**T.C.**
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# KÜTANÖZ LEİSHMANİASİS ETMENİ *L.TROPİCA*'DAN İZOLE EDİLEN LPG MOLEKÜLÜNE KARŞI HİBRİDOMA TEKNOLOJİSİNE DAYALI MONOKLONAL ANTİKORLARIN BÜYÜK ÖLÇEK ÜRETİLMESİ VE SAFLAŞTIRILMASI

**HİLAL ŞENTÜRK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**
**BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**
**BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN**
**PROF. DR. ADİL ALLAHVERDİYEV**

**İSTANBUL, 2017**

**T.C.**
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# KÜTANÖZ LEİSHMANİASİS ETMENİ *L.TROPİCA*'DAN ELDE EDİLEN LPG MOLEKÜLÜNE KARŞI HİBRİDOMA TEKNOLOJİSİNE DAYALI MONOKLONAL ANTİKORLARIN BÜYÜK ÖLÇEK ÜRETİLMESİ VE SAFLAŞTIRILMASI

Hilal ŞENTÜRK tarafından hazırlanan tez çalışması 14.04.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Bekir Sami KOCAZEYBEK
İstanbul Üniversitesi _____

Yard. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniveristesi _____

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 0254.STZ.2013-2 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

# ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilim ve akademik anlamda ilerlemem için her türlü desteği sağlayan, bilgi ve tecrübesini benden hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV'e, her zaman doğru yolda ilerlemem gerektiğini bir anne edasıyla anlatıp, bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya, tezin incelenmesinde gösterdiği duyarlılıktan dolayı jüri üyesi Sayın Prof. Dr. Bekir Sami KOCAZEYBEK'e ve her zaman yardımıma koşarak çalışmalarımda beni destekleyen sayın hocam Arş. Gör., Dr. Emrah Şefik Abamor'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı'nın 0254.STZ.2013-2 numaralı projesi ile desteklenen tez çalışmasında, iş birliği içerisinde olunan Salubris A.Ş'ye ve Sayın Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ'e,

Ayrıca, projenin başlangıç aşamasından itibaren verdikleri katkılarından dolayı değerli çalışma arkadaşlarım Hilal TOPTAŞ'a, Gülnaz YILDIRIM KÖKEN'e, Aslı Pınar ZORBA'ya, Mehmet AYDOĞDU'ya, Özlem Ayşe ÖZYILMAZ'a, Gizem COŞAR'a,

Bu tezin başarıyla yerine getirilmesine olanak sağlayan başta bölümümüzün kurucusu Prof. Dr. Mustafa AKDESTEYE'ye, bölüm kurucu üyesi Prof.Dr. Huriye KUZU'ya ve hali hazırda bölüm başkanı olan Prof. Dr. Sevil YÜCEL'e, bölümümüzün değerli öğretim üyeleri ile asistanlarına, Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına, Fen Bilimleri Enstitüsüne,

Beni bugünlere türlü zorluklarla getiren, mesleğimle ve yaptığım çalışmalarla her daim övünüp bana kol kanat geren sevgili annem Nimet ŞENTÜRK ve sevgili babam Adnan ŞENTÜRK'e, bana baktığında her daim gözlerinin içi parlayan canım dedem Naci DORA'ya en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Şubat, 2017

Hilal ŞENTÜRK

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ....viii

KISALTMA LİSTESİ....ix

ŞEKİL LİSTESİ....xii

ÇİZELGE LİSTESİ....xiv

ÖZET....xv

ABSTRACT....xviii

BÖLÜM 1

GİRİŞ .... 1

1.1 Literatür Özeti .... 1
1.2 Tezin Amacı .... 5
1.3 Hipotez .... 5

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER .... 7

2.1 Leishmaniasis .... 7
2.2 Leishmaniasis' in Epidemiyolojisi ve Prevalansı .... 8
2.3 Türkiye'de Leishmaniasis .... 10
2.4 *Leishmania* Türleri ve Morfolojileri .... 10
2.5 *Leishmania* Parazitlerinin Hayat Döngüsü .... 15
2.6 Leishmaniasis Türleri .... 16
2.6.1 Kütanöz Leishmaniasis (KL) .... 16
2.6.2 Mukokütanöz Leishmaniasis (MKL) .... 16
2.6.3 Visseral Leishmaniasis (VL) ya da Kala-Azar (KA) .... 16
2.7 *Leishmania* Parazitlerindeki Lipofosfoglikan (LPG) Molekülü .... 17
2.8 Leishmaniasis'in Tanısı .... 18
2.8.1 Kütanöz Leishmaniasis'in Tanısı .... 18
2.8.2 Visseral Leishmaniasis'in Tanısı .... 19

2.8.3 Leishmaniasis Tanı Yöntemleri ..... 20
2.8.3.1 Mikroskopik Tanı Yöntemleri ..... 20
2.8.3.2 Kültür Yöntemleri ..... 20
2.8.3.3 Mikro Kültür Yöntemi ..... 20
2.8.3.4 İdrarda Antijen Tespiti ..... 21
2.8.3.5 Serolojik Yöntemler ..... 22
2.8.3.6 Moleküler Yöntemler ..... 24
2.9 Leishmaniasis İmmünitesi ..... 25
2.9.1 Kompleman Sistem ..... 25
2.9.2 Doğal İmmünite Hücreleri ..... 26
2.9.3 Edinsel İmmünite Hücreleri ..... 27
2.9.4 Sitokinler ve Kemokinler ..... 28
2.9.5 Kütanöz Leishmaniasis'te İmmünite ..... 29
2.10 Antikorlar ve Yapısı ..... 29
2.10.1 Poliklonal ve Monoklonal Antikorlar ..... 33
2.11 Hibridoma Teknolojisi ..... 34
2.11.1 Hibridoma Teknolojisinin Prensipleri ..... 35
2.12 Hibrid Hücrelerinin Çoğaltılması ..... 39
2.12.1 Hibrid Hücrelerinin *İn Vitro* Küçük Ölçek Üretimi ..... 39
2.12.2 Hibrid Hücrelerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi ..... 41
2.12.3 Hibrid Hücrelerinin *İn Vitro* Büyük Ölçek Üretimi ..... 44
2.12.4 Hibrid Hücrelerinin *İn Vivo* Üretimi ..... 45
2.13 Monoklonal Antikorlar ..... 48
2.13.1 Monoklonal Antikorların Sınıflandırılması ..... 49
2.13.2 Monoklonal Antikorların Saflaştırılması ..... 50
2.13.3 Monoklonal Antikorların Karakterizasyonu ..... 54
2.13.4 Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları ..... 55
2.13.4.1 Tedaviye Yönelik Kullanım Alanları ..... 56
2.13.4.2 Kanser Tanısında Monoklonal Antikorlar ..... 56
2.13.4.3 Kanser Tedavisinde Monoklonal Antikorlar ..... 57
2.13.4.4 Analitik Kullanım Alanları ..... 58
2.13.4.5 Diğer Kullanım Alanları ..... 58
2.13.4.6 Leishmaniasis'in Tanısında Monoklonal Antikorların Kullanımı . 59
2.14 Leishmaniasis'in Kontrolü için Aşı Geliştirilmesi ..... 59

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR ..... 62

3.1 Materyal ..... 62
3.1.1 Ekipman ..... 62
3.1.2 Kimyasallar ..... 64
3.1.3 Deneylerde Kullanılan Tampon, Besiyerleri ve Kimyasalların Hazırlanışı ..... 66
3.1.3.1 Tamponlar ..... 66
3.1.3.2 Besiyerleri ..... 68
3.1.4 Deneylerde Kullanılan Deney Hayvanları ..... 69
3.1.5 Deneylerde Kullanılan Hücreler ..... 69

3.1.5.1 LPG Antijenin Eldesinde Kullanılan *Leishmania* Parazitleri ..... 69
3.1.5.2 Myeloma Hücre Hattı ..... 69
3.1.5.3 Antikor Üreten B-Lenfosit Hücreleri ..... 70
3.1.5.4 Besleyici Hücre Olarak Fare Periton Makrofajları ..... 70
3.1.5.5 J774 makrofaj hücre hattı ..... 70
3.2 Metod ..... 70
3.2.1 *L.tropica* Parazitlerinin Kriyobanktan Çıkarılması ..... 70
3.2.2 *L.tropica* Parazitlerinin Kültürünün Yapılması ..... 70
3.2.3 *L.tropica*'dan Lipofosfoglikan (LPG) Molekülünün Elde Edilmesi ..... 71
3.2.4 Balb/c Farelerin LPG Molekülü ile İmmünizasyonu ..... 72
3.2.5 Fare Serumlarının Antikor Yanıtlarını ELISA İle Tayin Edilmesi ..... 73
3.2.6 Füzyon Deneyleri ..... 74
3.2.6.1 P3-X63-Ag8.653 Hücrelerinin Kriyobanktan Çıkarılması ..... 74
3.2.6.2 P3-X63-Ag8.653 Myeloma Hücrelerinin Kültürünün Yapılması ..... 74
3.2.6.3 Myeloma Hücrelerinin 8-Azoguanin ile Muamele Edilmesi ..... 76
3.2.6.4 Füzyonda Yardımcı Hücre Hatlarının Hazırlanması için J774 Makrofaj Hücre Kültürünün Yapılması ..... 77
3.2.6.5 Besleyici Hücre Olarak Kullanılmak Üzere Fare Periton Makrofajlarının Elde Edilmesi ve Kültürünün Yapılması ..... 78
3.2.6.6 Füzyon Basamakları ..... 79
3.2.6.7 Hibridoma Kültürü ..... 82
3.2.6.8 Spesifik Antikor Üreten Kuyuların ELISA ile Belirlenmesi ..... 84
3.2.6.9 Sınırlayıcı Sulandırma Yöntemi ile Hibridoma Hücre Hatlarına Alt Klonlama İşleminin Uygulanması ..... 84
3.2.6.10 Monoklonal Antikor Üreten Hibridoma Hücrelerinin Büyük Ölçekte Üretilmesi ..... 85
3.2.6.11 Hibrid Hücrelerin Kriyoprezervasyonu ..... 86
3.2.6.12 Hibridoma Hücre Hatlarının Kriyobanktan Çıkarılması ..... 87
3.2.6.13 LPG'ye karşı üretilen Monoklonal Antikorların Alt izotipinin Belirlenmesi ve Saflaştırılması ..... 88
3.2.6.14 Üretilen Monoklonal Antikorların LPG'ye Karşı Spesifikliğinin SDS-PAGE ve Dot Blot İle Belirlenmesi ..... 90

BÖLÜM 4

DENEYSEL SONUÇLAR ..... 93

4.1 İmmünize Edilen Farelerin Antikor Yanıtları ..... 93
4.2 Füzyon Sonuçları ..... 94
4.3 Alt Klon Hibridoma Kültürün Sonuçları ..... 95
4.4 Büyük Ölçek Hibridoma Kültürünün Sonuçları ..... 97
4.5 Monoklonal Antikorun Alt İzotipinin Belirlenmesi ..... 98
4.6 Jel Filtrasyon Kromatografi (GPC) Sonucu ..... 98
4.7 HPLC Sonuçları ..... 100
4.8 HPLC Sonucu Elde Edilen Fraksiyonların Değerlendirilmesi ..... 102
4.8.1 IgM Fraksiyonun Alt İzotip Belirleyici Strip Sonucu ..... 102
4.8.2 Elde Edilen Fraksiyonların Monoklonal Antikor Miktarının Belirlenmesi ..... 103

4.8.3 Saf Monoklonal Antikorların Çapraz Reaksiyon Sonuçları ..... 103
4.8.4 SDS-PAGE Sonuçları ..... 105
4.8.5 Dot Blot Sonuçları ..... 106
4.9 Kriyobanktan Çıkarılan Hibrid Hücrelerinin Antikor Yanıtları ..... 107

BÖLÜM 5

SONUÇ ve ÖNERİLER ..... 108

KAYNAKLAR ..... 113

EK-A

ETİK KURULU RAPORU ..... 136

ÖZGEÇMİŞ ..... 139

## SİMGE LİSTESİ

| | |
|---|---|
| $A_{260}$ | 260 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri |
| $A_{280}$ | 280 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri |
| Balb/c | Laboratuvarda yetiştirilen albino deney faresi |
| cm | Santimetre |
| $cm^2$ | Santimetre kare |
| Da | Dalton |
| kDa | Kilo Dalton |
| J774 | Fare Makrofaj Benzeri Hücre Hattı |
| M | Molar |
| Mw | Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı |
| Mn | Sayıca ortalama molekül ağırlığı |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| nm | Nanometre |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| γ | Gama |
| δ | Delta |
| ε | Epsilon |
| κ | Kappa |
| µ | Mikro |
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| µm | Mikrometre |
| °C | Santigrat |

## KISALTMA LİSTESİ

| | |
|---|---|
| BSA | Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albümine) |
| C bölgesi | Antikor yapısında değişmez "Constant" bölge |
| $CD4^+$ | CD4 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit |
| $CD8^+$ | CD8 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit |
| CFA | Complete Freund's Adjuvan |
| $CH_1$ | Antikor yapısında Ağır zincirdeki değişmez bölgenin 1. kıvrımı |
| $C_L$ | Antikor yapısında hafif zincirdeki değişmez bölge |
| $CO_2$ | Karbondioksit |
| COOH | Karboksilik asit |
| DAT | Direk Aglütinasyon Testi |
| Dk | Dakika |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| EDTA | Etilen Diamin Tetra Asetik asit |
| ELISA | Enzim Bağlı İmmunosorbent Test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) |
| Fab | Fragment antigen binding (antijen bağlayan bölge) |
| Fc | Fragment crystallizable (kristalize olabilen bölge) |
| FACS | Floresan Aktive Hücre Ayırımı (Fluorescence-activated cell sorting) |
| FBS | Sığır Fetal Serum (Fetal Bovine Serum) |
| Gp63 | Leishmania yüzey membran metaloproteazı |
| H zinciri | Antikor yapısında ağır "heavy" zincir |
| $H_2O$ | Su |
| HAT | Hipoksantin, Aminopterin, Timidin |
| HCl | Hidroksi klorik asit |
| HEPES | 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit |
| HGPRT | Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz |
| HGPRT- | Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz mutant |
| HGPRT+ | Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz normal |
| HT | Hipoksantin Timidin |
| ICT | İmmünokromatografik test (Immunocromatografic Test) |
| IFAT | İmmunofloresan antikor testi (Immunofluorescent Antibody Test) |
| IFN-γ | İnterferon gama |

| | |
|---|---|
| IgA | İmmünoglobulin A |
| IgD | İmmünoglobulin D |
| IgE | İmmünoglobulin E |
| IgG | İmmünoglobulin G |
| IgM | İmmünoglobulin M |
| IL-10 | İnterlökin 10 |
| IL-12 | İnterlökin 12 |
| IL-13 | İnterlökin 13 |
| IL-4 | İnterlökin 4 |
| IL-5 | İnterlökin 5 |
| $K_2HPO_4$ | Potasyum fosfat (di) |
| KATEX | Yeni Latex Aglütinasyon Testi (New Latex Agglutination Test) |
| KCl | Potasyum klorür |
| kDNA | Kinetoplasta ait deoksiribonükleik asit |
| $KH_2PO_4$ | Potasyum fosfat (mono) |
| KL | Kütanöz Leishmaniasis |
| KOH | Potasyum hidroksit |
| L zinciri | Antikor yapısında hafif “light” zincir |
| LAT | Lateks Aglütinasyon Testi (Latex Agglutination Test) |
| LPG | Lipofosfoglikan |
| MACS | Manyetik Aktive Hücre Ayırımı (Magnetic Activated Cell Sorting) |
| $MgCl_2$ | Magnezyum klorür |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| MKL | Mukokütönöz leishmaniasis |
| MKY | Mikro kültür yöntemi |
| mRNA | Mesajcı Ribonükleik Asit |
| MW | Moleküler Ağırlık (Molecular Weight) |
| $Na_2HPO_4$ | Disodyum fosfat |
| NaCl | Sodyum klorür |
| $NaH_2PO_4$ | Monosodyum fosfat |
| $NaHCO_3$ | Sodyum bikarbonat |
| $NaN_3$ | Sodyum azid |
| NFB | Nükleer faktör B |
| $NH_2$ | Amin |
| $(NH4)_2SO_4$ | Amonyum sülfat |
| NK | Doğal öldürücü hücreler (Natural Killer cells) |
| NO | Azot monoksit (Nitrik Oksit) |
| OD | Optik Yoğunluk (Optical Density) |
| PBS | Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate buffered saline) |
| PEG | Polietilen Glikol |
| pH | Potansiyel hidrojen |
| POX | Polioksidinyum Adjuvantı |
| PZR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction) |
| RIA | Radyo İmmün Testi (Radio Immune Assay) |
| Rk39 | Leishmania LcKin proteini 39 aminoasit tekrar bölgesi) |
| RNA | Ribonükleik asit |

| | |
|---|---|
| RPM | Bir dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute) |
| RPMI-1640 | Roswell Park Memorial Institute-1640 |
| SDS | Sodium Dödesil Sülfat |
| SDS-PAGE | Sodium dödesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi |
| TEMED | Tetrametil etilen diamin |
| TGF-β | Transforming growth factor β (transforme büyüme faktörü beta) |
| Th1 | T helper 1 (Yardımcı T hücre yanıtı alt sınıf 1) |
| Th2 | T helper 2 (Yardımcı T hücre yanıtı alt sınıf 2) |
| TK | Timidin Kinaz |
| TMP | Timidin monofosfat |
| TNF-α | Tümör nekroz faktör alfa |
| UMP | Üridin monofosfat |
| UV | Ultraviyole |
| V bölgesi | Antikor yapısında değişken “Variable” bölge |
| VL | Visseral Leishmaniasis |
| WB | Western Blotting |
| $ZnCl_2$ | Çinko klorür |

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1 Dünya çapında Visseral Leishmaniasis'in dağılımı (2009) ..... 8
Şekil 2. 2 Dünya çapında Kütanöz Leishmaniasis'in Dağılımı (2009) ..... 9
Şekil 2. 3 2007-2009 yılları arasında Türkiye'de Kütanöz Leishmaniasis vakalarının yaygınlığı ..... 10
Şekil 2. 4 Leishmania parazitinin sahip olduğu promastigot ve amastigot formu..... 11
Şekil 2. 5 *Leishmania* parazitinin hayat döngüsü ..... 15
Şekil 2. 6 *Leishmania* parazitlerinin yüzeyinde bulunan LPG molekülünün yapısı ..... 17
Şekil 2. 7 İmmünoglobülinlerin (Ig) Sınıflandırılması ..... 30
Şekil 2. 8 Antikorun yapısında bulunan ağır ve hafif zincirlerin bağlandığı menteşe bölgesi ..... 32
Şekil 2. 9 Füzyondan sonra meydana gelen hücre seçilimi..... 36
Şekil 2. 10 Hibridoma teknolojisi kullanılarak üretilen monoklonal antikorların üretimini gösteren akış diyagramı ..... 38
Şekil 2. 11 Monoklonal antikorların anatomisi ..... 48
Şekil 2. 12 IgG1 monoklonal antikorun elektron mikroskobundaki görüntüsü..... 48
Şekil 2. 13 Monoklonal Antikorların Sınırlandırılması..... 49
Şekil 2. 14 Monoklonal antikorlar için saflaştırma basamakları ..... 50
Şekil 2. 15 HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ..... 52
Şekil 3. 1 L.tropica kültür görüntüsü (10x)..... 71
Şekil 3. 2 İmmünize edilen Balb/c ırkı fareler..... 72
Şekil 3. 3 Log fazındaki P3-X63-Ag8.653 myeloma hücreleri (20X)..... 75
Şekil 3. 4 Thoma lamı üzerindeki kareler..... 75
Şekil 3. 5 Azoguanin uygulaması sonrası myeloma hücrelerinin morfolojik görüntüsü 77
Şekil 3. 6 J774 hattının kültürü (20X)..... 78
Şekil 3. 7 Farenin periton bölgesine RPMI 1640 besyerinin verildikten sonra besiyerin enjektörle geri çekilme anı..... 79
Şekil 3. 8 Periton makrofajın feeder olarak plakalara ekildikten sonraki durumu(20x)..79
Şekil 3. 9 İmmünize Farelerden dalağın çıkarılması..... 80
Şekil 3. 10 İmmünize farelerden elde edilen dalak..... 80
Şekil 3. 11 Füzyon sonrası hücrelerin görüntüsü (20X)..... 82
Şekil 3. 12 HT besiyerine geçildikten 1 hafta sonraki kültür durumu (20X)..... 83
Şekil 3. 13 Hibrid hücrelerin HT besiyerindeki 27.gündeki durumu (20X)..... 83

Şekil 3. 14 *L.tropica'dan* izole edilen LPG molekülüne karşı geliştirilen hibridoma hücrelerinin alt klon görüntüsü…… 85
Şekil 3. 15 75cm$^{2}$'lik flasklarda kültürlenen hibridoma kültürü (10x)……86
Şekil 3. 16 Kademeli olarak yapılan büyük ölçek hibridoma kültürünün akış şeması……86
Şekil 3. 17 Kriyoprezervasyon sonrası açılan monoklonal antikor üreten hibridoma kültürünün flasktaki görüntüsü (10X)…… 87
Şekil 3. 18 Elde edilen antikorla kaplı altın nanopartikül çözeltisi……..91
Şekil 4. 1 12. İmmünizasyon sonrası farklı antijen - adjuvant kombinasyonları ile immünize edilen farelerden elde edilen serum örneklerinin LPG'ye karşı gösterdikleri antikor yanıtları …… 93
Şekil 4. 2 7 günlük hibridoma kültüründen elde edilen supernatatların LPG'ye karşı gösterdikleri antikor yanıtlar……..94
Şekil 4. 3 96 gözlü farklı plakalarda kültüre edilen hibridoma supernatantlarının LPG'ye karşı gösterdikleri antikor yanıtları……..95
Şekil 4. 4 8/E7 klonunun belirli zamanlarda süpernatantı alınmış hibridoma kolonisi gözlemlenen kuyulardaki hücrelerin LPG'ye karşı ürettikleri monoklonal antikor yanıtları…… 96
Şekil 4. 5 6'lı plakadan ve 75 cm2'lik flasktan alınan hibridoma supernatantların LPG'ye karşı gösterdikleri monoklonal antikor yanıtları…… 97
Şekil 4. 6 Alt izotip belirleyici kit sonucu…… 98
Şekil 4. 7 Yarı-saf supernatantın GPC grafiği…… 99
Şekil 4. 8 Süzülmüş yarı-saf örneğin HPLC sonucu…… 100
Şekil 4. 9 IgG3 fraksiyonunun HPLC sonucu……...101
Şekil 4. 10 IgM fraksiyonunun HPLC sonucu……..101
Şekil 4. 11 Fraksiyonların toplanmasındaki başlangıç ve bitiş noktaları……102
Şekil 4. 12 IgM fraksiyonun alt izotip belirleyici strip analiz sonucu……..103
Şekil 4. 13 HPLC'den elde edilen monoklonal antikor fraksiyonlarının farklı antijenik yapılara karşı gösterdiği antikor yanıtları……104
Şekil 4. 14 SDS-PAGE sonucu……105
Şekil 4. 15 Dot Blot sonucu……106
Şekil 4. 16 Kriyoprezervasyon işlemi öncesi ve sonrasında hibridoma hücrelerinin LPG'ye karşı ürettikleri antikor yanıtları……107

## ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 Leishmania türlerinin insanda meydana getirdiği hastalıkların, coğrafi yere, konakçı hayvanlara ve vektörlere göre sınıflandırılması ..... 11
Çizelge 2. 2 *Leishmania* türlerinin klinik belirtileri ve coğrafi dağılımı ..... 14
Çizelge 2. 3 İmmünoglobülin (Ig) sınıflarının önemli fonksiyonları..... 31
Çizelge 2. 4 Poliklonal ve monoklonal antikorların karşılaştırılması..... 33
Çizelge 2. 5 Biyoreaktör sistemlerinin monnoklonal antikor üretim kapasitesi..... 42
Çizelge 2. 6 Belirli türdeki istenmeyen moleküllerin uzaklaştırılması için kullanılan kromatografik yöntemler..... 52
Çizelge 2. 7 Monoklonal antikorların karakterizasyonunda kullanılan yöntemler……. 54
Çizelge 3.1 SDS-PAGE için hazırlanan %10'luk jellerin içeriği……88

# ÖZET

## KÜTANÖZ LEİSHMANİASİS ETMENİ *L.TROPİCA*'DAN ELDE EDİLEN LPG MOLEKÜLÜNE KARŞI HİBRİDOMA TEKNOLOJİSİNE DAYALI MONOKLONAL ANTİKORLARIN BÜYÜK ÖLÇEK ÜRETİLMESİ VE SAFLAŞTIRILMASI

Hilal ŞENTÜRK

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Leishmaniasis, Phlebotomus'un (enfekte kum sineklerinin) kan emme esnasında memeli konaklara bulaştırdıkları hücre içi Leishmania protozoonlarının oluşturduğu bir hastalıktır. Leishmaniasis'in; visseral, kütanöz ve mükokütanöz olmak üzere 3 klinik formu bulunmaktadır. Visseral leishmaniasis (VL), kronik bir hastalık olup, iç organ tahribatı ile ağır enfeksiyonlara hatta ölüme neden olabilmektedir. Kütanöz leishmaniasis (KL); L. tropica ve L. major'un neden olduğu ve genelde tropikal ve subtropik bölgelerde görülen, bir deri hastalığıdır. Kütanöz leishmaniasis, ülkemiz de dahil olmak üzere dünyanın yaklaşık 83 ülkesinde endemik olarak görülmektedir. Dünya genelinde olduğu gibi Türkiye'de de kütanöz leishmaniasis vakalarına daha sık rastlanmaktadır. 1988 ve 2010 yılları arasında Türkiye'de 50 bine yakın Kütanöz leishmaniasis vakasının Güneydoğu Anadolu Bölgesi civarında olduğu bildirilmiştir. Hastalığın tanısında; mikroskobik, kültür ve moleküler yöntemler kullanılır. Ancak, klasik kültür yöntemi ile mikroskobik yöntemin duyarlılığı örnekteki parazit sayısına bağlı olarak değişir. Özellikle Kütanöz leishmaniasis'in kronik ve iyileşmeyen formlarında duyarlılığı yaklaşık olarak %40 civarındadır. Klasik kültür yönteminden farklı olan mikro kültürü yöntemi (MKY); parazit sayısına bağlı olmaksızın en kısa sürede (1-3 gün) tayin etmesinin yanında, yüksek duyarlılık göstermesi ve ekonomik

olmasına rağmen görüntülenebilmesi için inverted mikroskoba ihtiyaç duyulur. Leishmaniasis'in tanısında kullanılan serolojik yöntemlerin özellikle visseral leishmaniasis'e karşı yüksek duyarlılık (%80-90) gösterdiği bilinmektedir. Fakat kütanöz leishmaniasis'de oluşan hümoral yanıtın visseral leishmaniasis'e göre düşük olmasından dolayı antikor temelli serolojik yöntemler yetersiz kalmaktadır. Buna göre de, kütanöz leishmaniasis'in tanısında antijen temelli serolojik testlerin değeri daha çok önem kazanmaktadır. Ancak antijen temelli serolojik yöntemler, antijene karşı üretilmiş yoğun bir antikorun bulunduğu koşullarda gerçekleşebilir. Bu sebeple, kütanöz leishmaniasis tanısında veya tanı kitlerinin geliştirilmesi, ancak hibridoma teknolojisine dayalı üretilen poliklonal ve monoklonal antikorlar ile mümkün olabilir. Leishmaniasis'de hibridoma teknolojisine dayalı monoklonal antikorların geliştirilmesi ile ilgili literatürde az sayıda çalışma bulunmakta olup bunların çoğu visseral leishmaniasis üzerine yoğunlaşmaktadır. Kütanöz leishmaniasis ile yapılan tek çalışmada; L.tropica lizatına karşı poliklonal antikorlar üretilmiştir. Son yıllarda konu ile ilgili laboratuvarımızda hem VL hemde KL etmeni parazitlere karşı hibridoma teknolojisine dayalı poliklonal ve monoklonal antikorların üretimine yönelik çalışmalar tamamlanmış ve hala yürütülmektedir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda, visseral leishmaniasis etmeni L. infantum' un 15kDa antijenine karşı spesifik olan monoklonal antikor ve kütanöz leishmaniasis etmeni L.tropica'ya karşı poliklonal antikorlar üretilmiştir. Ancak, şimdiye kadar kütanöz leishmaniasisin tanısında, L.tropica'nın yüksek immünojen özelliğine sahip yüzey antijenine karşı hibridoma teknolojisine dayalı monoklonal antikor üretilmesine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Laboratuvarımızda TÜBİTAK kapsamında gerçekleştirilen "Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesinde polimerlere dayalı yeni bir yaklaşım: LPG-polimer konjugatları" projede; lipofosfoglikan (LPG) molekülü izole edilmiş ve bu molekülün Leishmaniasis'e karşı %83 oranında koruyuculuk gösterdiği saptanmıştır. LPG molekülünün böyle yüksek düzeyde antikor üretebilmesine rağmen, Leishmania'nın herhangi bir türünden izole edilmiş LPG molekülüne karşı hibridoma teknolojisine dayalı monoklonal antikor üretilmesine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan, kütanöz leishmaniasis'de kullanılmak üzere geliştirilecek tanı kitinde, LPG molekülüne karşı üretilen monoklonal antikorların önemli rol oynayacağı düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında tezin amacı, Dünya'da ve ülkemizde L.tropica'nın en immünojen molekülü olan lipofosfoglikana (LPG) karşı hibridoma teknolojisine dayalı monoklonal antikorların üretilmesi, saflaştırılması ve kütanöz leishmaniasis tanısında kullanılmak üzere spesifikliğinin belirlenmesi üzerine kurulmuştur.

Bu hedefe ulaşabilmek için; dişi BALB/c farelerine (6-8 haftalık), L.tropica'dan izole edilmiş immonejen lipofosfoglikan (LPG) molekülü ile birlikte Freund ve daha önceki çalışmalarımızda etkinliği belirlenmiş FDA onaylı Freund adjuvantına göre daha az toksik olan POX adjuvantının farklı kombinasyonları ile immünize edildi. Füzyon öncesi hibridoma kültürünün gelişimini desteklemek için fare periton makrofajları besleyici hücre hattı olarak kullanıldı. İmmünizasyon sonucu LPG'ye karşı kontrol grubu farelere göre yaklaşık 8,5 kat daha yüksek antikor yanıtının görüldüğü fare B- lenfosit kaynağı olarak füzyon çalışması için kullanıldı. Füzyon aşamasında yüksek immün yanıt gösteren fareden elde edilen dalak hücreleri ile fare myeloma hücreleri (P3-X63-Ag8.653) polietilen glikol (PEG-4000) varlığında füzyona uğratıldı. Füzyon çalışmasının yürütüldüğü 660 kuyunun 128 kuyusunda hibridoma hücresi görüldü. Fakat yapılan

indrekt ELISA sonuçlarına göre sadece 16 kuyunun LPG'ye karşı antikor ürettiği tespit edildi. Antikor üretiminin en yüksek olduğu 8/E7 kuyusu alt klonlanarak monoklonal antikor üretiminin tek klon hibrid hücre tarafından üretilmesi sağlandı. 8/E7 klonundan çoğalan hibridoma hücreleri kademeli olarak büyük ölçek kültürü yapılarak elde edilen monoklonal antikorların HPLC ile saflaştırılma işlemi gerçekleştirildi. Saf olarak elde edilen monoklonal antikorların LPG molekülene olan spesifikliği Dot Blot analizi ile doğrulandı. Ayrıca yapılan çapraz reaksiyonla saf monoklonal antikorların herhangi bir çapraz reaksiyon göstermediği, sadece LPG molekülüne karşı cevap oluşturduğu ortaya çıkarıldı.

Sonuç olarak; Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından desteklenen 0254.STZ.2013-2 numaralı proje kapsamında, Dünya'da ve ülkemizde ilk kez olarak Kütanöz Leishmaniasis etmeni L.tropica'nın immünojenik yüzey molekülü olan lipofosfoglikana (LPG) karşı hibridoma teknolojisine dayalı monoklonal antikorlar elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, L.tropica'dan izole edilen LPG molekülüne karşı hibridoma teknolojisine dayalı olarak geliştirilen monoklonal antikorların, bu moleküle karşı yüksek düzeyde spesifiklik gösterdiğini ve bu nedenle elde edilen monoklonal antikorların gelecekte kütanöz leishmaniasis tanısında kullanılmasının uygun olabileceğini ortaya çıkarmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Leishmaniasis, LPG molekülü, Hibridoma teknolojisi, Monoklonal antikor, Saflaştırma, Tanı yöntemleri

## ABSTRACT

# LARGE SCALE PRODUCTION AND PURIFICATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES BASED ON HYBRIDOMA TECHNOLOGY AGAINST LPG MOLECULAR FROM L.TROPICA, CAUSATIVE AGENT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Hilal ŞENTÜRK

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Leishmaniasis is a disease which is caused by infected sand nets Phlebotomus while sucking the host mammalian blood ean intercellular Leishmania protozoons. Leishmaniasis has 3 clinical formes including visceral, cutaneous and mucocutaneous. Visseral leishmaniasis (VL) is a chronical disease which result with severe infections even if death by infection of internal organs. Cutaneous leishmaniasis (CL) is caused by L. trpica and L. major and it is a skin disease which is usually seen in tropical and subtropic regions. Cutaneous leishmaniasis is seen as endemic in 83 countries including our country. Between 1988 and 2010, 50.000 cases of cutaneous leishmaniasis in Turkey were reported to be located in the Southeastern Anatolia Region. In the diagnosis of the disease; Microscopic, culture and molecular methods are used. However, the sensitivity of the classical culture method and the microscopic method varies depending on the number of parasites in the sample.The sensitivity of chronic and non-curable forms of cutaneous leishmaniasis is approximately 40%. Micro culture method (MKY), which is different from classical culture method; detects the disease in the shortest time (1-3 days) regardless of the number of parasites, eventhough it is economic and high sensitive an inverted microscope is required. It is

known that the serological methods used in the diagnosis of Leishmaniasis show high sensitivity (80-90%) especially to visceral leishmaniasis. However, antibody-based serologic methods are inadequate because humoral response in cutaneous leishmaniasis is lower than visceral leishmaniasis. Accordingly, the value of antigen-based serological tests becomes more important in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. However, serologic methods based on antigens can be performed under conditions in which an intense antibody against the antigen is present. For this reason, the development of cutaneous leishmaniasis diognosis or diagnostic kits can only be possible with polyclonal and monoclonal antibodies produced based on hybridoma technology. There are few studies in the literature on the development of monoclonal antibodies based on hybridoma technology in Leishmaniasis, most of which focus on visceral leishmaniasis.In one study with cutaneous leishmaniasis, polyclonal antibody against L. tropica lysate is produced. In recent years, studies on the production of polyclonal and monoclonal antibodies based on hybridoma technology against both VL and CL mutant parasites have been completed and are still being carried out in our laboratory. As a result of these studies, monoclonal antibodies against to the 15 kDa antigen of L. infantum as visceral leishmaniasis factor and polyclonal antibodies against to L.tropica as cutaneous leishmaniasis factor were produced. However, as far as cutaneous leishmaniasis is concerned, there is no study based on hybridoma technology against surface antigen with high immunogenicity of disease-causing parasite. In our laboratory, a new approach based on polymers in the vaccine development against Leishmaniasis: LPG-polymer conjugates has been realized within the scope of TUBITAK. As a result of this project, a lipophosphoglycan (LPG) molecule has been isolated and it has been determined that this molecule is 83% protective against Leishmaniasis. Although there is such a high level of antibody production by LPG molecules, there is no study to produce monoclonal antibodies based on hybridoma technology against LPG molecules isolated from any species of Leishmania. Therefore, monoclonal antibodies against the LPG molecule are thought to play an important role in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. The aim of this thesis is to produce monoclonal antibodies based on hybridoma technology against lipophosphoglucan (LPG), the most immunogenic molecule of L. tropica in the world and in our country, to determine its specificity for use in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis.

For the purpose of this thesis study, POX and Freund adjuvants with LPG molecule isolated from L.tropica were injected with 3-5 week old female BALB / c mice, for immunization. To support the development of pre-fusion hybridoma cultures, mouse peritoneal macrophages were used as feeder cell lines. Mice in which a high-antibody response to immunization was observed were used for fusion studies as a B-lymphocyte source. In the fusion phase, the spleen cells which are the source of B lymphocyte spleen cells and mouse myeloma cells (P3-X63-Ag8.653) were fused in the presence of polyethylene glycol (PEG-4000). Hybridoma cells were seen in 128 wells of 660 wells where fusion work was carried out. However, according to the indirect ELISA results, it was determined that only 16 wells produced antibodies against LPG. The 8 / E7 well, the highest antibody production, was subcloned. Thus, monoclonal antibody production was provided by monoclonal hybrid cells. The hybridoma cells grown from the 8 / E7 clone were gradually cultured on a large scale. The purification of the

obtained monoclonal antibodies by HPLC was carried out. The specificity of pure monoclonal antibodies against LPG molecule was confirmed by Dot Blot analysis. In addition, no cross-reaction of the pure monoclonal antibodies with the cross-reaction made. It proved that it only responds to the LPG molecule. As a result, in this thesis study, for the first time in the world, a high amount of monoclonal antibody was obtained by forming hybridoma cell line producing monoclonal antibody against LPG molecule.

As a result; Monoclonal antibodies based on hybridoma technology against lipophosphoglucan (LPG), the most immunogenic surface molecule of L.tropica, have been obtained for the first time in the world and in our country, as a result of the project 0254.STZ.2013-2 supported by the Ministry of Science, Industry and Technology. These results show that monoclonal antibodies developed based on hybridoma technology against LPG molecule isolated from L. tropica have high specificity against this molecule and that the obtained monoclonal antibodies may be suitable for use in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the future.

**Keywords:** Leishmaniasis, LPG molecule, Hybridoma technology, Monoclonal antibody, Purification, Diagnostic method.

# BÖLÜM 1

# GİRİŞ

## 1.1 Literatür Özeti

Leishmaniasis, *Trypanosoma* cinsi zorunlu hücre içi parazitleriyle (*Leishmania*) enfekte olmuş Phlebotomus'un (dişi kum sineklerinin) memeli konaktan kan emerken parazitleri bulaştırmasıyla oluşan zoonotik bir hastalıktır [1]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün sıraladığı altı büyük tropikal hastalık listesinde, sıtmadan sonra ikinci sırada yer alan Leishmaniasis [2] ayrıca, latent enfeksiyonlara da neden olan en önemli protozoon hastalıklardan birisidir [3]. Leishmaniasis, dünyadaki ciddi halk sağlığı problemlerinden biri olup dünya çapında, [4] Türkiye de dahil olmak üzere, güneybatı Asya, batı Afrika, Hindistan, Çin ve Akdeniz havzası gibi daha sıcak iklim bölgelerinde yer alan yaklaşık 99 ülkede endemiktir [5]. Her yıl 12 milyon kişi *Leishmania* parazitleriyle enfekte olurken, Leishmaniasis'in endemik olduğu yerlerde yaşayan 350 milyon birey risk altındadır [4].

*Leishmania* parazitlerinin hayat döngüsü, , Phlebotomus'un memeli konağı sokup deri altına promastigot parazitlerini inoküle etmesiyle başlar. Konakçıya aktarılan promastigot formdaki parazitlerin makrofajlar tarafından fagosite edilmesine rağmen makrofajların içinde hayatta kalması ile süreç ilerlerler [6]. Makrofajlar içerisinde amastigot formuna dönüşüp çoğalan parazitler, makrofajların lizisine neden olarak diğer hücreleride de enfekte eder [7]. Döngü, Phlebotomus'un enfekte kişiyi tekrar ısırıp, konakçının kanında bulunan enfekte fagositlerin vektöre geçmesiyle devam eder. Phlebotomus'un orta bağırsağında, amastigotlar daha sonra promastigotlara dönüşür. Prosiklik olarak adlandırılan bu olgunlaşmamış promastigotlar yüzeye bağlandıktan

sonra, metasiklik promastigotlara olgunlaşırlar. Bu metasiklogenezden geçerek, promastigotlar virülans yeteneklerini kazanarak daha hareketli olurlar. Bu aşamadan sonra, metasiklik promastigotları epitelden ayrılır ve farinks ve bukkal boşluğa göç ederek yaşam döngüsü tamamlanır [8].

Leishmaniasis'in, visseral (VL), kütanöz (KL) ve mukokütanöz (MKL) olmak üzere 3 formu bulunmaktadır. Her yıl yaklaşık 1.5 milyon yeni kutanöz leishmaniasis vakası ve 500.000 visseral leishmaniasis vakası olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca, küresel ısınmadan dolayı hastalığın vektör sayısındaki artıştan ötürü leishmaniasis vakalarının arttığı rapor edilmiştir [4]. Visseral leishmaniasis (VL), tedavi edilmediği takdirde ölümcüldür ve her yıl dünya çapında yaklaşık 500.000 insan vakasında, 50.000'den fazla insanın ölümüne neden olmaktadır. Bu vakaların % 90'ına yakın kısmı Hint alt kıtasında, Doğu Afrika'da ve Brezilya'da görülür [9]. Kütanöz Leishmaniasis (KL), yüz ve el gibi açık bölgelerde yıllarca iyileşmeden kalabilen ve ciddi estetik kaygılara yol açan yara izlerinin oluşmasına neden olan tedavisi oldukça zor endemik bir hastalıktır. Küçük kütanöz nodüllerden brüt mukozal doku hasarına kadar değişen bir klinik spektrum gösterir. Lezyonların çoğu, boyun, kol, önkol ve ellerde olmak üzere vücudun açıkta kalan kısımlarında meydana gelir. Hastalık uzun yıllar boyunca kronik olarak devam edebilmektedir. Hastalık sırasında oluşan yara izlerinin kalıcı olması nedeniyle hastalarda psikolojik ve travmatik rahatsızlıklar da görülmektedir [10].

Kütanöz Leishmaniasis (KL), 77 ülkede endemik olduğu ve her yıl hastalığa yakalanan 1.5 milyon insanın % 90'ı Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, İran, Pakistan, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye'de yaşadığı bildirilmektedir [11]. Dünya genelinde olduğu gibi Türkiye'de de KL vakalarına daha sık rastlanmaktadır [12]. 1988 ve 2010 yılları arasında Türkiye'de 50 bine yakın KL vakasının yarısından fazlası Şanlıurfa başta olmak üzere Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde olduğu bildirilmiştir [13], [14]. Türkiye'de kütanöz leishmaniasis'e Güneydoğu Anadolu'da *Leishmania* tropica, Akdeniz Bölgesi'nin doğusunda ise *L. infantum* neden olmaktadır [15], [16]. Kütanöz leishmaniasis, pek çok deri lezyonu ile (deri tüberkülozu, bakteriyel deri enfeksiyonları, , malign deri tümörleri, deri kurtlanması, , mantar enfeksiyonları, keratoakantoma vb.) karıştırılabilir. Bu yüzden hastalığın tanısında, uygun tedavinin seçilebilmesi için birçok değişik teknikler kullanılmaktadır [17], [18].

Leishmania tanısında kullanılan yöntemler; mikroskobik, kültür, moleküler ve serolojik yöntemlerdir [19]. Klasik kültür yönteminin temeli, in vitro koşullar altında amastigotların hareketli promastigotlara dönüşerek çoğaltılmasına dayanmaktadır. Ancak, klasik kültür yönteminin duyarlılığı örneklerdeki amastigot sayısına bağlı olduğundan, parazit sayısı az olduğu durumlarda çok uzun bir inkübasyon süresi (1-6 ay) gerektirir [20]. Son yıllarda Allahverdiyev ve ark. tarafından geliştirilen Mikro kültür yöntemi (MKY), klasik yöntemden farklı olarak en kısa sürede (1-3 gün) ortamdaki parazit sayısına bağlı olmadan yüksek duyarlılık göstermektedir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda geliştirilen bu yeni yöntemin klasik kültür yöntemine nazaran daha duyarlı, en kısa sürede tanı koyabildiği ve daha ekenomik olduğu belirtilmiştir [21]. MKY, VL ve KL'nin tanısı için kullanılan kültür ortamının çeşidinden bağlı olmaksızın yüksek duyarlılığa sahiptir [22]. Ayrıca, klasik kültür yöntemle karşılaştırıldığında, bu yöntemin asemptomatik leishmaniasis'in tanısında dönor kan bankalarından alınan örneklerde diğer yöntemlere nazaran daha duyarlı olduğu gösterilmiştir [23]. Bu yöntem sadece leishmaniasisin tanısında değil, helikobakter tanısında da örnek bir model oluşturmuştur [24].

Spesifik serolojik tanı, spesifik bir hümoral yanıtın varlığına dayanır. Mevcut serolojik testler indirekt floresan antikor (IFA), enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA), Western Blot ve direkt aglütinasyon testi (DAT) olmak üzere dört format üzerine kurulmuştur. Fakat Kütanöz Leishmaniasis, genellikle yüksek düzeyde bir antikor tepkisine yol açmadığından tanıda kullanılan antikor temelli testlere karşı duyarlılığı düşüktür [24], [25], [26]. Buna göre de, KL tanısında antijen temelli serolojik testlerin değeri daha çok önem kazanmaktadır. Ancak antijen temelli serolojik yöntemler, antijene karşı üretilmiş yoğun bir antikorun bulunduğu koşullarda gerçekleşebilir. Bu sebeple, KL tanısında veya tanı kitlerinin geliştirilmesinde kullanılacak yüksek konsantrasyonlu antikorlar, hibridoma teknolojisine dayalı üretilen poliklonal ve monoklonal antikorlar ile mümkün olabilir. VL'de, KL'den farklı olarak parazit antijenlerine karşı yüksek düzeyde antikor oluşturduğundan antijen temelli serolojik testler önem taşımamaktadır. Buna göre, KL tanısında hibridoma teknolojisine dayalı poliklonal ve monoklonal antikorun üretilmesiyle tanı kitlerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Leishmaniasis'in tanısında kullanılan antijen temelli tanı yöntemlerinin

temelini, hastadaki antijenlerin parazite özgü antikorlar tarafından yakalanıp tespit edilmesine dayanır [27], [28], [29], [30], [31], [32], [33]. KL hastalarında, yüksek düzeyde antikor oluşmadığından hibridoma teknolojisine dayalı antikorların üretilmesi son derece önemlidir.

Monoklonal antikor üretimi, hibridoma teknolojisine dayanarak gerçekleştirilir. İlk kez 1975 yılında Köhler ve Milstein tarafından tanımlanan hibridoma teknolojisi, belirli bir antijen ile immünize edilen hayvandan elde eidlen antikor üreten B hücreleri ile kanser hücresi olan myeloma gibi ölümsüz bir hücre hattının birleşmesiyle oluşan hibrid hücrelerin, sonsuz monoklonal antikor üretme kapasitesine dayanır [34], [35].

Leishmaniasis için hibridoma teknolojisine dayalı literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır [36], [37], [38], [39]. Visseral leishmaniasis ile ilgili yapılan çalışmada VL'ye karşı elde edilen farklı tipteki monoklonal antikorların, VL etmeni bütün parazitlerin 57 kDa'luk ortak antijenik proteinini tanıdığı gösterilmiştir [36]. L.tropica'ya karşı hibridoma teknolojisine dayalı yapılan tek bir çalışmada ise, L.tropica lizatına karşı poliklonal antikor üretilmiştir [39].

