patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, *Mol. Immunol.*, 1993, 30: 255-263.
80. Golub E.S., Green D.R., Antibodies as tools, In: Immunology a Synthesis, 2nd ed., Sinauer Associates Inc., USA, 1991, pp. 134-139.
81. Kuby J., Immunoglobulins: structure and function. In: Immunology 2nd ed. Kuby J (Ed). W.H. Freeman and Company, Newyork. 1994, pp. 124-130.
82. Engvall E., Perlmann P.O., Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitive assay of immunoglobulin G., *Immunochemistry*, 1971, 8: 871-875.
83. Stiffler-Rosenberg G., Fey H., Measurement of human tetanus antitoxin using as enzyme-linked immunosorbent assay, *Schweiz Med Wochenscher*, 1977, 31: 1101-1104.
84. Ozkaya E., Arita M., Evaluation of an ELISA kit made in our laboratory for intratypic discrimination of poliovirus type 1 strains isolated from acute flask paralysis, *Mikrobiyol. Bul.*, 2002, 36(1): 71-77.
85. Wilson K., Goulding K.H., Methoden der Biochemie, 3. Aufgabe, Gorg Thieme Verlag, Stuttgert, 1991.
86. [http: www.uq.edu.au/vdu/ELISA.html](http://www.uq.edu.au/vdu/ELISA.html).
87. Aksoy N, Ozbilge H, Keles S, İriadam M, Vural H, Akcay F. A preliminary approach to the separation of Leishmania cell-surface antigens. *J Sep Sci.* 2004 Aug;27(12):1011-6.
88. Henry, JB. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Nineteenth edition. W.B. Saunder Company. A Division of Harcourt Brace &Company. Philadelphia 1996.
89. Sakai G., Saiki T., Uda. T., Miura N., Yamazoe N. Evaluation of binding of human serum albumin (HSA) to monoclonal and policlonal antibody by means of piezoelectric immunosensing techniquei Sensor and actuars B42; 1997, 89-94.

90. Chenf T.J., Chang H.C., Lin T.M. A piezoelectric quartz crystal sensor for the determination of coagulation time in plasma and whole, *Biosens Bioelectron* 1998, 1;13 (29: 147-156).
91. Charles L. Jaffe and Nurit Rachamim. Amastigote Stage-Specific Monoclonal Antibodies against *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, Dec. 1989, p. 3770-3777.
92. York-Dieter Stlerhof, Heinz Schwarz, Beatrice Menz, David G. Russell, Margret Quenten and Peter Overath. Monoclonal antibodies to *Leishmania mexicana* promastigote antigens. II. Cellular localization of antigens in promastigotes and infected macrophages.
93. Handman E. and Hocking R. E.. Stage-Specific, Strain-Specific, and Cross-Reactive Antigens of *Leishmania* Species Identified by Monoclonal Antibodies *Infection and immunity*, JULY 1982, p. 28-33.
94. CL Jaffe and D McMahon-Pratt. Monoclonal antibodies specific for *Leishmania tropica*. I. Characterization of antigens associated with stage- and species- specific determinants. *The Journal of Immunology*, Vol 131, Issue 4 1987-1993, Copyright © 1983 by American Association of Immunologists.
95. Handman E, Osborn AH, Symons F, Van Driel R, Cappai R (1995). The *Leishmania* promastigotes surface antigen 2 complex is differentially expressed during the parasite life cycle. *Mol Biochem parasitol*, 74: 189-200.
96. Symons FM, Murray PJ, Osborn AH, Cappai R, Handman E (1994). Characterization of a polymorphic family of integral membrane proteins in promastigotes of different *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol*, 67: 103-13.
97. Murray, P.J., T.W. Spithill and E. Handman, 1989. Characterization of integral membrane proteins of *Leishmania major* by Triton X-114. Fractionation and analysis of vaccination effects in mice. *Infect. Immun.*, 57: 2203-2209.
98. Okong'o-odera EA, Kurtzhals JA, Hey AD, Kharazmi A, 1993. Measurement of serum antibodies against native *Leishmania* gp63 distinguishes between ongoing and previous *L. donovani* infection. *APMIS* 101: 642-646.
99. Shreffler WG, Burns JM, Badaro R, Ghalib HW, Button LL, McMaster WR, Reed SG, 1993. Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. *J Infect Dis* 167: 426-430.
100. Yücel F., Başalp A. ve Öztürk S.. Hücre Füzyon Yöntemi ile Monoklonal Antikor Üretimi. Kurumsal ve Uygulama Kurs Ders Kitabı, 05-09 Haziran 2006: 71-72.
101. E. Dale Sevier, Gary S. David, Joanne Martinis, Walter J. Desmond, Richard M. Bartholomew, and Robert Wang. Monoclonal Antibodies in Clinical Immunology. *Clin. Chem.* 27/11, 1797-1806 (1981).

102. Chang, C. S., and Chang K. P.. 1986. Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of *Leishmania*-macrophage binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 100-104.
103. Handman, E., and Mitchell G. F.. 1985. Immunization with *Leishmania* receptor for macrophages protects mice against cutaneous leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5910-5914.
104. Jaffe, C. L., and Zalis M. 1988. Purification of two *Leishmania donovani* membrane proteins recognized by sera from patients with visceral leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27: 53-62.
105. Kahl L. P., and McMahon-Pratt D. 1987. Structural and antigenic characterization of a species and promastigote-specific *Leishmania mexicana amazonensis* membrane protein. *J. Immunol.* 138:1587-1595.
106. Pan A. A., and McMahon-Pratt D. 1988. Monoclonal antibodies specific for the amastigote stage of *Leishmania pifanoi*. I. Characterization of antigens associated with stage and species specific determinants. *J. Immunol.* 140:2406-2414.
107. Charles L. Jaffe and Nurit Rachamim. Amastigote Stage-Specific Monoclonal Antibodies Against *Leishmania Major*. *Infection and Immunity*, Dec. 1989, P. 3770-3777.
108. AA Pan and D McMahon-Pratt. Monoclonal antibodies specific for the amastigote stage of *Leishmania pifanoi*. I. Characterization of antigens associated with stage- and species-specific determinants. *The Journal of Immunology*, Vol 140, Issue 7 2406-2414, Copyright © 1988 by American Association of Immunologists.