Son yıllarda konu ile ilgili laboratuvarımızda da çalışmalar yürütülmektedir. Konu ile ilgili olarak hem VL hemde KL etmeni parazitlere karşı hibridoma teknolojisine dayalı poliklonal ve monoklonal antikorların üretimine yönelik çalışmalar tamamlanmış ve hala yürütülmektedir. "Visseral leishmaniasis etmeni leishmania infantum antijenine karşı hibridoma tekniği ile monoklonal antikor elde edilmesi" (Serkan Yaman, 2012) adlı yüksek lisans tezi başarı ile tamamlanmış olup çalışma sonucunda ilk kez olarak ülkemizde, L. infantum' un 15kDa antijenine karşı spesifik olan monoklonal antikor elde edilmiştir. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından desteklenen proje kapsamında "Leishmania tropica parazitlerinden elde edilen immünojen moleküllere karşı tanıda kullanılmak üzere hibridoma teknolojisine dayalı antikor üretilmesi" (Aslı Pınar Zorba, 2015) adlı yüksek lisans tezi çalışmasında ise, kütanöz leishmaniasis etmeni L.tropica'ya karşı üretilen poliklonal antikorların sadece L.tropica'ya özgü değil, L.infantum ve L.major'e ve karşı farklı duyarlılıkta etki gösterdiği saptanmıştır. Böylece, literatürde ve laboratuvarımızda elde edilen çalışma sonuçları, Leishmania parazitlerine karşı hibridoma teknolojisine dayalı üretilen poliklonal ve monoklonal antikorların tanı

sistemlerinde büyük bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak, şimdiye kadar kütanöz leishmaniasisin tanısında, hastalık etmeni parazitin immün baskılayıcı molekülüne karşı hibridoma teknolojisine dayalı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Laboratuvarımızda, (TÜBİTAK, Proje No:108S170) "Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesinde polimerlere dayalı yeni bir yaklaşım: LPG-polimer konjugatları" projesi tamamlanması sonucunda L.tropica parazitlerinden en immün baskın molekül olan lipofosfoglikan (LPG) molekülü izole edilmiş ve bu molekülün hastalığa karşı %83 oranında koruyuculuk gösterdiği ortaya çıkmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda LPG molekülü parazitin en immünojen molekülü olduğu ve bu moleküle karşı üretilecek antikorların yüksek tanı değerine sahip olacağı düşünülmüştür. Özellikle L.tropica parazitinin LPG molekülüne karşı geliştirilecek monoklonal antikor temelli tanı kiti ileride kütanöz leishmaniasis tanısını kolaylaştırmasını mümkün kılabilecektir. Literatürde ise, LPG'ye karşı monoklonal antikor üretimine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

### 1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı, L.tropica'nın en immünojen molekülü olan LPG ve onun sabit bölgesine karşı hibridoma teknolojisine dayalı monoklonal antikorların üretilmesi, saflaştırılması ve KL tanısında kullanılmak üzere spesifikliğinin belirlenmesidir.

### 1.3 Hipotez

Bu amaçla gerçekleştirilen tez çalımasında ise, ilk kez L.tropica'dan elde eidlen LPG molekülüne karşı monoklonal antikorların elde edilmesi , saflaştırılması ve tanı değerinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu hedefe ulaşabilmek için aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir;

→ KL etmeni *L.tropica* promastigotlarının kültürünün yapılması ve kriyoprezervasyonun gerçekleştirilmesi,

→ L.tropica'dan immünojen LPG yüzey molekülünün izole edilmesi,

→ Dişi Balb/c farelerin (6-8 haftalık) LPG molekülünün farklı adjuvantlar ile immünizasyonlarının gerçekleştirilmesi ve LPG'ye karşı yüksek antikor yanıtına sahip farelerin ELISA yöntemi ile belirlenmesi,

→ Antikor üreten B-lenfosit hücrelerine uygun füzyon hücre partneri olan P3-X63-Ag8.653 myeloma hücre hattının kriyobanktan çıkartılarak devamlı kültürünün yapılması,

→ Füzyon için yardımcı hücre hattı olarak kullanılacak olan J774 fare makrofaj benzeri hücre hattının kültürünün yapılması,

→ Füzyondan önce hibrid hücrelerinin kültür ortamındaki gelişimine katkı sağlamak amacıyla, kontrol grubu fareden periton makrofaj hücrelerinin alınması,

→ LPG'ye karşı yeterli antikor yanıtına sahip fareden elde edilen dalaktan, B-lenfosit hücre izolasyonunun yapılması ve myeloma hücreleri ile füzyonlarının gerçekleştirilmesi,

→ Füzyon sonrası oluşan hibrid hücrelerin seleksiyonu için seçici besiyerlerinde kültürlerinin yapılması ve spesifik antikor üreten kuyuların ELISA ile tespit edilmesi,

→ LPG'ye pozitif reaksiyon gösteren kuyuların destekleyici besiyeri içerisinde sınırlayıcı sulandırma yöntemiyle alt klonlaması yapılarak spesifik tek bir klona ait monoklonal antikor üreten hibrid hücrelerin elde edilmesi,

→ Alt klonlama sonucu kuyularda kolonize olan hibrid hücrelerinin LPG'ye karşı ürettikleri antikor düzeylerinin tespit edilmesi,

→ LPG'ye karşı pozitif reaksiyon gösteren alt klondan hibrid hücrelerin çoğaltılması ve monoklonal antikor üreten hibrid hücre hatlarının elde edilmesi,

→ Hibrid hücrelerin *in vitro*'da kademeli olarak büyük ölçek kültürü yapılmasıyla monoklonal antikorların elde edilmesi,

→ Hibrid hücrelerinin kriyoprezervasyonunun gerçekleştirilmesi,

→ Elde edilen monoklonal antikorların saflaştırılması ve LPG'ye olan spesifikliğinin belirlenmesi aşamaları gerçekleştirilmiştir.

# BÖLÜM 2

# GENEL BİLGİLER

## 2.1 Leishmaniasis

Leishmaniasis, *Leishmania* isimli zorunlu hücre içi protozoan mikroorganizmalarının neden olduğu vektör dişi kum sineğinin ısırmasıyla ortaya çıkan bir parazit enfeksiyonudur [7]. Hastalığın büyük çoğunluğu yoksul ülkelerde olmasına rağmen, dünyanın birçok yerinde endemiktir. 80 civarındaki ülkede 20 milyondan fazla *leishmania*sis hastası vardır ve yılda 400.000 yeni vaka insidansına sahiptir [40], [41]. Uluslararası seyahatler, göçler ve savaşlar hastalığın endemik olmayan bölgelere yayılmasını hızlandırmıştır [42]. Ayrıca, bağışıklık sistemi zayıf kişilerin sayısındaki artış, HIV enfeksiyonları ve son zamanlarda ortaya çıkan biyolojik tedavilerde kullanılan kemoterapötik maddeler, Avrupa içinde görülen *Leishmania*sis' de artışa neden olmuştur [43]. Üç çeşit Leishmaniasis türü olduğu bilinmektedir. Bunlar; Kütanöz *Leishmania*sis, Mukokütanöz Leishmaniasis ve Visseral Leishmaniasis'dir [41]. En yaygın görülen Kütanöz Leishmaniasiste, parazit deri dokusundaki (dermis) makrofajları enfekte ettiğinde cilt dokusunda yaralar ve nodüller oluştururken diğer yaygın görülen Visseral *Leishmania*sis'te parazit, kemik iliği, karaciğer ve dalak gibi iç organlarda bulunan makrofajların içinde gelişerek hastalığın daha şiddetli ve ölümcül olmasına neden olur. [7], [44]. Dünya Sağlık Örgütünün belirlediği paraziter hastalıklar arasında, *Leishmania*sis kaynaklı ölümler sıtmadan sonra ikinci sırada iken, üçüncü sırada Şistozomiyaz (schistosomiasis) kaynaklı ölümler bulunmaktadır.

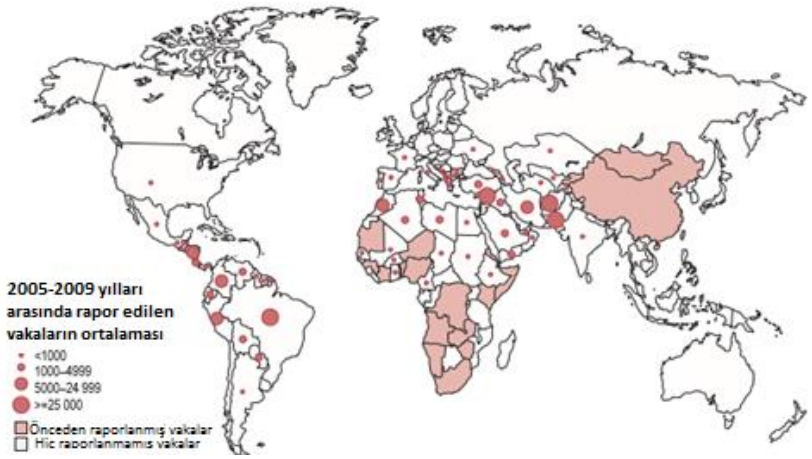
## 2.2 Leishmaniasis' in Epidemiyolojisi ve Prevalansı

Leishmaniasis'in, tahmini olarak her yıl 2 milyona yakın yeni vakası ortaya çıkmaktadır. Leishmania'nın bulaşabileceği alanlarda 350 milyondan fazla insan yaşamaktadır [7]. Güney Amerika, Afrika, Güney Avrupa ve Asya'daki 98 ülkeden vakaların olduğu bildirilmiştir. Hastalık yoksulluğa bağlı ve 'İhmal Edilen Tropikal Hastalıklardan biri olarak sayılmaktadır [45]. Leishmaniasis genellikle coğrafi konumlarına göre, Eski Dünya (Avrupa, Asya ve Afrika) veya Yeni Dünya (Amerika) olarak kategorize edilir. *Leishmania* cinsinin en az 20 türü insanlar için patojeniktir. Lokal deri ülserleri üzerindeki latent enfeksiyonlardan ölümcül sistemik hastalığa kadar uzanan bir dizi patolojiye yol açarlar. Üç ana klinik sendromu şu şekilde ayırt edilir: *visseral* (iç organ), kütanöz ve mukokütanöz leishmaniasis [44]. Visseral leishmaniasis (VL), tedavi edilmediği takdirde ölümcüldür ve her yıl dünya çapında 500.000 insan vakasında, 50.000'den fazla insanın ölümüne neden olmaktadır. Bu vakaların% 90'ına yakın kısmı Hint alt kıtasında, Doğu Afrika'da ve Brezilya'da görülür [9]. Doğu Afrika ve Asya'daki endemik topluluklarda yapılan prospektif çalışmalar, VL'nin görülme oranının yılda 1000 kişide 2-14 yaş aralığında değişmekte olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, hastalığın yayılımı, ayrı alanlarda gerçekleştiği için, küçük topluluklarda gözlemlenen insidans oranları, daha büyük alanlara göre tahmini yapılamaz. L. donovani'nin antroponotik yayılımı, genellikle Doğu Afrika'da ve Hint alt-kıtasında tekrar eden bir salgın döngüsü içerisinde, L. İnfantum'un hayvandan insana geçişi ise Akdeniz Havzası'nda, Orta Doğu'da, Orta Asya'da, Çin'de ve Güney Amerika'da olması VL'nin dünya üzerinde farklı yerlerdeki vakalara neden olur (Şekil 2. 1) [11].




Şekil 2. 1 Dünya çapında Visseral Leishmaniasis'in dağılımı (2009)

Kütanöz Leishmaniasis (*KL*) 77 ülke olduğu bildirilmektedir ve yaygın olarak dünyadaki seyahat kliniklerinde görülmektedir [46]. Tahmini 1.5 milyon yıllık vakanın yaklaşık% 90'ı Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, İran, Pakistan, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye'de görülmektedir (Şekil 2. 2) [11].




Şekil 2. 2 Dünya çapında Kütanöz Leishmaniasis'in Dağılımı (2009)

Yaşam boyu uzun yara izi ile sonuçlanan Kütanöz *Leishmania*sis, özellikle endemik bölgelerdeki genç kadınlar tarafından korkulmaktadır. Kütanöz *Leishmania*sis antroponotik veya zoonotik olabilir. Eski Dünya Kütanöz *Leishmania*sis'i genellikle yarı-kurak ya da çöl bölgelerinde görülürken, Yeni Dünya'da ormanlarla ilişkilendirilmişken, şimdi kent çevresi alanları da artan bir şekilde etkilenmektedir. Bildirilen vaka oranları genellikle yılda 10 000'de 1-10 aralığındadır. Brezilya'nın endemik bir bölgesindeki Kütanöz *Leishmania*sis 'ye ilişkin 5 yıllık prospektif bir çalışmada, 1000 kişide 8 yıllık bir hastalık vakasını ve hastalığın % 15'lik kısmında yaygın olduğu belgelenmiştir [47]. Mukokütanöz *leishmania*sis (M*KL*), Güney Amerika ile sınırlıdır ve olguların % 5'inden azında ortaya çıkan, Kütanöz *Leishmania*sis 'in seyrek bir komplikasyonudur. Mukokütanöz *Leishmania*sis genellikle rahatsız edici izler bırakarak ölümcül komplikasyonlara neden olabilir. Yukarıda belirtilen durum, primer lezyonu olan hastaların % 2.7'sinde ilk *KL*'den ortalama 6 yıl sonra ortaya çıkmıştır. Eski Dünyada *KL* ve VL'de mukozal olarak ilişkilendirmek mümkündür.

## 2.3 Türkiye'de Leishmaniasis

Türkiye, coğrafi yapısı gereğince Avrupa, Asya ve Afrika arasındaki subtropikal iklim kuşağında bulunmaktadır. Türkiye'de *KL* önemli bir halk sağlığı sorunudur ve bildirilen en önemli vektör hastalığıdır (Şekil 1). *KL*'nin kendini iyileştiren antroponotik formu Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Akdeniz Bölgelerinde endemiktir ve ayrıca Orta Anadolu ve Ege Bölgelerinde olduğu da bildirilmiştir [48], [49]. 1988 ve 2010 yılları arasında Türkiye'de 50.381 KL vakasının yarısından fazlası Şanlıurfa başta olmak üzere Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde olduğu bildirilmiştir [13], [14]. Bu vakaların ağırlıklı olarak L. tropica kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, bazı *KL* vakalarının, Türkiye'nin Doğu Akdeniz bölgesinde L. infantumdan kaynaklandığı düşünülmektedir [48], [50]. Son zamanlarda, L. major ve L. donovani parazit türleri, Adana [51] ve Şanlıurfa şehirlerinden [13] *KL*'ye sahip hastaların klinik örneklerine moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Phlebotomus papatasi ve P. Sergenti, *L.major* ve *L.tropica* için çok iyi bilinen spesifik vektörlerdir ve Eski Dünya'da yaygın bir dağılım gösterirler [52], [53]. Phlebotomus papatasi, kum sineğine göre Türkiye'de *Leishmania*sis'in endemik bölgelerinde oldukça antropofiliktir ve bol miktarda bulunur [48], [54], [55], [56].

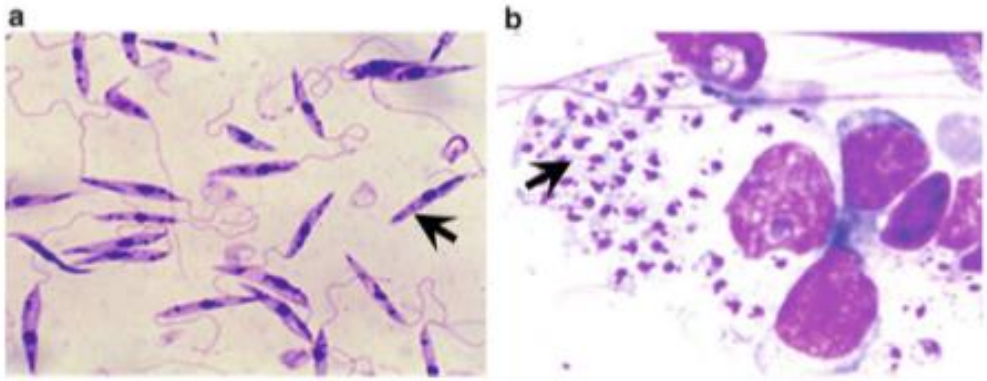



Şekil 2. 3 2007-2009 yılları arasında Türkiye'de Kütanöz Leishmaniasis vakalarının yaygınlığı [57]

## 2.4 *Leishmania* Türleri ve Morfolojileri

*Leishmania* parazitleri, Kinetoplastida sırasına göre Trypanosomatidae ailesine ait bir protozoandır. Bu parazitler; tekli, büyük mitokondrilerinde DNA içeren bir kütle ile tipik bir 'kinetoplast' bulunduran tek hücreli kamçılı organizmalardır. *Leishmania* parazitleri

iki şekle sahiptir: memeli konukçıdaki amastigot ve vektöründeki promastigot formu. Amastigotlar yaklaşık 2-6 µm boyutlarında bir çekirdek ve bir kinetoplast içeren oval gövdelerdir. Memeli konakçının makrofajlarında çoğalırlar. Vektörünün bağırsaklarındaki parazit, ince kamçılı hücre formu olan promastigot formunda (2-3 µm ile yaklaşık 15-30 µm) gelişir.




Şekil 2. 4 Leishmania parazitinin sahip olduğu promastigot ve amastigot formu [58]

Şekil 2.4 'te görüldüğü gibi; a)Her biri kamçı içeren promastigotlar olarak adlandırılan çok hücreli ve hareketli form. (b) L. donovani ile enfekte altın hamster dalağından hazırlanan Giemsa boyalı simirde görülen amastigotlar (küçük noktalar) olarak adlandırılan hücre içi ve hareketsiz evre Ross tarafından yapılan orijinal cins tanımlamasından bu yana, [59] en az 20 patojenik türün olduğu tanımlanmıştır. Bu türleri morfolojik olarak birbirinden ayırt edilmesinin olanaksız olduğu düşünülmektedir. Tür ayırımının sadece izo-enzim [60], [61], ya da moleküler metodlarla ayırt edilebilmektedir [62].

Çizelge 2. 1 Leishmania türlerinin meydana getirdiği hastalıkların, coğrafi yere, konakçı hayvanlara ve vektörlere göre sınıflandırılması [58]

| **Organizma** | **Enfeksiyonu** | **Coğrafyası** | **Kaynağı** | **Vektörü** |
|---|---|---|---|---|
| L. Donovani | Visceral *Leishmania*sis | Kuzey-doğu Hindistan | İnsanlar | Phiebotomus argentipes |

Çizelge 2.1 Leishmania türlerinin meydana getirdiği hastalıkların, coğrafi yere, konakçı hayvanlara ve vektörlere göre sınıflandırılması [58] (devamı)

| **Organizma** | **Enfeksiyonu** | **Coğrafyası** | **Kaynağı** | **Vektörü** |
|---|---|---|---|---|
| L. İnfantum | Visceral *Leishmania*sis | Akdeniz havzası, Orta Doğu, Çin, Asya | Köpekler,tilkiler, çakallar | P.pcrniciosufi, P.arias |
| L.Donovani | Visceral *Leishmania*sis | Sudan, Kenya, Afrika boynuzu | Sudan kemirgenleri, köpekler, insanlar | P.orinntalis, P.martini |
| *L.major* | Kütanöz *Leishmania*sis | Orta Doğudaki yarıçöller, Kuzey Hindistan, Pakistan | Çöl Faresi | P.papatassi |
| *L.major* | Kütanöz *Leishmania*sis | Yarı-sahara, Sudan | Kemirgenler | P.duboscqi |
| *L.tropica* | Kütanöz *Leishmania*sis | Orta Doğu, Akdeniz havzası, Asya | İnsanlar | P.sergenti |
| L. Aethiopica | Kütanöz *Leishmania*sis | Kenya, Etiyopya | Yaban fareleri | P.longipes, P.pedifer |

Çizelge 2.1 Leishmania türlerinin meydana getirdiği hastalıkların, coğrafi yere, konakçı hayvanlara ve vektörlere göre sınıflandırılması [58] (devamı)

| **Organizma** | **Enfeksiyonu** | **Coğrafyası** | **Kaynağı** | **Vektörü** |
|---|---|---|---|---|
| L.chagasi | Visceral *Leishmania*sis | Güneydoğu Amerika, Brezilya, Venezuella | Tilkiler, köpekler, Amerika keseli sıçanı | Luizomyia longipalpis |
| L.Mexicana | Kütanöz *Leishmania*sis | Yucatan, Guatemala | Orman kemirgenleri | L.olmeca |
| L.Amazonensis | Kütanöz *Leishmania*sis | Güney Amerika'nın tropikal ormanları | Orman kemirgenleri | L.flaviscutellata |
| L.Braziliensis | Mukokütanöz *Leishmania*sis | Güney ve Orta Amerika'nın tropikal ormanları | Orman kemirgenleri, Yarı-evcil hayvanlar | Psychodopygus Lutzomyia spp. |
| L.Peruviana | Mukokütanöz *Leishmania*sis | Peru'nun Güney Andları, Arjanti'nin yüksek kesimleri | Köpekler | L.verrucarum, L.pvmenis |

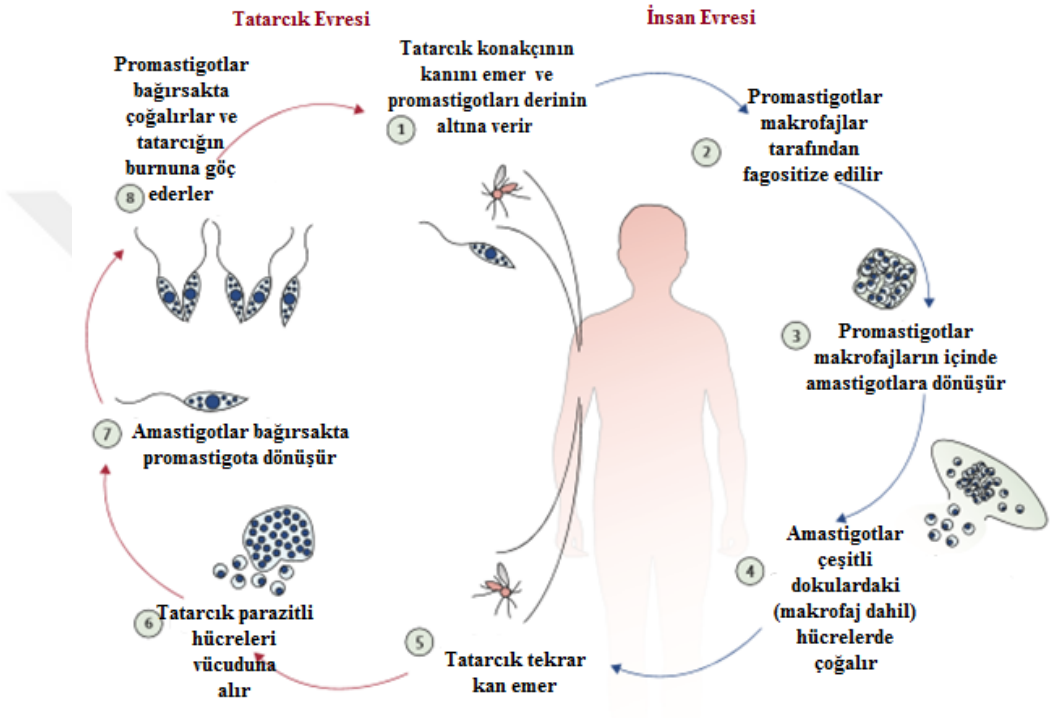
Çizelge 2. 2 *Leishmania* türlerinin klinik belirtileri ve coğrafi dağılımı [58]

| **Türleri** | **Klinik belirti** | **Coğrafik Dağılımı** |
|---|---|---|
| L.donovani | Visseral(kala-azar) | Eski Dünya: Çin, Hindistan, Bangladeş |
| *L.infantum* | Visseral | Eski Dünya: Kuzey-orta Asya, Kuzeybatı Çin, Özbekistan, Orta Doğu |
| L.chagasi | Visseral | Yeni Dünya: Güney ve Ota Amerika |
| *L.major* | Kütanöz | Eski Dünya: Afrika, Orta doğu, Kuzey Asya |
| L.mexicana | Kütanöz, Mukokütanöz | Yeni Dünya: Güney Meksika, Beliz, Kuzey Guatemala, Güney Teksas |
| L.amazonensis | Kütanöz, Mukokütanöz | Yeni Dünya: Güney ve Orta Amerika |
| L.braziliensis | Mukokütanöz, Kütanöz | Yeni Dünya: Güney Amerika boyunca |

*Leishmania* cinsi genel olarak visserotropik (L. donovani, L. infantum) ve dermatotropik türlere ayrılabilir. Bu duruma istisnalar ise: Akdeniz Havzasında tek tük vakalara neden olan dermatotropik bir enzimatik değişkene sahip L. infantum'un Kütanöz *Leishmania*sis'e sebep olması ve bazen immün yetmezliği olan kişilerde visseral

hastalığa neden olabilecek L. tropica ve L. amazonensis. Yeni Dünya dermatotropik türleri ikincil mukozal yayılımı ile bilinir, ancak Eski Dünya dermatotropik türlerinin neden olduğu tek tük mukozal vakaları da vardır. Visseralli hastalarda bile ağız, burun veya genital bölgede mukozal lezyon gelişebilir. Alışılmamış, tipik olmayan bu gösterim, HIV ile enfekte hastalarda daha sık görülür.

## 2.5 *Leishmania* Parazitlerinin Hayat Döngüsü




Şekil 2. 5 *Leishmania* parazitinin hayat döngüsü [5]

Dişi kum sineklerinin konakçıyı ısırmasıyla, enfektif (hastalık bulaştırıcı) aşamada *Leishmania* promastigotlarını deriye enjekte eder. Parazitler fagositler tarafından dermal dokuda yakalanırlar, başlangıçta kısa ömürlü nötrofiller ve daha sonra makrofajlar tarafından da yakalanır ve fagosite edilir. Promastigotlar makrofajların fagolizozomları içerisinde yerleşirler ve amastigot formlarına dönerek çoğalırlar. Promastigotları fagosite eden immün hücrelerin lizise uğramasıyla diğer hücrelerin amastigot ile enfekte edilmesine neden olur [7]. Döngü, dişi kum sineklerinin enfekte kişiyi ısırarak, konakçının kanında bulunan enfekte fagositlerin vektöre geçmesiyle devam eder. Vektörün bağırsağında *Leishmania* amastigot formundan promastigot

formuna döner. Parazitler daha sonra kum sineklerinin burnuna göç ederek *Leishmania* yaşam döngüsünü tamamlanır [5].

## 2.6 Leishmaniasis Türleri

### 2.6.1 Kütanöz Leishmaniasis (KL)

Bu, *Leishmania*sis'in en yaygın biçimi olup, ilk başta şark çıbanı olarak bilinir ve ısrarlı böcek ısırması gibi görülür. Basit cilt lezyonları vektör taşıyan kum sineğinin ısırdığı yerlerde görünür. Birkaç ay içinde kendi kendine iyileşir ancak iz bırakır. Kuluçka süresi birkaç günden aylara kadar sürebilir. Yavaş yavaş, lezyon büyür, kırmızı kalır ve ağrı yapar. Lezyonun iyileşmesinde enfekte bölgelere göç eden lökositler enfekte dokuların nekrozuna neden olur ve iyileşme sürecinde bir granülom oluşturarak yara dokusunun iyileşmesini sağlarlar.

### 2.6.2 Mukokütanöz Leishmaniasis (MKL)

"Espundia" olarak da bilinen bu hastalık biçimi, nazo-oral ve boğaz boşlukların aşırı tahrip edilmesine, vücutta korkunç lekelerin çıkmasına, yüzün bozulmasına ve yaşam boyu süren bir acıya neden olur. M*KL* bazen Sudan ve diğer Eski Dünya odaklarından bildirilmektedir. Bununla birlikte, klasik M*KL*, başlangıçta oluşan şark çıbanının görünüşte geçmesine rağmen, bazen yıllar sonra, yanak içlerinde veya burun mukozasında metastatik lezyonlar görülen L. braziliensis enfeksiyonlarıyla sınırlıdır. M*KL*'in yaşam döngüsü kemirgenlerden kemirgene ve memelilerden orman kum sineği Lutzomyia suşu tarafından aktarıldığı zoonotik bir enfeksiyon olarak da bilinmektedir.

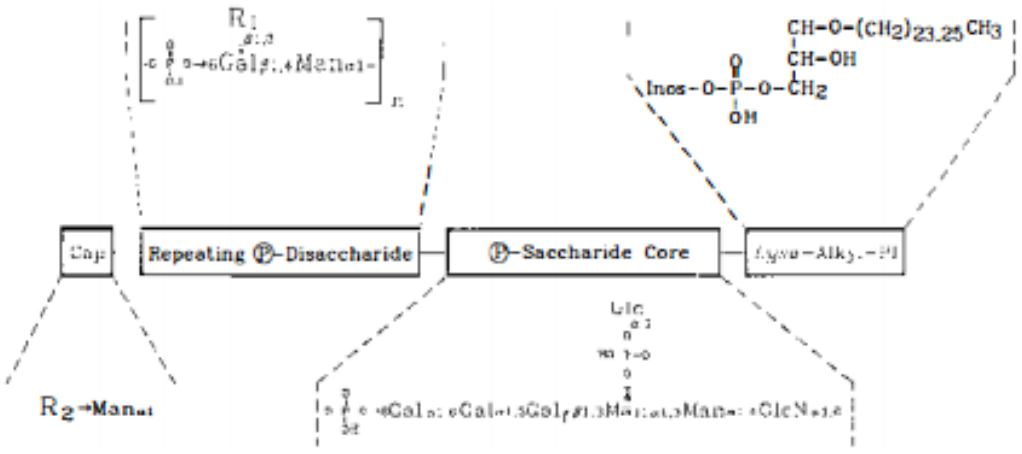
### 2.6.3 Visseral Leishmaniasis (VL) ya da Kala-Azar (KA)

VL, çeşitli *leishmania*sis formları arasında en korkunç ve yıkıcı olanıdır. En şiddetli hastalık şeklidir ve tedavi edilmediğinde genellikle ölümcüldür. Parazit, aşırı uç vakalarda asemptomatik bir enfeksiyondan ölümcül VL formuna geçebilen bir dizi klinik sendromdan sorumludur. Uzun süren ateş, dalak büyümesi, karaciğer büyümesi, önemli kilo kaybı, ilerleyen anemi, kan hücre sayılarının azalması ve kanda globülin fazlalığı gibi durumların görülmesine neden olur. VL, sekonder enfeksiyonlarla daha

komplike olur. Tam gelişmiş VL'nin sonucu genellikle zayıflamış immün sisteme sahip hastanın başka bir enfeksiyona yakalanarak VL ölümle sonuçlanır. VL, HIV-1 enfeksiyonu olan insanlar arasında önemli bir fırsatçı enfeksiyon olarak ortaya çıkmaktadır [63], [64]. Aslında, parazit HIV enfeksiyonunun patogenezinde bir kofaktör olabilir [65].

## 2.7 *Leishmania* Parazitlerindeki Lipofosfoglikan (LPG) Molekülü

Lipofosfoglikan (LPG), *Leishmania* parazitinin promastigot safhasında, flagella da dahil olmak üzere tüm yüzeylerde bulunan Leishmania parazitlerinin kritik bir hücre yüzeyi glikokonjugatıdır. *Leishmania* promastigotların yüzeyi hatta kamçısı büyük oranda glikosilfosfatidilinositol (GPI) sabitleyici moleküllerden oluşan yoğun bir glikokaliks yapı ile kaplıdır [66]. Bu GPI bağlantılı moleküller, parazit yüzey proteaz gp63 ve proteofosfoglikanlar (PPG) gibi protein yapılarını içerir. Parazit yüzeyinde bulunan en bol bileşen ise lipofosfoglikan (LPG) adı verilen bir GPI ile sabitlenmiş fosfoglikandır. LPG yapısında oluşabilecek spesifik farklılıklar, disakkarit tekrar birimlerinin sakkarit yan zincirlerle yer değiştirme derecesine göre gerçekleşir.




Şekil 2. 6 *Leishmania* parazitlerinin yüzeyinde bulunan LPG molekülünün yapısı [67]

Şekil 2.6'da görülen LPG molekülü yapısında; fosfatidilinositol lipid bağlanma bölgesi, Gal(α1,6)Gal(α1,3)Galf (β1,3)[Glc(α1)-PO4]Man(α1,3)Man(α1,4)-GlcN(α1) yapısını içeren sakkarit merkez, Gal(β1,4)Man(α1)-PO4) yapısını tekrarlayan fosforile disakkarit bölge ve küçük bir oligosakarit kap yapısı içerir [68].

Parazit yüzeyinde bulunan LPG, promastigotların kompleman aracılıklı liziden korunmak ve aynı zamanda konakçı makrofajları ile bağlanmalarını kolaylaştırmak ve konakçı makrofajın içinde hayatta kalmayı kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Leishmania'nın LPG'den yoksun suşları kum sineklerinde bir enfeksiyon oluşturamadığı görülmüştür Aynı zamanda hızla bölünen prosiklik promastigotların kum sineğinin bağırsak epitel hücrelerine bağlanmasında LPG molekülünün aracılık ettiği görülmüştür [66].

## 2.8 Leishmaniasis'in Tanısı

*Leishmania*sis'in tanısı, organizmalarda yarattığı tipik deri lezyonlarının görülmesi ile basit teşhis koyulabilmesine karşı klinikopatolojik bulgular ışığında tanı analiz sonuçlarının da değerlendirilmesi gerekebilir [19]. Visseral Leismaniasis için kemik iliği, dalak ve lenf nodlarındaki doku örneklerinde, Mukokütanöz *Leishmania*sis için mukokütanöz lezyonlarda ve Kütanöz *Leishmania*sis için deri lezyonlarında parazitlerin görülmesi hastalığın tanısını koyar [69]. Spesifik tanı yöntemleri, etkilenen dokuların sitolojik ve histopatolojik incelemesini, serolojiyi, etkilenmiş dokuların ve kan üzerindeki PCR deneylerinin sonuçlarını içerir. Endemik bölgelerde tanı koymak zor olabilir. Çünkü konakçı parazitle klinik bulguların yokluğunda uzun süre enfekte edebilir. Aynı zamanda diğer vektör kaynaklı patojenlerle ortak enfeksiyonlar klinik Çizelgeyu zorlaştırabilir ve *leishmania*sis'e benzeyen işaretlere neden olabilmektedir [19].

### 2.8.1 Kütanöz Leishmaniasis'in Tanısı

Laboratuvar koşullarında, biyopsi ya da kazıma ile alınmış örnekler Giemsa ile boyanarak amastigotların doğrudan tanımlanmasıyla mikroskobik tanı yapılır. Amastigotlar, karakteristik çekirdekleri ve kinetoplastları ile çapı 2-4 µm olan yuvarlak veya oval yapılar olarak gözlemlenir. Ülser tabanlı örnekler genellikle en yüksek verime sahiptir. Bununla birlikte, diğer çalışmalar da merkezden veya sınırdan alınan simir veya kültür örneklerinin tanısal sonuçlarında önemli bir fark bulmamıştır [70], [71]. Genellikle, farklı lezyon veya lezyon kısımlarından alınan aspirat örnekleri incelenir. Mikroskopinin tanısal duyarlılığı % 85'ten daha fazla olduğu bildirilmiştir [71], [72].

Anti-*Leishmania* antikorları serolojik testlerle de tespit edilebilir. Fakat antikorlar zayıf hümoral yanıt nedeniyle antikorlar saptanamayacak düşük titerlerde mevcut olma eğilimindedir [25], [26]. L. major veya L. tropica kaynaklı *KL*, genellikle saptanabilir bir antikor tepkisine yol açmaz. *Leishmania* suşlarına karşı hücredeki cevabı değerlendiren LST (*Leishmania* deri testi) genellikle olumludur. Fakat LST geçmiş ve anlık enfeksiyonları ayırt etmekte başarısızdır. Leishmanin deri testi (LST) veya Karadağ testi, *Leishmania* antijeninin intradermal olarak ön kola enjekte edilmesiyle gecikmiş hassaiyet reaksiyonunu ölçmektedir. LST, tipik olarak aktif VL'de hastaların anerjik durumundan dolayı negatiftir. Başarılı bir tedaviden sonra, VL hastalarının % 80'inde 6 ay sonra pozitife döner. LST'nin aktif VL'de az tanısal değeri vardır, ancak asemptomatik enfeksiyon durumunu ortaya koyduğu için epidemiyolojik çalışmalar için yararlı olabilmektedir. Parazitin nükleik asitlerinin PCR-temelli yöntemlerle saptanması, tanısal duyarlılığı geliştirir ve *Leishmania* türlerinin tanımlanmasına olanak sağlar [17], [73], [74]. Kültür metodu ve PCR ile DNA'nın tanısı hassastır ancak gelişmekte olan ülkelerde halen pratik değildir.

### 2.8.2 Visseral Leishmaniasis'in Tanısı

Epidemiyolojik şartlar ve spesifik olmayan biyolojik parametreler ile kombine edilen klinik durum VL şüphesine yol açar. Ancak tedaviye karar verilmeden önce tanının parazitolojik veya serolojik yöntemlerle onaylanması gerekir. Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) VL için bir klinik vaka tanımlaması oluşturmuştur: endemik bir alanda, 2 haftadan uzun süren ateş ve kilo kaybından herhangi birinin varlığı VL olma olasılığının yüksek olduğunu ve daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerektiğini belirtir [75]. Hastalığın yaygın olmadığı gelişmekte olan ülkelerde, laboratuvar imkanlarının varlığı hastalığın yeterli ve etkin bir şekilde izlenmesini sağlar. Bununla birlikte, gelişmekte olan ülkelerin kırsal alanlarında yaşayan hastalara yönelik kullanımı basit teşhis araçları gereklidir [76]. VL'nin laboratuvar teşhisi, yeterli örneklerin mikroskopik gözlemi ve kültürüne, antijen tespitine, serolojik testlere ve moleküler yöntemlere dayanır.

### 2.8.3 Leishmaniasis Tanı Yöntemleri

#### 2.8.3.1 Mikroskopik Tanı Yöntemleri

VL tanısının kesinliği, klinik örneklerdeki parazitlerin doğrudan gösterilmesini ve spesifik moleküler yöntemlerle desteklenmesini içerir [77], [78], [79]. Amastigotların varlığı aynı zamanda karaciğer biyopsileri ve lenf düğümlerinde de tespit edilebilir. Giemsa ile boyanan kemik iliğinin duyarlılığı yaklaşık % 60 ila % 85 arasındadır. Dalak aspiratlarında duyarlılık daha yüksektir (% 93) [80], ancak örneklerin alımı deneyim gerektirir. Duyarlılığı artırmak için floresan boya ile konjuge antikorlar da kullanılabilir [81]. Buna ek olarak, sonuçlar teknik uzmanlığa ve hazırlanan simirlerin kalitesine bağlıdır.

#### 2.8.3.2 Kültür Yöntemleri

Geleneksel kültür yöntemleri, hareketli promastigotların çoğaltılması için *in vitro* koşullar altında üretilmesini içerir. Parazitlerin kültüründe, Brain Heart Infusion Broth geniş bir aralıkta bulunan hassas organizmaların kültüründe kullanılan, beyin dokusu ve dekstrozun kombinasyonuyla zengin bir içeriğe sahip, ayrıca beyin ve kalp infüzyonları kullanılarak modifiye edilmiş besiyeri kullanılmaktadır. Kültür aşamasında ilk önce küçük ölçekte üretilen promastigot parazitler, parazit sayısına ve çoğalma hızına bağlı olarak büyük ölçeklere aktarılarak çoğaltılırlar. Bu yüzden klasik kültür yönteminde uzun süren bir inkübasyon süreci vardır (15 - 30 gün).

#### 2.8.3.3 Mikro Kültür Yöntemi

Parazit kültürünün tanıda yüksek hassasiyet göstermesine rağmen zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir. Dolayısıyla klasik kültür metodu klinik tanı için nadiren kullanılır. Mikro kültür yöntemi (MKY) gibi duyarlılığı artıran yeni kültür yöntemleri bulunmaktadır [21]. Allahverdiyev vd. VL ve *KL*'nin tanısı için parazitlerin sayısına veya kullanılan kültür ortamının çeşidinden bağlı olmaksızın yüksek duyarlılığa sahip mikro kültür yöntemini (MKY) geliştirmişlerdir..Bu yöntem oldukça basit ve ekonomik bir yöntemdir [22]. Geleneksel kültür yönteminin duyarlılığı örneklerdeki amastigot parazit sayısıyla değişkenlik gösterir ve bazen bu durum çok uzun bir inkübasyon süresi (1-6 ay)

gerektirebilir [20]. MKY, bu değişken parametrelere karşı daha kararlıdır ve hastalığa daha hızlı tanı koyulasını sağlar. MKY'nin yüksek hassasiyeti, örnek malzemeyi konsantre hale getiren ve amastigotların promastigotlara dönüştürülmesi için uygun mikroaerofilik koşullar sağlayan kılcal tüplerin kullanımı ile açıklanabilir. MKY'nin verdiği sonuçların, klasik kültür metodu kullanılarak elde edilemeyeceği vurgulanmıştır [21], [82]. Allahverdiyev vd. [23] yaptığı çalışmada, *Leishmania*sisin tanısında kullanılan (simir, NNN, IFAT, ELISA, ICT ve PCR) yöntemlerle MKY'yi karşılaştırarak, donör kanlarından *Leishmania* parazitlerini tespit etmek için MCM duyarlığını incelemişlerdir. Kan bankasından alınan numunelerde *Leishmania* parazitlerinin tespiti için MKY en duyarlı yöntem olarak bulunmuştur. Klasik yöntemlerle karşılaştırıldığında, donör kanlarınının MKY'ne yüksek duyarlılık göstermesi tanısı konulmamış asemptomatik *leishmania*sisin %80'inin tanısında yeni umutlara yol açtığı düşünülmektedir. MKY'nin semptomatik *leishmania*sis tanısında yüksek bir duyarlılığa sahip olduğu ve halen dünyanın çeşitli yerlerinde uygulanmakta olduğu bilinmektedir.

#### 2.8.3.4 İdrarda Antijen Tespiti

Birçok çalışmada VL hastalarının idrarında *leishmania*sis'e özgü antijen tespit edilmiştir. 1995'te De Colmenares vd. Kala-azar hastalarının idrarında 72-75 kDa ve 123 kDa'lık iki polipeptid antijenik yapı olduğunu bildirmiştir [83]. 2002'de Sarkari ve ark. , idrarda 5-20 kDa ağırlığında karbonhidrat temelli, VL hastalarının ısıya dayanıklı antijenini tespit etmişlerdir [84]. İdrar numunelerindeki bu antijenin saptanması için bir lateks aglutinasyon testi (KAtex, Kalon Biological, UK), geliştirilmiştir. Hasta örnekleri, endemik ve endemik olmayan bölgelerde kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu test, yüksek özgüllük (% 82-% 100) göstermiştir. Ancak düşük ile orta hassasiyet (% 47 ile % 95) gösterdiği bölgelerde mevcuttur [85], [86], [87], [88], [89]. Günümüzde bu yöntem, antikor üretimi az olan hastaların tanısı için kullanışlıdır. Bu bağlamda, bu yöntem immün yetmezliği olan hastalarda % 100 duyarlılığa ve % 96 özgüllük oranına sahip olduğu bildirmiştir [90]. Bir başka çalışmada, HIV ile enfekte hastalarda VL için % 87 özgüllük ve % 85 duyarlılık elde edilmiştir. Duyarlılığı % 60 ile % 71, özgüllüğü % 79 ile % 94 arasında değişen aglütinasyon testi, VL hastalarının idrarında bir başka leishmania'

ya ait düşük ısıda kararlı antijen tespit edilmiştir [91]. Özetle, lateks aglütinasyon testi basit, gerçekleştirilmesi kolay, ucuz ve hızlı bir tarama testidir.

#### 2.8.3.5 Serolojik Yöntemler

Spesifik serolojik tanı, spesifik bir hümoral yanıtın varlığına dayanır. Mevcut serolojik testler indirekt floresan antikor (IFA), enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA), Western Blot ve direkt aglütinasyon testi (DAT) olmak üzere dört format üzerine kurulmuştur. Duyarlılık, yönteme bağlı iken özgüllük, kullanılan serolojik yöntemden ziyade antijene bağlıdır. Tüm antikor tanı testlerinde bulunan dezavantaj; antikorların hasta iyileştikten sonra da aylarca kanda kalarak pozitif sonuç vermesidir. Bu yüzden enfeksiyonun geçip geçmediği hakkında tam bir bilgi elde edilemez. Bu yüzden, endemik bölgelerde asemptomatik olarak enfekte kişilerde bu testler pozitif olabilir.

Dolaylı floresan antikor (IFA) testinin hassasiyeti (% 87 -% 100) ve özgüllüğü (% 77-100) yüksektir [91], [92]. Visseral leishmaniasisin IFA testi ile teşhisi için promastigot formlarının, tripanozom serumu ile çapraz reaktivitesi en düşük olan antijen tercih edilmelidir [93]. Antikor yanıtı enfeksiyonda çok erken saptanabilir ve tedaviden altı ile dokuz ay sonrasında saptanamaz hale gelebilir. Tedaviden sonra antikorların düşük titrelerde devam etmesi, hastalığın tekrarladığını gösterir [94].

Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA), VL serolojik tanısı için tercih edilen bir laboratuvar testidir. Teknik son derece hassas, ancak özgül antijen kullanımına bağlı kolay bir testtitr. ELISA testinde kullanılan antijenlerden biri, canlı promastigotları dondurulup çözdürülerek elde edilen çözülebilir bir promastigot antijenidir (Siklosporin A). Siklosporin A kullanılan ELISA duyarlılığı % 80 - % 100 aralığında iken ve özgüllüğü de % 84 - % 95 arasında değişmektedir [95], [96], Seçici antijenik moleküller kullanıldığında (116 kDa, 72 kDa ve 66 kDa moleküler ağırlıkları) duyarlılık çok düşükken (% 37) özgüllük % 100'e yaklaşmıştır [97], [98]. Kullanılan diğer saflaştırılmış antijenler, 36-kDa'lık glikoprotein [99], *L. donovani* [100] tarafından salınan metabolik antijenler ve visseral hastalığın gelişiminde rol oynayan A2 proteinleridir [101], [102], [103]. *L. chagasi*'nin proteninden klonlanmış kinesin ilişkili rK39 rekombinant proteinin, korunmuş bir bölümü ELISA formatında çalıştırıldığında, insan ve köpek VL vakalarından yüksek düzeyde reaktif olduğu bildirilmiştir [104], [105]. Bu rekombinant

antijen kullanılarak, klinik VL'e karşı hastalarda % 99 özgüllük ve duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir. Hindistan'da bu antijenin,% 98 duyarlılık ve % 89 özgüllük gösterdiği bildirilmiştir [106]. Bununla birlikte, Sudan ve diğer ülkelerde yapılan bir çalışma raporu, bu antijenin düşük duyarlılık (% 75) ve özgüllük (% 70) gösterdiğini ortaya koymuştur [107]. HIV pozitif hastalarda rK39-ELISA, IFA testinden (% 54) daha yüksek duyarlılık göstermiştir. Başarılı bir tedavi ile, antikor titreleri hastalık esnasında ve tedavinin sonunda hızla azalır. Hastalığın nüksettiği kişilerde rK39'a karşı artan antikor titreleri görülmüştür. Bir başka çalışmada, *Leishmania* chagasi'nin iki hidrofilik antijeni (rk9 ve rk26) VL'nin serolojik tanısında kullanılmıştır [108].

Western Blot gibi bu tür testler için promastigotlar log fazına kadar kültürlenir, parçalanır ve proteinler SDS-PAGE'de ayrılır. Ayrılan proteinler, bir nitroselüloz zar üzerine transfer edilir ve hastanın serumuyla taranır. Western Blot tekniği, çeşitli *leishmania* antijenlerine ayrıntılı antikor yanıtları oluşturur [109], [110] ve özellikle VL ile birlikte enfekte HIV hastalarında [111], [112], [113] IFA testi ve ELISA'ya göre daha duyarlı olduğu bulunmuştur [71-73] Tekniğin dezavantajları (ekipman ve zaman gereksinimleri ve maliyet) araştırma laboratuvarlarındaki kullanımını kısıtlar.

Direkt Aglutinasyon Testi **(**DAT), serum örneğinde anti-*Leishmania* antikorlarıyla spesifik olarak reaksiyona giren ve promastigotların aglütinasyonuyla sonuçlanan, *Leishmania* promastigotolarının doğrudan aglütinasyonuna dayanır. Coomassie boya ile boyalı promastigotlar süspansiyon olarak ya da oda sıcaklığında en az iki yıl dondurularak kurutulmuş formda depolanarak kullanılabilmesi bu alandaki kullanımını kolaylaştırır [114], [115]. Chappuis ve ark. [116] yaptığı DAT metodunu değerlendiren otuz çalışmayı içeren analiz sonuçlarına göre; DAT'nin % 94.8 oranında duyarlılık ve % 97.1 oranında özgüllük gösterdiğini bulmuşlardır. Visseral *leishmania*sis'in serolojik tanısı için DAT, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmasına rağmen, hala bazı sınırlamaları vardır. Bunların arasında nispeten uzun inkübasyon süresi (18 saat) ve yapılması gereken numunelerin seri dilüsyonları vardır. Bu problemleri ortadan kaldırmak için Schoone ve ark. 2001'de [117] hızlı bir aglütinasyon tarama testi (FAST) geliştirdi. FAST metodu sadece bir serum seyreltmeye ve üç saat inkübasyona ihtiyaç duyar. Bu teknik büyük popülasyonların taranması için oldukça uygundur. FAST'ın

duyarlılığı ve özgünlüğü sırasıyla % 91.1-% 95.4 ve % 70.5- % 88.5 olarak bulunmıştur [118], [119].

İmmunokromatografik Metod (Ic), son yıllarda rK39 antijeninin (L. chagasi'den alınan 39 amino asit-tekrar rekombinant *leishmania*l antijeni) kullanıldığı immünokromatografik test oldukça yaygın hale gelmiştir. Bu metod, nitroselüloz membran üzerine şeritler halinde rekombinant K39 *Leishmania* antijenin emdirilmesiyle yapılan kalitatif membran bazlı immünolojik bir metoddur. Kan veya serum örneği tampon madde içerisinde şeritlere batırılırak çok kısa sürede sonuçlar alınır. Klinik VL vakalarda rK39 IC, farklı popülasyonlar üzerinde farklı duyarlılık ve özgüllük göstermiştir. rK39 IC, Hindistan'da [120], [121] % 100 duyarlılık ve % 93-98 özgüllük, Brezilya'da % 90 duyarlılık ve % 100 özgüllük [122] ve Akdeniz bölgesinde ise % 100 duyarlılık ve özgüllük göstermiştir [123]. Güney Avrupa'daki diğer raporlarda ise rK39 IC testi VL vakalarının sadece % 71.4' ünde pozitif iken [124] Sudan'da rK39 IC % 67'lik bir duyarlılık göstermiştir [107]. Duyarlılıktaki bu farklılıkların, farklı etnik gruplarda gözlemlenen antikor tepkilerinin farklı olmasına bağlanabilir. rK39 IC testinin akut enfeksiyonu tahmin etmede çok yönlü olduğu kanıtlanmıştır. Sahip olduğu yüksek duyarlılık ve özgüllük seviyeleri ile VL'nin tanısı için tek geçerli metod olarak görülmektedir. Ayrıca hızlı (15-20 dakika), kullanımı kolay ve tekrarlanabilir sonuçlar verir. DAT'da olduğu gibi, IC, endemik bölgelerdeki sağlıklı bireylerin önemli bir bölümünde ve tedaviden sonraki uzun süreler boyunca pozitiftir. Bu nedenle, IC, daha önceden VL geçirmiş ateş ve dalak büyümesini tekrar yaşama şikayetiyle gelen kişilerde kullanımını kısıtlar.

Lateks Aglutinasyon Testi LAT, amastigot formundan türetilen A2 antijenine karşı üretilen anti *Leishmania* antikorlarının hızlı tespiti için yakın zamanda geliştirilen hızlı bir tanı tekniğidir. DAT ile karşılaştırılan bir çalışmada, DAT ile doğrulanmış hasta serumlarının A2- LAT amastigotundaki özgüllüğü % 93.5 iken, duyarlılığı % 88.4 olmuştur [125], [126].

#### 2.8.3.6 Moleküler Yöntemler

Farklı moleküler yöntemler *Leishmania*sis tanısı için art arda değerlendirilmiş olsa da, PCR tabanlı metodlar, özellikle immün sistemin baskılandığ hastalarda ana moleküler

tanı araçlarıdır [127]. *Leishmania* DNA'sını VL tanısında algılayan PCR protokollerinde, dalak, lenf nodu ve kemik iliği aspirasyonları ile tam kan örnekleri kullanılmıştır [128]. VL'nin teşhisi için birçok PCR tabanlı yöntemler farklı özgüllük ve duyarlılık göstermiştir. Dalak veya kemik iliği [129] örneklerinde duyarlılık en yüksektir (% 100'e yakın). İdeal numune, invaziv olmaması nedeniyle periferik kandır. Periferik kan kullanılarak, bahsedilen duyarlılık aralıkları % 70 ila % 100 arasında değişir [130], [131]. Yakın zamanda, VL, kütanöz *leishmania*sis (*KL*) ve post kala-azar dermal *leishmania*sis (PKDL) tanısı için bir oligokromatografi-PCR geliştirilerek, lenf, kan ve kemik iliği örnekleri üzerinde yüksek bir duyarlılık (>% 95) gösterilerek VL doğrulanmıştır [132]. Bununla birlikte, PCR teknikleri karmaşık ve pahalı olması nedeniyle çoğu VL'in endemik olduğu ülkelerde, birkaç eğitim hastanesi ve araştırma merkezi ile kullanımı sınırlandırılmıştır. PCR muhtemelen günümüzde *Leishmania* enfeksiyonu için duyarlığı en yüksek testtir. Fakat, endemik bölgelerde, tek başına PCR pozitifliği aktif VL hastalığının bir kanıtı olarak alınamaz. Çünkü asemptomatik sağlıklı bireylerin önemli bir kısmı PCR testinde pozitif çıkar [133]. Marseilles'in *L. infantum* için yaptığı gerçek zamanlı kantitatif PCR çalışmasında, Fransa çevresindeki 81 sağlıklı bireyin % 58'i pozitif bulunmuştur [134]. PCR sonuçları bu nedenle daima klinik ve biyolojik verilerle birlikte yorumlanmalıdır.

## 2.9 Leishmaniasis İmmünitesi

Leishmania'nın başarılı bir şekilde ortadan kaldırılması, immün sisteminin çeşitli hücrelerin koordineli çalışmasına bağlıdır. Hastalık oluşumu ve parazit yok etme arasındaki savaş, kum sineklerinin ısırığından sonra kana aktarılan promastigotların konakçı hücre içerisinde nihai amastigot fomuna dönene kadar ki sürede Leishmania'nın konakçı bağışıklıklığından kaçma kabiliyetine bağlıdır. Leishmania'nın yok edilmesinde; konakçı savunma bileşenleri, doğal ve adaptif bağışıklık sisteminini hücreleri rol oynar [135].

### 2.9.1 Kompleman Sistem

Kompleman sisteminin, enfekte konakçının kan dolaşımındaki promastigotları yok etmesinde önemli bir rol oynadığı uzun zamandır bilinmektedir [136]. Son yıllardaki araştırmalar *Leishmania* parazitlerinin lizise olan duyarlılığının doğrudan serum

kompleman konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir [137]. Kompleman sisteminin klasik yolu *Leishmania* tarafından aktive edilmesine rağmen, parazitler için kompleman aracılı yıkımı genelde alternatif yolla meydana gelir. L. donovani'den alınan amastigotlar L. tropica amastigotlarına göre kompleman sistem tarafaından lizise uğrama açısından daha dirençlidir [138]. Fraksiyonlanmamış promastigotlar, tamamlayıcı tarafından lizise oldukça duyarlı iken, enfektif metasiklik promastigotlar genellikle daha dirençlidir [139].

### 2.9.2 Doğal İmmünite Hücreleri

Nötrofiller, kum sineğinin ısırığıyla oluşan *Leishmania* enfeksiyonu bölgesine birkaç saat içerisinde ulaşan ilk savunma hücreleridir [140], [141]. *Leishmania* promastigotlarını aktif olarak engellediği gösterilmiştir [142], [143]. Nötrofiller *Leishmania* üzerinde bir dizi öldürücü etkiye sahip nitrik oksit ve [144] trombosit aktive edici faktör [145] gibi faktörler üretir. İmmün yanıt konakçının genetiğine ve nötrofillerin apoptotik veya nekrotik durumuna bağlı olmakla birlikte nötrofiller genelde *Leishmania* enfeksiyonlarının çoğunda koruyucu bir role sahiptir [146], [147], [148], [149], [150].

*Leishmania* enfeksiyonu başlangıcında, doğal öldürücü (NK) hücreler de nötrofillerin enfeksiyon bölgesine göçünden sonra bölgeye dahil olurlar [140], [151]. Doğal öldürücü hücreler, erken IFN-γ kaynağıdır ve bu sitokin CD4+ hücrelerinin Th1 hücrelerine dönüşümünü tetikleyerek parazitin konakçı içerisinde yayılmasını sınırlandırır [152], [153]. NK hücreleri aynı zamanda sitotoksik aktivitesi ile direkt parazit lizisine aracılık etmenin yanında *Leishmania* ile enfekte makrofajlarda sitokin aracılı indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) indüksiyonunda katkıda bulunur [154]. NK hücreleri bakımından yetersiz farelerde yapılan çalışmalarda, NK hücrelerin L. donovani enfeksiyonunun önlenmesinde önemini gösterirken kütanöz *leishmania*sis modellerinde önemsiz olduğu görülmüştür [155], [156]. İnsan *leishmania*sisinde, iyileşen bölgeye CD56+ NK hücrelerin [157] bulunması NK hücrelerinin hastalıkta koyucu bir rol oynadığını gösterse de hastalığın ilerleyen safhalarında [157], [158] NK hücre popülasyonunun azaldığı görülmüştür.

T lenfositlerini içeren doğal immün hücrelerinin özellemiş alt kümeleri olan doğal öldürücü T hücreleri (Natural killer T, NKT), *Leishmania* enfeksiyonun [159], [160] erken dönemlerinde immün cevapta önemli bir rol oynar ancak bu roller *Leishmania* ve konakçının türüne bağlı olarak değişir. CD1d bakımından sınırlı NKT hücreleri, [159], [161]. *Leishmania*'nın yüzeyindeki glikokonjugatlar ve glikoinositi tanır. Ayrıca bu hücreler L.dovani ile enfekte BALB/c farelerin karaciğer boşluğunda IFN-γ [159] salımını teşvik ettiği görülmüştür. Fakat C57BL/6 [162] farelerde durumun kötüleştiği saptanmıştır. L. Major enfeksiyonunda NKT hücreleri organa özgü koruma gösterir. Örneğin; dalak ve deri lezyonlarında parazit kontrolüne katkı sağlarken lenf nodlarında böyle bir katkısı görülmez [161]. VL olan insanlarda hastalık ilerledikçe iNKT hücre sıklığı artarken tedavi sürecinde azalmaktadır [163].

### 2.9.3 Edinsel İmmünite Hücreleri

Lenfositler *Leishmania* enfeksiyonunda, makrofajların antiparasitik aktivitesini etkileyen sitokinlerin düzenlenmesini aktive ederek edinsel immünite cevabında rol oynarlar. T hücrelerinin, Leishmania'nın çeşitli formlarına karşı bağışıklıkta önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. Genellikle IFN- γ üreten Th1 hücreleri, makraofajlarda nitrik oksit (NO) üretimini arttırırlar. *L.major* enfeksiyonun iyileşmesi için gereklidir. Öte yandan, Th2 hücrelerinin ürettiği IL-4 ve IL-13 sitokinleri de duyarlılık ile ilişkilidir. Esasen, genetik olarak dirençli (C57BL / 6 gibi) veya L. major enfeksiyona duyarlı (BALB/c gibi) fareler, Th1 veya Th2 sitokin üretme kabiliyetleri ile karakterizedir. L.donovani'nin neden olduğu farelerde ve insanlarda görülen visseral *leishmania*sis'te IFN-γ üreten Th1 hücreleri şiddetli hastalığa karşı koruyucudur [164]. İnsandaki kütanöz *leishmania*sisinde de CD8+ T hücreleri tarafından üretilen IFN- γ hastalığın iyileşmesinde önemli bir katkıda bulunur [165], [166]. Bununla birlikte, *Leishmania* enfeksiyon modellerinde CD4 veya CD8 hücrelerinde yetersiz fareler kullanıldığında görülmüş ki, CD4 T hücreleri hastalığın çözümü için gerekliyken, CD8 T hücrelerinin kütanöz veya visseral *leishmania*sise karşı bağışıklıktaki rolü, kullanılan modele bağlı görünmüştür [167], [168], [169], [170], [171].

Düzenleyici T hücrelerinin (Tregs) aktivitesini ve göçünü etkileyen fare modellerinin kullanıldığı çalışmalarda, *L.major* enfeksiyonuna karşı oluşacak immün cevabın

düzenlenmesinde anahtar rol oynadığını göstermektedir [172], [173], [174]. Diğer yandan, CD4+T hücrelerinin efektör tepkileri, düzenleyici T hücrelerinin ürettiği IL-10 tarafından kısıtlanır. Bu durum, dirençli C57BL / 6 farelerin dahi parazit direncine neden olur ve bu da hastalığın yeniden aktive olmasına neden olur. Öte yandan düzenleyici T hücreleri L. major'a uzun vadeli bağışıklığın devam etmesinde katkıda bulunurlar [175], [176]. Efektör ve düzenleyici hücreler arasındaki bu denge, *Leishmania* parazitlerinin immün sistemden kaçışı ile potansiyel olarak istismar edilebilir.

Leishmania'ya karşı oluşan immüniteye diğer bağışıklık hücreleri de katılır. B hücreleri bakımından yetersiz olan farelerde parazit yüklerinde belirgin olarak azalma görülmesi B hücrelerinin, L.donovani enfeksiyonunun erken evrelerinde zararlı bir rol oynamakta olduğunu gösterir [177]. B hücrelerinin olduğu bölgelerde, antijene spesifik CD8+T hücrelerinin sitotoksik aktivitesinin yanı sıra IFN- γ üreten CD4+T [178] hücrelerinin sıklığını önlediği görülmüştür. Böylece artan parazit yüklerine katkıda bulunmuştur. Miyeloidden türetilen baskılayıcı hücreler üzerinde yapılan son çalışmalarda, T hücre aktivasyonunu baskılama yeteneklerine rağmen, NO'ya bağlı bir şekilde L. major'a direnç kazandırdıklarını göstermektedir [179]. L. major enfeksiyonu sırasında, dendritik hücre alt grupları ve bu gruplarrın farklılaşması, adaptif immüniteyi modüle etmede ve hastalığın sonucunu etkilemekte rol oynamaktadır [180], [181].

### 2.9.4 Sitokinler ve Kemokinler

Çeşitli sitokin ve kemokinlerin yıkıcı özelliklerinin gösterildiği fare modellerinde, sitokinlerin ve kemokinlerin *Leishmania* enfeksiyonları da dahil olmak üzere bir dizi bulaşıcı hastalığa karşı bağışıklıkta büyük bir rol oynadığı görülmüştür. Parazitlerin ortadan kaldırılmasında, salgılanan protein kaynaklı immün düzenleyicilerden bazıları (IL-12, TNF-α, IFN-γ gibi) [182], [183] önemli bağışıklık hücrelerinin aktivasyonuna ve farklılaşmasına katılırken, diğerler sitokinler (örneğin IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β) ya Leishmania'ya karşı immün cevabı kısıtlar ya da Leishmania'nın sürekliliğini sağlayacak şekilde immün hücrelerin aktivasyonu ve farklılaşmasını sağlayabilir [184]. Sitokinler, immün veya enfekte hücreler tarafından üretilir. Leishmania'nın büyümesini inhibe veya destekleyen molekülleri salmak için diğer hücreleri aktive ederek işlevlerini yerine

getirirler. Kemokinler ve kemokin reseptörleri, bağışıklık hücrelerinin inflamatuar bölgelere taşınmasıyla ilgilidir. Gerçekten de, birçok araştırmacı *leishmania*sis'in immün-profilaksinde ve tedavisinde kullanımlarını önermişlerdir [185].

### 2.9.5 Kütanöz Leishmaniasis'te İmmünite

Kütanöz *leishmania*sis'teki dokunun iyileşmesi, $CD4^+$ T hücrelerinden salınan IFN-γ indüksiyonu ile karakterizedir. Tedavi başarısızlığı, Leishmania'ya spesifik CD4 + T hücrelerinden düşük IFN-γ yanıtlarıyla artmış IL-4 seviyeleri ile ilişkilidir. L. major lezyonlarında artmış IL-10 ekspresyonunun ise hastalığın ilerlemesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Çalışmalar, insanlardaki KL'de Th1 ile Th2 hücreleri arasındaki cevapların ikiye bölünmesine dikkat çekmiştir [186].

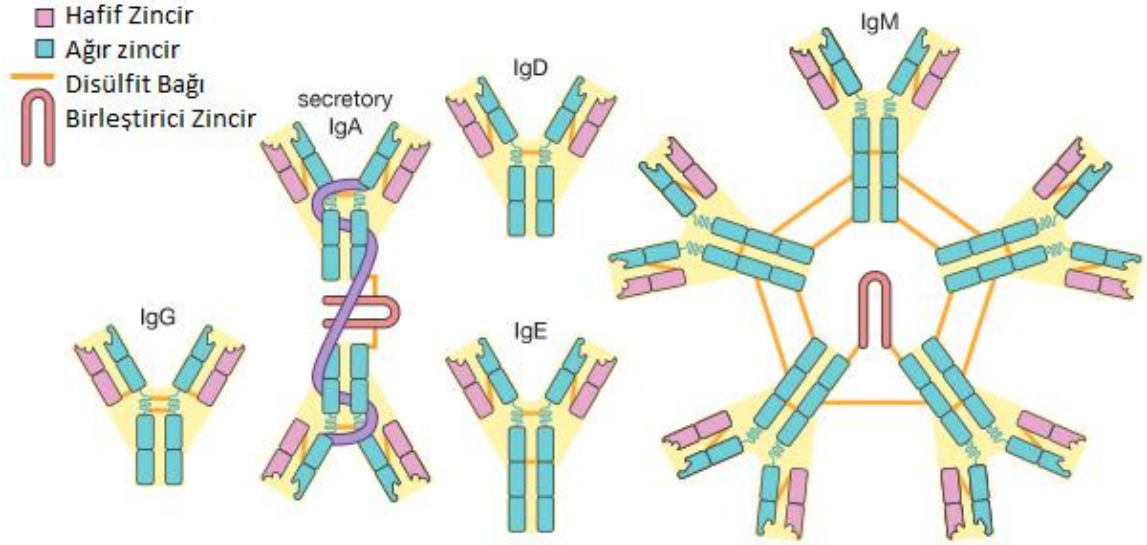
Mukozal ve diffüz kütanöz *leishmania*sis, immünolojik spektrumun zıt uçlarına düşen şiddetli iki hastalık formudur. Tüm klinik formdaki hastalıkların iyileşmesi için T yardımcı 1 (TH1) tipi tepkilere ihtiyaç duysa da, artmış TH1 tipi yanıt ve artmış CD8 + sitotoksik T hücresi, hastalık şiddeti ile ilişkilidir. Aşırı abartılı hücresel yanıt ile, parazitlerin nazofaringeal mukozaya metastaz yaparak lezyonların bozulmasına neden olan mukozal *leishmania*sis'in gelişmesine neden olur. Bu durumun aksine, TH1 sitokinlerinin düşük seviyelerinin bir sonucu olarakta diffüz kütanöz *leishmania*sis olarak adlandırılan hastalık formu yüksek antikor titreleri ile de ilişkilidir. Buna ek olarak, diffüz kütanöz *leishmania*sis'li hastalar yüksek düzenleyici sitokin interlökin-10 (IL-10) üretirken, mukoza *leishmania*sisli hastalarda IL-10 seviyesi düşüktür [187]. Diffüz (D*KL*) kütanöz *leishmania*sis hastaları, negatif bir gecikmiş tip hipersensitivite (DTH) ve tam bir anerji-*leishmania*l antijenine sahip olması nedeniyle ağırlıklı olarak Th2-tipi sitokin tepkisini göstermektedir. D*KL* hastalarında düşük konsantrasyonda interferon-γ (INF- γ) ve interlökin 12 (IL-12) göstermesine rağmen, yüksek miktarda interlökin 4 (IL-4), interlökin 5 (IL-5) ve TNF-α konsantrasyonları bulunmaktadır [188].

## 2.10 Antikorlar ve Yapısı

Antikorlar, tüm moleküllerin genel işleyişinde önemli bir rol oynayan birkaç işlevsel bölgeye sahip büyük, karmaşık, çok fonksiyonlu proteinlerdir. İnsan antikorları, 50-75 kDa büyüklüğünde, her biri bir çift özdeş hafif ve ağır zincirden oluşan bazik $H_2L_2$

yapısına sahip Y-şeklinde yaklaşık 25 kDa'luk monomerik altbirimlerden oluşur [189], [190], [191], [192]. Antikorlar, birçok disülfid bağıyla bir arada tutulan, iki özdeş ağır zincir ve iki özdeş hafif zincirlerden oluşur. Antikor zincirleri, amino asit değişkenliklerine dayanarak sabit (C) ve değişken (V) bölgelere sahiptirler. Hem ağır hem de hafif zincirlerin N-terminal bölümlerinde bulunan değişken bölgeler, molekülün en önemli bölgelerinden biri olan antijen bağlama fragmanını (Fab) oluşturur. Bu bölgede öncelikle bağlayıcı antijen ile ilgili tamamlayıcılık belirleme bölgeleri (CDR'ler) olarak adlandırılan hiper-değişken alanlar vardır. CDR'lerin amino asit dizilimindeki çeşitliliği sayesinde farklı bağlanma özgüllüklerine sahip çok sayıdaki farklı antikorlar seçilebilir. Antikor yapısında değişken ağır ve hafif alanların dışında çok az varyasyon sergilenir ve bu uzantılar (FRs) olarak adlandırılır. Antikorun kristalize edilebilir fragmanı (Fc), bağlanma yüzey reseptörlerine katılır ve immünolojik cevaplarda bir takım önemli fizyolojik rol oynar. Bu Fc kısmı, her iki Fab kolundaki bağlama alanlarının birbirlerinden bağımsız olarak çalışmasına izin veren esneklik sağlayan bir menteşe bölgesi ile bağlıdır [193].

α, δ, ε, γ ve μ ağır zincirleri sırasıyla Ig şekilde ağır zincir dizilerinden, IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM sınıflarını tanımlar ve bu grupların her biri insan immün sisteminde farklı bir role sahiptir.



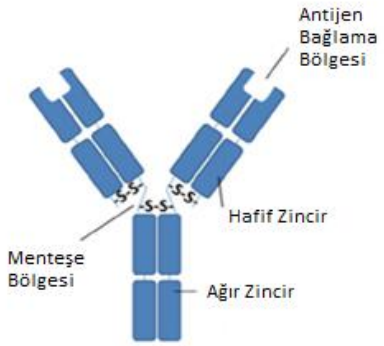

Şekil 2. 7 İmmünoglobülinlerin (Ig) Sınıflandırılması [194]

Çizelge 2. 3 İmmünoglobülin (Ig) sınıflarının önemli fonksiyonları [195]

| ***Sınıf*** | ***Alt sınıf*** | ***Hafif zincir*** | ***Ağır zincir*** | ***Önemli fonksiyonları*** |
|---|---|---|---|---|
| *IgG* | IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 | κ veya λ | γ | Kompleman sistem aktivasyonu, toksinlerin nötralizasyonu ve opsanizasyonu |
| *IgA* | IgA1, IgA2 | κ veya λ | α | Viral ve bakteriyal moleküllerin yüzeye bağlanmasını engellenme |
| *IgM* | Yok | κ veya λ | μ | Antijenik moleküllere yapışma ve komplement sistemin aktivasyonuyla mikropların öldürülmesi |
| *IgD* | Yok | κ veya λ | δ | Lenfosit aktivasyonu |
| *IgE* | Yok | κ veya λ | ε | Allerjik reaksiyonları içeren parasit enfeksiyonlarına karşı koyma |

Hafif zincirler, tüm sınıflar için κ veya λ izoformundadır. $H_2L_2$ yapısı, Fc ve FAb denilen β-katlı tabakalar içeren bölgelerden oluşurlar. Bir IgG antikorunda bulunan, bir çift menteşe, $CH_2$ ve $CH_3$ sabit alanlarından oluşan Fc kısmı, çok hücreli öldürme

mekanizmalarının yanı sıra antikorun plazma yarı ömrünü uzatan mekanizmaları da içeren çeşitli temel fonksiyonları belirler [189], [190], [191], [192]. IgG'lerin olağanüstü bir esnekliğe sahip olduğu bilinmektedir; Fc, dalgalanması ve ayrıca menteşe üzerinde dönmesi için FAb kollarının ileri ve geri salınması ve FAb dirseklerinin bükülmesi yeteneğine sahiptir [196], [197], [198], [199].




Şekil 2. 8 Antikorun yapısında bulunan ağır ve hafif zincirlerin bağlandığı menteşe bölgesi [195]

Menteşe bölgesi, antikora çeşitli konformasyonlara girebilme yeteneği kazandıran hem dönme hem de sallama esnekliği için izin verir [196], [198], [199]. İnsan IgG'lerin menteşe itme esnekliği büyükten küçüğe IgG3> IgGl> IgG4> IgG2 şeklinde sıralanır [198]. Antikorlar, hümoral cevap için en önemli eleman olarak düşünülür ve iki önemli işlevi yerine getirirler: (1) Fab kısmı yoluyla hedef tanıma ve (2) Fc kısmı yoluyla antijen eleme / efektör fonksiyonu. Antikorlar poliklonal ve monoklonal olarak sınıflandırılır. Poliklonal antikorlar, plazma ve hücre dışı sıvılarda bulunan ve herhangi bir patojen veya yabancı molekülün saldırısına karşı ilk tepki olarak üretilen konakçı proteinlerdir. Antikorların temel amacı, bağışıklık sisteminin karşılaştığı herhangi bir tehdidi ortadan kaldırmaktır [200]. Antikorlar adaptif (edinsel) bağışıklık tepkisinin bir parçasıdır. Bu yüzden herhangi bir tehdit ve enfeksiyona karşı spesifiktirler. Böylece, spesifik antikorlar antijenlere yüksek afiniteyle bağlanır. Bu özelliklerinden dolayı antikorlar, bilimsel ve tıbbi araştırmalarda çeşitli amaçlar için kullanılabilirler. Bilimsel çalışmalara bu şekilde doğrudan ya da dolaylı olarak katkıda bulunabilecek başka malzeme bulunmamaktadır. Poliklonal antikorlar *in vivo* üretilirken, monoklonal antikorlar biyoteknolojik manipülasyonlar ile üretilmiştir [195].

### 2.10.1 Poliklonal ve Monoklonal Antikorlar

Bu antikorların her ikisi de aynı yapıya ve işleve sahiptir; ancak PAb ve *MAb*'ın orijinleri, üretimi ve özgüllüğü birbirinden farklıdır. Bu iki antikor arasındaki temel fark, onları üreten hücrelerin klonalitelerinde (hangi kök/klondan geldiği) yatar. *MAb* tek bir klon tarafından üretilirken, PAb birlikte sayısız klon tarafından üretilir. Kısaca, poliklonal antikor, herhangi bir patojen üzerindeki bütün epitopları tanıyıp bağlanabilirken, monoklonal antikorlar patojenin sahip olduğu tek bir epitopa bağlanabilen tek B-lenfosit klonunundan üretilen antikorlardır. Bu antikor tiplerinin her birinin kendine ait artı ve eksileri vardır [201].

Çizelge 2. 4 Poliklonal ve monoklonal antikorların karşılaştırılması [195]

| **Özellikler** | **Antikorlar** | |
|---|---|---|
| | **Poliklonal** | **Monoklonal** |
| **Epitop Tanıması** | Çoklu | Tek |
| **Çapraz Reaksiyon Verme** | Yüksek- Düşük | Çok düşük – Sıfıra Yakın |
| **Konjugasyon** | Zor | Kolay |
| **Spesifikliği** | Düşük | Oldukça Yüksek |
| **Kararsızlık** | Yüksek | Düşük |
| **Degrade Olabilmesi** | Düşük | Yüksek |
| **In Vitro Üretim** | - | + |
| **In vivo Üretim** | + | + |
| **İçerdiği Klon Sayısı** | Çoklu | Tek |
| **Hassasiyet** | Düşük | Yüksek |
| **Üretim Maliyeti;** | | |
| **Başlangıç** | Düşük | Yüksek |
| **Uzun Vadede** | Yüksek | Düşük |

## 2.11 Hibridoma Teknolojisi

İlk kez 1975 yılında Köhler ve Milstein tarafından tanımlanan hibridoma teknolojisi, monoklonal antikorlara dayalı modern antikor tedavilerine yol açan yeni gelişmeler ile ilerlemiştir. Antikor üreten B hücresi ile kanser hücresi olan miyeloma gibi ölümsüz bir hücre hattı arasındaki kaynaşmadan kaynaklanan hibridoma, tanımlanmış özgünlüğü ve afinitesi ile belirli bir monoklonal antikorun sonsuz bir kaynağı olabilir. Hibridomların ortaya çıkışı 1970'lerin başında üç teknolojinin yakınlaşmasından kaynaklanmıştır: 1) Ölümsüz miyeloma-miyeloma hücre füzyonları; (2) ölümlü, antikor üreten B hücreleri; ve (3) antikor üreten B hücrelerini görselleştirmek için yapılan uygulmaları kapsar. César Milstein ve onun Medical Research Council'deki grubu, antikorları salgılayan miyelom-miyeloma füzyonlarını üretmişlerdir [34], [35]. Üretilen fare antikorlarının germ hattı serilerinin olmamasının sebebi, bilinmeyen antijenlere karşın değişen izoptiplerin ve somatik mutasyonlarıdır [202]. Schwaber ve Cohen [203] ölümsüz bir mürin miyeloma hücre hattının insan periferik kan lenfositleri ile kaynaştırılmasından oluşan melez hücre dizilerinin sürekli olarak insan immünoglobülini salgıladığı sonucunu göstermiştir. Bu çalışma spesifik hibridoma üretimi için temel oluşturmuştur. Aynı zamanda, Georges Köhler, İsviçre'deki Basel'deki İmmünoloji Enstitüsünde doktora tezi için farelerin tek bir antijenle bağışıklamasına yanıt olarak üretilen antikor çeşitliliğini değerlendiriyordu. Kültürünü yaptığı ölümlü B hücrelerinden antikorlar elde etmeye çalışıyordu, fakat B hücrelerinin kültürlendiğinde gösterdiği aşırı narinlik ve kısa ömrü olması sebebiyle çok az başarı elde etmiştir. Köhler ve Milstein aynı çalışma ortamda çalışmaya başladıktan sonra Köhler, hem ölümsüz, hem de spesifik bir antijeni tanıyan tek bir antikor üreten B hücreleri ile miyeloma hücreleri arasında gerçekleştirilecek füzyon proseslerini geliştirdi [204]. 1984'de Milstein, Köhler ve Jerne, monoklonal antikor üreten hibridomaları üretmek için keşfettikleri yöntemler için Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülünü almışlardır. Köhler ve Milstein'ın bu keşiflerinin patentini almamışlardır. Böylece hibridoma teknolojisi hem akademisyenler hem de endüstri tarafından kilometre taşı olarak kullanılarak gelişmiştir. Serbest erişiminden ve yüksek düzeyde epitopa spesifik bağlanma reaktifleri üretme gücünden dolayı, hibridoma teknolojisi spesifik antijenlere karşı fare antikorları elde etmek için kısa sürede standart bir yaklaşım haline gelmiştir.

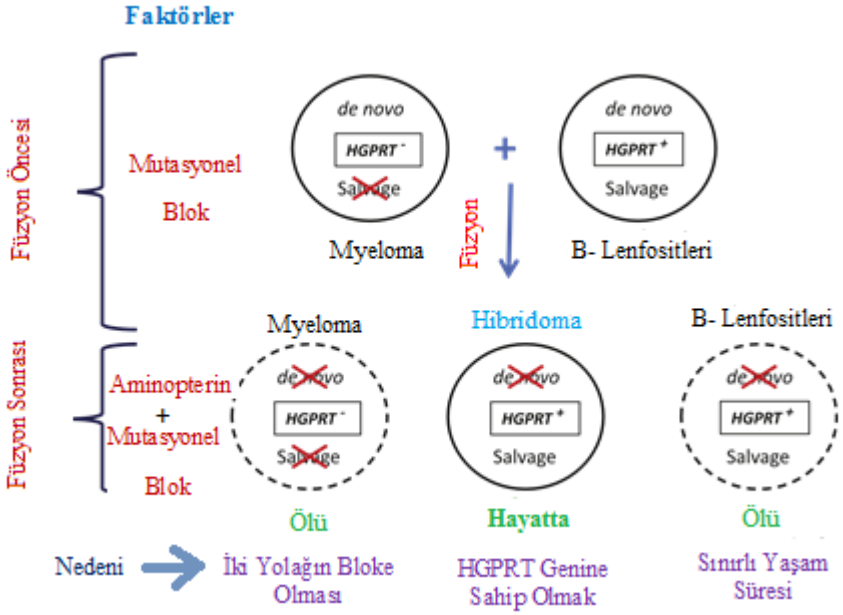
### 2.11.1 Hibridoma Teknolojisinin Prensipleri

Hibridoma üretiminin ilk basamağı, hayvanların ilgili antijenle bağışıklanması ve immün cevabın arttırılması için antijenin adjuvan ile karıştırılmasını içerir. Geleneksel bir immünizasyon 3 aşamada gerçekleşir; 1) Antijenin hazırlanması, 2) Hayvanların bağışıklanması ve 3) Antikor titresinin belirlenmesi.

Klasik bir immünizasyon; antijenin Freund adjuvantıyla aşılanmasıyla başlar ve 14. ve 22. günlerde düşük Freund oranı verilerek antijenin etkinliği arttırılır [205]. İmmünize olan hücreler B hücrelerinin aktive olmasıyla antikor üretirler [195]. İmmün cevabın yeterli düzeyde olan hayvandan, immünizasyon için kullanılan antijene karşı antikor salgılayan B-lenfositleri içeren dalak izole edilir. Çünkü lenfositler için en iyi kaynak dalaktır. Dalak izole edilecekken fare, servikal dislokasyonla öldürülmeli ve işlemden önce cilt yüzeyi % 70'lik etanol ile sterilize edilmelidir. Dalak, steril koşullar altında cerrahi olarak çıkarılmalıdır. İzole edilen dalak uygun fizyolojik tamponlar ile taşınır. Dalaktaki B hücreleri (veya alternatif olarak periferik B hücreleri, lenf nodlarından ve / veya kemik iliği B hücreleri) toplanır ve SP2/0, NS0 ya da FO hücre hattı gibi ölümsüz fare miyeloma hücreleri ile polietilen glikol varlığında belli oranda füzyona uğratılır [205], [206]. PEG dışında Sendai virüs ile de füzyon gerçekleştirilebilir [207].

Hibrit hücreleri seçmek için, nükleotid sentez yolağının önemi ortaya çıkmıştır. Kurtarma yolaklarını etkileyen ilgili enzimlerde yapılan bir mutasyon, memeli hücre kültürlerinde istenilen hücrenin canlılığını koruması için kullanılan yaygın bir yöntemdir. En yaygın hedef enzim hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) 'dir. HGPRT enzimi kurtarma yolunda (salvage pathway) kullanılan önemli bir enzimdir. HGPRT enzimine sahip hücreler normal şekilde büyüyebilir ve de novo yolunu kullanarak DNA sentezi yapabilir. De novo sentez yolağında ise nükleik asitler tekrardan üretilir. B hücrelerinin kültür ortamında sınırlı bir ömre sahip oldukları ve bir süre sonra ölecekleri bilinmektedir. Fakat miyeloma hücrelerinin kültür ortamından elimine edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, miyeloma hücreleri HGPRT enziminden yoksun hale getirilmelidir. Kültür ortamı ise yalnızca HGPRT enzimine sahip hücrelerinin büyümesini destekleyen bir ortamda yapılmalıdır. Myeloma hücreleri 8-azaguanin'e maruz bırakılarak HGPRT enziminden yoksun hale getirilir. HGPRT (-) myeloma

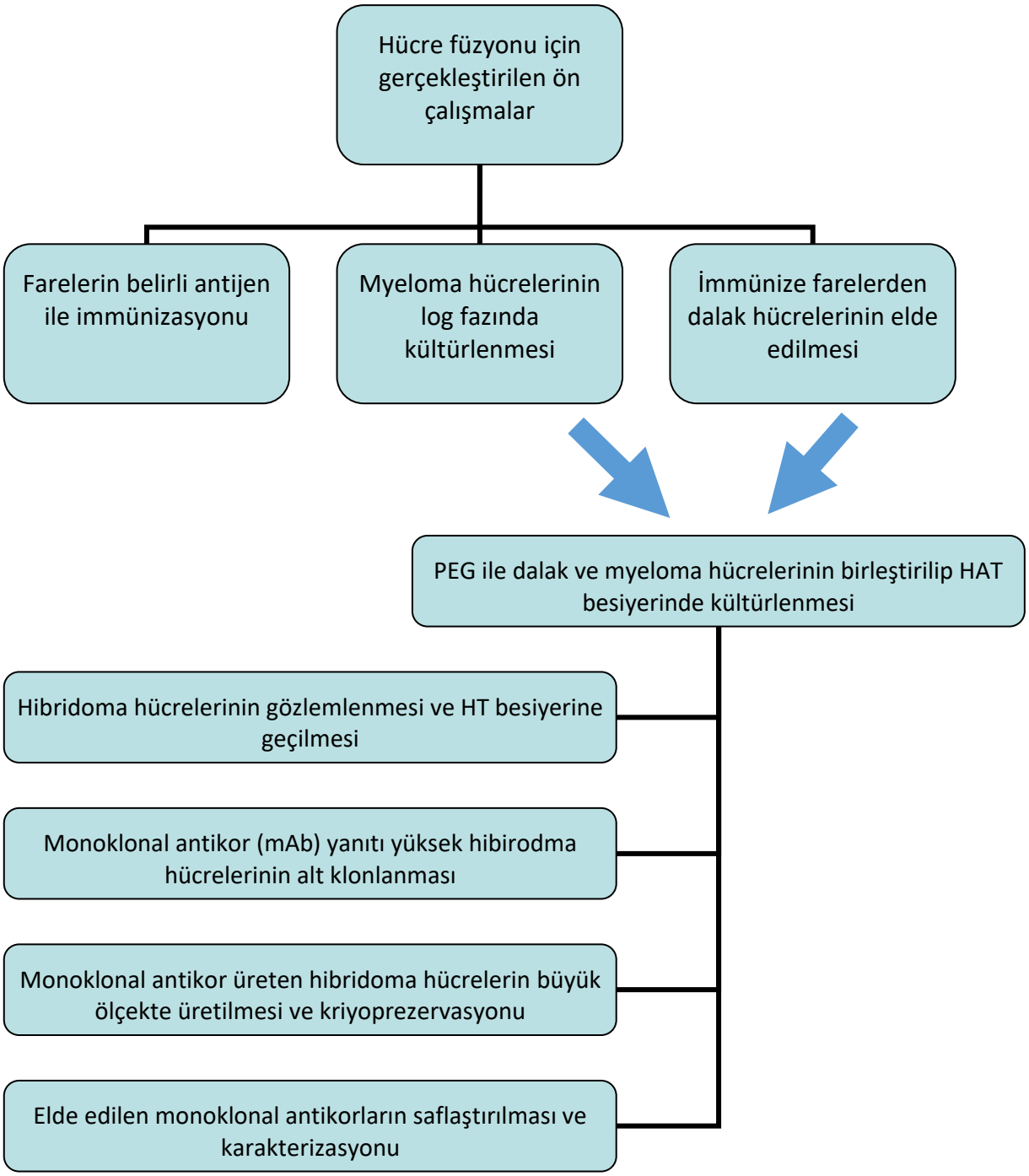
hücreleri ile HGPRT (+)B hücreleri kaynaştırılır. Füzyon sonrasında, ortamda farklı hücre popülasyonları vardır: (1) kaynaşmamış B-lenfositler, (2) kaynaşmamış myeloma hücreleri ve (3) kaynaşmış hücreler (veya hibrid hücreler). Buradaki en önemli nokta antikorlar üreten melez hücreleri seçmektir. Bu sorun ise ortama seçici besiyeri ilave edilerek ortadan kaldırılmıştır. *MAb* üretimi için kullanılan seçici ortam HAT Ortamı (Hipoksanthine, Aminopterine ve Thymidine) olarak bilinir. Aminopterin de novo yolunu engellerken, kurtarma yolunda ise nükleotid biyosentezi için hipoksantin ve timidin gereklidir [195].




Şekil 2. 9 Füzyondan sonra meydana gelen hücre seçilimi [195]

Füzyon öncesinde kullanılan HGPRT (-) myeloma hücreleri kurtarma yolunu kullanamaz. Füzyon sonrasında hibridoma hücreleri, B-lenfositlerinden HGPRT + genini alırlar. Bu hücreler seçici ortamda (HAT ortamı) ile kültürlendiğinde, HAT ortamındaki aminopterin de novo yolunu bloke eder, ancak hibridoma kurtarma yolunu kullanarak nükleotid sentezine devam ederek hayatta kalabilir [195]. HAT (hipoksantin-aminopterin-timidin) destekli besiyeri ortamında, HGPRT enziminden yoksun olan miyeloma hücreleri eğer füzyona uğramadıysa ortamda ölürler [208]. Böylece füzyonla birlikte, ölümsüz, antikor üreten hibridoma hücreleri oluşturulur [207]. Sıçanlarda, sıçan miyeloma hücre hattı Y/0, füzyon partneri olarak kullanılır [206], [209]. Sonuç olarak hibridomalar, B hücrelerinden gelen aktif HGPRT genine sahiptirler. Oluşan

hibridomaların seçici olarak çoğaltılması için HAT ortamında büyürler [208]. Füzyon sonrasında hücreler oldukça narin hale gelir, bu nedenle daha ileri adımlar çok dikkatli yapılmalıdır. Üretilen hibridomalar alt klonlama işlemine tabii tutularak spesifik tek bir klona ait monoklonal antikor üreten hibridoma hücreleri elde edilir. Alt klon kültürden üretilen metabolitlerin antijene olan spesifikliği belli aralıklarla ölçülür. Kültürden istenilen antikor bulunduğu takdirde, hibridoma hücre hattından V bölgeleri klonlanarak da rekombinant yapılabilir [210]. Antikor ürettiği tespit edilen alt klon kültürden elde edilen supernatantlar antikor saflaştırılması için depolanırken, hibridomalar *in vitro* veya *in vivo* olarak büyük ölçekte üretilir. Yeteri kadar antikor elde edilen hibridomaların sonradan tekrar kullanılabilmesi için kriyoprezervasyonu gerçekleştirilerek sıvı azotta saklanır.




Şekil 2. 10 Hibridoma teknolojisi kullanılarak üretilen monoklonal antikorların üretimini gösteren akış diyagramı [193]

## 2.12 Hibrid Hücrelerinin Çoğaltılması

*mAb* üretiminde hem *in vivo* hem de *in vitro* yöntemler kullanılır. Pazarlanan tedavi edici ürünler haricinde metodun belirlenmesinde genellikle maliyet önemlidir. Ekonomik açıdan genelde *in vivo* daha avatajlıdır [211]. Büyük ölçek monoklonal antikorların (*mAb*) üretiminin hızlanması, insanlarda ve hayvanlarda kullanılan tıbbi teşhislerde, tarımda ve ayrıca insanlardaki terapötik prosedürlerde kullanımı da orantılı olarak arttırmıştır. Analitik amaçlar için *mAb*'ın mikro veya miligram miktarları yeterli olmaz. Bunun için gram veya bazen kilogram miktarında elde edilmesi gerekir. Bu miktarları üretmek için *in vivo* çalışmalar etik yönünden uygun olmamaktadır. Bu yüzden *mAb*'lar biyoreaktörlerde esas olarak üretilmektedir [212].

İn vitro büyük ölçek kültür için ise avantajlı bir çok durum söz konusudur. Bunlar;

1) Fare gövdesinde üretilen antikorlarda kontamine proteinlerin bulaşma riski oldukça yüksektir. Bu yüzden hücre kültürü süpernatrallarının kullanılması daima gereklidir. Saf bir monoklonal antikor sadece serumsuz kültürden elde edilebilir.

2) Serumsuz hücre kültürünün önemli bir avantajı, antikorların daha kolay saflaştırılabilmesidir.

3) Bir *in vitro* reaktör sistemi, *in vivo* koşullara yaklaşırsa fizyolojik ve fizyokimyasal açıdan son derece verimli olur ve yüksek miktar, yüksek kalite ve ekonomik *mAb* üretimi yapılır. Bu şekildeki mevcut biyoreaktör sistemleri, tekrarlanabilirlik, büyütme, gözetleme ve kontrol açısından önemli avantajlara sahip olur [213].

### 2.12.1 Hibrid Hücrelerinin *İn Vitro* Küçük Ölçek Üretimi

Statik kültür olarak bilinen kültür flasklarında üretilen hibridoma hücreleri, 106 hücreye / ml yoğunluğuna kadar çoğaltılabilir. Bu nedenle pahalı ve çok emek gerektirir, fakat az miktarda *mAb* üretimi için tercih edilen az yer kaplayan bir yöntemdir. Enfeksiyon tehlikesi, özellikle yavaş büyüyen hücreler için nispeten daha büyüktür. Filtreli kültür kaplarında gaz giriş çıkışı olduğundan pH değerinin stabil tutulması daha zordur.

Silindirli şişe kültürlerinde, daha büyük sayıda hücre kültürlenip üretilebilir. Hibridoma hücreleri 0,5 ila 3 rpm arasında kuvvetli bir şekilde çoğalır. Fizyolojik pH'nın doğru

ayarlanması ve bakımı ile ilgili sorunlar ortaya çıkabilir. Kültür aşamasından önce silindir şişeleri $CO_2$ ve maksimum 10 mM HEPES tamponu ilave edilerek stabilize edilir. Bu ön işlemler hücrelerin yüksek canlılık göstermesini sağlar.

Dönen Flasklar (Spinner Flasks), hibridoma hücre kültürü için küçük bir mıknatısa sahip olması yeterlidir. Çoğu hibrit hücreler, kültürün süspansiyon halinde tutulmasını sağlayan karıştırma hızına (50-100 rpm) hassas değildir. Bazı klonlar ise bu koşullara dayanamaz ve mekanik olarak yok olur. Bu sistem için bir çubuk veya büyük bir kürek benzeri küresel bir karıştırıcı kullanılması tavsiye edilebilir ve bunlar dakika da 15-30 devirlik dönüş hızlarına izin verir. Sitostatlarda, daha yüksek hibridoma hücre yoğunlukları elde edilebilir. Sitostatlarda hem hücre hem de antikor üretimi, yüksek bir seviyeye ulaşır. (1 x $10^7$ hücre / ml'den fazla). Optimize edilmiş sitostat kültürlerinde ml'de 40 µg antikor üretilebilir [214].

Katabolitlerin bir kısmı, hücre büyümesi sırasında ortama salınır. Daha öncede belirtildiği gibi amonyak iyonları, yüksek konsantrasyonlarda sitotoksiktir. Bunun gibi katabolitler kültürden sürekli olarak uzaklaştırılırsa, hücreler istenen *mAb*'yi oldukça uzun süre üretebilir. Hücre ortamından toksik maddelerden arındırmanın basit bir yöntemi de diyalizdir [215], Bu yötemde, hücreler bir diyaliz tüpüne doldurularak bir kültür şişesine (flaska) yerleştirilir [216] Adamson ve ark. [217] bu işlemle, 1.5 X $10^7$ hücre / ml'ye varan hücre yoğunluğuna ulaşarak dönen (spinner) yığın kültürlerine kıyasla daha yüksek antikor konsantrasyonları elde ettiler.

Poliamın çapraz bağlı alginattan yapılmış jel mikrokürelerine hibridoma hücrelerinin dahil edilmesi aslen pankreastaki adacık hücrelerinden baz alınarak tasarlanmıştır. Bu tasarım, hibridoma hücreleri için yüksek verimlilikle (> 1 X $10^7$ hücre / ml) sağlamıştır [218], [219], [220], [221]. Birden çok kapsülleme yöntemleri vardır. Bir yöntemde hücreler bir sodyum aljinat çözeltisi ile karıştırılarak Ca$KL_2$ çözeltisine damlatılır. Burada damlalar jelleşir ve bir polimer (ör., Poli-L-Lisin) ile çevrelenir. Bu polimer hücre etrafında pasif bir zar oluşturur. Aljinat jelini sıvılaştırmak için bir sodyum sitrat çözeltisi kullanılarak ve hücreler polimer küresinde (mikrokapsül) kalacak şekilde durulanır. Kültür sonunda kapsüller ortamdan basit sedimantasyonla ayrılır, membranlar açık olarak kırılır ve *mAb* içeren süpernatant, santrifüj edilerek elde edilir.

Mikrokapsüllerdeki hücrelerin kapsüllenmesi fazla teknik çaba gerektirdiğinden, bu yöntem şimdiye kadar laboratuar üretimi için herhangi bir büyük ölçekte kullanılmamıştır.

### 2.12.2 Hibrid Hücrelerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi

*MAb*'ler için beslemeli hücre kültürü proseslerinin gelişimi son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. Artışın temelinde iki önemli faktör vardır [222] (i) doğru büyüme özelliklerine ve yüksek özgül verimliliğe üretken hücre hatları üretmek ve (ii) reaktör çalışması boyunca yüksek ve devamlı canlı hücre yoğunluğu sağlamak için besiyeri ve beslenme stratejilerinin daha iyi anlaşılması. Hızlı büyüme ve yüksek spesifik üretkenliğe (Qp) sahip hücre hattının oluşturulması, hücre kültürü üretim sürecini geliştirmek için temel oluşturmaktadır. İn vitro kültüre ilave edilen destekleyici kimyasallar hücre hattının stabilitesi ve büyüme kabiliyetini arttırır [223]. Etkili ekspresyon sistemlerinin kullanımı [222], [223] yüksek üretken bir hücre hattı oluşturmak için bir ön şarttır. Aşamalı olarak hibridoma kültürlerinin özelliklerini izlemek için 96 gözlü plakalardan, çalkalamalı şişelere hatta küçük biyoreaktörlere geçilir [224].

Büyük ölçekli hücre kültürü işlemlerinde, boyut ve / veya hacim olarak kademeli büyütme yapılarak çalkalayıcı flasklara veya dönen flasklara geçilir. Tek kullanımlık kültür malzemeleri biyoreaktörlere geçiş sürecinde yaygın şekilde kullanılır. Hücre kütlesi biyoreaktöre aktarılacak düzeye gelinceye kadar büyütülür. Beslemeli reaktörler hücre büyümesi ve ürün üretimi için en yaygın kullanılanıdır. Bu sistemde biyoreaktörde bulunan besin maddelerini desteklemek için küçük miktarda besin ilavesi gerekir. Çözünmüş oksijen, pH, sıcaklık, oksijenin kütle transferi ve $CO_2$ üretimi biyoreaktörde sürekli kontrol edilir.

Serum içermeyen ortamların kullanılması, yüksek hücre kültürü titrelerinin elde edilmesine olanak sağlar. Maya veya bitki kaynaklarından elde edilen hidrolizatlar sıklıkla hücre kültürü ortamına ilave edilmiştir. Bu durumun neticesinde, büyük ölçekli işlemlerde serum kullanımını etkili bir şekilde değiştirmiştir. Amino asitler gibi metaller gibi işaretleyici ortam bileşenlerinin hücre kültüründe ürün verimi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir [225], [226]. Gaz alışverişi verimliliğinin korunması, hücre kültürü ölçeklendirilmesinin başarılması için çok önemli bir kriterdir [227]. *MAb* hücre kültürü

saflaştırma adımlarından önce hücreleri ve hücre artıklarını ayırmak için derinlik ve membran filtrelerinin ardından santrifüj kullanır [228]. Yoğunluk filtreleri, parçacıkları uzaklaştıran membran filtrelerden farklı olarak içinde partikülleri tutabilen lifli bir yatağa sahiptir. Son zamanlarda, derinlik filtrelerinin, partiküllerin uzaklaştırılmasındaki filtrasyon rolüne ek olarak, konakçı hücre proteinleri ve DNA gibi çözünebilir yabancı maddeler için adsorpsiyon özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir [229].

İmmunoglobulin üretimi, hibridomadan hibridomaya farklılık gösterir. Bu yüzden, Fazekas de St. Groth'un (1983) test ettiği hücre dizileri, hücre başına saniyede 500 ile en fazla 8 milyondan fazla Ig molekülü salgılar [214]. Ig sekresyon oranı, hücre sayısı ile orantılı olarak artmaktadır. Genel olarak *mAb* konsantrasyonu, ulaşılabilen maksimum nihai hücre yoğunluğu ile hücrelerin bu yoğunluktaki canlılığı ile doğru orantılıdır [230]. Hücrelerin yüksek canlılık gösterdiği yüksek hücre yoğunlukları, hibridoma hücrelerine besin girişinin ve atık (ölü) hibridoma hücrelerinin kültür sisteminden çıkartılması ile sağlanır. Hücrelere sağlanan besin maddeleri ve katalitik olarak aktif maddeler (amino asitler, vitaminler, koenzimler, hormonlar, peptidler, lipidler, tuzlar, vs.) ve ortamın fizyolojisi (osmolalite, pH, konsantrasyon, çözünmüş oksijen, sıcaklık vb.) hücrelerin gereksinimlerine göre ayarlanmalıdır. Diğer yandan, katabolitlerin uzaklaştırılması, örneğin amonyak veya hücreleri zehirleyebilecek olan toksik bileşenlerin kültür ortamından uzaklaştırılması gerekmektedir [231].

Çizelge 2. 5 Biyoreaktör sistemlerinin monnoklonal antikor üretim kapasitesi [232]

| **Kültür Sistemi /Metod** | **Kültür Tipi** | **Maksimum Yoğunluk** | **Mab Konsantrasyonu** |
|---|---|---|---|
| **Hücre Kültürü Flaskları** | Statik | 0,5 – 1 | 10 – 30 |
| **Dönen Flasklar** | Karıştırmalı | 1 – 2 | 10 - 50 |
| **Diyaliz Tüpleri** | Karıştırmalı | 10 – 20 | 100 – 300 |

Çizelge 2. 6 Biyoreaktör sistemlerinin monnoklonal antikor üretim kapasitesi [232] (devamı)

| **Kültür Sistemi /Metod** | **Kültür Tipi** | **Maksimum Yoğunluk** | **Mab Konsantrasyonu** |
|---|---|---|---|
| **Fermantörler;** | | | |
| **-Reaktör** | Karıştırmalı | 1 - 2 | 10 – 30 |
| **-Bölünmüş reaktör** | Karıştırmalı | 0,5 – 1 | 10 – 30 |
| **-Beslemeli reaktör** | Karıştırmalı | 2 – 3 | 30 – 100 |
| **-Hava kaldırmalı** | Hava Akışlı | 1 - 5 | 100 – 350 |
| **-Dönen filtreli perfüzyon** | Karıştırmalı | 5 - 10 | 300 – 600 |
| **-Enkapsülasyon** | Karıştırmalı | 50 – 100 | 500 – 1000 |
| **İnce Boşluklu Fiber Sistemler** | | 100 - 1000 | 500 - 1000 |
| | | | **İn Vivo 40.000 'e kadar** |

Gerekli *mAb* miktarı, üretim sisteminin doğru seçimi için belirleyici niteliktedir. µg-mg aralıklarındaki miktarlar geleneksel statik doku kültürü şişeleri içinde sorunsuz üretilebilir, dönen flasklar (spinner flasks), içi boş fiber sistemler veya karıştırılmış küçük fermantörlerde mg-g miktarı için uygunken, daha büyük miktarların üretilmesi için, fermantör sistemler kullanılır. Büyük boşluklu fiber sistemler gibi sistemlerin kullanımı kolay ve büyütülebilir olması, daha küçük üretim birimlerinin çoğaltılmasından daha uygundur. Spin filtreli veya ultrafiltrasyon membranlı hava kaldırmalı veya perfüzyon fermenterler de hücrelerin ortam içerisinde kesintisiz akış değişiminde tutulması için uygundur [215], [233]. Biyoreaktöre sadece bir kez hücreler inoküle edilir ve sonraki aşamalarda herhangi bir madde eklenmez. Hücreler genel

olarak maksimum 1-2 x $10^6$ hücre / ml hücre yoğunluğuna kadar büyürler. Yüksek konsantrasyonlardaki toksik katabolitlerin ağırlıklı olarak amonyum iyonları [234] hücrelerin kısa zamanda ölmesine neden olur. Beslemeli reaktörlerde (Fed-batch) prosedüründe, besin maddeleri ve katalitik olarak aktif maddeler sürekli olarak veya aralıklarla ilave edilir, bu da hücre yoğunluğunu ve ürünün verimini arttırır [232].

### 2.12.3 Hibrid Hücrelerinin *İn Vitro* Büyük Ölçek Üretimi

İnce boşluklu fiber sistemler ve fermenterler, laboratuardan endüstriyel boyutlara kadar ölçeklendirme için çok fazla çalışma yapılmasına gerek duyulmayan en önemli biyoreaktör sistemleridir.

İnce boşluklu fiber sistemler, içi boş fiber kılcal membran demetlerinden oluşur. Hücreler, oyuk-fiber modülünün kapiller boşluklarında kolonize olurlar. Uygun bir kültür ortamı, içi boş fiber kılcal damarlardan akarak hibridom hücrelerini besler ve toksik metabolik ürünler uzaklaştırılır [232]. İç boşluklu fiber biyoreaktör, toplamda 500 mg veya daha fazla *mAb* sağlayacak şekilde tasarlanmıştır. Bu sistemlerin kurulabilmesi yüksek maliyet gerektiğinden ancak büyük miktarda *mAb* gerekliyse kullanılır. Boşluklu fiber reaktör birçok laboratuarda başarıyla kullanılmıştır [235], [236], [237]. Birçok üretici firma, hayvan ve insan hücrelerinin kültürlenmesi için tasarlanmış standart veya özel fermenterler tedarik etmektedir. Fermantasyon sisteminin temel özellikleri, paslanmaz çelik kabın ve çevresinin 121 ° C' de sterilize edilmesini ve fermantasyon cihazında sıcaklık, karıştırma hızı, çözünmüş oksijeninin ve pH'ının kontrolünü yapmaya elverişli olmasıdır. Kültürleri iyice karıştırmak için kullanılan yöntemler hassas hücrelere herhangi bir şekilde hasar vermemelidir. Bu, fermantasyon sistemlerinde karıştırma yoluyla veya yönlendirilmiş bir gaz akışı ile başarılabilir. Birinci durumda, hücre kültürü mekanik olarak bir karıştırıcıyla karıştırılır. Tarif edilen çok sayıda karıştırıcıdan, (eğik) bıçak karıştırıcısı ve özellikle de bir gemi pervanesine benzeyen karıştırıcı (deniz çarkı) süspansiyon kültürler için en uygundur. Bu reaktörlerde köpük oluşumu, serum içeren veya protein açısından zengin ortam kullanılıyorsa sorunlara neden olur. Köpük oluşumu ortamdaki biyokimyasal ve fiziksel koşulları değiştirdiğinden hücreler hızlı bir şekilde ölür. Köpük oluşumu, belirli bir dereceye kadar, yani toksisite sınırına ulaşılana

kadar, köpük engelleyici kimyasalların eklenmesi veya kısa bir buhar enjeksiyonu ile engellenebilir [232].

### 2.12.4 Hibrid Hücrelerinin *İn Vivo* Üretimi

*İn vitro* teknikler, *mAb* üretim ihtiyacının % 90'ından fazlasını karşılar. Ancak *in vitro* yöntemlerin etkisiz olacağı durumların var olduğu bilinmelidir. Kültür sürecince hibrit hücrelerin özellikleri değişerek *mAb* üretim ihtiyaçları çeşitlilik gösterir. İn vitro teknikler her duruma uygun değildir. Özellikle hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere özgüllük açısından çok sayıda *mAb* taranması gerekebilir ve bu durumda araştırma aksayabilir. Bazı hibridoma hücre hatları, *in vitro* koşullara iyi uyum sağlayamaz. İn vitro yöntemler ile üretilen hibridomaların % 90'ında *mAb* üretmesine rağmen, sınırlı ve önemli bir başarısızlık oranı vardır [211].

Başlangıçta *mAb* üreten hibridomaları seçmek için *in vitro* koşulların kullanılmasına rağmen, başlangıç kültürü besleyici hücreler gibi davranabilen birçok normal dalak hücresi içerir. Bazı durumlarda devam eden *in vitro* kültür, hibridoma büyümesini desteklemez. Bunun sonucunda, yükselen antikor konsantrasyonu, hibridoma büyümesi veya sekresyonu olumsuz şekilde etkilenebilir. İn vivo çalışmalar genellikle, bir antikorun bir reseptör-ligand etkileşimini bloke etme, mikrobik patojenin bazı yönlerini inhibe etme veya belirli bir hücre türünün lizizini veya apoptozunu indükleme kabiliyetini inceler [211]. *İn vivo* yöntemde, antikor üreten klonlar farelerin periton boşluğuna enjekte edilir ve burada tümör gibi büyümeye başlarlar. Antikorlar, farelerin peritoneal boşluğundaki asit sıvısında hibridoma (tümör) hücreleri tarafından salgılanır [195]. Farenin periton boşluğu, hibridoma hücrelerinin çoğalması için ve dolayısıyla monoklonal antikorların üretimi için en uygun koşulları sunmaktadır. Potter ve Boyce [238] önce tümör hücrelerinin çoğalması için uygun olduğunu açıklamışlardır. Farelerde periton boşluğuna mineral yağ ve mineral yağı adjuvanları enjekte edildikten sonra plazmositom oluşumunu gözlemlemişlerdir. Bu etkinin hibridoma hücrelerinin çoğalmasında da görülebileceği sonucunu çıkarmıştır

*İn vivo* optimizasyon, sadece sürekli üretime gidecek hücre hatları için gereklidir. Ancak *in vitro* optimizasyon, tüm hücre hatları için kabul edilebilir büyüme ve *mAb* üretimi sağlamak için gereklidir. Optimizasyon işlemi ayrıca *in vitro* üretimle ilişkili artan

maliyetlerin önemli bir faktörü olan büyük miktarda tek kullanımlık sarf malzemesi gerektirir [211]. *İn vivo* üretim ve optimizasyonunu etkileyen değişkenler arasında farenin yaşı, cinsiyeti, soyu, aşılanacak hibridoma hücre büyüklüğü ve hacmi yer alır [211], [239]. İn vivo üretilen yüksek titreli monoklonal antikor preparatları, monoklonal antikor üreten hibridoma hücreleri ile intraperitoneal olarak inoküle edilen farelerin asit sıvısından elde edilebilir. Sıvı, hücrelerin enjeksiyonundan sonra birkaç kez toplanır. Isı ile inaktive edilerek titre edilir ve depolanır.

İn vivo üretimde gerçekleşen basamaklar;

1. Hücreleri aşılamadan 1 hafta önce farelere 0.5 - 1 ml Pristane periton içine enjekte edilir.
2. DMEM10 / HEPES / piruvat içeren 175 $cm^{2}$'lik kültür flasklarında hibridoma hücreleri log fazına geçinceye kadar kültürlenir.
3. Kültürü 50 ml'lik falkon tüplerine aktarılarak 1500 rpm'de oda sıcaklığında 5 dakika boyunca santrifüjlenir ve supernatant ortamdan uzaklaştırılır.
4. FBS içermeyen 50 ml steril PBS veya HBSS içinde yeniden süspanse edilerek hücreleri yıkanır ve tekrar santrifüj edilirek supernatant ayrılır. Bu işlem iki kez tekrarlanır ve 5 ml PBS veya HBSS içinde süspansiyon haline getirilir.
5. Toplanan hücreler tripan mavisi ile boynarak sayılır [240].
6. Hücre konsantrasyonunu, FBS içermeyen PBS veya HBSS ile 2.5 x $10^{6}$ hücre / ml'ye ayarlanır. İlk enjeksiyondan yaklaşık 1 hafta sonra [241] Farenin karın boşluğuna hücreler enjekte edilir.
7. Karın tamamen asidik sıvı (genellikle 3-4 hafta) ile dolana kadar aşılanmış farelerin her 3-5 günde bir karın distansiyonu için kontrol edilir. İğne yardımıyla karın bölgesinden asidik sıvı boşaltılır.
8. Toplanan sıvılar, 10 dakika boyunca oda sıcaklığında 2700 rpm'de santrifüjlenir [240].
9. Süpernatantları ileriki çalışmalar için +4°C'de saklanır. Pellet atılır [241]. Toplanan supernatantlar 56°C'deki su banyosunda 45 dakika ısı ile inaktive edilir.
10. *MAb* içeren asitin titresi uygun yöntemle test edilir.
11. 1:10 oranında seyreltilerek 0.45 µm'lik bir filtreden geçirilerek sterilize edilir ve -70°C'de uzun vadede saklanır [240].

Hibridoma hücrelerinin üretiminde kullanılan *in vitro* ve *in vivo* yöntemler karşılaştırıldığında;

*İn vitro* yöntemlerin avantajları;

1. Fare kullanımı azalır,
2. İlaç endüstirisi tarafından büyük ölçek *mAb* üretimi için tercih edilen bir yöntemdir.
3. Yarı geçirgen membran kullanılan *in vitro* yöntemlerde, fare asit sıvısında üretilen konsantrasyonda *mAb* üretilebilir ve fare asitik sıvından gelebilecek kontaminasyon faktörleri içermez [211].

*İn vitro* yöntemlerin dezavantajları;

1. Küçük ölçekli veya orta ölçekli *mAb* üretimi için *in vivo* yöntemlere göre daha pahalıdır [235], [237], [239], [242], [243].
2. Bazı hibridomlar kültürde iyi gelişmez veya kültürde kaybolurlar. Kültür ortamında FBS kullanımı ise ileriki saflaştırma işlemleri için sorun yaratır.
3. Genel olarak, kültür süpernatantları, mililitre başına 0.002-0.01 *mAb* içerir. Bu miktar *in vivo* yöntemlerle elde edilen antikor mktarının altındadır.
4. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA)'ya göre *in vivo* yöntemler için sponsor maliyetinin 2-10 milyon dolar arasına mal olacağını tahmin etmektedir [211].

*İn vivo* yöntemlerin avantajları;

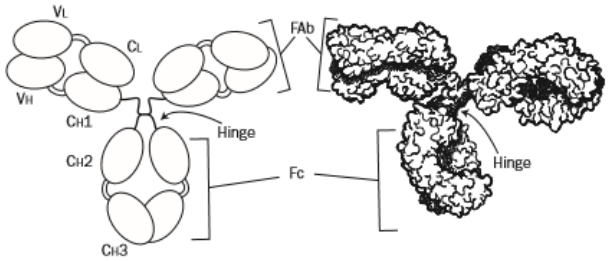
1. Fare asit sıvısında *mAb* yüksek konsantrasyonda üretilir.
2. Maliyeti daha düşüktür.
3. *İn vitro* kültür yöntemlerini öğretme ihtiyacı ortadan kalkar.

*İn vivo* yöntemlerin dezavantajları;

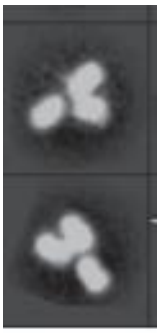
1. Günlük gözlem gerektirir.
2. İn vivo yöntemlerle üretilen *mAb*, saflaştırma gerektirebilecek çeşitli fare proteinleri veya diğer proteinler içerebilir.
3. *İn vivo* yöntemler, farelerde ağrıya ve sıkıntıya neden olabilir [211].

## 2.13 Monoklonal Antikorlar

*MAb* yapısı üzerinde birkaç görüş vardır [244], [245], [246]. *MAb*'ların monomerik birimi 150-180 kDa'lık bir moleküler kütleye sahip ve Y şekline oldukça karmaşık makromoleküllerdir. Antikorların sekonder yapılarının % 70'ini antiparalel β tabakaları oluşturduğu görülmüştür. Bu β tabaklar, iki özdeş hafif zincirde ve iki özdeş ağır zincirde bulunurlar ve her biri yaklaşık 110 amino asit uzunluğunda, β variller şeklinde düzenlenir. Bu alanlar birbirleriyle etkileşime girerek menteşe bölgesi ile bağlantılı kurar. Böylece molekül esnek Y şeklini alır [247].




Şekil 2. 11 Monoklonal antikorların anatomisi [210]



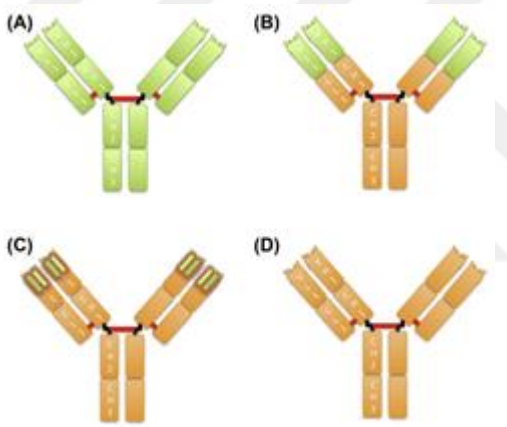
Şekil 2. 12 IgG1 monoklonal antikorun elektron mikroskobundaki görüntüsü [248]

Son 30 yılda rekombinant ve sentetik olmak üzere yeni iki *MAb* tipi geliştirilerek onaylanmıştır. Rekombinant *MAb*'ler, germ hatlarında insan gen lokuslarını taşıyan transgenik farelerde üretilebilir [249]. Bakteriyofaj görüntü tabanlı teknolojiler sayesinde büyük ölçekte yüksek afiniteli antikorlar [250] üretilmiştir. Kimyasal çeşitlilik yaratmak ve doğal *MAb*'lerin hedef antijenlerine spesifik bağlanmanın en temel özelliğini taklit eden nükleik asit esaslı moleküller üretmek için amino asitlerin diğer

biyolojik moleküller tarafından değiştirilmesi ile ilgili başarılı çalışmalar yapılmıştır [251]. Klasik *MAb* ailesinde, konakçı türlerin aralığı, fare-fare hibridomalarından farelere, sıçanlara, hamsterlara, tavşanlara, insanlara, tavuklara ve bitkilerden kaynaklanan mono ve hetero hibridomalara kadar genişler [252].

### 2.13.1 Monoklonal Antikorların Sınıflandırılması

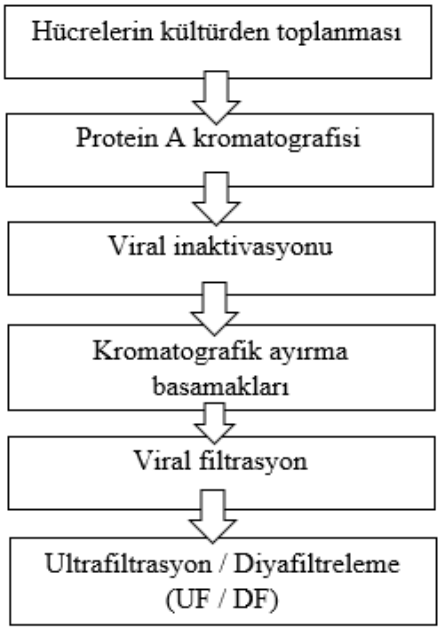
Farklı kaynaklardan ve farklı türlerden elde edilen *MAb*'lar için bir adlandırma kuralı gerekli olmuştur. İsimde bulunan 4 veya daha fazla hece ürün hakkında bilgi vermektedir. *MAb* terminolojisi, monoklonal antikor için "*mAb*" son ekini içerir. "*MAb*" son ekinden önceki bir veya iki harf, insan kaynağı için "u", fare için "o", sıçan için "a", primat ( maymungiller) için "i", kimerik için "xi" ve insanlaştırılmış antikor kaynağı içinse "zu" eki kullanılır.




Şekil 2. 13 Monoklonal Antikorların Sınırlandırılması [253]

Şekil 2.13'te gösterildiği gibi; (A) (Mürin) Fare antikorları tamamen yabancıdır ve modifiye edilmemiştir. (B) Kimerik bir antikorda, sabit bölge insandan modifiye edilir. (C) İnsanllaştırılmış antikorların, insan kaynaklı olarak düzenlenmiş değişken bölgenin bir kısmı vardır. (D) Tam bir insan antikoru, insan kökenli sabit ve değişken bölgeler içerir [253].

### 2.13.2 Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

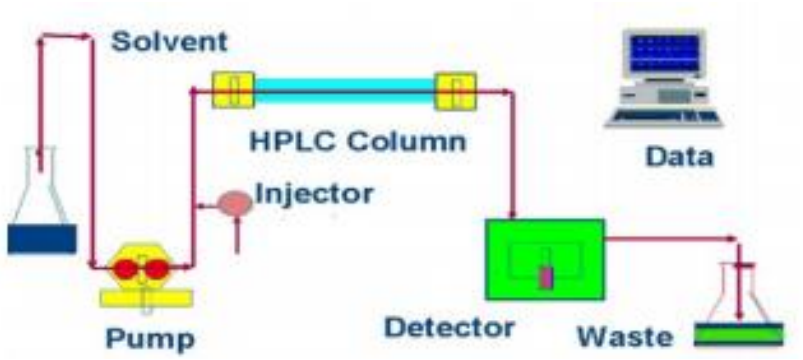



Şekil 2. 14 Monoklonal antikorlar için saflaştırma basamakları [254]

*MAb*'lerin hücre kültürü ortamından verimli bir şekilde toplanması ve saflaştırılması, üretim sürecinin kritik bir parçasıdır ve toplam üretim maliyetlerinin önemli bir bölümünü belirleyebilir [255]. Saflaştırma prosesindeki temel husus saflıktır. Diğer önemli hususlar sürecinin hızıdır çünkü tedavi süreci aksamamalıdır. Bir diğer önemli husus ise genel verimdir. Buna ek olarak, saflaştıma işlemleri, işlemin sağlamlığı, güvenilirliği ve ölçeklenebilirliği de dahil olmak üzere çeşitli üretilebilirlik ölçütlerini karşılamalıdır. Ürünün saflığını, proseslerden gelebilecek kontamine moleküller (örn., konakçı hücre proteinleri, DNA, süzülmüş Protein A ve bazı hücre kültürü atıkları) düşürür. Buna ek olarak, safsızlık durumunda ürünün güvenliğini sağlamak için virüslerden arındırma yeteneğine de sahip olmalıdır [254]. Farmasötik olarak kabul edilebilir saflık seviyelerini elde etmek için diğer kromatografi yöntemleri Protein A kromatografisi ile birleştirilmiştir. Anyon değiştirme kromatografisi ve boyut ayırma kromatografisi, hibridoma hücre kültürü tarafından eksprese edilen monoklonal antikoru saflaştırmak için kullanılmıştır [255]. Aşağı akış prosesinde (saflaştırma proseslerinde) son adım, depolama hacminin düşürülmesi ve ürünün ya da ilaç maddesinin uygun ortmada üretilmesi için ultrafiltrasyon / diyafiltrasyon işlemidir (UF / DF).

Saflaştırma basamaklarında en çok çok kullanılan yöntem Protein A afinite kromatografisidir. Bu afinite kromatografisi, *mAb*'lerin Fc bölgesi ile Protein A ligandı arasındaki spesifik bağlanma afinitesine dayanır. Bu özgüllük, hücre kültürü işleminden gelen konakçı hücre proteinlerinin, DNA ve diğer safsızlıklarının uzaklaşmasına izin verir ve tek bir adımda >% 98 saflık kazandırır. Saflaştırma prosesleri, özellikle de konakçı hücre proteinlerini, DNA'yı ve yüksek molekül ağırlıklı agregatları ilaç maddesinde kabul edilebilir seviyelere indirmeyi hedefler [257]. Protein A afinite basamağındaki bağlanma kapasitesi, akış hızı ve yükleme esnasındaki kalış sürelerinden önemli ölçüde etkilenmektedir [258]. Büyük ölçekli Protein A kromatografisi için bir diğer sıkıntı, sistemde kullanılan reçinenin ömrüdür. Protein A ligandının aşırı pH koşullarına duyarlı olduğu bilinir ve ürünlere bağlanma kabiliyetini zamanla kaybedebilir. Baz temelli ligandlar, yüksek maliyetlerinden ötürü halen yaygın olarak kullanılmamaktadır. Agaroz esaslı Protein A reçinelerinin, yeniden oluşturulması için sıklıkla kullanılan alkaline maruz kaldığında bağlanma kapasitesinde aşamalı bir gerileme, meydana gelmiştir [259]. Hücre kültür süpernatantı doğrudan kolona yüklenerek (nötr bir pH'da) ve ürün, düşük pH'larda kolondan ayrılır [254].

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), klasik kolon kromatografisinden türetilmiştir ve bugün analitik kimyanın en önemli yöntemlerinden biridir [260]. HPLC, örnek içindeki saflığı kontrol etmek, reaksiyon değişikliklerini izlemek, yeni formülasyonları değerlendirmek ve nihai ürünlerinin kalite kontrol / güvencesi uygulamak için tercih edilen bir yöntemdir [261]. HPLC'nin hedefi, numunenin, içindeki maddenin miktar tayinini tespit edip ayırmaktır [262]. HPLC, numunenin enjekte edildiği kolon içindeki gözenekli materyalden (sabit faz) ve kolondan daha yüksek basınçla pompalan sıvı fazdan (mobil faz) oluşur. Hareketli faz kolona yüksek akış hızında verilerek sabit faz boyunca ilerler ve enjekte edilen numuneyi kolon boyunca taşır. Ayırma prensibi, sabit faza olan yapışmaya bağlı olarak çözünen maddenin sabit fazda adsorbe edilmesidir. Ayrışma tamamlandıktan sonra kolondan farklı zamanda ayrılan fraksiyonlar UV ile analiz edilir.




Şekil 2. 15 HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) [263]

Protein A kolonundan elde edilen ürünün düşük pH'da olması ve çoğu *mAb*'ın düşük pH koşullarında çözelti içinde dengeli olması nedeniyle, virüsleri inaktive etmek için düşük bir pH inkübasyon adımını saflaştırma prosesine dahil edilir. Düşük pH inaktivasyonu, çeşitli biyoteknoloji ürünleri için retrovirüsleri başarıyla inaktive ettiği gösterilmiştir [264]. Düşük pH'larda stabil olan çoğu monoklonal antikor için, retrovirüslerin tam inaktivasyonunu düşük pH koşullarında sağlanabilir ve bu pH aralığında inkübasyon gerçekleşir [265]. pH inaktivasyonunun ardından, ürün daha dengeli bir pH aralığına taşınması için nötralize edilir.

Protein A kromatografik basamağından sonra yapılan kromatografik çalışmalar, düşük seviyelerde kalan, konakçı hücre protein safsızlıklarını, yüksek molekül ağırlıklı agregatları, DNA ve süzülmüş Protein A'yı ürünün örnekten uzaklaştırmasını amaçlar. Genellikle, katyon değiştirme kromatografisi (CEX), anyon değişim kromatografisi (AEX) ve hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC) kullanılır.

Çizelge 2. 7 Belirli türdeki istenmeyen moleküllerin uzaklaştırılması için kullanılan kromatografik yöntemler [254]

| **Safsızlık** | **Kromatografik Yöntem** |
|---|---|
| **Büyük moleküller ( agregatlar)** | Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC), Katyon değiştirme kromatografisi (CEX) |

Çizelge 2. 8 Belirli türdeki istenmeyen moleküllerin uzaklaştırılması için kullanılan kromatografik yöntemler [254] (devamı)

| **Safsızlık** | **Kromatografik Yöntem** |
|---|---|
| **Konak hücrenin potein yapılı safsızlıkları** | Anyon değişim kromatografisi (AEX), Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC), Katyon değiştirme kromatografisi (CEX) |
| **Kolondan kopmuş Protein A** | Hidroksiapatit (HA), Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC), Katyon değiştirme kromatografisi (CEX) |
| **Viral temizleme** | Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC), Katyon değiştirme kromatografisi (CEX), Hidroksiapatit (HA), Anyon değişim kromatografisi (AEX) |

Düşük pH'da tamamlanan viral inaktivasyon adımını tamamlamak için viral filtrasyon işlemi yapılır. Viral filtreler, gözenek boyutlarına göre (retroviral (<50 nm) ve parvoviral (<20 nm)) sınıflandırılabilir [266]. Viral filtreler, tekrarlanan kromatografik basamaklarından birini takiben saflaştırma prosesinde bulunur. Kullanılan viral filtre tipleri moleküller arasında titre edilebilirken, kullanılan filtrelerin yeri ve boyutu ürüne göre değişkenlik gösterir. Saflaştırmanın tamamlanmasının ardından, ürünün kendi tamponuna aktarılarak depolanması gerekir [267]. Bu işlem, bir ultrafiltrasyon / diyafiltrasyon düzeneği kullanılarak gerçekleştirilir. Kullanılan membran türü, zar içine uygulanan basınç, çapraz akış hızı ve diafiltrasyonun gerçekleştirildiği konsantrasyon, tüm *mAb*'ler için farklıdır.

### 2.13.3 Monoklonal Antikorların Karakterizasyonu

Antikorların karakterizasyonu, antikorların sınıfını, bağlanma kinetiğini, epitop spesifikliğini, çapraz reaktivitesini ve antikor afinitesini belirlemede önemli rol oynar. Çizelge 2.7' de, bu özellikleri değerlendirmek için kullanılan bazı teknikler gösterilmiştir. Antikor sınıfının ve alt sınıfının belirlenmesi, radyoimünoassay, ELISA ve alt sınıflara özgü antikorlarının kullanıldığı immün çöktürme işlemleriyle yapılır. Bunlar ticari olarak antikor izotipi kitleri formunda bulunurlar. Monoklonal antikorlar söz konusu olduğunda, antikor sınıfının belirlenmesi, antikorun gerçekten monoklonal olduğunu kanıtlamaz. Bununla birlikte, hibridomadan üretilen bir antikor, belirlendiği alt sınıf türünde spesifik monoklonal davranışına sahipse, antikorun monoklonalite sergilediği varsayılmıştır. Antikor spesifikliği, ELISA, RIA, BIAcore, Western ve Dot Blot analizleriyle antijen ve diğer yapısal olarak benzer antijenlerle çapraz reaktivite çalışmaları yapılarak belirlenir. Antikorun spesifik antijenine gösterdiği afinitesi ELISA veya biyosensörler kullanılarak araştırılabilir. BIAcore, yüzey plazmon rezonansı (SPR) teknolojisi kullanılarak biyomoleküller arasındaki bağlanma etkileşimleri üzerine gerçek zamanlı nicel veri sağlayan bir testtir. Aynı zamanda BIAcore, etiketleme gerekmeksizin biyomoleküler etkileşimleri incelemek için kullanılabilen gerçek zamanlı bir biyosensördür. Antikor-antijen etkileşimi BIAcore kullanılarak incelenebilir, bu nedenle bağlanma ve ayrılma kinetiği hakkında önemli bilgiler sunar [193].

Çizelge 2. 9 Monoklonal antikorların karakterizasyonunda kullanılan yöntemler [193]

| **Karakteristik** | **Teknik** |
|---|---|
| Antikor spesifikliği ve çapraz reaktivite | Farklı antijenlere karşı ELISA, RIA, BIAcore, Western ve Dot Blot analizi |
| Antikor afinitesi | Kinetik çalışmalar, BIAcore |
| Depolamadaki kararlılığı | Depolamadan sonra geri kazanılan titrenin testi |

Çizelge 2. 10 Monoklonal antikorların karakterizasyonunda kullanılan yöntemler [193] (devamı)

| Karakteristik | Teknik |
|---|---|
| **Monoklonalite** | Çapraz adsorpsiyon çalışmaları, Alt klonlama ve analiz, Flow sitometri |
| **Antikor sınıfı / Alt sınıfı** | İmmün Çöktürme, RIA, ELISA |

Western Blot; Bir protein varlığını tanımlamanın yanı sıra, incelemek için kullanılan sisteme bağlı olan örnekler arasındaki protein konsantrasyonundaki değişiklikleri de tanımlar. İmmünoblot lekeler yarı kantitatif bir analiz olarak bilinir. Çünkü lekeler arasında büyük farklılıklar vardır (transfer verimliliği, kuyu başına aynı miktarda protein yüklenmesi, yıkama süreleri) İmmünoblotting işlemi, protein ekstraksiyonu ile başlar. Ardından bir poliakrilamid jel dökümü ve numunelerdeki proteinlerin boyutuna göre ayrılması (SDS-PAGE), proteinlerin jelden bir membrana aktarılması ve bloke etme basamaklarını içerir. Ancak deneyi çalıştırmadan önce, ne kadar antikorun kullanılacağı bilinmesi gerekir [268].

(Dot-Blot) Nokta-İmmün-bağlayıcı Testi, nitroselüloz selüloz membran (NCM) disklerinin (1 cm çapında) antijenin yerleştirilmesini ve 12 saat boyunca 4 ° C'de inkübe edilmesini gerektirir. Disklere standart bloklma ve bağlama prosedürleri uygulanır ve pozitif bir reaksiyon, nitroselüloz selüloz membran disklerinin orta bölümünde çözünmeyen bir mor rengin oluşmasıyla gösterilir [269].

### 2.13.4 Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları

Öncelikle antikorlar, patojenleri nötralize ederek konakçıyı korumak için vücuda salınırlar. Antikorlar bir hayvanı işgalcilere karşı koruyabilirse, benzer şekilde antikorlar ekojen olarak verildikleri takdirde diğer hayvanları aynı enfeksiyonlardan koruyabilecekleri hipotezi ileri sürülmüştür. Zamanla, antikorların diğer uygulama

alanları kabul edilerek genişlemiştir. Ancak monoklonal antikorların keşfi, antikor uygulamalarında devrim yaratmıştır [270].

Monoklonal antikorlar çeşitli hastalıklar için teşhis, tedavi, araştırma reaktifleri ve ilaç hedefleme ajanları olarak kullanılmıştır. Hibridoma teknolojisi, rekombinant DNA teknolojisi ile birlikte, kimerik antikorların, insanlaştırılmış antikorların, antikor yapılarının ve spesifik antikorların geliştirilmesine yol açmıştır. Monoklonal antikor üretim teknolojisinin geliştirilmesi ve istenen niteliklere (özgünlük ve yüksek afinite gibi) sahip özel olarak hazırlanmış antikorların üretilmesi sonucunda monokloanl antikorlar bilim insanları tarafından kullanılabilir hale geldi. Monoklonal antikorlar, hem teşhis hem de tedavi için tercih edilen poliklonal antikorların yerini almaya başlamıştır [271]. Genel olarak antikor uygulamaları; tedavi edici, analitik ve diğer uygulama alanları olmak üzere 3 kategoride incelenir.

#### 2.13.4.1 Tedaviye Yönelik Kullanım Alanları

Yüksek özgünlüğü ve aynı monoklonal antikor özelliklerinin tekrar tekrar üretebilmesi nedeniyle immünoterapötik ajan olarak *mAb*'lar iyi bir seçimdir. Terapötik *mAb*, klinik çalışmalarda ve çok sayıdaki makalede [272], [273], [274] kapsamlı olarak incelenmiştir. *MAb*'ın diğer bir avantajı, çeşitli ajanlarla (örn., ilaçlar, radyoaktif işaretleyiciler, toksinler, işaretleyiciler, vb.) konjuge olabilmesidir. Konjuge *mAb*, aşağıdaki nedenlerden ötürü terapötik maddeler olarak kullanılabilir: (1) özgüllüklerinden dolayı spesifik hedeflere bağlanarak etki edebilir; (2) yüklerle konjuge edildiğinde, yükü belirli hedeflere iletilebilir. *MAb*'ın kanser tedavisinde kullanılmasının nedeni de budur. Toksin ile konjuge antikor kullanıyorsa, yapılan işlem bir immüno-toksin olarak tanımlanabilir. Benzer şekilde, radyoaktif işaretleyici antikorun kullanılması radyo-immünoterapi olarak bilinir.

#### 2.13.4.2 Kanser Tanısında Monoklonal Antikorlar

Tanı amaçları için, pek çok monoklonal antikor bir gamma yayıcıya benzetilir. Radyasyon, hücrelerin çeşitli katmanlarını tespit etmek amacı ile nüfuz edebilir. En yaygın olarak kullanılan radyoizotop; teknetyumdur (Tc99m). Bazı monoklonal antikorlar yaygın olarak tanı için; CSE-tarama (kalın bağırsak kanserinde yüksek

seviyelerde belirlenip saptanan fare karsinoembriyojenik antijen (KEA) monoklonal antikorları), Indimacis 125 (yumurtalık adenokarsinonda belirlenip tümör antijeni CA-125 saptanan fare monoklonal antikorları) ve şu anki diğer tanı görüntülemelerde kullanılır.

#### 2.13.4.3 Kanser Tedavisinde Monoklonal Antikorlar

Monoklonal antikorlar, radyoaktif izotoplar ya da zehirli kimyasallarla, ilaçlar ve ön ilaçlar ile direkt olarak tümörlerle birleştirilip sitotoksik taşıma kapasitelerini geliştirmek için de kullanılabilir. Monoklonal antikorlar bir radyoaktif maddeye, ilaca ya da toksik bir maddeye bağlanır. Monoklonal antikorlar, üzerine yüklenen bu maddeleri kanser hücrelerine vermek için hedeflenen bir ajan gibi kullanılır. Konjuge monoklonal antikorlar hedef antijeni bulup, bağlanana kadar vücut içerisinde dolaşır. Bu durum vücudun diğer bölümlerindeki sağlıklı olan hücreler üzerindeki zararını azaltır.

Konjuge monoklonal antikorlar hangi yapıya bağlandıklarına göre pek çok farklı tiplere ayrılırlar;

- Monoklonal antikorlar kemo-işaretlenmiş gibi adlandırılan kemoterapik ilaçlara bağlanırlar. Örneğin, brentuxi*mAb* vedotin (Adcetris) FDA tarafından kabul edilen kemo-işaretlenmiş antikorlar, B ve T hücrelerindeki CD30 antijeni bulunması amaçlar. Monomethyl auristatin E (MMAE) olarak adlandırılan monoklonal antikor bir kemoterapi ilacına bağlanır.
- Monoklonal antikorlar, radyoizotoplara bağlanırlar. Ibritumo*mAb* tiuxetan (Zevalin) ve tositumo*mAb* (Bexxar) radyoaktif işaretli monoklonal antikorlara örnektirler. Bu antikorların ikisi de direkt olarak CD20 antijenine karşıdır; ancak her biri farklı bağlayıcı radyoaktif moleküllere sahiptirler.
- Monoklonal antikorlar immunotoksin olarak isimlendirilen moleküllere tutturulurlar. İmmunotoksinler, kemo-işaretli ve radyoaktif işaretli monoklonal antikorların yarattığı sitotoksik zehirlere sahiptirler.

Hedef hücrelere ilacın seçici olarak verilmesi için, ilaçların ve ön ilaçların pekçok tipleri monoklonal antikorlara bağlanır ve tümör yerlerine karşı seçici bir şekilde hedef alınmış olunur. Kemoterapik ilaçlar örneğin adriamycin, auristatins, methotrexate, doxorubicin ve

önilaçlar monoklonal antikorlara bağlanır ve seçici bir şekilde tümör yerlerine ulaşarak başarılı bir hedefleme gerçekleştirilir [195].

#### 2.13.4.4 Analitik Kullanım Alanları

Monoklonal antikorların, yüksek özgünlükleri nedeniyle çeşitli analitik uygulamalar için mükemmel bir seçim olduğu zamanla ortaya çıkmıştır. Bu uygulamalar; laboratuvar bilgilerinin analizinden, teşhis testlerine, klinik ve patoloji laboratuvarına kadar geniş bir yelpazede kullanılır. Monklonal antikorların gelişimi ve teknolojinin ilerleyişi ile işaretleyici tiplerinin çeşitliliği ile immunolojik teşhisde monoklonal antikorların değerini arttırmıştır. Günümüzde, bu testler çeşitli hastalıkların tanısı ve tedavisi için yaygın bir şekilde kullanılmasından dolayı çok güvenilir hale gelmiştir. Günümüzde, immünolojik tanı testleri saha koşullarında bile direkt olarak kullanılabilir. İmmunolojik teşhis testlerinin alan testlerindeki bazı örneklerine HIV ve hamilelik testleri örnek olarak verilebilir. Bir laboratuvar çevresindeki monoklonal antikorların en yaygın analitik kullanımlarına; Western Blot, radyolojik immuno analizler, Ouchterlony'nın İkili Difüzyonu (ODD), Radyal İmmunodifüzyon (RID), Enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA), Floresan İlişkili Hücre Ayırma (FACS), İmmünohistokimya (IHC), İmmünofloresans örnek olarak gösterilebilir.

#### 2.13.4.5 Diğer Kullanım Alanları

Antijen-antikor etkileşimlerinin tersinir reaksiyonlarının karakteristik özellikleri antikorların hazırlayıcı uygulamaları için teşvik edici hale gelmiştir. Bu tür uygulamalar ile, herhnagi bir yapıya bağlı bir ürünün, ürüne özgü antikorları kullanarak karmaşık bir karışımdan izole edilebilmesi ve saflaştırılması gerçekleştirilir. Saflaştırılacak ürünü içeren kompleks karışım, bir matrise tutturulur, antikorlar ile karıştırılır ve ürün antikora bağlanır. Bağlanan ürün (antijen-antikor kompleksi), tamponun pH'ının veya iyon konsantrasyonunun değiştirilmesiyle ayrılırr ve ürün toplanır. Bu yöntem immuno-arıtma ya da immuno-zenginleştirme adıyla da bilinir. Bu FACS ve MACS gibi çeşitli uygulamalar için laboratuvarlarda kullanılır. Bu method birçok endüstriyel uygulamalara entegre edilebilme özelliğine sahiptir [195].

#### 2.13.4.6 Leishmaniasis'in Tanısında Monoklonal Antikorların Kullanımı

Leishmania'nın serolojik tanı kapsamında (antikor tespitine bağlı olarak) parazitolojik tanıda alternatif bir yöntem olarak görünmektedir. VL'nin teşhisi için ELISA, [29], [275] dot ELISA [276], [277] ve indrekt ELISA [30], [278], [279], [280] gibi pekçok serolojik teknikler geliştirilmiştir. Bu tür tanı yöntemlerinin duyarlılığı ve özgünlüğü, kullanılan antijen türüne, kaynağına ve saflığına bağlıdır. *Leishmania* antijenlerinden bazıları, diğer mikroorganizmalarla paylaşılan çapraz reaksiyona giren ortak epitopları vardır. [281], [282], [283] VL tanısında, idrarda antikorun saptanmasını, İslam ve ark. [27] ELISA sistemi ile VL hastalarının idrarında IgG bulgularını % 95 duyarlılık ve özgüllük gösterdiğini bulmuşlardır. Ancak antikor saptama analizinde bir takım sorunlar yaşanmaktadır: (1) asemptomatik enfeksiyonlarda pozitif olabilirler (2) pek çok serolojik testte olduğu gibi, mevcut ve geçmiş enfeksiyonların ayrımı kolay yapılamaz.

Antikor tespitine bir alternatif olarak, idrar veya serumda antijen tespit edilmesi, paraziter enfeksiyonların tanısında yeni bir yaklaşım meydana getirmiştir. Müdahale olmayan bir teknik olarak idrarda antijen tespiti çeşitli paraziter hastalıkların teşhisinde kullanılmıştır [284], [285], [286] *Leishmania*sis'de VL hastalarının idrarında L. donovani çözünür antijeninin ilk tespiti Kohanteb ve ark. tarafından çift yönlü immünoelektroforez kullanarak bulunmuştur [31]. Son zamanlarda, *leishmania*sisde antijen tespiti alanında Attar ve ark. [32] lateks aglutinasyon testi ("KAtex") ile VL hastalarının idrarında antijen varlığını göstermiştir. Eğer idrar, testten 5 dakika önce denatüre edilirse, KAtex'in duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla % 70-80 ve % 100 olacağını vurgulamışlardır. Sonraki çalışmalarda ise, aglütinasyon testi için kullanılan hedef antijenin düşük molekül ağırlıklı (5-20 kDa) bir karbonhidrat antijeni olduğu saptanmıştır [84]. Kısa süre önce başka bir rekombinant protein olan rK28 da bir çalışmada değerlendirilerek, hem ELISA'da hem de hızlı tanı testi (RDT)'de rK39'dan daha iyi performans sergilediği gösterilmiştir [33].

### 2.14 Leishmaniasis'in Kontrolü için Aşı Geliştirilmesi

KL'e karşı koruyucu bağışıklık edinilmesi, uygun bir hücresel bağışıklık tepkisi oluşturması durumunda aşılamanın *leishmania*sis'in kontrolüne yönelik uygulanabilir bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla tasarlanan, birinci nesil aşılar, virülansı, uzun süreli

kültür, γ-radyasyon, kimyasal mutajenez veya gen inaktivasyonu ile öldürülmüş veya zayıflatılmış parazitleri içerir. Az miktarda zayıflatılmış organizmalarla enjeksiyon bazen doğal enfeksiyona karşı koruyucu bir Th1 yanıtını uyarmada daha verimli olsa da, HIV enfeksiyonlarının yayılması, organ nakli veya kanser kemoterapisinde immünosupresif ilaçların kullanımı, ani bir cevap oluşumunu etkiler ve bu yüzden bazı endişelerin doğmasın sebep olmuştur. Aksi takdirde bağışıklık sistemi zayıf olan kişilerde latent *Leishmania* enfeksiyonu görülür.

Son birkaç yılda tanımlanmış antijenik bileşenlerden oluşan ve *Leishmania* enfeksiyonlarına karşı etkili hücresel bağışıklığı uyandırmak üzere tasarlanmış ikinci nesil aşıların geliştirilmesine yönelik önemli çalışmalar gösterilmiştir. L. braziliensis'in neden olduğu mükokütanöz *leishmania*sis ve L. amazonensis'in neden olduğu diffüz kütanöz *leishmania*sis, M*KL* çalışması için uygun fare modelleri bulunmadığından, aşı çalışmalarının çoğunluğu L. major enfeksiyonundan kaynaklanan kütanöz *leishmania*sis'e ya da L. Donovani 'den kaynaklanan visseral *leishmania*sis'e odaklanmıştır [287], [288]. *Leishmania* enfeksiyonuna karşı koruma sağlamak için birkaç strateji araştırılmasına rağmen şu anda kütanöz veya visseral *leishmania*sis için etkili bir aşı bulunmamaktadır. *Leishmania*sis'i önlemenin en başarılı yolu, canlı parazitlerle enfeksiyon olan 'Leishmanization' diye adlandırılan bu prosedür yüzyıllar boyunca vücudun maruz kalmış kısımlarındaki lezyonlara karşı koruma sağlamak için kullanılmıştır. Bu yöntemin genellikle etkili olmasının yanında parazitin virülans kaybı, standardizasyon zorluğu ve iyileşmeyen lezyonların gelişimi ile ilişkilendirilebilir. Bunlara ek olarak, parazitlerin asla vücuttan temizlenmemesi ve bağışıklık sistemi baskılanan bireylerde enfeksiyonun tekrarlama riski olduğundan bu yaklaşım günümüzde kullanılmamaktadır. Bununla birlikte, leishmanization'ın başarısı, *leishmania*sis için bir aşı olabileceği fikrini destekledi. Bununla birlikte, canlı aşıdan daha geleneksel aşılara olan uçurum, başlangıçta düşünülenden çok daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır. Öldürülen tüm parazitler, zayıflatılmış canlı parazitler, parazit proteinleri, altbirim rekombinant aşılar, vektörlü aşılar ve DNA aşıları ile aşılama girişimlerinden sınırlı başarı elde edildi. Güvenlik österilerine rağmen, tüm parazitlerin öldürülmüş faz III aşı denemeleri başarısız olmuştur [289]. Bu başarısızlığın nedeni, geleneksel aşılar ve adjuvanlar tarafından uzun süreli hücre aracılı antikor üretilememesinden kaynaklanmaktadır. Doğal bağışıklık tepkilerini daha kaliteli alabilmek

için bu sorunun üstesinden gelebilecek yeni adjuvanlar geliştirilmektedir [290], [291]. *Leishmania*sis aşısının gelişimini geciktiren bir başka konu ise, CD4 + T hücreleri tarafından tanınan immünodominant antijen eksikliğidir.

Bununla birlikte, son zamanlarda *Leishmania* proteini glikozomal fosfoenolpiruvat karboksiminin, CD4 + T hücreleri tarafından tanınan immünodominant bir antijen olduğu ve bir çok farklı *Leishmania* parazitinde korunduğu keşfedildi. En önemlisi, bu proteinin aşılandığı hayvan modellerinde hem kütanöz hem de visseral *leishmania*sis'e karşı önemli koruma sağlamıştır. *Leishmania* kum sinekleri vasıtasıyla bulaşması, birkaç aşı çalışmasında kum sineklerinin tükürük proteinlerinin potansiyel rolünü araştırılmıştır [292]. Örneğin, bir kum sineğinin tükürük proteini ile aşılama, rhesus maymununda *Leishmania* major'un kum sineğine iletimine karşı önemli koruma sağlamıştır [293]. Bu sonuç, kum sineğinin tükürük proteinlerinin bir aşı ile birleştirilmesinin daha iyi koruma sağlayabileceğini düşündürmüştür. Bu veriler, *leishmania*l bir aşı geliştirmeye yönelik çabaların devam ettiğini göstermektedir. *Leishmania*sis'e karşı aşı tasarımı için yeni yaklaşımlarda kum sineklerinin rolü ve bir aşı parçası olarak kum sinek proteinlerinin potansiyel rolü de dahil olmak üzere *leishmania*l bir aşı ulaşılabilir bir hedef olmaya devam etmektedir.

# BÖLÜM 3

# DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında, deney hayvanları ile ilgili yapılan çalışmalar hariç gerçekleştirilen bütün çalışmalar, 2015-2017 yılları arasında Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik bölümünde yer alan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarında Prof. Dr. Adil M. Allahverdiyev ve Yrd. Doç. Dr Melahat Bağırova'nın önderliğinde deneysel metodojik bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

## 3.1 Materyal

### 3.1.1 Ekipman

- Steril hücre kültür odası
- Hava akımlı kabinler (Laminar flow -Thermo Scientific Hera safe, Faster BHEN 2006)
- Karbondioksitli inkübatör (New Brunswick scientific CO-150 37°C, FrioCell 111 25 °C)
- İnverted mikroskop (Olympus CKX41)
- Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR3000)
- pH metre (HANNA instruments)

- Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
- Buz makinesi (Scotsman AF100)
- Vortex (LMS(laboratuvary medical supplies) VTX-3000L)
- Su banyoları (GFL (gesselschaft für labortechnik) mbH, Kerman)
- Isıtıcılı karıştırıcı (Heidolph instruments)
- ELISA çoklu plak yıkama cihazı (Thermo)
- Dondurucular (Beko(+4,-20°C), Arçelik(+4,-20°C), GFL(-40°C))
- -197 °C azot tankı ve azot taşıma tankları (DMC air liquid systems)
- Otoklav (Kerman, HIRAYAMA)
- UV-spektrofotometre (Jasco V-530)
- ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrometre) (Thermo)
- Saf su ve ultra saf su sistemleri (GFL2104)
- 10, 100 ve 1000 µl'lik mikropipetler (Thermo, Pippetman)
- 1-10, 20-200, 100-1000 µl'lik tek kullanımlık pipet uçları (AxyGen)
- Santrifüj tüpleri 15 ve 50 ml. (Eppendorf , IsoLAB)
- ELISA 96 kuyulu plakları (TPP)
- Hücre kültürü plakları (TPP)
- Hücre kültür flaskları 25 $cm^2$, 75 $cm^2$ (TPP, Corning)
- Serolojik pipet tabancası (Thermo)
- Serolojik pipetler 1,5,10 ml (Blau Brand Germany)
- Steril pastör pipeti 3 ml (LP ITALIANA SPA)
- Diyaliz membranı (MWCO 50,000 Thermo)
- Kriyotüpler (TPP)

- Makas, diseksiyon seti (Müller - Germany)
- Süzgeç (BD Falcon)
- 50-1000ml'lik otoklavlanabilir cam şişeler (ISOLAB, SCHOTT)
- Hücre sayımı için thoma lamı (Menzel superior)
- 1, 5, 10 ve 50 cc'lik enjektör (Ayset)
- 0,22 µm ve 0, 45 µm'lik şırınga filtreleri (MILLIPORE, TPP, Sartorius)
- SDS-PAGE jel elektroforez sistemi (Hoefer)
- Güç kaynağı (Hoefer)
- 0.2 µm Nitroselüloz Membran (GE Healthcare Life Sciences, Amersham Protran Premium)
- GPCmax (VISCOTEK)
- Sıvı Kromatografi LC-6AD(SHIMADZU)
- Fraksiyon Toplayıcı FRC-10A (SHIMADZU)
- Hızlı ELISA Fare *mAb* izotip kiti (Thermo SCIENTIFIC)
- Altın AB Konjugasyon Kiti (PanReac AppliChem)
- Lateks eldiven (Broche)

### 3.1.2 Kimyasallar

- Anti-fare IgGs (G,A,M)-Alkaline Fosfat Antikoru (Sigma)
- Freund complete adjuvan (Sigma)
- Hidroklorik asit, H*KL* (Riedel-de Haën)
- Protein ladder (low range) (Thermoscientific)
- BSA bovine serum albümin (Sigma)
- Tripan mavisi (Biologycal Industry)

- Akrilamid (Sigma)
- Bis-akrilamid (Sigma)
- Trizma-Baz(Sigma)
- β-Merkaptoetanol (Fluka)
- EDTA (AppliChem)
- Bromofenol mavisi (aMReSCO)
- Sodyum dödesil sülfat (SDS) (Sigma)
- N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED) (Sigma)
- Yağsız süt tozu (AppliChem)
- 8-Azaguanin (Sigma)
- Hipoksantin aminopterin timidin, 50X HAT (PAN)
- Hipoksantin timidin, 100X HT (Gibco)
- Polietilen glikol-4000, PEG-4000 (Sigma)
- Amonyum sülfat, $(NH_4)2SO_4$ (merck)
- Sodyum klorür, Na*KL* (Sigma)
- Sodyum bikarbonat, $NaHCO_3$ (Merck)
- Sükroz (MERCK)
- Glisin (Fluka)
- Etanol (Merck)
- L-Glutamine (PAN Biotech)
- Magnezyum klorür, Mg$KL_2$ (Fluka)
- Çinko Klorür, Zn$KL_2$ (Fluka)
- Sodyum azid, $NaN_3$ (Sigma)

- Potasyum hidroksit, KOH (Merck)
- Dipotasyum fosfat, $K_2HPO_4$ (Sigma)
- Monopotasyum fosfat, $KH_2PO_4$ (Sigma)
- Sodyum di hidrojen fosfat mono hidrat, $NaH_2PO_4.H_2O$ (Merck)
- Disodyum hidrojen fosfat, $Na_2HPO_4$ (Merck)
- K*KL* (Sigma)
- Amonyum persülfat (MERCK)
- 4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (SIGMA)
- Tween-20 (MP Biomedicals LLC)
- RPMI-1640 (Fenol redli ve fenol redsiz) besiyerleri (GIBCO Invitrogen)
- HEPES (AppliChem)
- FBS-fetal bovine serum (GIBCO Invitrogen)
- DMSO (AppliChem)
- Gentamisin (GIBCO)
- Penisillin-streptomisin (PAN Biotech)

### 3.1.3 Deneylerde Kullanılan Tampon, Besiyerleri ve Kimyasalların Hazırlanışı

#### 3.1.3.1 Tamponlar

**PBS Tamponu**

8 g Na*KL*, 0,2 g $KH_2PO_4$, 1,8 g $Na_2HPO_4.2H_2O$ ve 2 g K*KL* hassas terazide tartıldı. Üzerine 900 ml distile su eklenerek pH'ı 7,4'e ayarlandı. Son hacmi 1 lt olacak şekilde distile su ile tamamlandı, süzüldü ve otoklavlandı.

**PBS-Tween 20 Tamponu**

Hazırlanan fosfat tamponuna (PBS) hacimce %0,05 olacak şekilde Tween-20 eklendi.

**Kaplama Tamponu (pH; 9,6)**

1,59 g $Na_2CO_3$, 2,93 g $NaHCO_3$ ve 0,2 g $NaN_3$ hassas terazide tartılarak pH'ı 9,6'ya ayarlandı. Tamponun hacmi distile su ile 1lt'ye tamamlandı.

**Bloklama Çözeltisi (ELISA)**

Kaplama tamponuna %2 (ağırlık/hacim) olacak şekilde yağsız süt tozu ilave edildi.

**PBS/Tween20/süt tozu**

PBS/Tween20 çözeltisine %2 (ağırlık/hacim) olacak şekilde yağsız süt tozu eklendi.

**Substrat Tamponu (pH:10,4)**

0,02 g Zn$KL_2$, 0,04 g Mg$KL_2$ ve 1,5 g glisin hassas terazide tartılarak distile suda çözüldü. pH; 10,4'e ayarlandı ve son hacim 200 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

**%50 PEG Çözeltisi (ağırlık/hacim)**

10 g PEG-4000 (Sigma) 121 °C'de 10 dakika boyunca otoklavlandı. Ardından 37°C'de 10 ml PBS içerisinde çözülerek ependorflara 1'er ml bölüştürülerek 4°C'de karanlıkta saklandı.

**Stok Akrilamid Çözeltisi**

29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid hassas terazide tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**3 M Tris-HCL Tamponu (pH 8,8)**

72,68 g Trizma-baz tartılarak distile suda çözüldü. 3N H*KL* ile pH 8,8'e ayarlandı. Ardından son hacimi distile su ile 200ml'ye tamamlandı.

**1,5 M Tris-HCLTamponu (pH 6,8**)

35,35 g Trizma-baz tartılarak distile suda çözüldü. 3N H*KL* ile pH 6,8'e ayarlandı. Ardından son hacimi distile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

**%10 SDS**

10 g Sodyum dödesil sülfat (SDS) distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**%10 Amonyum Persülfat (APS)**

Amonyum Persülfat her zaman taze hazırlandı ve hazırlanırken önce 0,1 g tartılarak distile su ile 1 ml'ye tamamlandı.

**1 x Yürütme Tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0,1 SDS, pH 8.3)**

3.03 g Tris, 14.4 g Glisin ve 1 g Sodyum dödesil sülfat (SDS) distile su ile çözüldü. pH 8,3' ayarlandı ve son hacmi 1 lt olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

**Örnek Yükleme Tamponu**

2 ml 1,5 M Tris-H*KL* (pH 6,8), 0,5 g SDS, 5 g Sukroz, 0,25 ml β-Merkaptoetanol ve 5 ml bromofenol mavisi (% 0,5 ağırlık/hacim) distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

**Bloklama Solüsyonu (DOT BLOT)**

Hazırlanan fosfat tamponu (PBS) içerisine %0.1 (ağırlık/hacim) olacak şekilde BSA ilave edildi.

**Yıkama Solüsyonu (DOT BLOT)**

Hazırlanan fosfat tamponu (PBS) içerisine %0.05 (ağırlık/hacim) olacak şekilde Tween-20 eklendi.

### 3.1.3.2 Besiyerleri

**Myeloma ve Makrofaj Kültür Besiyeri**

Besiyeri, %80 RPMI 1640, %20 fetal bovine serum (FBS) ve 50 µg/ml Penisillin-streptomisin olacak şekilde hazırlanarak +4°C'de kullanıma hazır ve steril bir şekilde muhafaza edildi.

**Seçici Besiyerleri**

**A)** HAT; Hipoksantin aminopterin timidin (50X HAT) supplement (PAN) 1lt. kültür besiyerine 20 ml. olacak şekilde eklendi. Kullanıma hazır ve ışık görmeyecek şekilde steril olarak -20°C'de muhafaza edildi.

**B)** HT; Hipoksantin timidin (100X HT) suplement 1 lt besiyerine 10 ml. olacak şekilde eklendi. Kullanıma hazır ve ışık görmeyecek şekilde steril olarak +4°C'de muhafaza edildi.

**Hibridoma Kültür Besiyerleri**

**A)** HAT içerikli: %80 RPMI 1640, %20 fetal bovine serum (FBS), 100 µg/ml Penisillin-streptomisin ve hacimce %1 HAT içerecek şekilde steril olarak +4°C'de saklandı.

**B)** HT içerikli: %80 RPMI 1640, %20 fetal bovine serum (FBS), 100 µg/ml Penisillin-streptomisin ve hacimce %0,5 HT içerecek şekilde steril olarak +4°C'de saklandı.

**Dondurma Besiyeri**

%95 FBS ve %5 DMSO olacak şekilde hazırlandı.

### 3.1.4 Deneylerde Kullanılan Deney Hayvanları

Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuarında, etik kurul rapor onayı doğrultusunda füzyon çalışmaları için 6-8 haftalık dişi Balb/c ırkındaki fareler B-lenfosit kaynağı olarak kullanıldı.

### 3.1.5 Deneylerde Kullanılan Hücreler

#### 3.1.5.1 LPG Antijenin Eldesinde Kullanılan *Leishmania* Parazitleri

İmmünizasyon işlemlerinde antijen kaynağı olarak Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuarımızda kriyobankı oluşturulmuş *L.tropica* promastigotlarından izole edilen Lipofosfoglikan (LPG) molekülü kullanıldı.

#### 3.1.5.2 Myeloma Hücre Hattı

Hibridoma çalışmalarında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hayvan Hücre Kültürü Laboratuvarı sorumlu öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. S.İsmet Deliloğlu Gürhan tarafından temin edilen ve daha sonrasında laboratuvarımızca kriyobankı oluştulan P3-X63-Ag8.653 myeloma hücre hattı kullanıldı.

#### 3.1.5.3 Antikor Üreten B-Lenfosit Hücreleri

6 hafta boyunca 10 gün arayla immünize edilmiş dişi Balb/c farelerin dalak lenfosit hücreleri, füzyon çalışmalarından B-lenfosit hücre kaynağı olarak kullanıldı.

#### 3.1.5.4 Besleyici Hücre Olarak Fare Periton Makrofajları

Füzyon çalışmalarında destekleyici hücre olarak immünize edilmemiş kontrol grubu dişi Balb/c fareden elde edilen periton makrofaj hücreleri kullanıldı.

#### 3.1.5.5 J774 makrofaj hücre hattı

Laboratuvarımızda kriyobankı oluışturulmuş J774 hücre hattı, kültür ortamına salgıladığı metabolit ve büyüme faktörlerinin hibridoma kültür gelişimini desteklemesi için kullanıldı.

## 3.2 Metod

### 3.2.1 *L.tropica* Parazitlerinin Kriyobanktan Çıkarılması

Sıvı azottan çıkarılan hücreler 27°C'de ki su banyosunda iyicene çalkalanarak çözdürüldü. Çözdürülen hücrelerin tamamı kriyotüpün içerisinden alınarak, 5 ml %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyerinin bulunduğu 25cm$^{2}$'lik flasklara $10^{6}$ parazit / ml olacak şekilde ekimi yapıldı.

### 3.2.2 *L.tropica* Parazitlerinin Kültürünün Yapılması

Parazit sayısı $10^{7}$ parazit /ml değerine ulaştığında besiyeri miktarı iki katına çıkartıldı. Aynı döngü tekrarlanarak $10^{7}$ parazit /ml sayısına ulaştığında 25 ml %5 FBS içeren RPMI 1640 bulunan 75 cm$^{2}$'lik flask içerisinde $10^{6}$ parazit / ml olacak şekilde ekimi yapıldı. $10^{7}$ parazit /ml sayısına ulaşıldığında 300 ml Brain Heart Infusion (BHI) besiyeri içeren 1 litrelik erlene $10^{6}$ parazit / ml olacak şekilde ekim yapıldı ve dördüncü gün besiyeri iki katına çıkarıldı. Promastigotlar metasiklik evreye ulaştıklarında 4°C'de 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi ve pelletler antijen eldesi için gerekli işlemlerin yapılacağı güne kadar -20°C'de saklandı.



Şekil 3.1 L.tropica kültür görüntüsü (10x)

### 3.2.3 *L.tropica*'dan Lipofosfoglikan (LPG) Molekülünün Elde Edilmesi

L.tropica pelletlerinden lipofosfoglikan (LPG) molekülünün izolasyonu daha önce laboratuvarımızda tamamlanan TÜBİTAK destekli proje kapsamında belirli protokol izlenerek izole edilmiştir. 108S170 kodlu yürütücülüğünü Prof. Dr. Adil Allahverdiyev'in yaptığı "Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesinde polimerlere dayalı yeni bir yaklaşım: LPG-polimer konjugatları" adlı proje kapsamında, lipofosfoglikan (LPG) molekülünün izolasyonu aşağıdaki adımlarla gerçekleştirilmiştir;

Buzu çözdürülen pelletler her bir falkona 3ml olacak şekilde dağıtıldı. Üzerlerine önceden hazırlanan 2:1 oranındaki klorofom/metanol karışımı eklendi. Her bir tüpteki pellet sonikatörle 1 dk boyunca buz içinde parçalandı ve 1 saat beklemeye bırakıldı. Beklemenin ardından örnekler 4000 rpm ve 4°'C de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süprenatantlar ayrıldı. Pelletlerin üzerine 15 ml önceden hazırlanmış %9'luk isopropanol eklendi. Vortekslenerek çözdürülen pelletler buz içerisinde sonikatör ile 1dk boyunca tekrar parçalandı. 1 saat beklemenin ardından 14000 rpm'de 25 dk boyunca santrifuj edildi. Süpernatantlar ayrı bir yerde toplandı. Pellete tekrardan parçalama ve santrifuj işlemleri uygulandı. Bu parçalama işlemi toplamda üç kere tekrarlandı. Süpernatantlar bir yerde toplanıp daha sonra liyafilizatorde kurutulmak üzere -40'C a kaldırıldı. Liyofilizatörde kurutulan örnekler oktil seferoz kolonundan

geçirildi ve toplanan fraksiyonların TLC ile LPG analizi yapıldı. TLC sonucu LPG'nin olduğu fraksiyon liyofilizatörde kurutularak -40°C'de saklandı [66].

### 3.2.4 Balb/c Farelerin LPG Molekülü ile İmmünizasyonu

Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında bulunan deney hayvanları üzerinde uygulanacak formülasyonların oluşturulması amacıyla *L.tropica* promastigotlarından elde edilen toz halindeki LPG steril PBS ile 3ml'ye sulandırıldı. 0,45 µm'lik filtre ile steril edilerek, enjeksiyon ve ELISA aşamalarında kullanılmak üzere -40 °C'de saklandı. Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalar doğrultusunda etkinliği tespit edilmiş, toksik olmayan, FDA onaylı POX adjuvantı ile Freund adjuvantının LPG molekülülü ile farklı kombinasyonları hazırlandı. Hazırlanan formülasyonlar 6 haftalık dişi Balb/C fareler üzerinde intraperitonal olarak tatbik edildi. İlk immunizasyon öncesinde kontrol amaçlı olarak hayvanlardan intrakardiyak olarak kan alımı gerçekleştirildi. İmmunizasyonlar 10 gün aralıklarla gerçekleştirildi.

Deney hayvanlarının immünizasyonu için LPG ile farklı adjuvan kombinasyonları aşağıdaki gibi hazırlandı;

LPG :POX (250 µg : 45 µl) (Düşük doz)

LPG : POX (350 µg : 45 µl) (Yüksek doz)

LPG : Freund (150 µg : 45 µl)

Hazırlanan karışımların toplam hacmi 200 µl olacak şekilde PBS ile tamamlanarak farelere enjekte edildi.



Şekil 3.2 İmmünize edilen Balb/c ırkı fareler

### 3.2.5 Fare Serumlarının Antikor Yanıtlarını ELISA İle Tayin Edilmesi

Farelerden alınan serumlar 3000g'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Üstte kalan serum alınarak ELISA işleminde kullanılmak için -40°C'de saklandı. Kandan ayrılan serum örneğinin ELISA işlemi için ilk önce 96 gözlü plaka LPG molekülü ile kaplandı. Her kuyuya 1 µg LPG ve 100 µL kaplama solüsyonu düşecek şekilde hesaplama yapıldı. Belirlenen kuyulara 100'er µL LPG + kaplama solüsyonu konuldu. Plaka 1 gece +4 ºC'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün antijenle kaplanan plaka 3 kez yıkandı. (Yıkama solüsyonu 1L PBS + 0,5 ml Tween 20) Antijenle kaplanan plakada antijenle kaplanmayan yerlerin kaplanması için %2'lik süt tozu içeren kaplama tamponu hazırlandı. Her kuyucuğa 100 µl süt tozu karışımı ilave edildi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. 1 saat sonunda plaka 3 kere yıkandı. Fare serumlarının yoğun olmasından dolayı ile 1/50 oranında seyreltildi. Bunun için belirli kuyulara 5 µl serum, üzerlerine 245 µl %2'lik süt tozu içeren PBS-Tween 20 koyularak 1 saat 37°C'de inkübe edildi. 1 saatin sonunda plaka 3 kez yıkandı. Anti- Mouse Polyvalent 1/1000 oranında olacak şekilde PBS+Tween 20 ile karıştırılarak hazırlandı. Her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde ilave edildi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. 1 saatin sonunda plaka 5 kez yıkandı. -40°C'de saklanan 4-nitrophenyl phosphate di(tris) salt substratı her kuyucukta 1mg/ml olacak şekilde substrat tamponu ile hazırlandı. Yapılan bu çözelti karanlık ortamda her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde ilave edildi ve oda sıcaklığında 35-45 dk boyunca

karanlıkta bekletildi. Bu süre sonunda plaka ELISA reader cihazında 405 nm dalga boyunda okutularak sonuçlar kaydedildi.

### 3.2.6 Füzyon Deneyleri

#### 3.2.6.1 P3-X63-Ag8.653 Myeloma Hücrelerinin Kriyobanktan Çıkarılması

Sıvı azottan çıkarılan P3-X63-Ag8.653 myeloma hücre hattı 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldü. Kriyotüpün etrafı %70'lik etanol ile iyice temizlendi. Kriyotüpün içerisinde çözünmüş hücreler pipet yardımıyla daha önceden içerisine 4 ml %10 FBS içeren RPMI 1640 konulmuş 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılarak 1000 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak falkonun tabanına hafif bir mekanik kuvvet uygulanarak hücre pelleti süspanse edildi. Süspanse hücre pelleti %10 FBS içeren RPMI 1640 ile 1 ml'ye tamamlanarak 25 $cm^2$'lik flasklara 5 × $10^4$ hücre/ml olacak şekilde aktarıldı. Flasklar 37°C'de %5 $CO_2$ ve %98 nem içeren inkübatörde kültüre edildi.

#### 3.2.6.2 P3-X63-Ag8.653 Myeloma Hücrelerinin Kültürünün Yapılması

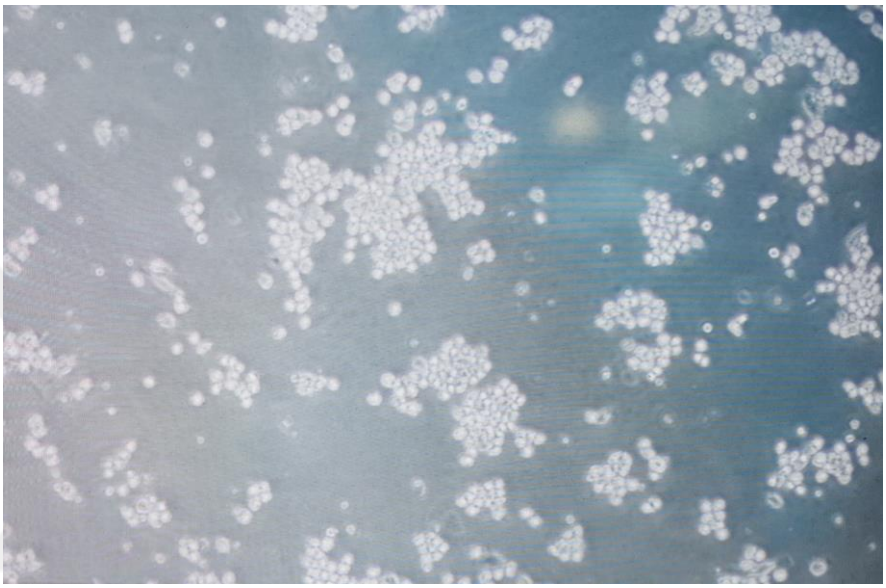
P3-X63-Ag8.653 myeloma hücre hattının besiyeri ortamı 2 günde bir gerekli miktarda değiştirilerek devam ettirildi. Hücrelerin durumu inverted mikroskop (Olympus) ile izlendi. Kültür ortamında yoğun bir şekilde çoğaldığı gözlenen hücreler ilk önce sayılarak pasaj işlemi gerçekleştirildi. Hücre sayımı için flasktaki hücreler ilk önce hafif bir mekanik darbe ile yüzeyden kaldırıldı. Daha sonra pipet yardımıyla kültür ortamı tekrar flaskın içine boşaltılarak hücrelerin daha iyi kalkması sağlandı. Çok fazla köpük oluşturmadan kaldırılan hücreler 15 ml'lik falkon tüpüne alındı. 15ml'lik falkon tüpüne aktarılan tüm hücreler 1000 rpm'de 5 dk. santrifüjlendi. Santrifüjden sonra supernatant ortamdan uzaklaştırıldı, pellet süspanse edildi ve %10 FBS içeren RPMI 1640 ile 1 ml'ye tamamlandı. Hücre sayımı için sayım tüpüne 48 µl %10 FBS içeren RPMI 1640, 2µl süspanse hücre pelleti ve 50 µl Tripan mavisi koyularak iyicene karışırıldı. Karışım, Thoma lamı üzerindeki lamelin altına yüklendi ve karelerin içinde kalan parlak hücreler sayıldı. Thoma lamındaki sayım aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi;

Hücre sayısı (1ml) = Ort. hücre sayısı x Sulandırma katsayısı x Thoma lamı sabiti (3.1)

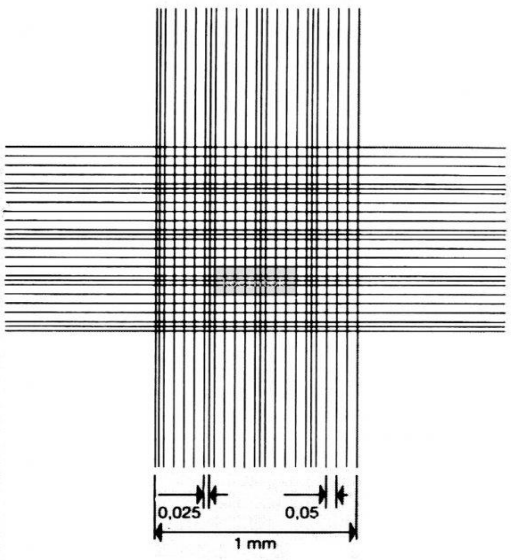
Ortalama hücre sayısı: Thoma lamının alt ve üst tarafında bulunan 16 kare içerisindeki hücrelerin aritmetik ortalaması

Sulandırma katsayısı: Pelletten alınan hücrelerin sayımı için yapılan sulandırma katsayısı, Thoma lamı sabiti: 10.000

Sayılan hücreler $5x10^5$ hücre/ml yoğunluğuna ulaştığında pasajları gerçekleştirildi.



Şekil 3.3 Log fazındaki P3-X63-Ag8.653 myeloma hücreleri (20X)




Şekil 3.4 Thoma lamı üzerindeki kareler

### 3.2.6.3 Myeloma Hücrelerinin 8-Azoguanin ile Muamele Edilmesi

8-azoguanin pürin nükleotid biyosentezinin inhibitörü olarak bilinen guaninin triazol analoğudur. B lenfosit-myeloma füzyonu sonucunda antikor üreten aktif saf hibridoma elde edebilmek için füzyon öncesinde myeloma hücreleri 8-azaguanin mutajenik maddesiyle muamele edilerek HGPRT- mutant duyarlı myeloma hücre hatları elde edildi. Bunun için; füzyondan 10-15 gün önce myeloma hücrelerine azoguanin muamelesi yapıldı. 8-azoguaninin uygulanma miktarı 20µg/ml olacak şekilde hesaplandı [294], [295], [296], [297]. 6,6x10-3 M'ye sahip 8-azaguanin 10 ml steril hücre kültür besiyeri ile sulandırıldı. Dilüe edilen solüsyon 1ml'lik ependorflar içerisine bölünerek kullanılacağı güne kadar -20◦C'de saklandı. Uygulanacak azoguanin miktarının belirlenmesi için aşağıdaki hesaplama yapıldı;

M=n/V (3.2)

M=m/mA/V (3.3)

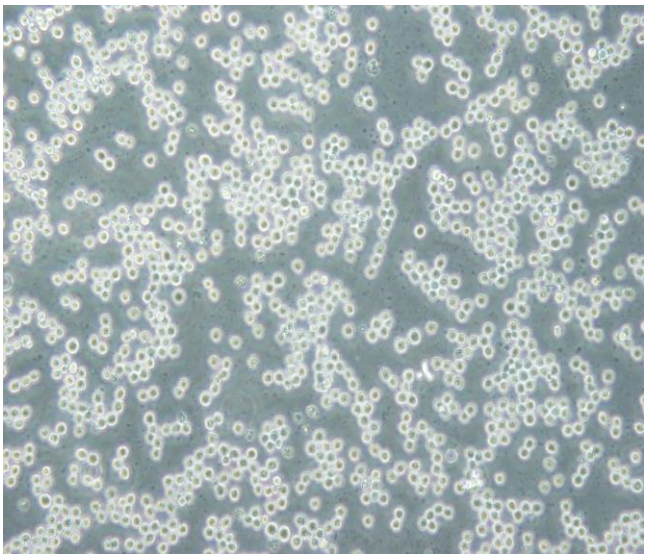
(6,6x10^-3)=(m/(152,1))/(0,01)

m=0,0100386 gr

m=10,0386 mg

m=10038,6 µg

Bu hesaplamalar doğrultusunda 10 ml kültür besiyeri içerisinde 10038,6 µg azoguanin olduğu belirlendi. Kültür ortamında bulunan 10 ml'lik besiyerine 20 µg/ml azoguanin eklenebilmesi için stoktan her uygulamada 200 µl solüsyon alındı ve hücre kültür besiyerine eklendi. Flaskın tabanından kaldırılan myeloma hücreleri 15 ml'lik falkonlar içerisine toplanarak 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti taze %10 FBS içeren RPMI besiyeri ile süspanse edildi. 75 $cm^2$'lik flask içerisine 10 ml taze besiyeri ile $5x10^4$ hücre/ml olacak şekilde süspanse myeloma hücreleri ilave edildi. Son olarak 10 ml besiyeri içerisine 200 µg azoguanin eklendi ve bu işlem iki kere tekrar edildi. 8-azaguanin füzyon işleminden en az 1 hafta önce kültür ortamından arındırıldı.



Şekil 3.5 Azoguanin uygulaması sonrası myeloma hücrelerinin morfolojik görüntüsü (20 X)

### 3.2.6.4 Füzyonda Yardımcı Hücre Hatlarının Hazırlanması için J774 Makrofaj Hücre Kültürünün Yapılması

Daha önce laboratuvarımızda VL ile ilgili hibridoma teknolojisine dayalı yürütülmüş çalışmada, füzyonda yardımcı hücre hatları olarak fare periton makrofajları yerine J774 metabolitlerinin kullanılmasının uygun olacağı gösterilmiştir. Bu sayede kontaminasyon olasılığı en aza indirilerek etik olarak boş yere fare kullanılmasının önüne geçilmiştir. Bu yüzden, bu tez kapsamında da füzyon için ürettiği metabolitleri kullanılması adına J774 hücre hattının kültürü yapılmıştır.

Sıvı azottan çıkarılan J774 hücre hattı 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldü. Kriyotüpün etrafı %70'lik etanol ile iyice temizlendi. Kriyotüpün içerisinde çözünmüş hücreler pipet yardımıyla daha önceden içerisine 4 ml %10 FBS içeren RPMI 1640 bulunan 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılarak 1000 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak falkona dışarıdan hafif bir mekanik kuvvet uygulanarak hücre pelleti süspanse edildi. Süspanse hücre pelleti %10 FBS içeren RPMI 1640 ile 1 ml'ye tamamlanarak 25 $cm^2$'lik flasklara 5 × $10^4$ hücre/ml olacak şekilde aktarıldı. Flasklar 37°C'de %5 $CO_2$ ve %98 nem içeren etüvde kültüre edildi. Kültür süresince inverted mikroskopta gelişimleri izlenen hücrelerin besiyeri değişimi ve hücre sayısına bağlı olarak pasaj işlemi gerçekleştirildi.

Pasajlanmak için flasklardan toplanıp santrifüj edilen hücrelerin supernatantları hibridoma kültüründe besleyici ortam oluşturması için 0,22 µm'lik filtre (Millipore) ile süzüldü ve kullanılacağı güne kadar +4°C'de saklandı.

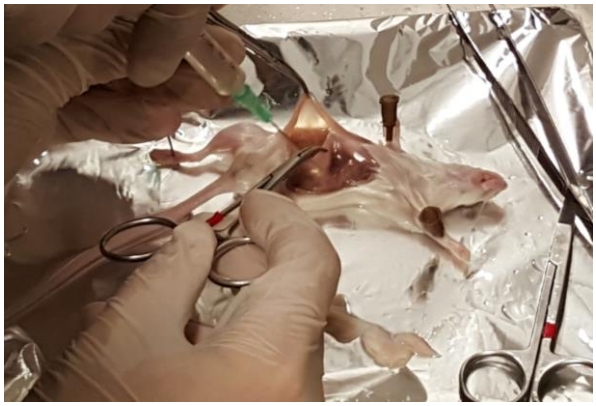


Şekil 3.6 J774 hattının kültürü (20x)

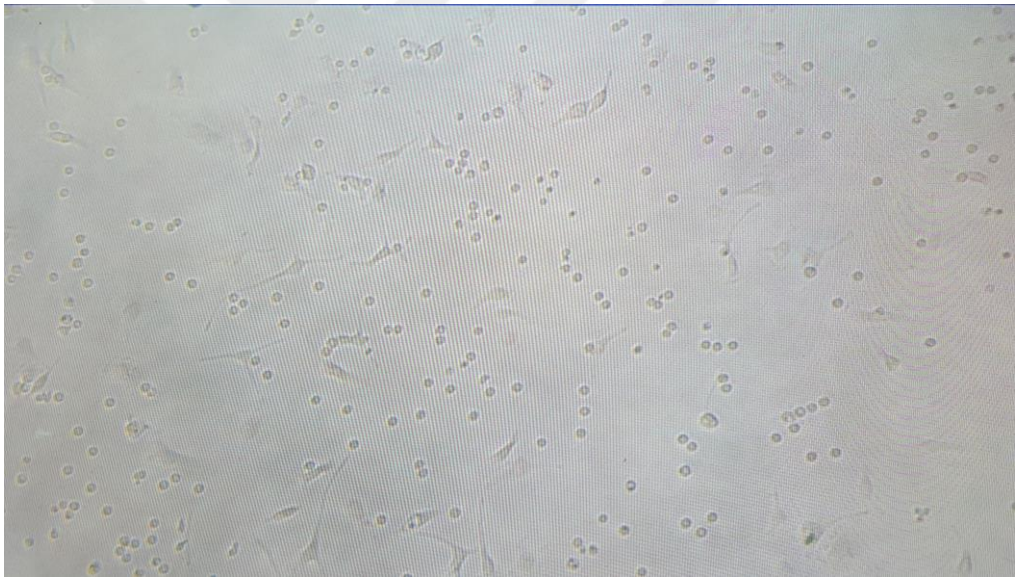
### 3.2.6.5 Besleyici Hücre Olarak Kullanılmak Üzere Fare Periton Makrofajlarının Elde Edilmesi ve Kültürünün Yapılması

Periton makrofaj hücreleri füzyondan 2 gün önce alındı. Fare yüksek dozda eter inhalasyonu ile sakrifiye edildi ve %70'lik alkol ile dezenfekte edildi. Steril kabin içerisinde sırt üstü yatırılan farenin bacakları penslerle zemine sabitlendi. Karın bölgesi steril pens ve makas yardımıyla yanlara ve yukarı doğru açıldı. Farenin uygun periton bölgesine, daha önceden hazırlanan 5 ml'lik enjektör içerisindeki 3 ml soğutulmuş RPMI 1640 besiyeri diğer organlara değmeden dikkatli bir şekilde dolduruldu. Besiyerinin periton bölgesinde iyicene dağılması sağlandı. Daha sonra periton bölgesindeki besiyeri enjektörle geri çekildi ve kültür işlemine kadar soğuk ortamda tutuldu. Alınan periton makrofajı 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Ortamdan supernatant uzaklaştırıldı ve pellet %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyeri ile 1 ml'ye tamamlanarak Tripan mavisi ile hücre sayımı gerçekleştirildi. Füzyon işlemi sonucunda oluşacak hibridoma kültürünün ekileceği plakalara kuyu başına 10.000 periton makrofajı ve 100 µl besiyeri olacak şekilde hücreler 96 gözlü plakanın

ortasındaki kuyucuklara ekimi yapıldı. Plaklar 37°C'lik %5 $CO_2$ ve %98 nem koşullarındaki inkübatörde (New Brunswick scientific CO-150 37°C) kültüre edildi.



Şekil 3.7 Farenin periton bölgesine RPMI 1640 besyerinin verildikten sonra besiyerin enjektörle geri çekilme anı



Şekil 3.8 Periton makrofajın feeder olarak plakalara ekildikten sonraki durumu (20x)

### 3.2.6.6 Füzyon Basamakları

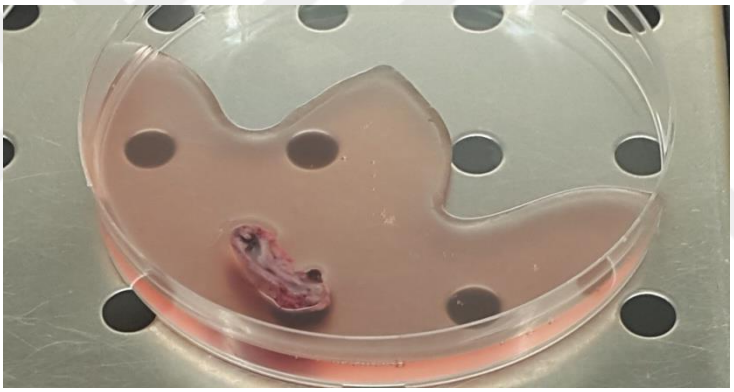
**İmmünize Dalakların İzole Edilerek B-Lenfosit Hücrelerinin Hazırlanması**

Antikor yanıtı yüksek olan fare füzyon için sakrifiye edilmeden 2 gün önce adjuvansız tam doz antijenle vuruldu. Füzyon günü fare yüksek dozda dietil eter inhalasyonu ile sakrifiye edildi. %70 etanol ile yıkanarak steril pensler ve makas yardımıyla derisi

kesildi. Kesilen deri altından farenin periton boşluğu açıldı ve karın bölgesinin sol alt kısmından dalak dikkatlice çıkartıldı.



Şekil 3.9 İmmünize Farelerden dalağın çıkarılması



Şekil 3.10 İmmünize farelerden elde edilen dalak

Alınan dalak laminar flow içerisinde serum içermeyen RPMI 1640 içeren petrinin içerisine aktarıldı. Pens yardımıyla dalağın etrafındaki yağ veya herhangi doku/organ parçaları temizlendi. Dalak tekrardan serum içermeyen RPMI 1640 olan petri içerisine alınarak üzerine kısa çizikler atıldı. 5 ml'lik enjektörle çekilen serumsuz RPMI, dalak içerisine verilerek kan hücrelerinin besi ortamına yayılması sağlandı. Kan hücrelerinden ayrılan dalak steril petri içerisinde 0.70 µm' lık filtre üzerinde enjektörün tersi ile üzerine serum içermeyen RPMI eklenerek ezildi. Steril petri içerisinde biriken hücreler serolojik pipet yardımı ile steril falkonlara aktarıldı. Falkona toplanan hücreler 1000 rpm.'de 5 dk boyunca santrifüjlendi. Bu işlem en az 3 kez kan hücrelerinden ayrılıncaya

kadar tekrar edildi. En son santrifüjden sonra supernatant uzaklaştırılarak hücre serumsuz medium ile süspanse edildi ve hücre sayımı gerçekleştirildi.

**P3-X63-Ag8.653 Myeloma Hücrelerinin Hazırlanması**

P3-X63-Ag8.653 myeloma hücreleri flasklardan kaldırılarak 50 ml'lik santrifüj tüpüne toplandı ve 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlendi. Süpernatant pipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve hücre pelleti serum içermeyen RPMI ile süspanse edilerek füzyon için gerekli hücre sayımı yapıldı.

**Hücre Sayımı**

Myeloma ve dalak hücrelerinin sayımı için 2 farklı sayım tüpüne tripan mavisi solüsyonundan 50 µl, serumsuz besiyerinden 48 µl ve hücre süspansiyonlarından 2 µl alınarak iyicene karıştırıldı. Lamel ile kapatılmış Thoma lamının iki tarafına sayım tüpündeki karışım yüklendi. İnverted mikroskop ayarlanarak Thoma lamının alt ve üst tarafındaki 16 şar büyük karedeki parlak hücreler sayıldı, aritmetik ortalaması alındı ve hücrelerin canlılıkları aşağıdaki formül ile hesaplandı:

Hücre sayısı (1ml) = Ort. hücre sayısı x Sulandırma katsayısı x Thoma lamı sabiti (3.1)

Ortalama hücre sayısı: Thoma lamının alt ve üst kısımlarında bulunan 16 karedeki canlı hücrelerin aritmetik ortalaması

Sulandırma katsayısı: Pelletten alınan hücrelerin sayımı için yapılmış sulandırma katsayısı

Thoma lamı sabiti: 10.000

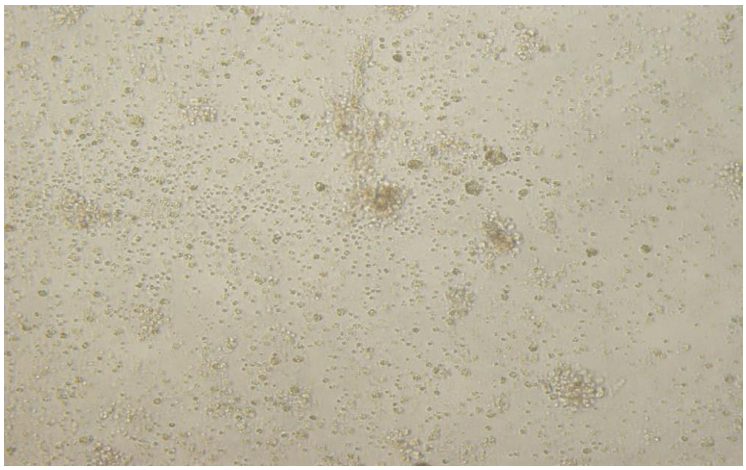
**Hücre Füzyonu**

Hücreler; 1: myeloma hücresi, 10: dalak hücresi olacak şekilde karıştırıldı. Gerekli hücre sayısını içeren hücre süspansiyonları steril falkon içerisinde toplandı ve 10 dk boyunca 1250 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti süspanse edildi. 1ml PEG solüsyonu 1 dk boyunca yavaşça hücre pelletine ilave edildi ve pipetle dikkatlice karıştırıldı. Füzyon karışımına 4 dakika boyunca 4 ml serum içermeyen RPMI 1640 eklenerek karıştırıldı. Ardından hücrelere 10 ml serum

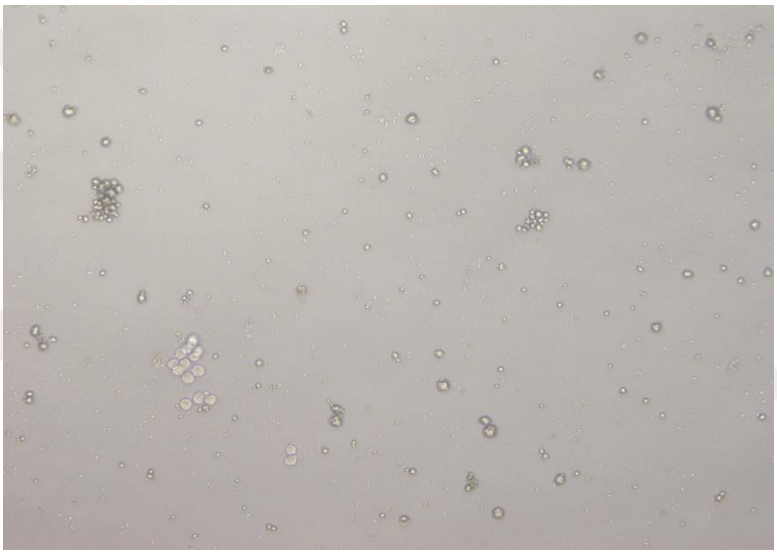
içermeyen RPMI 1640 eklendi ve 15 dk 37°C ‘de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından karışıma yavaşça 30 ml %20 FBS içeren RPMI 1640 eklendi ve 1250 rpm’de 7 dk boyunca santrifüj edildi. PEG’in uzaklaştırılması için süpernatant atıldı ve seçici besiyeri ile süspanse edildi. (Seçici besiyeri : %2’lik HAT olacak şekilde hazırlanan %20’lik RPMI 1640) Süspanse edilen hücre pelleti, daha önceden periton makrofajlarının ekildiği kuyulara, her kuyuya 150 µl olacak şekilde koyuldu. Nemli bir ortam sağlanması için plakaların kenarlarına steril PBS koyularak kültür, 37°C, %5 $CO_2$ ve %98 nem sağlayan koşullarda inkübasyona bırakıldı.

#### 3.2.6.7 Hibridoma Kültürü

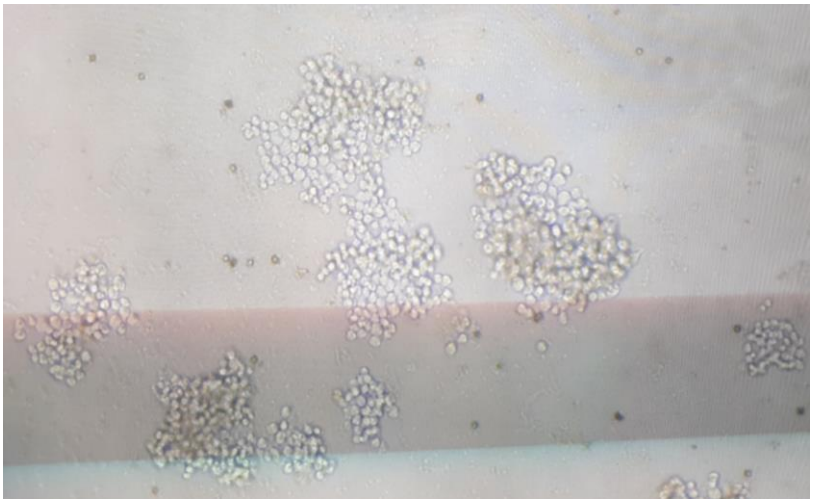
Kültürün 3.gününde bir plaka seçilerek inverted mikroskop altında hibrid hücrelerinin oluşup oluşmadığı ve kültürün durumu incelendi. Kültürün 7. gününde yapılan incelemede birçok kuyuda hibridoma morfolojisine yakın hücre görüldü. Fakat inkübasyon süresi yeterli olmadığından işaretlenmedi. Fakat aynı gün her kuyudan kuyunun dibine değmeden 100 µl kültür üst sıvısı alındı ve taze 100 µl %2 HAT ve %20’lik FBS ihtiva eden RPMI 1640 besiyeri eklendi. Kültür süresi boyunca hücrelerin durumuna ve kültür ortamındaki kirliliğe bağlı olarak bu işlem tekrarlandı. Füzyondan yaklaşık 3 hafta sonra besiyerinin içeriği HT, J774 hücre hattından elde edilen süpernatant ve %20’lik FBS içeren RPMI 1640 besiyeri olacak şekilde hazırlandı ve hücreler bu besi ortamı ile kültürlendi. Besiyeri değişimi sırasında hibridoma hücrelerinin görüldüğü kuyulardan toplanan supernatantlar indirekt ELISA yöntemi ile antikor yanıtları belirlendi.



Şekil 3.11 Füzyon sonrası hücrelerin görüntüsü (20X)



Şekil 3.12 HT besiyerine geçildikten 1 hafta sonraki kültür durumu (20X)



Şekil 3.13 Hibridoma hücrelerinin HT besiyerinde 27.gündeki durumu (20X)

### 3.2.6.8 Spesifik Antikor Üreten Kuyuların ELISA ile Belirlenmesi

Toplanan hibridoma süpernatnatların ELISA işlemi için ilk önce 96 gözlü plaka LPG ile kaplandı. Her kuyuya 1 µg LPG ve 100 µL kaplama solüsyonu düşecek şekilde hesaplama yapıldı. Belirlenen kuyulara 100'er µL LPG + kaplama solüsyonu konuldu. Plaka 1 gece +4 ºC'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün antijenle kaplanan plaka 3 kez yıkandı. (Yıkama solüsyonu 1L PBS + 0,5 ml Tween 20) Antijenle kaplanan plakada antijenle kaplanmayan yerlerin kaplanması için %2'lik süt tozu içeren kaplama tampounu hazırlandı. Her kuyucuğa 100 µl süt tozu karışımı ilave edildi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. 1 saat sonunda plaka 3 kere yıkandı. Hibridoma süpernatantlarına herhangi bir seyreltme işlemi uygulanmadı. Kuyulara 100 µl hibirodoma süpernatantı koyuldu ve yaklaşık 1,5 saat 37°C'de inkübe edildi. 1 saatin sonunda plaka 3 kez yıkandı. Anti- Mouse Polyvalent 1/1000 oranında olacak şekilde PBS+Tween 20 ile karıştırılarak hazırlandı. Her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde ilave edildi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. 1 saatin sonunda plaka 5 kez yıkandı. -40°C'de saklanan 4-nitrophenyl phosphate di(tris) salt substratı her kuyucukta 1mg/ml olacak şekilde substrat tamponu ile hazırlandı. Yapılan bu çözelti karanlık ortamda her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde ilave edildi ve oda sıcaklığında 35-45 dk boyunca karanlıkta bekletildi. Bu süre sonunda plaka ELISA reader cihazında 405 nm dalga boyunda okutularak sonuçlar kaydedildi.

### 3.2.6.9 Sınırlayıcı Sulandırma Yöntemi ile Hibridoma Hücre Hatlarına Alt Klonlama İşleminin Uygulanması

ELISA ile LPG'ye karşı monoklonal antikor ürettiği tespit edilen kuyulardaki hibrid hücreler pipetaj yapılarak kuyucuklardan kaldırıldı ve 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant dökülerek pellet besiyeri ile 1 ml'ye tamamlandı ve hücre sayımı tripan blue yöntemi ile gerçekleştirildi. Hibrid hücrelerin tek klondan üremesini sağlamak için klonlanacak hibridoma hücreleri kuyucuk başına 1-10 hücre düşecek şekilde hesaplanarak HT içeren besiyeri ile seyreltildi. Oluşturulan hücre süspansiyonları 96'lık plakada her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Plaklar 1-2 gün boyunca medyumu hiç değiştirilmeden inkübe edildi. Gelişimleri inverted

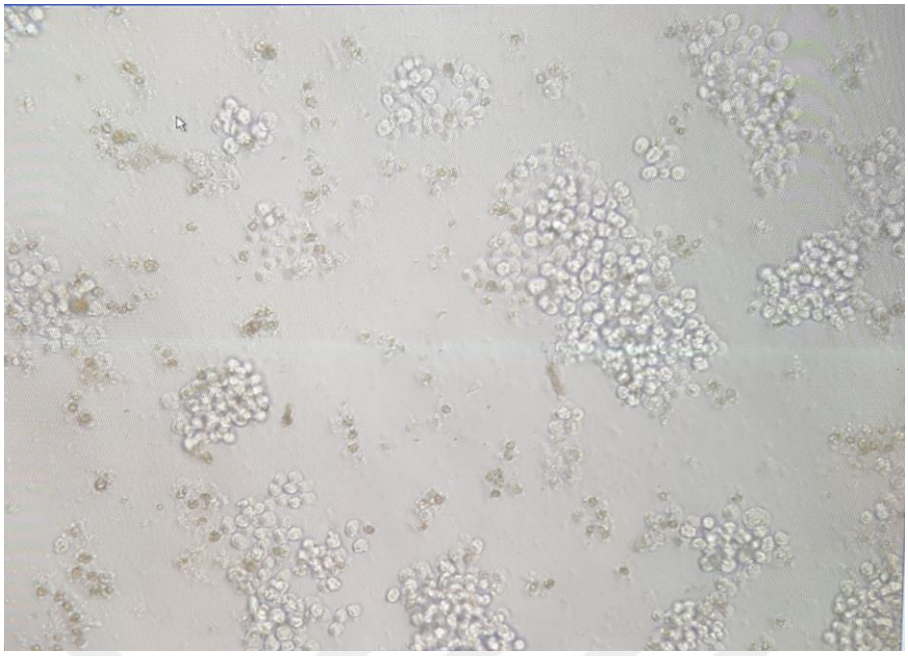
mikroskopta izlenen hibridoma alt klon hücrelerine gereken zamanda besiyeri değişimi yapıldı.



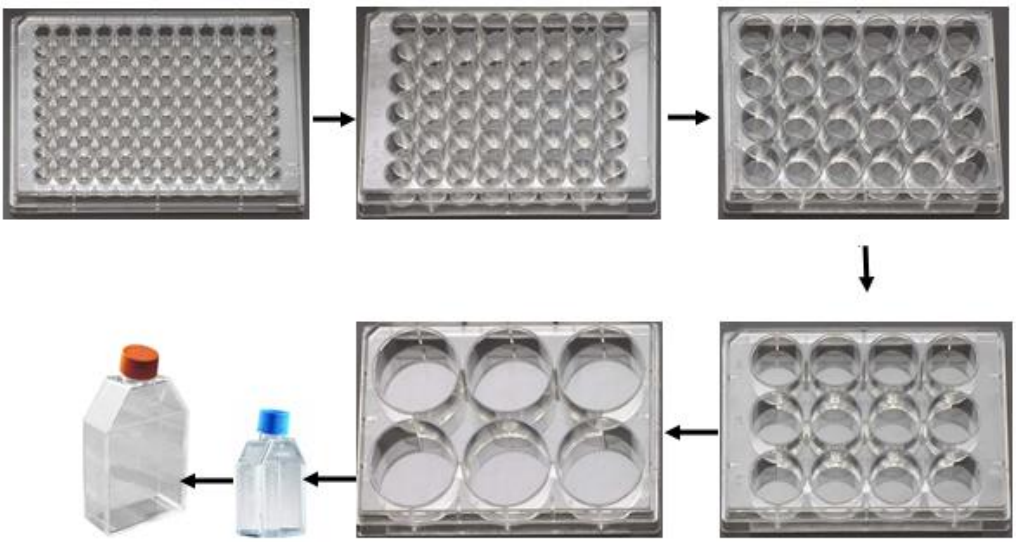
Şekil 3.14 *L.tropica'dan* izole edilen LPG molekülüne karşı geliştirilen hibridoma hücrelerinin alt klon görüntüsü

### 3.2.6.10 Monoklonal Antikor Üreten Hibridoma Hücrelerinin Büyük Ölçekte Üretilmesi

96'lı plakalarda kültürlenen monoklonal antikor üreten hibrid hücrelerinin zamanla belli kuyularda oluşturduğu hibrid kolonizasyonu inverted mikroskopta incelendi. Gelişim görülen kuyulardaki hücreler pipetaj ile kuyulardan kaldırılarak 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. J774 supernatantı ile destekli HT besiyeri ile süspanse edilerek 48 kuyucuklu plaklara her kuyuda 0.8 ml olacak şekilde aktarıldı ve 37°C, %5 $CO_2$ ve %98 nem koşullarını sağlayan inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyonun 5. gününde, kuyucuk başına 200 µl olacak şekilde J774 süpernatant ilaveli taze besiyeri eklendi. Külür devamında iki günde bir kuyulardan 200 µl alınıp yerine 200 µl taze besiyeri ilave edilerek kültüre devam edildi. Hücrelerin düzgün morfoloji ve üremesine bağlı uygun kolonizasyon görüldüğünde, hibrid hücreler 12'li ve 6'lı plakalara aktarıldı. 6 gözlü plakanın her bir gözünde kültürlenen hibridomalar ayrı 25 $cm^2$'lik ve 75 $cm^2$'lik flasklara aktarılarak, kültür ölçeği büyütüldü. Büyük ölçek (25 $cm^2$, 75 $cm^2$ flasklarda) kültürden toplanan süpernatantlar 0,22 µm'lik filtereden geçirilerek +4°C'de saklandı.



Şekil 3.15 75cm$^2$'lik flasklarda kültürlenen hibridoma kültürü (10x)



Şekil 3.16 Kademeli olarak yapılan büyük ölçek hibridoma kültürünün akış şeması

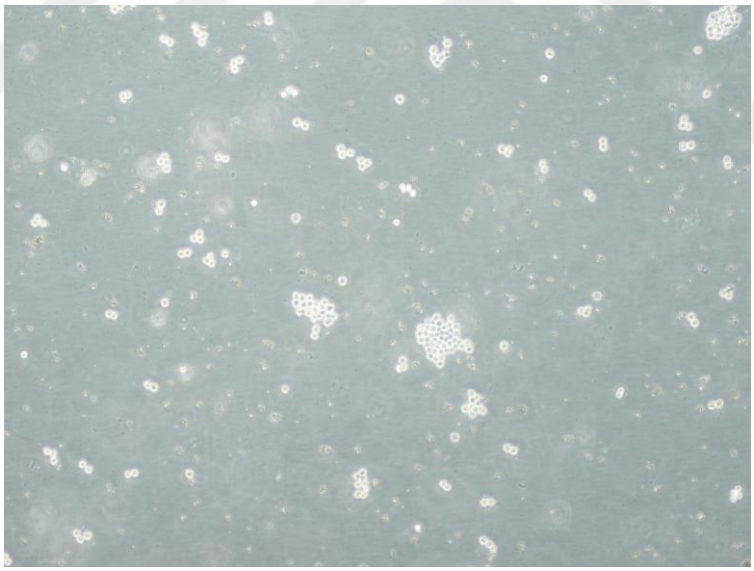
### 3.2.6.11 Hibrid Hücrelerin Kriyoprezervasyonu

Büyük ölçekte kültürlenen hibrid hücreler pipetle flask yüzeyinden kaldırılarak falkonlara aktarıdı, +4°C' de 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Pellet besiyeri ile süspanse edildi. Bir kriyo tüpte dondurulacak maksimum hücre sayısına bağlı olarak pellet besiyeri ile süspanse edilerek aynı hacimde %5 DMSO içeren dondurma solüsyonu yavaşça ilave edildi.

Kriyoprotektan ile muamale edilmiş hücre pelleti kriyo tüplere aktarıldı. Kriyo tüpler +4°C' de 1 saat, – 20°C' de 2 saat tutulduktan sonra, – 40°C derin dondurucuda 1 gece bekletildikten sonra, sıvı azot tankına aktarıldı.

### 3.2.6.12 Hibridoma Hücre Hatlarının Kriyobanktan Çıkarılması

Sıvı azottan çıkarılan monoklonal antikor üreten hibrit hücreler 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldü. Kriyotüpün etrafı %70'lik etanol ile iyice temizlendi. Kriyotüpün içerisinde çözünmüş hücreler pipet yardımıyla daha önceden içerisine 4 ml besi ortamı konulan 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılarak 1000 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak falkona dışarıdan hafif bir mekanik kuvvet uygulanarak hücre pelleti süspanse edildi. Süspanse hücre pelleti HT ve %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyeri ile 1 ml'ye tamamlanarak 25 $cm^{2}$'lik flasklara 5 × $10^{4}$ hücre/ml olacak şekilde aktarıldı. Flasklar 37°C'de %5 $CO_2$ ve %98 nem içeren etüvde kültüre edildi.



Şekil 3.17 Kriyoprezervasyon sonrası açılan monoklonal antikor üreten hibridoma kültürünün flasktaki görüntüsü (10X)

### 3.2.6.13 LPG'ye karşı üretilen Monoklonal Antikorların Alt izotipinin Belirlenmesi ve Saflaştırılması

**Üretilen Monoklonal Antikorların Alt İzotiplerinin Belirlenmesi**

Hibridoma süpernantanlarında bulunan monoklonal antikor tipinin bilinmesi bir sonraki aşamada hangi tür saflaştırma proseslerinin uygulanacağını göstermiştir. Bu yüzden alt izotip belirleyici strip kit (Hızlı ELISA Fare *mAb* izotip kiti (Thermo SCIENTIFIC)) ile antikor tiplemesi gerçekleştirildi. Bu amaçla; 150 µl Hibridoma süpernatantı kit içerisindeki gelişim tüpüne konuldu. 15 ile 25°C arasında 30 saniye inkübe edildi ve ardından kısa süre içerisinde renklenmiş lateks tamamen çözünene kadar kuvvetlice çalkalandı. İzotiplendirme stripin siyah ucu tüpün dibine gelecek şekilde yerleştirildi ve en az 1 dk boyunca sıvıyı emmesi için beklendi. Pozitif kontrol bantlarının belirgenliştiğinden emin olduğumuz takdirde stripler tüpten çıkartılarak analizi yapıldı.

**Amonyum sülfat**

Monoklonal antikor üreten hibrid hücrelerden elde edilen supernatantların saflaştırma işlemi için ilk önce amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Bunun için; hibridoma supernatantının üzerine hacimce %30'luk olacak şekilde amonyum sülfat tuzu $(NH4)_2SO_4$ +4°C'de 30 dakika boyunca çalkalanarak ilave edildi. Tuzun eklenmesinin ardından 1 saat boyunca +4°C'de inkübe edildi. 1 saatin sonunda örnekler 13.000 rpm'de 30 dakika boyunca +4°C'de santrifüjlendi. Supernatant pipetle dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak dibe çöken proteinler PBS ile iyice pipetaj yapılarak süspanse edildi.

**Diyaliz**

Diyaliz membranları örnek sayısına göre uygun boyutta kesilerek, uçları iple bağlandı. Geniş bir mezura yaklaşık 1000 ml PBS çözeltisi konuldu. Ortamın sirkülasyonu için çözeltinin içine manyetik karıştırıcı koyuldu. Ucu bağlanan diyaliz membranlarına, amonyum sülfat çöktürmesi işleminde elde edilen PBS ile süspanse edilmiş örnek yüklendi ve içinde manyetik karıştırıcı bulunan PBS çözeltisi içerisine yavaşça bırakıldı.

Bu işlem +4°C'de 16 -18 saat boyunca devam edildi. Bu süre sonunda membranlardan örnekler dikkatlice alınarak -20°C'de muhafaza edildi.

**Jel Filtrasyon Kromatografisi (GPC)**

Amonyum sülfat ve diyalizi yapılmış örnekler jel filtrasyon kromatografiden geçirilerek numune içindeki alt birimlerin moleküler ağırlığı ve yüzdelikleri belirlendi. Bu yöntem GPCmax (VISCOTEK) cihazı kullanılarak yapıldı. Saflaştırma aşamasında yapılan bu işlem bir bakıma HPLC için hazırlık aşamasıdır. Jel filtrasyon tekniğinde ilk önce hazırlanan PBS 0.45 µm'lık filtreden geçilerek süzüldü. Amonyum sülfat çöktürmasi ile diyalizi yapılmış yarı saf haldeki hibridoma süpernatantı 0.22 µm'lık filtreden geçirilerek kolona yüklendi. Kolondaki yarım saatlik akışın sonrasında numunenin içindeki alt birimlerin göründüğü veriler elde edilerek sisteme kaydedildi.

**HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)**

Saf monoklonal antikorlar HPLC (Sıvı Kromatografi LC-6AD (SHIMADZU)) yöntemiyle elde edildi. HPLC kolonunun bağlı olduğu sistem açılarak ilk önce süzülmüş tampon çözelti (PBS) 30 dakika boyunca kolon akışının sabitlenmesi için geçirildi. Akışın sabitlendiği kolona yaklaşık 1 ml süzülmüş PBS verildi. PBS yüklemesinden sonra kolona yüklenecek örnekler belirli hacimlerde 0.45 µm'lık filtrelerden geçirilerek kolona yüklendi. Fraksiyonlar (Fraksiyon Toplayıcı FRC-10A (SHIMADZU)) , kolonun bağlı olduğu programdan manuel olarak toplandı ve elde edilen fraksiyonların tamamı -20°C'de muhafaza edildi.

### 3.2.6.14 Üretilen Monoklonal Antikorların LPG'ye Karşı Spesifikliğinin SDS-PAGE ve Dot Blot İle Belirlenmesi

**SDS-PAGE Jel Elektroforezi**

Çizelge 3.1 SDS-PAGE için hazırlanan %10'luk jellerin içeriği

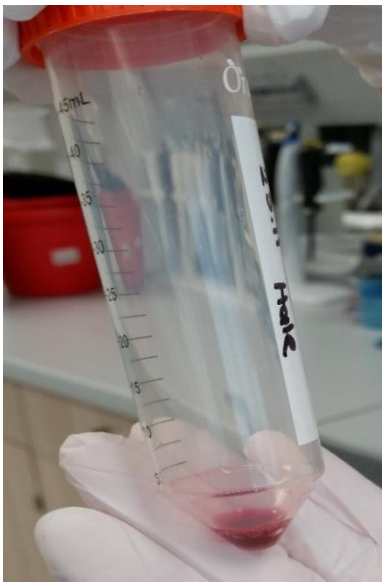
| **Yükleme jeli** | **Ayırma jeli** |
|---|---|
| 3 ml distile su | 4,13 ml distile su, |
| **Yükleme Jeli** | **Ayırma Jeli** |
| 700 µl %30'luk akrilamid /bisakrilamid, | 3,3 ml %30'luk akrilamid /bisakrilamid, |
| 1,25 ml %0.4 SDS içeren 0.5 MTris-H*KL* (pH=6.8), | 2.5 ml %0.4 SDS içeren 1.5 MTris-H*KL* (pH=8.8), |
| 25 µl %10'luk Amonyum sülfat | 60 µl %10'luk Amonyum sülfat |
| 20 µl TEMED | 13 µl TEMED |

İlk önce kulanılacak olan camlar silinerek sisteme otutturuldu. Temiz bir beherin içerisine sırasıyla belirlenen miktarlarda distile su, %30'luk akrilamid, 1.5 M Tris-H*KL* eklendi. Taze hazırlanan amonyum sülfat çözeltisi belirli miktarda ilave edildikten sonra en son TEMED eklenerek, konulan 2 cam arasına pipet yardımıyla hazırlanan jel karışımı döküldü ve polimerleşmesi için üzeri distile su ile kapatılarak bir süre beklendi. Polimerleşmenin ardından üzerindeki su dökülerek yükleme jeli hazırlandı. Yükleme jeli içinde sırasıyla belirlenen ölçülerde distile su, %30'luk akrilamid, 0.5 M Tris-H*KL*, taze hazırlanan amonyum sülfat ve TEMED eklendi. Hazırlanan jel iki cam arasına polimerleşmiş jelin üzerine döküldü ve üzerine tarağın yerleştirilmesiyle kuyucukların

oluşması beklendi. Polimerleşme tamamlandıktan sonra sisteme yerleştirilen camların arasına ve sistem kabının içine yükleme tamponu (1x) dolduruldu. Yüklenecek örneklerden 20 µl, yürütme tamponundan ise 8 µl ependorfun içine koyularak 95°C'de 5 dakika denatüre edildi. Kuyucukların başına SDS leaderdan 3.5 µl koymak üzere, örneklerin tamamı kuyucuklara yüklendi. Kasetin üzeri kapatılarak sistem 100 V.'a ayarlanarak çalıştırıldı. Sistem içinde tam bir ayrışma olduğunda sistem kapatıldı. Camlar birbirinden dikkatlice ayrılarak ayrışmanın olduğu jel alındı ve boyanması için çalkalayıcıda staining çözeltisi içerisinde 1 gece bekletildi. Ertesi gün ise jelin rengi açılana kadar destaining çözeltisinde çalkalanarak analizi gerçekleştirildi.

**Dot Blot**

Dot Blot analizinin gerçekleştirilebilmesi için antijen antikor kompleksmize spesif olarak bağlanacak işaretleyici bir moleküle ihtiyacımız vardı. Bu yüzden, Dot Blot analizin yapılabilmesi için öncelikle saf bir şekilde elde edilen monoklonal antikorların altın naopartiküller ile konjuge edildi. Konjugasyon kitindeki (Altın AB Konjugasyon Kiti (PanReac AppliChem) protokol gereğince; ilk olarak 5 ml konjugasyon bufferı 15 ml'lik falkonun içerisine koyuldu. Konjugasyon bufferı ile monoklonal antikor 20 µg/ml'e ayarlandı ve 0.05 ml antikor çözeltisi falkona aktarıldı. Sonrasında falkona 625 µl altın nanopartikül solüsyonu eklendi. Burada antikorun bağlanması kendiliğinden oluşmuştur. Reaksiyon kabı karıştırılarak 90 saniye oda sıcaklığında inkübe edildi. 312,5 µl bloklama solüsyonu ilave edilerek nanopartikül yüzeyindeki serbest bağlanma yerlerini doyurmak için karıştırılarak 15 dakika inkübe edildi. 62,5 µl stabilizasyon ilave edilirek karıştırıldı. 15 dakika inkübe edildi. Fizyolojik pH'ya ulaşmak için 93,75 µl nötralizasyon çözeltisi ortama ilave edilerek ve karıştırıldı. 5 dakikalık inkübasyon süresi sonunda son olarak 187,5 µl %99'luk glisin reaksiyon kabına eklenerek karıştırıldı. Prob karışımı 30 dakika 3500g'de oda sıcaklığında santrifüjlendi. Santrifüj sonrası ortamdan supernatant uzaklaştırıldı ve pellet 250 µl saklama buffer'ı ile süspanse edilerek +4°C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.18 Elde edilen antikorla kaplı altın nanopartikül çözeltisi

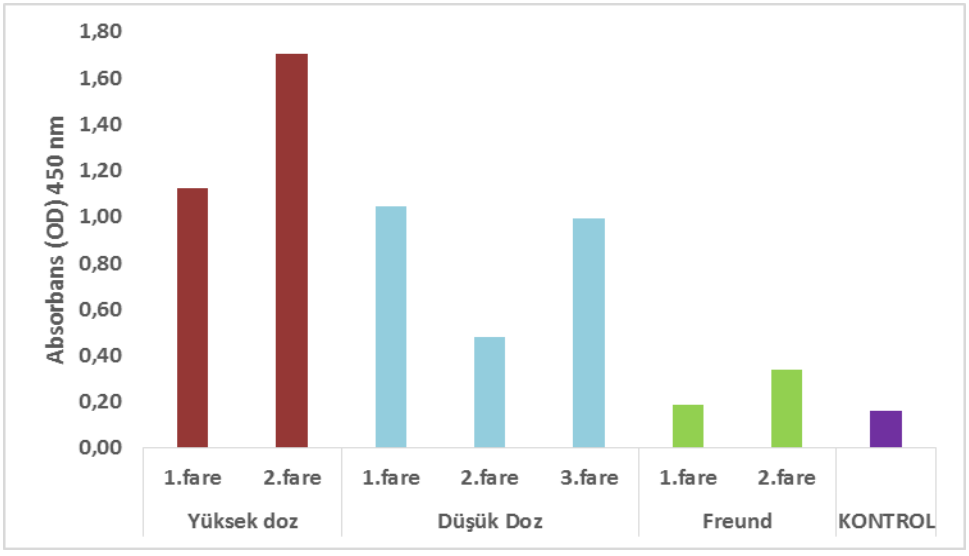
Dot blot analizi için 0.2 µm'lik por büyüklüğüne sahip nitroselüloz membran (0.2 µm Nitroselüloz Membran (GE Healthcare Life Sciences, Amersham Protran Premium)) uygun boyutta kesildi. Yaklaşık olarak 2 µl LPG ile 2 µl saf monoklonal antikor bir ependorfa koyularak birbiriyle inkübe olması sağlandı. Yaklaşık 10-15 dakika sonra 4 µl'lik antijen-antikor kompleksi nitroselüloz membrana koyularak kuruması beklendi. Kuruduktan sonra kağıdın üzerini kaplayacak şekilde bloklama solüsyonu (20 mM PBS + %0.1 BSA) koyularak 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. 1 saatlik inkübasyondan sonra membran (20 mM PBS + %0.05 Tween 20 içeren) yıkama solüsyonu ile 3 er kez 5'er dakika muamele edilerek yıkandı. Üzerine Au ile konjuge monoklonal antikor ilave edilip kuruması beklendi. Membran kuruduğunda bir defa daha Au ile kaplı monoklonal antikor ilave edilerek konsantrasyonu arttırıldı.

# BÖLÜM 4

# DENEYSEL SONUÇLAR

## 4.1 İmmünize Edilen Farelerin Antikor Yanıtları

Füzyon için kullanılan Balb/c farelerinin, L. Tropica'dan izole edilen LPG molekülüyle faklı kombinasyonlardaki adjuvantlarla immünizasyonu belli aralıklarla gerçekleştirildi. Füzyon için belirli tarihlerde immünize edilen farelerin 12.immünizasyondan sonra elde edilen serum örnekleri, indirekt ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. Serum örneklerinin LPG'ye karşı gösterdiği antikor yanıtları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

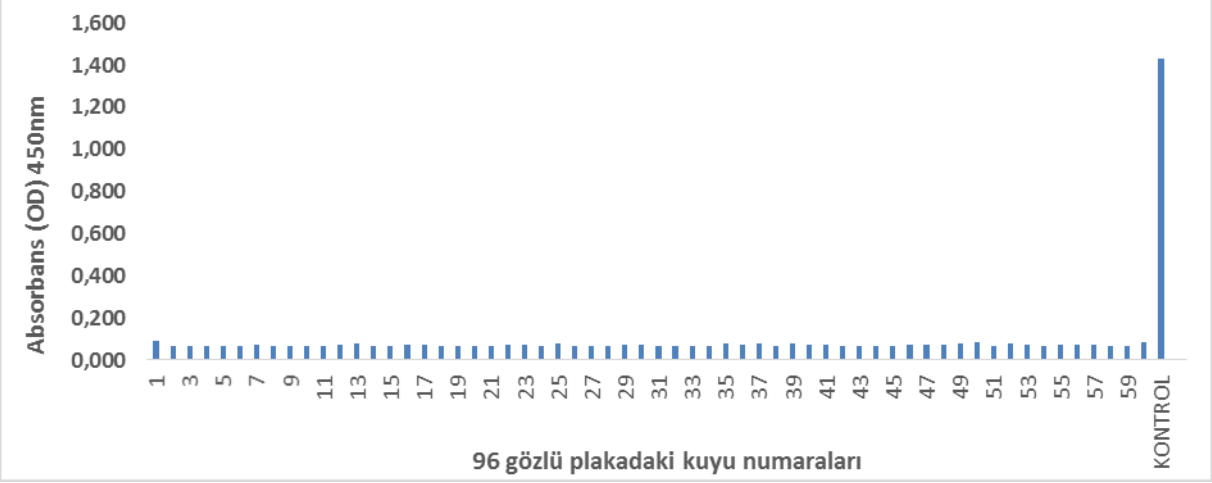



Şekil 4.1 12. İmmünizasyon sonrası farklı antijen - adjuvant kombinasyonları ile immünize edilen farelerden elde edilen serum örneklerinin LPG'ye karşı gösterdikleri antikor yanıtları (Yüksek doz: (LPG : POX (350 µg : 45 µl)), (Düşük doz; LPG :POX (250 µg : 45 µl)), LPG : Freund (150 µg : 45 µl)

Şekil 4.1'de görüldüğü üzere, immünize edilen tüm farelerden elde edilen serum örnekleri 1/50 oranında sulandırılarak indrekt ELISA yöntemi ile LPG'ye karşı antikor yanıtı belirlenmiştir. Tüm farelerde LPG'ye karşı spesifikliğin kontrol grubu fareye göre oldukça yüksek çıktığı görülmüştür. Bu sonuç immünizasyonların başarılı olduğunu göstermiştir. Bu sonuçtan faydalanarak en yüksek antikor yanıtı gösteren yüksek doz LPG molekülü ve POX adjuvantı ile immünize edilen fare füzyon için seçilmiştir.

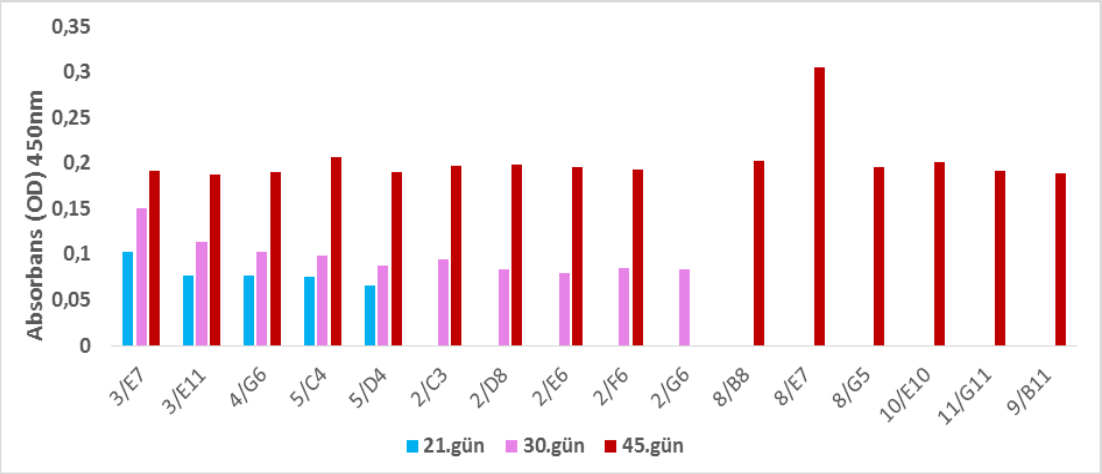
## 4.2 Füzyon Sonuçları

Füzyon aşamasında hücre sayımı gerçekleştirilen myeloma ve dalak hücreleri 1:10 oranında füzyona uğratılmıştır. Bu sayım sonucunda toplamda dalak hücrelerinin sayısı 59.000.000 olarak sayılmıştır. 1:10 oranına uyması için ise 5.900.000 myeloma hücresi süspanse hale getirilerek dalak hücreleri ile birleştirilmiştir. Füzyon prosedüründen sonra hibrid hücreler, daha önceden periton makrofajı ekilmiş 96 gözlü plakaların ortadaki kuyularına 100 µl olacak şekilde ilave edildi. Toplamda 11 tane 96 gözlü plaka (60 x 11 = 660 kuyu) inkübasyona bırakılmıştır. Hibridoma kültürünün 7.gününde deneme amaçlı seçilen 1 adet 96 gözlü plakanın tüm kuyuları LPG'ye karşı antikor yanıtları indrekt ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Kontrol grubunda 1/50 oranında seyreltilmiş fare serumu kullanıldığı ELISA sonucu aşağıdaki gibidir;




Şekil 4.2 7 günlük hibridoma kültüründen elde edilen supernatatların LPG'ye karşı gösterdikleri antikor yanıtları

Şekil 4.2'de görüldüğü gibi 7 günlük bir inkübasyonun hibridoma hücrelerinin yeterli düzeyde antikor üretmesine yeterli olmamıştır. Bu yüzden diğer plakaların inkübasyonuna devam edilmiştir. Toplamdaki 660 kuyuda hibridoma hücresinin görülebilmesi için düzenli olarak inverted mikroskop altında takibi yapılmıştır. İncelemenin sonucunda 660 kuyudan, kültürün 21., 30. ve 45. günlerinde hibridoma görülen kuyular işaretlenerek, kültür supernatantlarının LPG'ye karşı spesikliği indrekt ELISA ile tayin edilmiştir (Şekil 4.3).

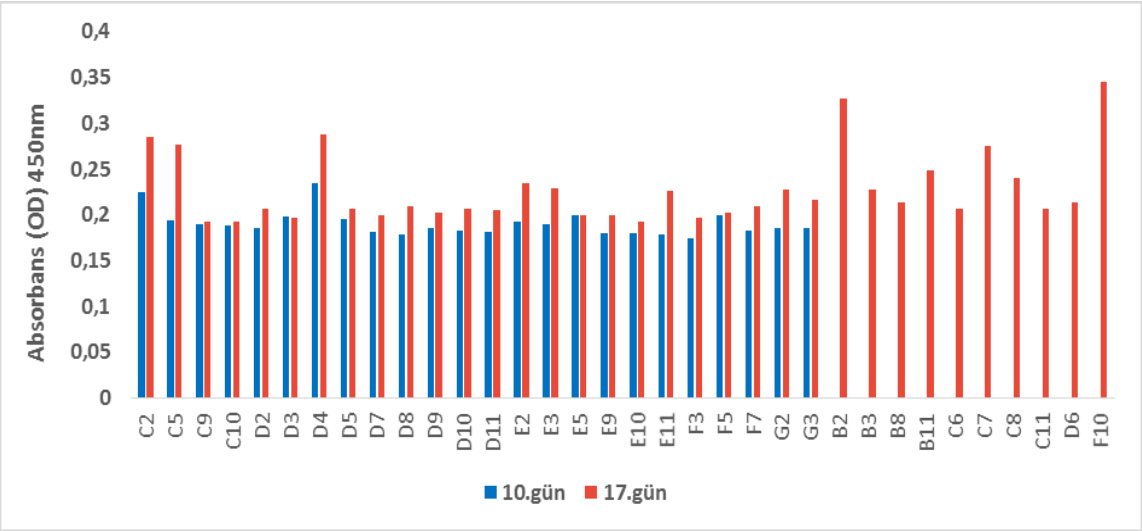



Şekil 4.3 96 gözlü farklı plakalarda kültüre edilen hibridoma supernatantlarının LPG'ye karşı gösterdikleri antikor yanıtları

Grafikte, inkübasyon süresi uzadıkça kuyularda hibrdoma hücrelerinin görülme olasılığı ile hücrelerin antikor üretme kapasitesinin arttığı görülmektedir. Grafikten anlaşılacağı gibi en yüksek absorbans değerinin görüldüğü kuyu 8.plakada kültürlenen 8/E7 kuyusudur. Yaklaşık değeri 0.325 OD (450 nm) olarak ölçülmüştür. Çıkan bu sonuçlar doğrultusunda antikor yanıtı yüksek olan 8/E7 kuyusunun alt klonlanma işlemi yapılmıştır ve bundan sonraki kültür 8/E7 klonu olarak adlandırılmıştır. 8/E7 klonu 96 gözlü plakada kültürlenmiştir.

## 4.3 Alt Klon Hibridoma Kültürün Sonuçları

Alt klon kültürünün (8/E7 klonunun) sürekli takibi neticesinde hibridoma ve hibridoma kolonisi görülen kuyuların, LPG'ye karşı oluşturdukları monoklonal antikor düzeyinin tespiti için toplanan alt klon süpernatantlarının indrekt ELISA analizi yapılmıştır. (Şekil 4.4)

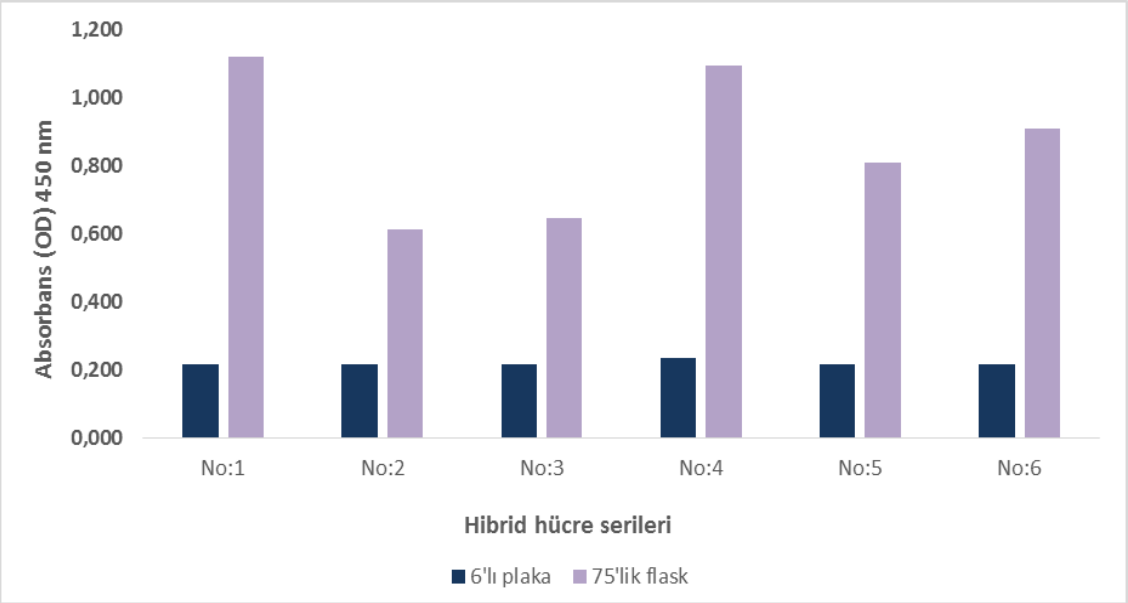



Şekil 4.4 8/E7 klonunun belirli zamanlarda süpernatantı alınmış hibridoma kolonisi gözlemlenen kuyulardaki hücrelerin LPG'ye karşı ürettikleri monoklonal antikor yanıtları

Şekil 4.4'te görüldüğü gibi, 8/E7 (0.325 OD) klonu, sınırlayıcı alt sulandırma işlemi sonucunda 96 gözlü plakanın 60 kuyusunda kültürlenmiştir. Alt klon kültürün 10. gününde 24 kuyuda hibiridoma kolonisi görülürken, kültürün 17. gününde ise 34 kuyuda hibridoma kolonisi gözlemlenmiştir. Koloni oluşan 34 kuyunun tamamında LPG'ye karşı monoklonal antikor yanıt oluşmuştur. En yüksek monoklonal antikor yanıtına sahip kuyular alt klon kültürün 17.gününde süpernatantları toplanan F10 (0,345 OD) ve B2 (0,327 OD) kuyuları olmuştur. 17.günde yapılan indirekt ELISA'da daha fazla kuyunun çalışılmasının sebebi ise hibridoma kültürünün inkübasyon süresi uzadıkça hibrid hücrelerin daha iyi kolonize olmasıdır. 10. ve 17.günde de indirekt ELISA'sı yapılan kuyularda antikor yanıtları kültür devam ettikçe artmıştır. Yapılan alt klonlama sonrası yüksek antikor yanıtı saptanmış F10 ve B2 kuyuları, kademeli olarak büyük ölçek kültürü yapılmak üzere sırasıyla; 24'lü,12'li, 8'li plakaların ardından 25 $cm^{2}$'lik ve 75 $cm^{2}$'lik flasklara aktarılarak büyük ölçekte kültürlenmiştir. 6 gözlü plakanın her bir kuyusu farklı bir 75 $cm^{2}$'lik flaska pasajlanarak toplamda 6 farklı 75 $cm^{2}$'lik flask elde edilmiştir.

## 4.4 Büyük Ölçek Hibridoma Kültürünün Sonuçları

Her bir büyük ölçeğe geçiş aşamasında toplanan hibridoma süpernatantlarının monoklonal antikorlar düzeylerinin karşılaşılaştırılması için indrekt ELISA ile analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 6 gözlü plakada ve 75 $cm^2$'lik flaskta kültürlenen aynı hibridoma hücrelerine ait süpernatantlar indrekt ELISA yöntemi ile analiz edilerek kıyaslanmıştır (Şekil 4.5).




Şekil 4.5 6'lı plakadan ve 75 $cm^2$'lik flasktan alınan hibridoma supernatantların LPG'ye karşı gösterdikleri monoklonal antikor yanıtları

Şekil 4.5'te sonuçları karşılaştırılan süpernatantlar; aynı hibrid hücrelerinin 6 gözlü plakadan ve 75 $cm^2$'lik flasklardan toplanan süpernatantlardır. 6'lı plakalarda kültüre edilen hibrid hücreler birbirine yakın düzeyde monoklonal antikor üretmişlerdir. (Mavi göstergeler) 6'lı plakalarda kültürlenen hibrid hücreler yaklaşık olarak 0,215 OD (450 nm) değerinde antikor üretirken 75 $cm^2$'lik flasklara aktarıldıktan sonra bütün hibridoma serilerinde üretilen monoklonal antikor seviyelerinde artış görülmüştür. 6 gözlü plaka ile 75 $cm^2$'lik flask karşılaştırıldığında flask yaklaşık olarak 6 kat daha geniş bir kültür ortamı sunmaktadır. 75'lik flaska aktarıldıktan sonra hücreler daha yüksek üreme hızı göstererek flaskın tabanını kaplamışlardır. 75'lik flasklarda kültürlenen hücreler, 6'lı plakada kültürlenirken ulaştıkları maksimum hücre sayısından çok daha fazla hücre sayısına ulaşmışlardır. Bu yüzden büyük ölçekğe geçildikçe daha yüksek oranda monoklonal antikor elde edilmiştir.

## 4.5 Monoklonal Antikorun Alt İzotipinin Belirlenmesi

L. tropica'dan izole edilen LPG antijenine karşı özgü monoklonal antikorlar büyük ölçek kültürlerde üretildikten sonra saflaştırma işlemlerinin kararlaştırılması için antikorun alt izotipi belirlendi.

a)




b)

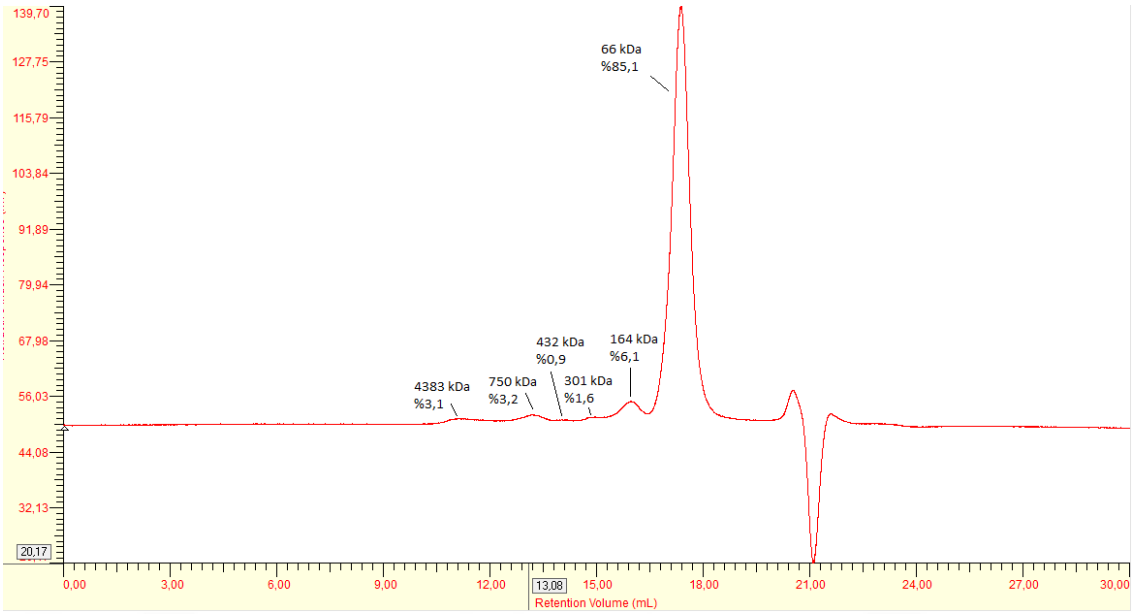



Şekil 4.6 Alt izotip belirleyici kit sonucu

Şekil 4.6'da, A'da testin çalıştığını gösteren pozitif bant, ağır zincirini gösteren M bantı ve hafif zinciri gösteren kappa bantında mavi bant gözlemlenmiştir. B'de ise testin çalıştığını gösteren pozitif bantın yanında silik bir G3 bantı görülmüştür. Bu aşamadan sonra +4°C'de muhafaza edilen hibridoma süpernatantları amonyum sülfat ile çöktürülerek istenmeyen proteinler, diyaliz ile de ortamdaki tuzlar uzaklaştırılmıştır.

## 4.6 Jel Filtrasyon Kromatografi (GPC) Sonucu

Amonyum sülfat ve diyalizi yapılmış yarı saf haldeki örnekler jel filtrasyon kromatografiden geçirilerek numune içindeki alt birimlerin moleküler ağırlığı ve yüzdelikleri belirlenmiştir. Numunenin içindeki alt birimleri gösteren grafik aşağıdaki gibidir:

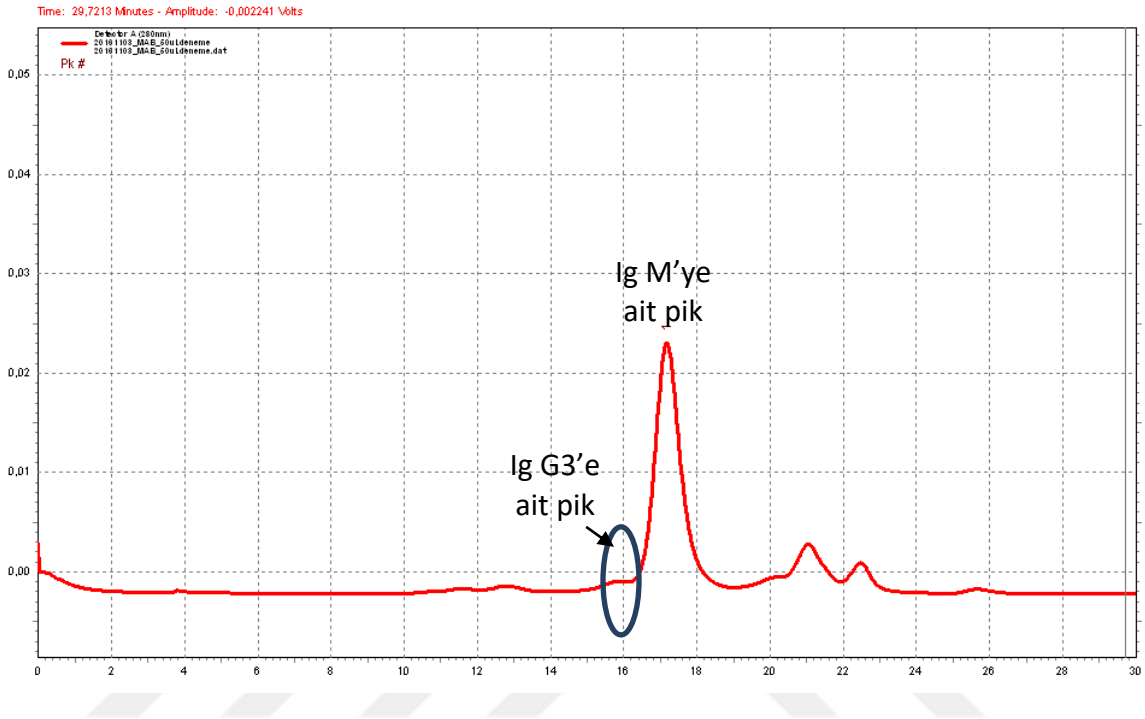



Şekil 4. 7 Yarı-saf supernatantın GPC grafiği

Şekil 4.7' de görüldüğü gibi; ilk pikte 4383 kDa'luk kısmın dispersitesi (Mw/Mn, polimerik yapı olup olmadığını gösteren değer) 1'in üzerinde çıkmıştır. Bu değerin 1 civarında olması, yapının protein, sakkarit ya da nükleik asit olduğunu göstermektedir. İlk pikteki dispersite değeri 2.31 oluğu için bu yapının agregat olduğu söylenebilir. İkinci pikte ise numunenin %3,2'lik kısmını oluşturan 750 kDa'luk alt birim, üçüncü pikte örneğin %0,9'luk kısmını oluşturan 432 kDa'luk kısım ve bir sonra ki pikte %1,6'lık kısmı oluşturan 301 kDa'luk altyapı görülmektedir. Diğer pikte gözlemlenen yarı-saf örneğin %6,1'sını oluşturan IgG3 olarak öngördüğümüz literatüre uygun 164 kDa'luk moleküler ağırlığına sahip altyapı görünmektedir. Son pikte, numunenin büyük bir kısmını oluşturan ve IgM olması gereken fakat kDa'unu daha az olduğu için kuşkuya düştüğümüz 66 kDa'luk kısım görülmektedir. Literatürde IgM'nin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 900 kDa olarak geçmektedir. Bu kuşkuyu ortadan kaldırmak için, ilk HPLC sonucunda IgM olarak tahmin ettiğimiz fraksiyonu alt izotip belirleyici strip ile tekrar test edilmesine karar verilmiştir.

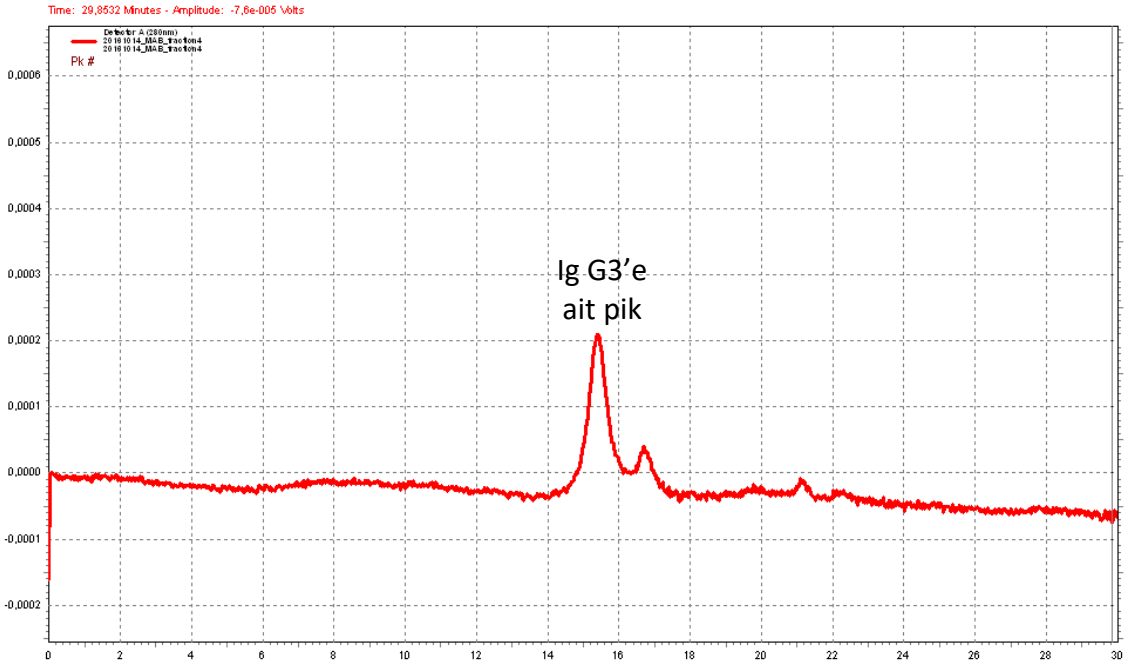
## 4.7 HPLC Sonuçları

Yarı saf haldeki örneklerden, monoklonal antikorı saf bir şekilde elde etmek için HPLC yapılmıştır. HPLC sistemine verilen süzülmüş yarı saf örneğin kolon boyunca ilerledikten sonra alınan sonucu aşağıdaki gibidir;

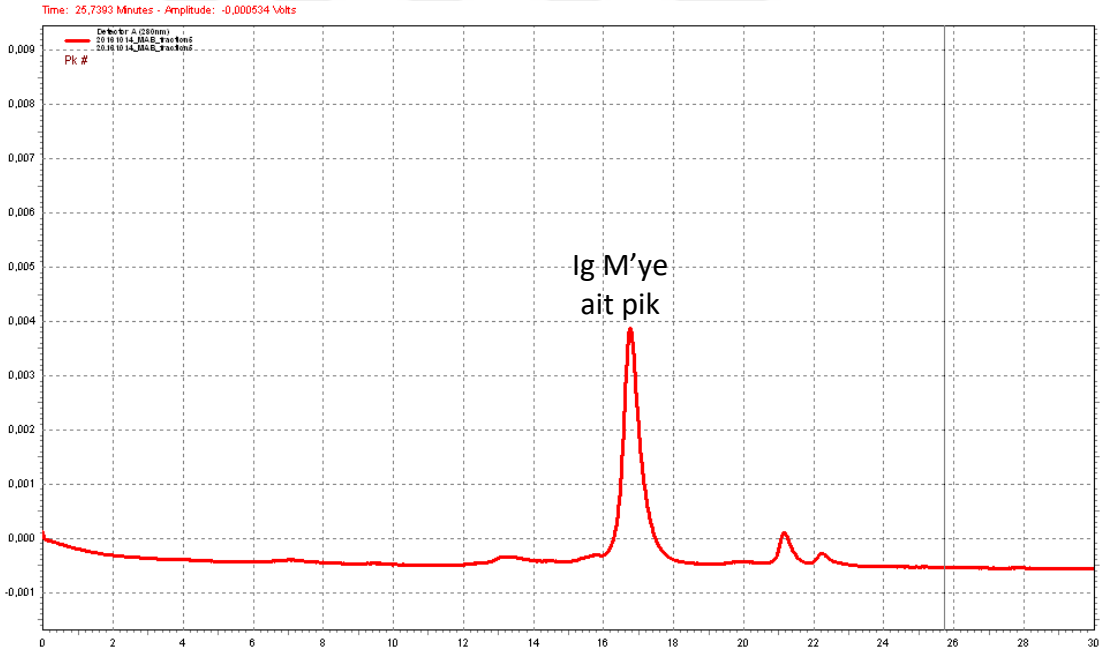



Şekil 4. 8 Süzülmüş yarı-saf örneğin HPLC sonucu

Şekil 4.8'i görmemizdeki temel amaç, ayırmak istediğimiz kısımların kolondan kaçıncı dakikada geçtiğini görmektir. Sırasıyla süzülmüş bir şekilde kolona yüklenen numunelerin kolon içerisindeki hareketi grafikte izlendi. Toplanmak istenilen bölgenin pik başlangıcı ve bitişi dikkate alınarak fraksiyonlar toplandı. Bu yüzden, IgG3 için 16.dakika içerisinde, IgM için ise 16-18.dakikalar arasında monoklonal antikorlar fraksiyon tüplerine toplandı. Toplanan fraksiyonların tamamı -20°C'de muhafaza edildi. Tüpte toplanan IgG3'ün ne kadar saf bir şekilde elde edildiğini görmek için fraksiyon tekrardan HPLC'den geçirilerek test edildi.



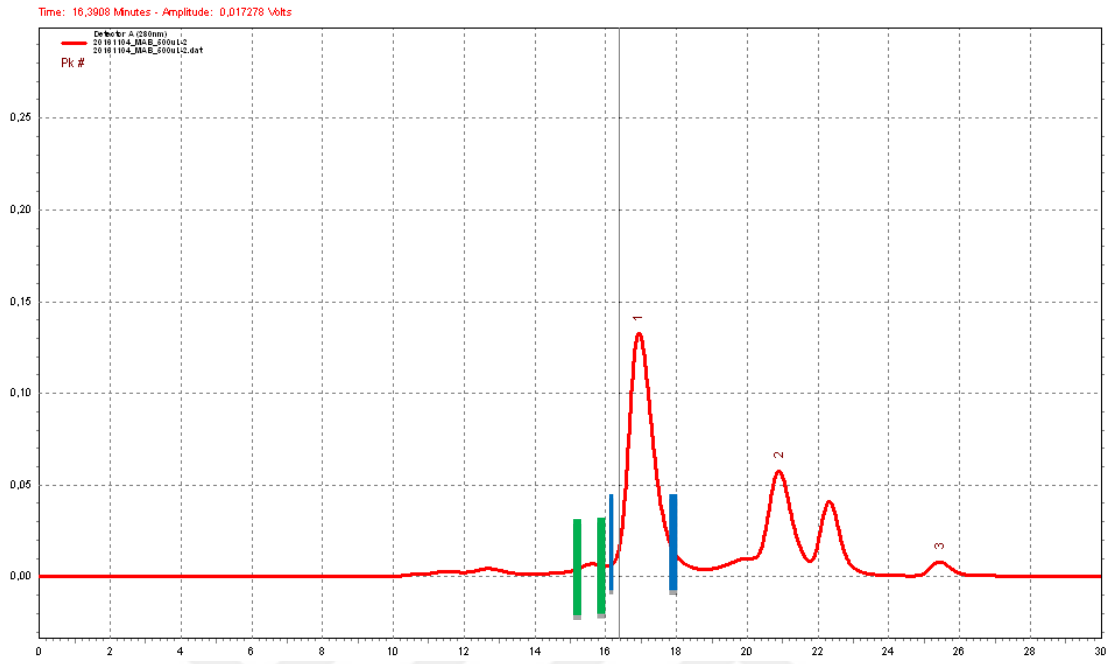

Şekil 4. 9 IgG3 fraksiyonunun HPLC sonucu




Şekil 4. 10 IgM fraksiyonunun HPLC sonucu

Şekil 4.9; 30 dakikalık HPLC sonucunda, IgG3'ün saf olarak elde edildiğini göstermektedir. IgG3'ün hem numune içinde düşük yüzdeliğe sahip olması hemde kolonu terketme zamanına yakın IgM'nin kolondan geçmesinden dolayı IgG3'ün toplanma süresini kısıtlanmıştır. Bu yüzden IgG3'te örnek kaybının olduğu

görülmektedir. Şekil 4.10'da ise IgM'nin saf bir şekilde elde edildiği, sistemin kayda değer tek pik vermesiyle doğrulanmıştır.




Şekil 4.11 Fraksiyonların toplanmasındaki başlangıç ve bitiş noktaları

Grafik 4.11'de görüldüğü gibi yeşil ile gösterilen aralık IgG3 toplandığı alanı, mavi ile gösterilen aralık ise IgM'nin toplandığı alanı ifade etmektedir. IgG3'ün pik sonu ile IgM'nin pik başlangıcı çakıştığı için, IgG3 fraksiyonuna IgM düşmemesi adına toplama işlemi daha önceden kesilerek tamamlanmıştır. Toplama süresinin kısalığı toplanan IgG3 fraksiyonarının düşük konsantrasyonlu olmasına neden olmuştur.

## 4.8 HPLC Sonucu Elde Edilen Fraksiyonların Değerlendirilmesi

### 4.8.1 IgM Fraksiyonun Alt İzotip Belirleyici Strip Sonucu

kDa açısından kuşkuya düşülen fakat IgM olarak tahmin edilen fraksiyon, alt izotip belirleyici striple tekrar test edildi. Sonuç aşağıdaki gibi olumlu çıkmıştır;




Şekil 4. 12 IgM fraksiyonun alt izotip belirleyici strip analiz sonucu

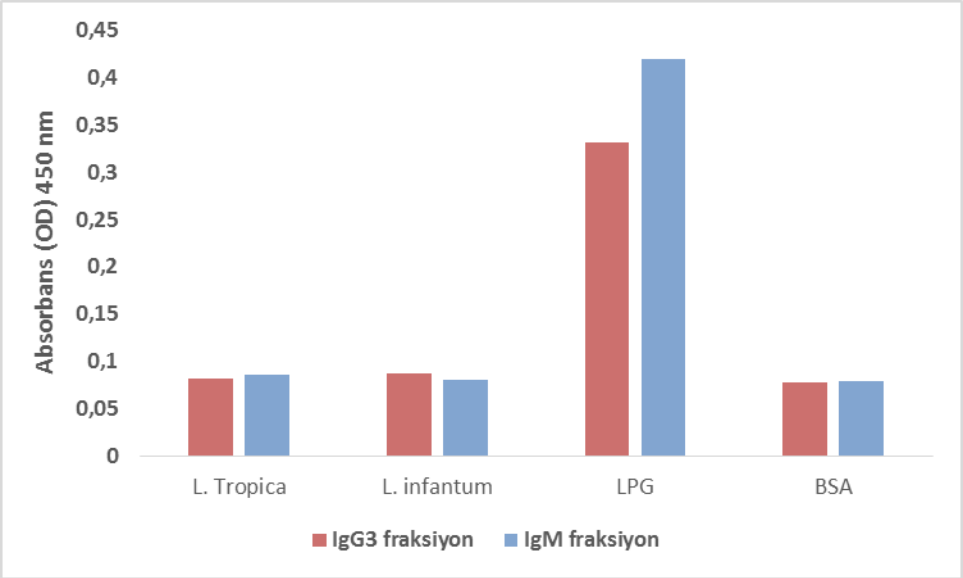
Şekil 4.12'de M bandını gösteren çizgiler dışında sadece testin çalışıp çalışmadığını gösteren kontrol bantları görülmüştür.

### 4.8.2 Elde Edilen Fraksiyonların Monoklonal Antikor Miktarının Belirlenmesi

Büyük ölçek üretilen hibrid hücrelerinde toplanan bütün süpernatantlar HPLC'den geçirelerek monoklonal antikorlar saf bir şekilde elde edilmiştir. Elde edilen IgM ve IgG3 monoklonal antikorların miktar tayini için UV Spektrofotometrede ölçüm alınmıştır. Yapılan ölçüm neticesinde alınan absorbans değerlerine göre IgG3 fraksiyonun 1 ml'sinde yaklaşık 1 mg IgG3'ün, IgM fraksiyonun 1 ml'sinde ise yaklaşık olarak 6 mg IgM monoklonal anitkor olduğu bulunmuştur. (IgG3 1mg/ml, IgM 6mg/ml)

### 4.8.3 Saf Monoklonal Antikorların Çapraz Reaksiyon Sonuçları

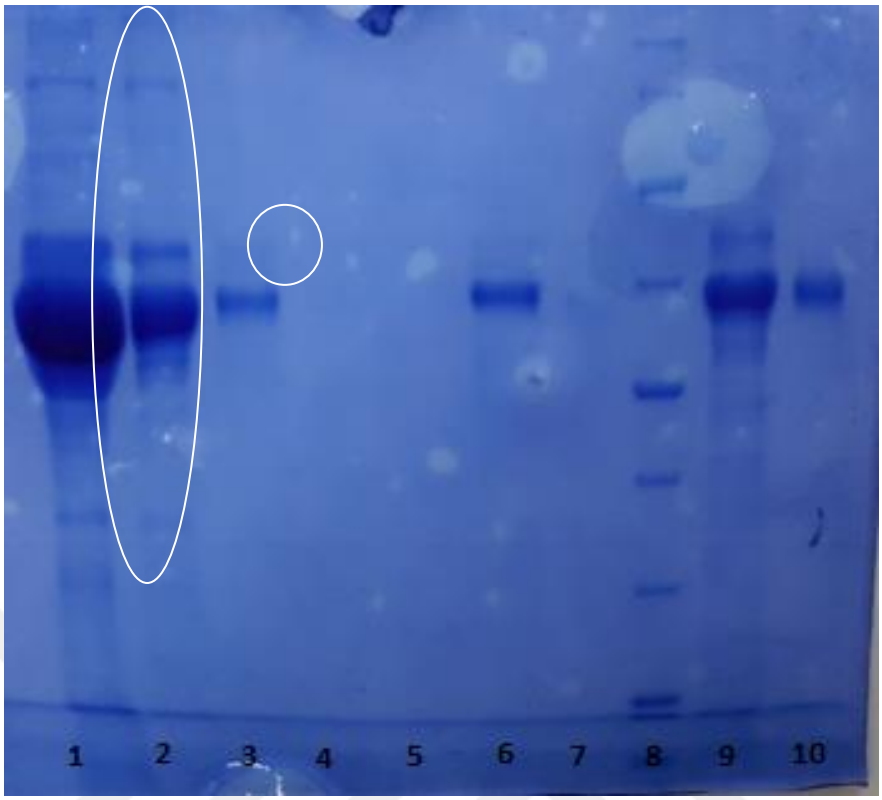
LPG'ye karşı yüksek monoklonal antikor yanıtının oluştuğu 8/E7 klonundan üretilen büyük ölçek hibrid hücre süpernatantlarının HPLC ile elde edilen fraksiyonları, farklı antijenik yapılara karşı oluşturduğu antikor yanıtları indrekt ELISA analizi yapılarak test edilmiştir. Bu analiz için 96 gözlü plakalar, L. infantum'un parçalanmış bütün yüzey antijenleri, L. tropica'nın parçalanmış bütün yüzey antijenleri ve BSA ile kaplanmıştır.




Şekil 4.13 HPLC'den elde edilen monoklonal antikor fraksiyonlarının farklı antijenik yapılara karşı gösterdiği antikor yanıtları

Şekil 4.13'den anlaşılacağı üzere, saf monoklonal antikorların BSA, L. infantum'un ve *L.tropica*'nın parçalanmış bütün yüzey antijenleri gibi antikor cevabının görülebileceği antijenik yapılara karşı antikor cevabı göstermediği tespit edilmiştir. Bu da elde edilen monoklonal antikorların herhangi bir çapraz reaksiyon göstermediğini, sadece belirli epitopa karşı (LPG) üretildiğini ortaya koymuştur.

### 4.8.4 SDS-PAGE Sonuçları




Şekil 4. 14 SDS-PAGE sonucu

Şekil 4.14'teki; 1. ve 2. kuyular saflaştırılmamış monoklonal antikorlar (farklı hibrid hücrelerden toplanmış süpernatatlar), 3.kuyu HPLC sonucu alınan IgM fraksiyonu, 4. Ve 5. Kuyulara HPLC sonucu alınan IgG3 fraksiyonu, 6.kuyu HPLC sonucu alınan IgM fraksiyonu, 7.kuyu ihmal edilmiştir, 8. Kuyu Ledder, 9.kuyu HPLC'den geçmemiş sadece amaonyum sülfat ve diyaliz işlemleri gerçekleştirilmiş yarı saf örnekler, 10.kuyu ise BSA'dır. 1. ve 2. kuyulardaki örnekler saflaştırılmadığı için içinde farklı moleküler ağırlığa sahip alt birimlerin olduğu ve bantların üst üste binerek bir yığıntı oluşturduğu görülmektedir. 9.kuyuya bakıldığında ise 1 ve 2 kuyulara nazaran bantların daha belirgin olduğu ve istenmeyen yapıların amonyum sülfat ve diyaliz işlemleriyle örnekten uzaklaşırıldığı görülmektedir. 3. Ve 6. Kuyuya yüklenen HPLC sonucu elde edilen IgM fraksiyonu ise sadece 68 kDa'lık kısımda bant vererek HPLC'nin başarılı olduğunu kanıtlamıştır. Bu kDa aralığı 10.kuyuya koyulan 68 kDa'luk BSA örneğiyle de desteklenmiştir. Jelde IgG3 fraksiyonu (4. ve 5. kuyular) bant oluşturmamıştır. Bunun sebebi ise; elde ettiğimiz IgG3 fraksiyonun düşük konsantrasyonda olmasıdır.

Saflaştırılmamış ve saflaştırılmış örneklerin kuyuları karşılaştırıldığında (şekilde yuvarlak ile gösterilmiştir) saflaştırmadan sonra örneğin nasıl tek banta indiği görülmektedir.

### 4.8.5 Dot Blot Sonuçları

LPG molekülü ile saf haldeki monoklonal antikorların görsel anlamda birleştiğini görmek için Dot Blot analizi yapılmıştır. Uygun membran, uygun bloklama ve yıkama solüsyonları kullanılarak, antijen antikor kompleksinin membrana tutunması sağlanmıştır. Son aşamada noktasal kırmızılığı vermesi adına, daha önceden konjugasyonu yapılan monoklonal antikor ile kaplı altın nanopartiküller membrana yüklenmiştir.

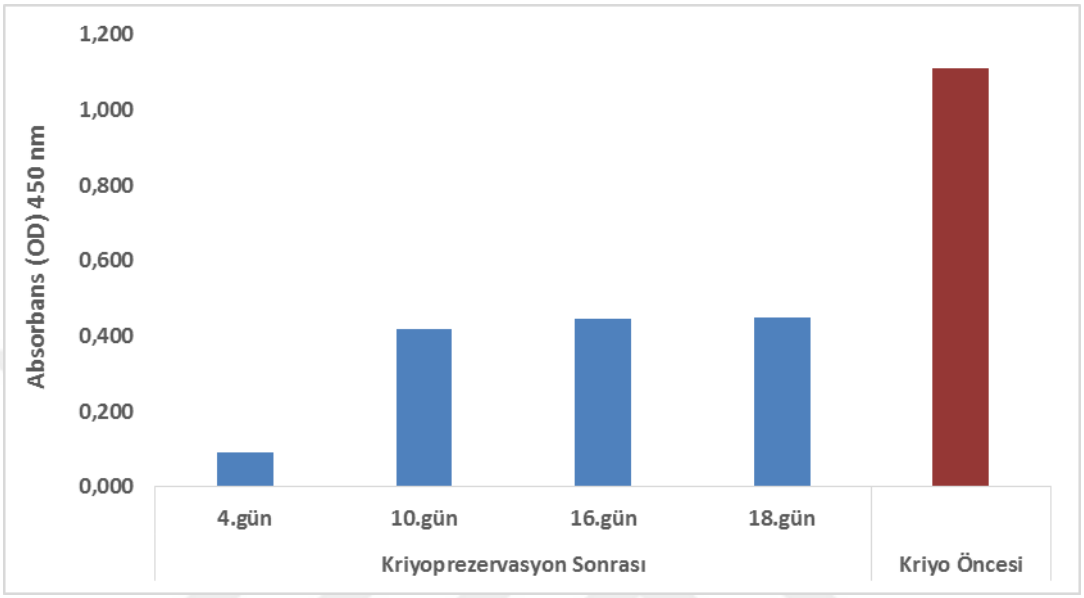


Şekil 4. 15 Dot Blot sonucu

Şekil 4.15'te son yıkama işleminden sonra membranda oluşan pembe noktasal görüntü, membran üzerinde yüklenen antijen antikor kompleksine monoklonal antikor kaplı altın nanopartiküllerin bağlandığını gösterir. Bu sonuç elde edilen saf monoklonal antikorun LPG ile spesifik bir bağlanma gerçekleştirdiğini kanıtlamıştır.

### 4.9 Kriyobanktan Çıkarılan Hibrid Hücrelerinin Antikor Yanıtları

Monoklonal antikor üreten hibrid hücrelerinin dondurma işleminden önce LPG'ye karşı ürettiği monoklonal antikor düzeyleri ile kriyoprezarasyon sonrası kültürlenen hibrid hücrelerinin LPG'ye karşı ürettiği monoklonal antikor yanıtları karşılaştırıldı.




Şekil 4.16 Kriyoprezervasyon işlemi öncesi ve sonrasında hibridoma hücrelerinin LPG'ye karşı ürettikleri antikor yanıtları

Sıvı azot tankından çıkartılarak tekrardan kültüre edilen hibridoma hücreleri kültürün 2.gününde ortama adapte olup çoğalmaya başlamışlardır. Hibridoma kültürün süpernatantları, besiyeri değişimi ve pasajlama esnasında toplanmıştır. Farklı tarihlerde toplanan hibridoma süpernatantlarının LPG'ye karşı gösterdiği antikor yanıtları Grafik 4.16'da gösterilmiştir. Grafikteki sonuçlar karşılaştırıldığında kriyoprezervasyon öncesi hibridomaların daha fazla monoklonal antikor sekrete ettiği görülmüştür. Kriyoprezervasyon sonrası açılan hibridoma kültürü, kültür süresince daha fazla antikor üretmeye devam etmiştir. Kriyoprezervasyon öncesi hibrid hücreler 1,110 OD (450 nm) düzeyinde monoklonal antikor üretirken kriyodan sonrası kültürün 18.gününde üretilen monoklonal antikor düzeyi 0,450 OD (450 nm) olarak ölçülmüştür. Değerler göz önüne alındığında kriyoprezervasyon sonrası hücrelerin antikor üretme kapasitesinin %59,4 oranında düştüğü görülmektedir.

# BÖLÜM 5

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Dünyanın en önemli halk sağlığı problemlerinden birisi olan Leishmaniasis enfekte kum sineklerinin (Phlebotomus) kan emme esnasında memeli konaklara bulaştırdıkları hücre içi Leishmania protozoonları vasıtasıyla ortaya çıkan parazitik bir hastalıktır [1]. Yüz ve el gibi açık bölgelerde yıllarca iyileşmeden kalabilen ve ciddi estetik kaygılara yol açan Kütanöz leishmaniasis, genellikle yüksek düzeyde bir antikor tepkisine yol açmadığından tanıda kullanılan antikor temelli testlere karşı duyarlılığı düşük bir Leishmaniasis formudur. [24], [25], [26]. Buna göre de, Kütanöz leishmaniasis tanısında antijen temelli serolojik testlerin değeri daha çok önem kazanmaktadır. Ancak antijen temelli serolojik yöntemler, antijene karşı üretilmiş yoğun bir antikorun bulunduğu koşullarda gerçekleşebilir. Bu sebeple, Kütanöz leishmaniasis tanısında veya tanı kitlerinin geliştirilmesinde kullanılacak yüksek konsantrasyonlu antikorlar, hibridoma teknolojisine dayalı üretilen monoklonal antikorlar ile mümkün olabilcektir.

Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarımızda, “Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesinde polimerlere dayalı yeni bir yaklaşım: LPG-polimer konjugatları” adlı projenin tamamlanması sonucunda L.tropica parazitlerinde immünojen molekül olan lipofosfoglikan (LPG) molekülü izole edilmiş ve bu molekülün hastalığa karşı %83 oranında koruyuculuk gösterdiği ortaya çıkmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda LPG molekülü parazitin en immünojen molekülü olduğu ve bu moleküle karşı üretilecek antikorların yüksek tanı değerine sahip olacağı düşünülmüştür. Özellikle L.tropica parazitinin LPG molekülüne karşı geliştirilecek monoklonal antikor temelli tanı kitinin

geliştirilmesi ileride kütanöz leishmaniasis tanısını kolaylaştırmasında etkin rol oynayabilecektir.

Bu amaç doğrultusunda yapılan tez çalışmasında aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir;

- Hibridoma teknolojisinin temel prensipleri gereğince, immünizasyonda kullanılacak antijen ve adjuvant seçimi immünizasyonun altın kriterlerini oluşturmaktadır. Çünkü iyi bir immünizasyon, fareden antikor yanıtı yüksek B-lenfosit hücrelerini meydana getirmektedir. Antikor yanıtı yüksek B hücrelerinin, dişi Balb/c fareden elde edilmiş P3-X63-Ag8.653 myeloma hücreleri ile füzyonu sonucu hibridoma hücrelerinin başarılı bir şekilde oluşturulması sağlanır. Bu sebeple doğru immünizasyon uygulaması için 6 haftalık dişi Balb/c fare ırkı ve Freund adjuvantının yanı sıra laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalar doğrultusunda etkinliği tespit edilmiş, toksik olmayan, FDA onaylı POX adjuvantı immünizasyon işlemi için seçilmiştir. İmmünizasyonda antijen kaynağı olarak, *L.tropica* promastigotlarından izole edilen LPG molekülü kullanılmıştır. LPG ve POX kompleksinin; düşük dozu (LPG :POX (250 µg : 45 µl) 3 fareye, yüksek dozu (LPG : POX (350 µg : 45 µl)) 2 fareye, LPG ve Freund adjuvant kompleksi (LPG : Freund (150 µg : 45 µl)) ise 1 fareye intraperitonel olarak uygulanmıştır (Şekil 3.2). İmmünizasyonlar 10 gün arayla gerçekleştirilmiş ve 12. İmmünizasyon sonrası farelerden elde edilen serum örnekleri indirekt ELISA yöntemiyle 1/50 oranında sulandırılarak LPG'ye karşı oluşturdukları antikor yanıtları incelenmiştir (Şekil 4.1). Elde edilen sonuçlarda yüksek doz LPG:POX kompleksiyle immünize edilen 2 numaralı farenin LPG'ye karşı en yüksük antikor yanıtına (1,70 OD (450 nm)) sahip olduğu saptanmış ve füzyon için seçilmiştir.
- İmmünizasyon işleminin paralelinde Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarımızda daha önceden kriyo bankı oluşturulumuş myeloma hücre hattı sıvı azottan çkarılarak kültürü yapılmıştır. Füzyon işleminden sonra ortamda sadece hibridoma hücrelerinin bulunması için myeloma hücreleri 8-azaguanin mutajenik maddesiyle belli oranlarda muamele edilerek HGPRT enziminden yoksun hale getirilmiştir. Böylece, füzyon sonrası kültür ortamındaki seçici besiyeri (HAT) varlığında ortamda sadece hibridoma hücreleri çoğalması sağlanmıştır.

- Füzyon öncesinde, hibridoma kültürü için besleyici hücre hattı olması için kontrol grubu fareden periton makrojları elde edilerek füzyon sonrası hibridoma kültürünün sürdüreleceği kuyulara ekimi gerçekleştirilmiştir.
- LPG'ye karşı yüksek immün yanıt oluşturan farenin dalağından elde edilen B-lenfositleri, 8-azaguanine maruz bırakılarak log fazında kültürlenen P3-X63-Ag8.653 myeloma hücreleri ile PEG varlığında füzyonu gerçekleştirilmiş ve seçici kültür ortamı içerisinde (HAT) kültürlenmiştir. Yapılan hibridoma kültüründe, LPG'ye karşı antikor üreten kuyular indirekt ELISA ile belirlenmiştir (Şekil 4.3). Kültür süresi uzadıkça LPG'ye karşı üretilen antikor yanıtları ile ve başka kuyularda hibridoma kolonisi görülme şansının arttığı saptanmıştır. LPG'ye karşı en yüksek antikor yanıtın görüldüğü kuyu 8.plakada kültürlenen E7 kuyusu OD 0.325 (450 nm) olmuştur. 8/E7 kuyusundaki hibridoma hücreleri, sınırlayıcı sulandırma yöntemi ile alt klonlanarak 96 gözlü plaklara ekimi gerçekleştirilmiştir (8/E7 klonu). Alt klonlama işleminde kullanılan kültür ortamında, daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalar neticesinde fare periton makrofajları yerine J774 hücre hattından alınan metabolit kullanımı kontaminasyonun ve aynı zamanda ekonomik ve etik olarak boş yere fare kullanılmasının önüne geçip olumlu sonuçlar vermesiyle bu tez çalışmasında da hibridoma kültürüne sağladığı olumlu etkisinden dolayı J774 üst sıvısı ve DNA sentezini teşvik edici HT besi ortamı kullanılmıştır.
- 96 gözlü plakta kültürlenen 8/E7 klonu, sürekli takip edilerek kuyularda kolonize olan hibridoma hücrelerinin LPG'ye karşı oluşturdukları monoklonal antikor yanıtları belli aralıklarla indirekt ELISA ile ölçülmüştür (Şekil 4.4). 8/E7 klonunda LPG'ye karşı en yüksek antikor yanıtını F10 (0,345 OD) ile B2 (0,327 OD) kuyularında görülmüştür. F10 ve B2 kuyularından toplanan hibridoma hücreleri sırasıyla 48'li, 24'lü, 12'li ve 8'li plakaların ardından 25 $cm^2$'lik ve 75 $cm^2$'lik flasklara aktarılmıştır. 6 gözlü plakanın her bir kuyusu farklı bir 75 $cm^2$'lik flaska pasajlanarak toplamda 6 farklı 75 $cm^2$'lik flask elde edilmiş ve *in vitro*'da büyük ölçek hibridoma üretimi yapılmıştır.
- LPG'ye karşı monoklonal antikor üreten hibridoma hücrelerinin büyük ölçek üretimi 75 $cm^{2'}$lik flasklara kadar yapılmıştır. Kademeli ölçek büyütme işlemleri sırasında 6 gözlü plakadan alınan hibridoma üst sıvısı ile 75 $cm^{2'}$lik flasklardan toplanan hibridoma üst sıvısının LPG'ye karşı ürettikleri antikor yanıtları indirekt ELISA yöntemi ile

kıyaslanmıştır (Şekil 4.5). Sonuçlar; kültür ölçeğinin büyümesiyle hibridoma hücrelerinin ortama sekrete ettiği monoklonal antikor miktarının doğru orantılı bir şekilde arttığını göstermiştir.

- Üretilen monoklonal antikorların saflaştırma basamaklarının belirlenebilmesi için alt izotip belirleyici kit ile immunoglobulin alt tipi tayin edilmiştir. Analiz sonucu üretilen monoklonal antikorların iki alt sınıfa (IgG3 ve IgM) ait olduğu bulunmuştur (Şekil 4.6)
- Büyük ölçek hibridoma kültüründen elde edilen süpernatantların saflaştırma prosesleri; amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kromotografisi (HPLC) yapılarak gerçekleştirilmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi yarı saf (amonnyum sülfat ve diyalizi yapılmış hibridoma süpernatantları) örneklerinin içindeki bütün alt birim yapılarını görmemizi sağlayarak (Şekil 4. 7) HPLC'de iki ayrı immunoglobulin sınıfının saf bir şekilde elde edilebilmesi sağlamıştır (Şekil 4.9 ve 4.10)
- Elde edilen saf monoklonal antikorlar ile saflaştırılmamış hibridoma süpernatant örneklerinin SDS-PAGE analizi yapılarak saflaştırmanın ne kadar başarılı olduğu görülmek istenmiştir (Şekil 4. 14). Elde edilen IgG3 fraksiyonu düşük konsantrasyonda olması sebebiyle jelde bir bant verememiştir. Fakat daha yüksek konsantrasyonda elde edilen IgM fraksiyonu jelde tek bir bant vererek saf bir şekilde elde edildiği teyit edilmiştir. Bu analiz ile sadece amonyum sülfat çöktürmesi ve diyalizi gerçekleştirilmiş süpernatantların hiçbir saflaştırma basamağı uygulanmamış süpernatantlara oranla yüksek ölçüde safsızlıklardan arındığı görülmüştür.
- HPLC'de yüksek hassasiyetle birbirinden ayrılan IgG3 ve IgM monoklonal antikorlarının LPG'ye karşı olan spesikliği çapraz reaksiyon ve Dot Blot analizleri ile değerlendirilmiştir. Yapılan çapraz reaksiyon sonucunda (Şekil 4.13) saf bir şekilde elde edilen monoklonal antikor fraksiyonları; BSA, L. infantum'un ve *L.tropica*'nın parçalanmış bütün yüzey antijenleri gibi antikor cevabının görülebileceği antijenik yapılara karşı antikor cevabı göstermediği sadece LPG'ye karşı yüksek spesifiklik gösterdiği tespit edilmiştir.
- Yapılan Dot Blot analizinde, hibridoma hücrelerinin LPG molekülüne karşı ürettiği monoklonal antikorların, LPG molekülüne bağlanarak, monoklonal antikor ile kaplı altın nanopartiküllere tutunması gerçekleştirilmiştir. Antijen-antikor kompleksinin spesifik

bir şekilde monoklonal antikor kaplı nanopartiküllere bağlanması nitroselüloz membran üzerinde pembe nokta halinde görülmüştür (Şekil 4. 15) Bu test sonucunda elde edilen saf monoklonal antikorun LPG molekülüne karşı spesifik olduğu bir kez daha kanıtlanmıştır.

- Son olarak kriyoprezervasyonu gerçekleştirildikten bir süre sonra sıvı azottan çıkartılmış LPG'ye karşı spesifik monoklonal antikor üreten hibridoma hücreleri ile ve kriyoprezervasyon öncesi hibridoma hücrelerinin LPG'ye karşı oluşturdukları antikor yanıtları kıyaslanmıştır (Şekil 4. 16). Sonuçlar değerlendirildiğinde; kriyoprezervasyon öncesi hibridoma hücrelerinin yüksek oranda monoklonal antikor ürettiği görülmüştür. Kriyoprezervasyon sonrası açılıp kültürlenen hibridoma hücrelerinin antikor üretim kapasitesinin, kültür süresi boyunca artmasına rağmen dondurulmadan önceki gibi yüksek düzeyde üretmediği tespit edilmiştir. Kriyoprezervasyon öncesi hibridoma hücreler LPG'ye karşı 1,110 OD (450 nm) değerine sahip monoklonal antikor üretirken, kriyoprezervasyon sonrası 0,45 OD (450 nm) değerine sahip monoklonal antikorlar üretmiştir. Bu veriler ışığında kriyoprezervasyon işlemi, hibrid hücrelerinin monoklonal antikor üretme kapasitesini yaklaşık olarak %59,4 oranında düşürdüğünü göstermiştir.

Böylece bu tez çalışma sonucunda, Dünya'da ve ülkemizde ilk kez olarak Kütanöz Leishmaniasis etmeni L.tropica'nın immünojenik yüzey molekülü olan lipofosfoglikana (LPG) karşı hibridoma teknolojisine dayalı monoklonal antikorlar elde edilmiştir. Yine ilk kez olarak, hibridoma hücrelerinden üretilen LPG'ye özgü monoklonal antikorların saflaştırılmasında HPLC yöntemi kullanılarak saflık oranı oldukça yüksek monoklonal antikorlar elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, L.tropica'dan izole edilen LPG molekülüne karşı hibridoma teknolojisine dayalı olarak geliştirilen monoklonal antikorların, bu moleküle karşı yüksek düzeyde spesifiklik gösterdiğini ve bu nedenle elde edilen monoklonal antikorların gelecekte kütanöz leishmaniasis tanısında kullanılmasının uygun olabileceğini ortaya çıkarmıştır.

## KAYNAKLAR


[1] Zeyrek, F. Y., Erdoğan, D. D., Uluca, N., Tumer, S. ve Korkmaz, M., (2012). "Kutanöz Leishmaniasis tanısında serolojinin yeri", Kafkas Univ Vet Fak Derg, 18(Suppl A):A121-4.

[2] Allahverdiyev, A., Bagirova, M., Cakir Koc, R., Oztel, O.N., Elcicek, S., Ates, S.C. ve Karaca, T.D., (2010). "Approaches and problems in vaccine development against Leishmaniasis", Turkiye Parazitol. Derg, 34: 122–130.

[3] Allahverdiyev, A. M., Bagirova, M., Elcicek, S., Koc, R. C., Baydar, S. Y., Findikli, N. Ve Oztel, O. N. (2011). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new host cell in latent leishmaniasis", The American journal of tropical medicine and hygiene, 85(3): 535-539.

[4] Allahverdiyev, A. M., Abamor, E. S., Bagirova, M., Ustundag, C. B., Kaya, C., Kaya, F. ve Rafailovich, M. (2011). "Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light", Int J Nanomedicine, 6: 2705-2714.

[5] Ates, S. C., Bagirova, M., Allahverdiyev, A. M., Baydar, S. Y., Koc, R. C., Elcicek, S., Abamor, E.S. ve Oztel, O. N. (2012). "Detection of antileishmanial antibodies in blood sampled from blood bank donors in Istanbul", Future Microbiology, 7(6): 773-779.

[6] McConville, M. J. ve Ferguson, M. A. (1993). "The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes", Biochemical Journal, 294(Pt2):305-324.

[7] Borghi, S.M., Fattori, V., Conchon-Costa, I., Pinge-Filho, P., Pavanelli, W.R., Verri ve W.A., (2016). ''Leishmania infection: painful or painless?'', Parasitology Research, 1:1-11.

[8] Elcicek, S., Bagirova, M. ve Allahverdiyev, A. M. (2013). "Generation of avirulent Leishmania parasites and induction of nitric oxide production in macrophages by using polyacrylic acid", Experimental parasitology, 133(3): 237-242.

[9] Bern, C., Maguire, JH. ve Alvar, J., (2008). ''Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis'', PLoS Negl Trop Dis, 2: 313.

[10] Allahverdiyev, A. M., Koc, R. C., Ates, S. C., Bagirova, M., Elcicek, S. ve Oztel, O. N. (2011). "Leishmania tropica: the effect of darkness and light on biological activities in vitro", Experimental Parasitology, 128(4): 318-323.

[11] Daumerie, D. ve Savioli, L., (2010). "Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases (Vol. 1)", World Health Organization, Geneva, Switzerland.

[12] Uzun, R. ve Buzgan, T., (2005). TC Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Şark Çıbanı, Ankara.

[13] Zeyrek, F.Y., Gurses, G. ve Uluca, N., (2014). ''Is the agent of cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa changing? First cases of Leishmania major'', Turkiye Parazitol Dergisi, 38: 270–274.

[14] Demirel, R. ve Erdogan, S., (2009). ''Determination of high risk regions of cutaneous leishmaniasis in turkey using spatial analysis'', Turkiye Parazitol Derg, 33: 8–14.

[15] Akman, L., Aksu, HS., Wang, RQ., Ozensoy, S., Ozbel, Y. ve Alkan, Z., (2000). "Multi-site DNA polymorphism analyses of Leishmania isolates define their genotypes predicting Clinical epidemiology of leishmaniasis in a specific region", J Eukaryot Microbiol, 47: 545-54.

[16] Gouzelou, E., Haralambous, C., Amro, A., Mentis, A., Pratlong, F. ve Dedet, JP., (2012). "Multilocus microsatellite typing (MLMT) of strains from Turkey and Cyprus reveals a novel monophyletic L. donovani sensu lato group", PLoS Negl Trop Dis, 6:e1507.

[17] Vega-Lopez, F., (2003). "Diagnosis of cutaneous leishmaniasis", Curr Opin Infect Dis, 16(2): 97-101.

[18] Alvar, J., Croft, S. ve Olliaro, P., (2006). "Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis", Adv Parasitol, 61: 223-74.

[19] Jane, E.S., Gad, B., Christine, A. ve Petersen., (2014). "Canine and Feline Infectious Diseases'', Elsevier Health Sciences, 74:713-726.

[20] Riera, C., Fisa, R., Udina, M., Gallego, M. ve Portus, M., (2004). ''Detection of Leishmania infantum cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods'', Trans R Soc Trop Med Hyg, 98: 102–110.

[21] Allahverdiyev, A.M., Bagirova, M., Uzun, S., Alabaz, D., Aksaray, N., Kocabas, E. ve Koksal, F., (2005). ''The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood'', Am J Trop Med Hyg, 73:276-280.

[22] Allahverdiyev, A.M., Bagirova, M., Cakir Koc, R., Elcicek, S., Oztel, O. N., Canim Ates, S. ve Yesilkir Baydar, S., (2012). ''Utility of the microculture method in non-invasive samples obtained from an experimental murine model with asymptomatic leishmaniasis'', The American journal of tropical medicine and hygiene, 87(1): 81-86.

[23] Ates, S.C., Bagirova, M., Allahverdiyev, A.M., Kocazeybek, B. ve Kosan, E., (2013). ''Utility of the microculture method for Leishmania detection in non-invasive samples obtained from a blood bank'', Acta tropica, 128(1):54-60.

[24] Allahverdiyev, A. M., Bagirova, M., Caliskan, R., Tokman, H. B., Aliyeva, H., Unal, G., Oztel, O.N., Abamor, E.S., Toptas, H., Yuksel, P., Kalayci, F., Aslan, M., Erzin, Y., Bal, K. ve Kocazeybek, BS. (2015). "Isolation and diagnosis of Helicobacter pylori by a new method: microcapillary culture", World J Gastroenterol, 21(9): 2622-8262.

[25] Romero, G.A., De la Gloria Orge Orge, M., De Farias, M.V., Paes, M.G., De Olivera Macedo, V. ve De Carvalho, E.M., (2005). ''Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by Lesihmania (Viannia) brazilensis or Leishmania (Viannia) guayanensis in Brazil'', Acta Trop, 93:49-56.

[26] Ahluwalia, S., Lawn, S.D., Kanagalingen, J., Grant, H. ve Lockwood, A., (2004). "Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers to central and South America'', BMJ, 329:842-844.

[27] Islam, M.Z., Itoh, M., Shamsuzzaman, S.M., Mirza, R., Matin, F., Ahmed, I., Shamsuzzaman, A.K.M., Hossain, M.A., Qiu, X., Begam, N., Furuya, M., Leafasia, J.L., Hashiguchi, Y. ve Kimura, E., (2002). ''Diagnosis of Visceral Leishmaniasis by enzymelinked immunosorbent assay using urine samples'', Clin. Diagn. Lab Immunol, 9:789-794.

[28] Kaul, P., Malla, N., Kaur, S., Mahajan, R.C. ve Ganguly, N.K., (2000). ''Evaluation of a 200-kDa amastigote-specific antigen of L. donovani by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of visceral leishmaniasis'', Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94:173-175.

[29] Zijlstra, E.E., Daifalla, N.S., Kager, P.A., Khalil, E.A., El-Hassan, A.M., Reed, S.G. ve Ghalib, H.W., (1998). ''rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Leishmania donovani infection'', Clin. Diagn. Lab Immunol, 5:717-720.

[30] Rab, M.A. ve Evans, D.A., (1997). ''Detection of anti- Leishmania antibodies in blood collected on filter- paper by the direct agglutination test'', Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 91:713-715.

[31] Kohanteb, J., Ardehali, S.M. ve Rezai, H.K., (1987). ''Detection of Leishmania donovani antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients'', Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 81:578- 580.

[32] Attar, Z.J., Chance, M.L., El-Safi, S., Carney, J., Azazy, A., El-Hadi, M., Dourado C. ve Hommel M., (2001). ''Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis'', Acta Tropica. 78:11-16.

[33] Pattabhi, S., Whittle, J. ve Mohamath R., (2010). ''Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis'', PLoS Negl Trop Dis, 4:822.

[34] Milstein, C., (1985). “From the structure of antibodies to the diversification of the immune response”, Nobel lecture, 8 Aralık 1984, Biosci. Rep., 5:275–97.

[35] Cotton, R.G. ve Milstein, C., (1973). “Letter: Fusion of two immunoglobulinproducing myeloma cells”, Nature, 244: 42–3.

[36] Nejad-Moghaddam, A. ve Abolhassani, M., (2009). “Production and characterization of monoclonal antibodies recognizing a common 57-kDa antigen of Leishmania species”, Iranian Biomedical Journal, 13(4): 245.

[37] Gao, C. H., Yang, Y. T., Shi, F., Wang, J. Y., Steverding, D. ve Wang, X., (2015). “Development of an immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis based on detection of a circulating antigen”, PLoS Negl Trop Dis, 9(6): e0003902.

[38] Cabral-Miranda, G., De Jesus, J. R., Oliveira, P. S., Britto, G. G., Pontes-de-Carvalho, L. C., Dutra, R. F. ve Alcântara-Neves, N. M., (2014). “Detection of Parasite Antigens in Leishmania infantum–Infected Spleen Tissue by Monoclonal Antibody-, Piezoelectric-Based Immunosensors”, Journal of Parasitology, 100(1): 73-78.

[39] De Ibarra, A. A. L., Howard, J. G. ve Snary, D. (1982). “Monoclonal antibodies to Leishmania tropica major: specificities and antigen location”, Parasitology,85(03); 523-531.

[40] David P., (2014). “Leishmaniasis”, JInfect, 69:(1)10-18.

[41] Modabber, F., (1987). ‘’The leishmaniases in Tropical Disease Research’’, a Global Partnership, Eighth Programme Report, TDR’ (J. Maurice and A. M. Pearce, eds), 12:1-99.

[42] Field, V., Gautret, P., Schlagenhauf, P., Burchard, G.D., Caumes, E. ve Jensenius, M., (2010). ‘’Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008’’, BMC Infect Dis, 17:10-330.

[43] Ready, P. D., (2010). “Leishmaniasis emergence in Europe”, Euro surveill, 15(10): 19505.

[44] Chappuis, F., Sundar, S., Hailer, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J. ve Boelaert, M., (2007). ‘’Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treat- ment and control?’’, Nat. Rev., 5:873–882.

[45] Alvar, J., Yactayo, S. ve Bern, C., (2006). ‘’Leishmaniasis and poverty’’, Trends Parasitol, 22:552–7.

[46] Schwartz, E., Hatz, C. ve Blum, J., (2006). “New world cutaneous leishmaniasis in travellers’’, Lancet Infect Dis, 6:9-342.

[47] Jones, T.C., Johnson W.D. ve Barretto, A.C., (1987). ‘’Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to Leishmania braziliensis braziliensis’’, J Infect Dis, 156: 73–83.

[48] Ok, U.Z., Balcioglu, I.C., Taylan Ozkan, A., Ozensoy, S. ve Ozbel, Y., (2002). ‘’Leishmaniasis in Turkey’’, Acta Trop, 84: 43–48.

[49] Gürel, M. S., Yesilova, Y., Ölgen, M. K. ve Özbel, Y. (2012). "Cutaneous leishmaniasis in Turkey", Türkiye Parazitolojii Dergisi, 36(2): 121129.

[50] Alvar, J., Velez, I.D. ve Bern, C., (2012). ''Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence'', PLoS One, 7:35671.

[51] Koltas, I.S., Eroglu, F., Alabaz, D. ve Uzun, S., (2014). ''The emergence of Leishmania major and Leishmania donovani in southern Turkey'', Trans R Soc Trop Med Hyg, 108:154–158.

[52] Boussaa, S., Kahime, K., Samy, A.M. ve Salem, A.B., (2016). ''Boumezzough A. Species composition of sand flies and bionomics of Phlebotomus papatasi and P. sergenti (Diptera: Psychodidae) in cutaneous leishmaniasis endemic foci, Morocco'', Parasit Vectors, 9: 60.

[53] Chajbullinova, A., Votypka, J. ve Sadlova, J., (2012).''The development of Leishmania turanica in sand flies and competition with L. Major'', Parasit Vectors, 5:219.

[54] Ergunay, K., Kasap, O.E. ve Orsten, S., (2014). ''Phlebovirus and Leishmania detection in sandflies from eastern Thrace and northern Cyprus'', Parasit Vectors, 12: 575.

[55] Erisoz Kasap, O. ve Alten, B., (2007). ''Comparative demography of the sand fly Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae) at constant temperatures'', J Vector Ecol, 31: 378–385.

[56] Volf, P., Ozbel, Y., Akkafa, F., Svobodova, M., Votypka, J. ve Chang, K.P., (2007). ''Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey: Relationship of Phlebotomus sergenti with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis'', J Med Entomol, 39: 12–15.

[57] Özbilgin, A., Çulha, G., Uzun, S., Harman, M., Topal, S. G., Okudan, F. ve Töz, S., (2016). ''Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation of Leishmania major from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions'', Tropical Medicine & International Health, 21(6): 783-791.

[58] Kumar, A., (2013). Leishmania and leishmaniasis, First Edition, Springer Briefs in Immunology, New York.

[59] Ross, R., (1903). ''Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan'', BMJ, 2:1261–2.

[60] Gardener, P.J., Chance, M.L. ve Peters, W., (1974). ''Biochemical taxonomy of Leishmania. II. Electrophoretic variation of malate dehydrogenase'', Ann Trop Med Parasitol, 68:317–25.

[61] Rioux, J.A., Lanotte, G. ve Serres, E., (1990). ''Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new Classification'', Ann Parasitol Hum Comp, 65:111–25.

[62] Schallig, H.D. ve Oskam, L., (2002). ''Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification'', Trop Med Int Health, 7:641–51.

[63] Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R. ve Moreno J., (1997). ‘’Leishmania and human immunodefi ciency virus coinfection: the fi rst 10 years’’, Clin Microbiol Rev, 10:298–319.

[64] Desjeux, P. ve Alvar, J., (2003). ‘’Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe’’, Ann Trop Med Parasitol, 97(1):3–15.

[65] Bernier, R., Barbeau, B., Tremblay, M.J. ve Olivier, M., (1998). ‘’The lipophosphoglycan of Leishmania donovani up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor-kappaB elements’’, J Immunol, 160:2881–2888.

[66] Topuzogullari, M., Koc, R. C., Isoglu, S. D., Bagirova, M., Akdeste, Z., Elcicek, S., Oztel O.N., Baydar, S.B., Ates, S.C. ve Allahverdiyev, A. M. (2013). “Conjugation, characterization and toxicity of lipophosphoglycan-polyacrylic acid conjugate for vaccination against leishmaniasis”, Journal of biomedical science, 20(1): 35.

[67] Turco, S.J. ve Descoteaux, A., (1992). "The lipophosphoglycan of Leishmania parasites", Annu Rev Microbiol, 46: 65-94.

[68] McConville, M. ve Blackwell, J., (1991). "Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of Leishmania donovani. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids", Journal of Biological Chemistry, 266: 15170.

[69] Farrar, J., Hotez, P., Junghanss, T., Kang, G., Lalloo, D. ve White, N.J., (2013). ‘’Manson's tropical diseases. Elsevier Health Sciences’’, Protozoan Infections, 9:643.

[70] Weina, P.J., Neafle, R.C., Wortmamm, G., Polhemus, M. ve Aronson, N.E., (2004). ‘’Old World leishmaniasis: an emerging infection among deployed US military and civilian workers’’, Clin Infect Dis, 39:1674-1680.

[71] Ramirez, J.R., Adugelo, S. ve Muskus, C., (2000). ‘’Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensititivity of parasitological diagnosis’’, J Clin Microbiol, 38:3768-3773.

[72] Blum, J., Desjeux, P., Schwartz, E., Beck, B. ve Hazt, C., (2004). ‘’Treatament of cutaneous leishmaniasis among travellers’’, J Antimicrob Chemother, 53:158-166.

[73] Lopez, M., Inga, R. ve Cangalaya, M., (1993). ‘’Diagnosis of Leishmania using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work’’, Am J Trop Med Hyg, 49:348–56.

[74] Pirmez, C., Da S.T, V. ve Paes-Oliveira, N.M., (1999). ‘’Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil’’, J Clin Microbiol, 37:1819–23.

[75] World Health Organization. Control of the Leishmaniases. World Health Organization. Geneva: WHO. WHO Technical Report Series 2010; 949.

[76] Santarém, N. ve Cordeiro da Silva A., (2007). ''Diagnosis of visceral leishmaniasis'', Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. Badajoz: Formatex, 839- 846.

[77] Reus, M., García, B., Vázquez, V., Morales, D.D., Fuster, M. ve Sola, J., (2005). "Visceral leishmaniasis: diagnosis by ultrasound. Guided fine needle aspiration of an axillary node'', Br J Radiol, 78:158-160.

[78] Artan, R., Yilmaz, A., Akcam, M. ve Aksoy, N.H., (2006). "Liver biopsy in the diagnosis of visceral leishmaniasis'', J Gastroenterol Hepatol, 21:299-302.

[79] Del Olmo, M.L., Aller de a Fuente, R., Velayos Jimenez, B., Fernandez Salazar, L. ve Gonzalez Hernandez, J.M., (2009). ''Visceral leishmaniasis diagnosed by duodenal biopsy'', Rev Esp Enferm, 101:439-440.

[80] Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S. ve Sundar, S., (2011). ''Diagnosis of visceral leishmaniasis'', Trans R Soc Trop Med Hyg, 105:1-6.

[81] Zijlstra, E.E., Ali, M.S., el-Hassan, A.M., el-Toum, I.A., Satti, M., Ghalib, H.W. ve Kager, P.A., (1992). ''Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis'', Trans R Soc Trop Med Hyg, 86:505-507.

[82] Allahverdiyev, A.M., Uzun, S., Bagirova, M., Durdu, M. ve Memisoglu, H.R., (2004). ''A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis'', Am J Trop Med Hyg, 70:294–297.

[83] De Colmenares, M., Portus, M., Riera, C., Gallego, M., Aisa, M.J. ve Torras, S., (1995). ''Detection of 72-75-kD and 123-kD fractions of Leishmania antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis'', Am J Trop Med Hyg, 52: 427-428.

[84] Sarkari, B., Chance, M.L. ve Hommel, M., (2002). ''Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterization of a carbohydrate antigen'', Acta Tropica, 82:339-348.

[85] Attar, Z.J, Chance, M.L, el-Safi, S., Carney, J., Azazy, A., El-Hadi, M., Dourado, C. ve Hommel, M., (2001). ''Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis'', Acta Trop, 78:11-16.

[86] El-Safi, S.H., Abdel-Haleem, A., Hammad, A., El Basha, I., Omer, A., Kareem, H.G., Boalert, M., Chanc,e M. ve Hommel, M., (2003). ''Field evaluation of latex agglutination test for detecting urinary antigens in visceral leishmaniasis in Sudan'', East Mediterr Health J, 9(4):844-855.

[87] Rijal, S., Boelaert, M., Regmi, S., Karki, B.M., Jacquet, D., Singh, R., Chance, M.L., Chappuis, F., Hommel, M., Desjeux, P., Van der Stuyft, P., Le Ray, D. ve Koirala, S., (2004). ''Evaluation of a urinary antigen-based latex agglutination test in the diagnosis of kala-azar in eastern'', Nepal, 9:724-729.

[88] Malaei, S., Mohebali, M., Akhoundi, B. ve Zarei, Z., (2006). ''Evaluation of latex agglutination test (Katex) for the detection of urinary antigens in human visceral leishmaniasis'', J Tehran Un Med Sci, 4:101-108.

[89] Diro, E., Techane, Y., Tefera, T., (2007). ''Field evaluation of FDDAT rK39 dipstick and KATEX (urine latex agglutination for diagnosis of visceral leishmaniasis in northwest Ethiopia'', Trans R Soc Trop Med Hyg, 101:908-914.

[90] Vilaplana, C., Blanco, S., Domínguez, J., Giménez, M., Ausina, V., Tural, C. ve Muñoz, C., (2004). ''Noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex agglutination test for detection of antigens in urine samples'', J Clin Microbiol, 42:1853-1854.

[91] Boelaert, M., Rijal, S., Regmi, S., Singh, R., Karki, B., Jacquet, D., Chappuis, F., Campino, L., Desjeux, P., Le Ray, D., Koirala, S. ve Van der Stuyft, P., (2004). ''A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis'', Am J Trop Med Hyg, 70:72-77.

[92] Iqbal,J., Hira, P.R., Saroj, G., Philip, R., Al-Ali F., Madda, P.J., Sher, A., (2002). ''Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays'', J Clin Microbiol, 40:475-479.

[93] Badaró, R., Reed, S.G. ve Carvalho, E.M., (1983). ''Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two Leishmania species'', Am J Trop Med Hyg, 32: 480-484.

[94] Singh, S. ve Sivakumar, R., (2003). ''Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis'', J Postgrad Med, 49:55-60.

[95] Ryan, J.R., Smithyman, A.M., Rajasekariah, G.H., Hochberg, L., Stiteler, J.M. ve Martin, S.K., (2002). ''Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) & IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis'', J Clin Microbiol, 40:1037-1043.

[96] Rajasekariah, G.H., Ryan, J.R., Hillier, S.R., Yi, L.P., Stiteler, J.M., Cui, L., Smithyman A.M. ve Martin S.K., (2001). ''Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens'', J Immunol Methods, 252:105-119.

[97] Maurya, R., Mehrotra, S., Prajapati, V.K., Nylén, S., Sacks, D. ve Sundar, S., (2010). ''Evaluation of blood agar microtiter plates for culturing leishmania parasites to titrate parasite burden in spleen and peripheral blood of patients with visceral leishmaniasis'', J Clin Microbiol, 48:1932-1934.

[98] Vinayak, V.K., Mahaja, D., Sobt, R.C., Singl, N. ve Sunda, S., (1994). ''Anti-66 kDa anti-leishmanial antibodies as specific immunodiagnostic probe for visceral leishmaniasis'', Indian J Med Res, 99:109-114.

[99] Palatnik-de-Sousa, C.B., Gomes, E.M., Paraguai-de-Souza, E., Palatnik, M., Luz, K. ve Borojevic, R., (1995). ''Leishmania donovani: titration of the antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis'', Trans R Soc Trop Med Hyg, 89:390-393.

[100] Martin, S.K., Thuita-Harun, L., Adoyo-Adoyo, M. ve Wasunna, K.M., (1998). ''A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis based on antigen from media

conditioned by Leishmania donovani promastigotes'', Ann Trop Med Parasitol, 92:571-577.

[101] Carvalho, F.A., Charest, H., Tavares, C.A., Matlashewski, G., Valente, E.P., Rabello, A., Gazzinelli, R.T. ve Fernandes A.P., (2002). ''Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant Leishmania donovani A2 antigen'', Diagn Microbiol Infect Dis, 43:289-295.

[102] McCall, L., Zhang, W. ve Matlashewki, G., (2013). ''Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease'', PLOS Pathog, 9: (100)30-53.

[103] Rafati, S., Hassani, N., Taslimi, Y., Movassagh, H., Rochette, A. ve Papadopoulou, B., (2006). ''Amastin peptide-binding antibodies as biomarkers of active human visceral leishmaniasis'', Clin Vacc Immunol, 13:1104-1110.

[104] Burns, J.M., Shreffler, W.G., Benson, D.R., Ghalib, H.W., Badaro, R. ve Reed, S.G., (1993). ''Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in both African and American visceral leishmaniasis'', Proc Natl Acad Sci USA, 90:775-790.

[105] Badaró, R., Benson, D., Eulálio, M.C., Freire, M., Cunha, S., Netto, E.M., Pedral-Sampaio, D., Madureira, C., Burns, J.M., Houghton, R.L., David, J.R. ve Reed, S.G., (1996).''A Cloned Antigen of Leishmania chagasi that Predicts Active Visceral Leishmaniasis'', J Infect Dis, 173:758-776.

[106] Singh, D.P., Goyal, R.K., Singh, R.K., Sundar, S. ve Mohapatra, T.M., (2010). ''In search of an ideal test for diagnosis, prognosis of kala-azar'', J Health Popul Nutr, 28:281-285.

[107] Zijlstra, E.E., Nur, Y., Desjeux, P., Khalil, E.A., El-Hassan, A.M. ve Groen, J., (2001). ''Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan'', Trop Med Int Health, 6:108-113.

[108] Mohapatra, T.M., Singh, D.P., Sen, M.R., Bharti, K. ve Sundar, S., (2010). ''Comparative evaluation of rK9 rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis'', J Infect Dev Ctries, 4:114-117.

[109] Brito, M.E., Mendonca, M.G., Gomes, Y.M., Jardim, M.L. ve Abath, F.G., (2000). ''Identification of potentially diagnostic Leishmania braziliensis antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis'', Clin Diagn Lab Immunol, 7:318-321.

[110] Ravindran, R., Anam, K., Bairagi, B.C., Saha, B., Pramanik, N., Guha, S.K., Goswami, R.P., Banerjee, D. ve Ali N., (2004). ''Characterization of immunoglobulin G & its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy'', Infect Immun, 72: 863-870.

[111] Mary, C., Lamouroux, D., Dunan, S. ve Quilici, M., (1992). ''Western blot analysis of antibodies to Leishmania infantum antigens: potential of the 14-kD & 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes'', Am J Trop Med Hyg; 47:764-771.

[112] Santos-Gomes, G., Gomes-Pereira, S., Campino, L., Araujo, M.D. ve Abranches, P., (2000). ''Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral

Leishmaniasis in human immunodeficiency virus-Leishmania sp.-coinfected patients'', J Clin Microbiol, 38:175-178.

[113] Cota, G.F., de Sousa, M.R., Demarqui, F.N. ve Rabello, A., (2012). ''The Diagnostic Accuracy of Serologic and Molecular Methods for Detecting Visceral Leishmaniasis in HIV Infected Patients: Meta-Analysis'', PLoS Neg Trop Dis, 6:16-65.

[114] Oskam, L., Nieuwenhuijs, J. ve Hailu, A., (1999). ''Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze-dried antigen for the detection of anti-Leishmania antibodies in stored sera from various patient groups in Ethiopia'', Trans R Soc Trop Med Hyg, 93:275-277.

[115] Fakhar, M., Motazedian, M.H., Hatam, G.R., Asgari, Q., Monabati, F.A. ve Keighobadi, M., (2012). ''Comparative performance of direct agglutination test indirect immunofluorescent antibody test polymerase chain reaction, bone marrow aspiration method for diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis'', African J Microbiol, 6:5777-5781.

[116] Chappuis, F., Rijal, S., Soto, A., Menten, J. ve Boelaert, M., (2006). ''A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis'', BMJ, 333:723.

[117] Schoone, G.J., Hailu, A., Kroon, C.C., Nieuwenhuys, J.L., Schallig, H.D. ve Oskam, L., (2001). ''A fast agglutination-screening test (FAST) for the detection of anti-Leishmania antibodies'', Trans R Soc Trop Med Hyg, 4:400-401.

[118] Hailu, A., Schoone, G.J., Diro, E., Tesfaye, A., Techane, Y., Tefera, T., Assefa, Y., Genetu, A., Kebede, Y., Kebede, T. ve Schallig, H.D., (2006). ''Field evaluation of a fast anti-Leishmania antibody detection assay in Ethiopia'', Trans R Soc Trop Med Hyg, 100:48-52.

[119] Akhoundi, B., Mohebali, M., Babakhan, L., Edrissian, G.H., Eslami, M.B., Keshavarz, H. ve Malekafzali, H., (2010). ''Rapid detection of human Leishmania infantum infection: A comparative field study using the fast agglutination screening test and the direct agglutination test'', Travel Med Infect Dis, 8:305-310.

[120] Sundar, S., Reed, S.G., Singh, V.P., Kumar, P.C. ve Murray, H.W., (1998). ''Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis'', Lancet, 351:563-565.

[121] Sundar, S., Pai, K., Sahu, M., Kumar, V. ve Murray, H.W., (2002). ''Immunochromatogaphic strip test detection of anti k39 antibody in Indian visceral leishmaniasis'', Ann Trop Med Parasitol, 96:19-23.

[122] Carvalho, S.F., Lemos, E.M., Corey, R. ve Dietze, R., (2003). ''Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis'', Am J Trop Med Hyg, 68:321-324.

[123] Brandonsio, O., Fumarola, L., Maggi, P., Cavalerfe, R., Spinelli, R. ve Pastore, G., (2002). ''Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis'', Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 21(6):461- 464.

[124] Jelinek, T., Eichenlaub, S. ve Löscher, T., (1999). ''Sensitivity, specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis'', Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 18:669-670.

[125] Ghatei, M.A., Hatam, G.R., Hossini, M.H. ve Sarkari, B., (2009). ''Performance of latex agglutination test (KAtex) in diagnosis of visceral leishmaniasis in Iran'', Iran J Immunol, 6:202-227.

[126] Akhoundi, B., Mohebali, M., Shojaee, S., Jalali, M., Kazemi, B., Bandehpour, M., Keshavarz, H., Edrissian, G.H., Eslami, M.B., Malekafzali, H. ve Kouchaki, A., (2013). ''Rapid detection of human, canine visceral leishmaniasis: assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of Leishmania infantum'', Exp Parasitol, 133:307-313.

[127] Piarroux, R., Gambarelli, F., Dumon, H., Fontes, M., Dunan, S., Mary, C., Toga, B. ve Quilici, M., (1994). ''Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients'', J Clin Microbiol, 32:746-749.

[128] Pizzuto, M., Piazza, M., Senese, D., Scalamogna, C., Calattini, S., Corsico, L., Persico, T., Adriani, B., Magni, C., Guaraldi, G., Gaiera, G., Ludovisi, A., Gramiccia, M., Galli, M., Moroni, M., Corbellino, M. ve Antinori, S., (2001). ''Role of PCR indiagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfected with human immunodeficiency virus type 1'', J Clin Microbiol, 39:357-361.

[129] Lachaud, L., Dereure, J., Chabbert, E., Reynes, J., Mauboussin, J.M., Oziol, E., Dedet, J.P. ve Bastien, P., (2000). ''Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients'', J Clin Microbiol, 38:236-240.

[130] Osman, O.F., Oskam, L., Zijlstra, E.E., Kroon, E.E., Schoone, G.J., Khalil, E.T., El-Hassan, A.M. ve Kager, P.A., (1997). ''Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis'', J Clin Microbiol, 35:2454-2457.

[131] Singh, N., Curran, M.D., Rastogil, A.K., Middleton, D. ve Sundar, S., (1999). ''Diagnostic PCR with Leishmania donovani specificity using sequences from the variable region of kinetoplast minicircle DNA'', Trop Med Int Health, 4:448- 453.

[132] Saad, A.A., Ahmed, N.G., Osman, O.S., Al-Basheer, A.A., Hamad, A., Deborggraeve, A., Büscher, P., Schoone, G.J., Schallig, H.D., Laurent, T., Haleem, A., Osman, O.F., Eltom, A.M., Elbashir, M.I. ve El-Safi, S., (2010). ''Diagnostic Accuracy of the Leishmania OligoC-TesT and NASBA-Oligochromatography for Diagnosis of Leishmaniasis in Sudan'', PLoS Neglec Trop Dis, 4:776.

[133] Deborggraeve, S., Boelaert, M. ve Rijal, S., (2008). ''Diagnostic accuracy of a new Leishmania PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease'', Trop Med Int Health, 13:1378–83.

[134] Mary, C., Faraut, F. ve Drogoul, M.P., (2006). ‘’Reference values for Leishmania infantum parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up’’, Am J Trop Med Hyg, 75:858–63.

[135] Gupta, G., Oghumu, S. ve Satoskar, A. R., (2013). ‘’Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis’’, Advances in applied microbiology, 82:155.

[136] Rezai, H.R., Sher, S. ve Gettner, S., (1969). ‘’Leishmania tropica, L. donovani, and L. enriettii: immune rabbit serum inhibitory in vitro’’, Experimental Parasitology, 26:257–263.

[137] Moreno, I., Molina, R., Toraño, A., Laurin, E., García, E. ve Domínguez, M. (2007). “Comparative real-time kinetic analysis of human complement killing of Leishmania infantum promastigotes derived from axenic culture or from Phlebotomus perniciosus”, Microbes and Infection, 9(14): 1574-1580.

[138] Hoover, D.L., Berger, M., Nacy, C.A., Hockmeyer, W.T. ve Meltzer, M. S., (1984). ‘’Killing of Leishmania tropica amastigotes by factors in normal human serum’’, Journal of Immunology, 132:893–897.

[139] Puentes, S. M., Sacks, D. L., Da Silva, R. P. ve Joiner, K. A. (1988). “Complement binding by two developmental stages of Leishmania major promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan”, J Exp Med, 167(3): 887-902.

[140] Müller, K., Van Zandbergen, G., Hansen, B., Laufs, H., Jahnke, N. ve Solbach, W., (2001). ‘’Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of Leishmania major infection in mice’’, Medical Microbiology and Immunology, 190:73–76.

[141] Pompeu, M.L., Freitas, L. A., Santos, M.L., Khouri, M. ve Barral-Netto, M., (1991). ‘’Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by Leishmania amazonensis’’, A quantitative approach. Acta Tropica, 48:185–193.

[142] Mollinedo, F., Janssen, H., de la Iglesia-Vicente, J., Villa-Pulgarin, J. A. ve Calafat, J,. (2010). ‘’Selective fusion of azurophilic granules with Leishmania-containing phagosomes in human neutrophils’’, Journal of Biological Chemistry, 285:34528–34536.

[143] Pearson, R.D. ve Steigbigel, R.T., (1981). ‘’Phagocytosis and killing of the protozoan Leishmania donovani by human polymorphonuclear leukocytes’’, Journal of Immunology, 127:1438–1443.

[144] Charmoy, M., Megnekou, R., Allenbach, C., Zweifel, C., Perez, C. ve Monnat, K., (2007). ‘’Leishmania major induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection’’, Journal of Leukocyte Biology, 82:288–299.

[145] Camussi, G., Bussolino, F., Salvidio, G. ve Baglioni, C., (1987). ‘’Tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear

neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor'', Journal of Experimental Medicine, 166:1390–1404.

[146] Afonso, L., Borges, V.M., Cruz, H., Ribeiro-Gomes, F.L., DosReis, G.A. ve Dutra, A.N., (2008). ''Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with Leishmania amazonensis'', Journal of Leukocyte Biology, 84:389–396.

[147] De Souza Carmo, E. V., Katz, S. ve Barbiéri, C.L. (2010). ''Neutrophils reduce the parasite burden in Leishmania (Leishmania) amazonensis-infected macrophages'', PLoS One, 5:13815.

[148] Filardy, A.A., Pires, D.R., Nunes, M.P., Takiya, C.M., Freire-de-Lima, C.G. ve Ribeiro-Gomes, F.L., (2010). ''Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL- 12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages'', Journal of Immunology, 185:2044–2050.

[149] Novais, F. O., Santiago, R.C., Báfica, A., Khouri, R., Afonso, L. ve Borges, V.M., (2009). ''Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against Leishmania braziliensis infection'', Journal of Immunology, 183:8088–8098.

[150] Ribeiro-Gomes, F.L., Otero, A.C., Gomes, N.A., Moniz-De-Souza, M.C., Cysne-Finkelstein, L. ve Arnholdt, A.C., (2004). ''Macrophage interactions with neutrophils regulate Leishmania major infection'', Journal of Immunology, 172:4454–4462.

[151] Thalhofer, C.J., Chen, Y., Sudan, B., Love-Homan, L. ve Wilson, M.E., (2011). ''Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan Leishmania infantum chagasi'', Infection and Immunity, 79:108–117.

[152] Diefenbach, A., Schindler, H., Donhauser, N., Lorenz, E., Laskay, T. ve MacMicking, J., (1998). ''Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite'', Immunity, 8:77–87.

[153] Laskay, T., Diefenbach, A., Röllinghoff, M. ve Solbach, W., (1995). ''Early parasite containment is decisive for resistance to Leishmania major infection'', European Journal of Immunology, 25:2220–2227.

[154] Prajeeth, C.K., Haeberlein, S., Sebald, H., Schleicher, U. ve Bogdan, C., (2011). ''Leishmaniainfected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity'', Infection and Immunity, 79:2699–2708.

[155] Kirkpatrick, C.E. ve Farrell, J.P., (1982). ''Leishmaniasis in beige mice'', Infection and Immunity, 38:1208–1216.

[156] Satoskar, A. R., Stamm, L. M., Zhang, X., Okano, M., David, J. R. ve Terhorst, C., (1999). "NK cell-deficient mice develop a Th1-like response but fail to mount an efficient antigen-specific IgG2a antibody response", Journal of Immunology, 163: 5298–5302.

[157] Pereira, L.I., Dorta M.L., Pereira, A.J., Bastos, R.P., Oliveira, M.A. ve Pinto, S.A., (2009). ''Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated

with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/Leishmania antigens'', American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 81:378–383.

[158] Peruhype-Magalhães ,V., Martins-Filho, O.A., Prata, A., Silva, L. A., Rabello, A. ve TeixeiraCarvalho, A., (2005). ''Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome'', Scandinavian Journal of Immunology, 62:487–495.

[159] Amprey, J.L., Im, J.S., Turco, S.J., Murray, H.W., Illarionov, P.A. ve Besra, G.S., (2004). ''A subset of liver NK T cells is activated during Leishmania donovani infection by CD1dbound lipophosphoglycan'', Journal of Experimental Medicine, 200:895–904.

[160] Ishikawa, H., Hisaeda, H., Taniguchi, M., Nakayama, T., Sakai, T. ve Maekawa, Y., (2000). ''CD4(+) v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with Leishmania major'', International Immunology, 12:1267–1274.

[161] Mattner, J., Donhauser, N., Werner-Felmayer, G. ve Bogdan,, C. (2006). ''NKT cells mediate organ-specific resistance against Leishmania major infection'', Microbes and Infection, 8:354–362.

[162] Stanley, A. C., Zhou, Y., Amante, F. H., Randall, L. M., Haque, A. ve Pellicci, D. G., (2008). ''Activation of invariant NKT cells exacerbates experimental visceral leishmaniasis'', PLoS Pathogens, 4:10-28.

[163] Rai, A.K., Thakur, C.P., Seth, T. ve Mitra, D. K. (2011). ''Enrichment of invariant natural killer T cells in the bone marrow of visceral leishmaniasis patients'', Parasite Immunology, 33:688–691.

[164] Kushawaha, P.K., Gupta, R., Sundar, S., Sahasrabuddhe, A.A. ve Dube, A. (2011). ''Elongation factor-2, a Th1 stimulatory protein of Leishmania donovani, generates strong IFN-γ and IL-12 response in cured Leishmania-infected patients/hamsters and protects hamsters against Leishmania challenge'', Journal of Immunology, 187:6417–6427.

[165] Mary, C., Auriault, V., Faugère, B. ve Dessein, A. J. (1999). ''Control of Leishmania infantum infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells'', Infection and Immunity, 67:5559–5566.

[166] Nateghi Rostami, M., Keshavarz, H., Edalat, R., Sarrafnejad, A., Shahrestani, T. ve Mahboudi, F., (2010). ''CD8+ T cells as a source of IFN-γ production in human cutaneous leishmaniasis'', PLoS Neglected Tropical Diseases, 4:845.

[167] Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E. ve Bertholet, S., (2002). ''CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with Leishmania major'', Journal of Immunology, 168:3992–4000.

[168] Erb, K., Blank, C., Ritter, U., Bluethmann, H. ve Moll, H. (1996). ‘’Leishmania major infection in major histocompatibility complex class II-deficient mice: CD8+ T cells do not mediate a protective immune response’’, Immunobiology, 195:243–260.

[169] Gomes-Pereira, S., Rodrigues, O.R., Rolão, N., Almeida, P.D. ve Santos-Gomes, G.M., (2004). ‘’Hepatic cellular immune responses in mice with “cure” and “non-cure” phenotype to Leishmania infantum infection: importance of CD8+ T cells and TGFbeta production’’, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 41:59–68.

[170] Huber, M., Timms, E., Mak, T.W., Röllinghoff, M. ve Lohoff, M., (1998). ‘’Effective and longlasting immunity against the parasite Leishmania major in CD8-deficient mice’’, Infection and Immunity, 66:3968–3970.

[171] Tsagozis, P., Karagouni, E. ve Dotsika, E. (2005). ‘’Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis’’, Parasitology International, 54:139–146.

[172] Liu, D., Zhang, T., Marshall, A.J., Okkenhaug, K., Vanhaesebroeck, B. ve Uzonna, J.E., (2009). ‘’The p110delta isoform of phosphatidylinositol 3-kinase controls susceptibility to Leishmania major by regulating expansion and tissue homing of regulatory T cells’’, Journal of Immunology, 183:1921–1933.

[173] Suffia, I., Reckling, S. K., Salay, G. ve Belkaid, Y., (2005). ‘’A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of Leishmania major infection’’, Journal of Immunology, 174:5444–5455.

[174] Yurchenko, E., Tritt, M., Hay, V., Shevach, E.M., Belkaid, Y. ve Piccirillo, C.A., (2006). ‘’CCR5- dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of Leishmania major infection favors pathogen persistence’’, Journal of Experimental Medicine, 203:2451–2460.

[175] Belkaid, Y., (2003). ‘’The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in Leishmania infection’’, Expert Opinion on Biological Therapy, 3:875–885.

[176] Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M. ve Sacks, D.L., (2002). ‘’CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity’’, Nature, 420:502–507.

[177] Smelt, S.C., Cotterell, S.E., Engwerda, C.R. ve Kaye, P.M., (2000). ‘’B cell-deficient mice are highly resistant to Leishmania donovani infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology’’, Journal of Immunology, 164:3681–3688.

[178] Bankoti, R., Gupta ,K., Levchenko, A. ve Stäger, S., (2012). ‘’Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection’’, Journal of Immunology, 188:3961–3971.

[179] Pereira, W.F., Ribeiro-Gomes, F.L., Guillermo, L.V., Vellozo, N.S., Montalvão, F. ve Dosreis, G.A., (2011). ‘’Myeloid-derived suppressor cells help protective immunity to Leishmania major infection despite suppressed T cell responses’’, Journal of Leukocyte Biology, 90:1191–1197.

[180] Kautz-Neu, K., Noordegraaf, M., Dinges, S., Bennett, C. L., John, D. ve Clausen, B. E., (2011). ''Langerhans cells are negative regulators of the anti-Leishmania response'', Journal of Experimental Medicine, 208:885–891.

[181] Wiethe, C., Debus, A., Mohrs, M., Steinkasserer, A., Lutz, M. ve Gessner, A., (2008). ''Dendritic cell differentiation state and their interaction with NKT cells determine Th1/Th2 differentiation in the murine model of Leishmania major infection'', Journal of Immunology, 180:4371–4381.

[182] Mattner, F., Magram, J., Ferrante, J., Launois, P., Di Padova, K. ve Behin, R., (1996). ''Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with Leishmania major and mount a polarized Th2 cell response'', European Journal of Immunology, 26:1553–1559.

[183] Swihart, K., Fruth, U., Messmer, N., Hug, K., Behin, R. ve Huang, S., (1995). ''Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with Leishmania major but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response'', Journal of Experimental Medicine, 181:961–971.

[184] Kopf, M., Brombacher, F., Kohler, G., Kienzle, G., Widmann, K.H. ve Lefrang, K., (1996). ''IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with Leishmania major'', Journal of Experimental Medicine, 184:1127–1136.

[185] Gupta, G., Majumdar, S., Adhikari, A., Bhattacharya, P., Mukherjee, A.K. ve Majumdar, S.B. (2011). ''Treatment with IP-10 induces host-protective immune response by regulating the T regulatory cell functioning in Leishmania donovani-infected mice'', Medical Microbiology and Immunology, 200:241–253.

[186] Ajdary, S., Alimohammadian, MH., Eslami, MB., Kemp, K. ve Kharazmi, A., (2000). "Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection", Infect Immun, 68: 1760–4.

[187] Scott, P. ve Novais, F O., (2016). "Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis", Nature Reviews Immunology, 16(9): 581-592.

[188] Bomfi, M G., Nascimento, C., Costa, J., Carvalho, EM., Barral-Netto, M. ve Barral, A., (1996). "Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diff use cutaneous leishmaniasis", Exp Parasitol, 84: 188–94.

[189] Dall'Acqua, W.F., P.A. ve Kiener Wu H., (2006) "Properties of human IgG1 engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn)", J. Biol. Chem, 281: 23514–24.

[190] Roopenian, D.C. ve Akilesh S., (2007) "FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age", Nature Rev. Immunol, 7:715–725.

[191] Baker, K., Qiao, S. W., Kuo, T., Kobayashi, K., Yoshida, M., Lencer, W. I. ve Blumberg, R. S. (2009). "Immune and non-immune functions of the (not so) neonatal Fc receptor, FcRn", In Seminars in immunopathology, 31: 223–6.

[192] Suzuki, T., I.-W.A. Ishii-Watabe, M., Tada, T., Kobayashi, T. ve Kanayasu, T., (2010) "Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR," J. Immunol, 184:1968–76.

[193] Stapleton, S., Tully, E. ve O'Kennedy, R. (2004). Encyclopaedia of Analytical Science, Second Edition, Academic Press, New York.

[194] Encyclopædia Britannica, The five main classes of antibodies (immunoglobulins): IgG, IgA, IgD, IgE, and IgM. https://www.britannica.com/science/immune-system/images-videos, 23 Şubat 2017.

[195] Verm, A. ve Sing A., (2014). Animal biotechnology: models in discovery and translation, First Edition, Academic Press, Uttar Pradeş.

[196] Hanson, D.C., Yguerabide, J. ve Schumaker, V.N., (1981). "Segmental flexibility of immunoglobulin G antibody molecules in solution: a new interpretation", Biochemistry, 20:6842–52.

[197] Brekke, O.H., Michaelsen, T.E. ve Sandlie, I., (1995). "The structural requirements for complement activation by IgG: does it hinge on the hinge?", Immunol. Today, 16:85–90.

[198] Roux, K.H., Strelets, L. ve Michaelsen, T.E., (1997) "Flexibility of human IgG subclasses", J. Immunol., 159:3372–82.

[199] Roux, K.H., (1999) "Immunoglobulin structure and function as revealed by electron microscopy", Internat. Arch. Allerg. Immunol, 120:85–99.

[200] Roitt, I. M. ve Delves, P. J. (2001). "Roitt's essential immunology", UK: Blackwell Science Ltd, 451-462.

[201] Lipman, N. S., Jackson, L.R., Trudel, L.J. ve Weis-Garcia, F., (2005). ''Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications and information resources'', Institute for Laboratory Animal Research Journal, 46:258–267.

[202] Alkan, S.S., (2004) "Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine", Nature Rev. Immunol, 4:153–6.

[203] Schwaber, J. ve Cohen E.P., (1973) "Human x mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types", Nature, 244:444–7.

[204] Köhler, G. ve Milstein, C., (1975) "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", Nature, 256:495–7.

[205] Staquet, K., Fisher, J., Lamb, R., Bannish, G. ve Duchala, C., (2006) "A rapid and efficient method for generating anti-variable region monoclonal antibodies using type-1 interferons as iImmune modulators", Human Antibod., 15:61–9.

[206] Groves, D.J. ve Morris, B.A., (2000) "Veterinary sources of nonrodent monoclonal antibodies: interspecific and intraspecific hybridomas", Hybridoma, 19:201–14.

[207] Pandey, S., (2010) "Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies", Int'l. J. Pharmaceut. Sci. Rev. Res, 1:88–94.

[208] De St Groth, S.F. ve Scheidegger, D., (1980) "Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics", J. Immunol, Meth, 35:1–21.

[209] Sibéril, S., De Romeuf, C., Bihoreau, N., Fernandez, N. ve Meterreau, J.L., (2006) "Selection of a human anti-RhD monoclonal antibody for therapeutic use: impact of IgG glycosylation on activating and inhibitory FcγR functions," Clin. Immunol., 118:170–9.

[210] Strohl, W. R. ve Strohl, L. M. (2012). Therapeutic antibody engineering: current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry, First Edition, Elsevier, Ohio.

[211] Institute of Laboratory Animal Resources (US) Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies Workshop on Methods of Producing Monoclonal Antibodies (1999). Monoclonal antibody production/ Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies, Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council, National Academies Press, Washington, DC.

[212] Kuhlmann, I., Kurth, W. ve Ruhdehl, I., (1989). ''Monoclonal antibodies: in vivo and in vitro production on a laboratory scale, with consideration of the legal aspects of animal protection'', Alternatives Lab Anim, 17:73-82.

[213] Baumgarten, H., Franze, R., Peters, J.H., Borgya, A., Baron, D., Debus, E. ve Kubbies, M. (1992). ''Mass Production of Monoclonal Antibodies'', In Monoclonal Antibodies 1:223-257.

[214] Groth, S. F. D. S. (1983). "Automated production of monoclonal antibodies in a cytostat", Journal of immunological methods, 57(1-3): 121-136.

[215] Comer, M.J., Kearns, M.J., Wahl, J., Munster, M., Lorenz, T., Szperalski, B., Koch, S., Behrendt, D. ve Brunner, H., (1990). ''Industrial production of monoclonal antibodies and therapeutic proteins by dialysis fermentation'', Cytotechnology, 3:295-299.

[216] Sjogren-Jansson, E. ve Jeansson, S., (1985). ''Large-scale production of monoclonal antibodies in dialysis tubing'', J Immunol Methods, 84:359-364.

[217] Adamson, S.R., Fitzpatrick, S.L. ve Behie, L.A., (1983). ''İn vitro production of high titre monoclonal antibody by hybridoma cells in dialysis cultures'', Biotechnol Lett, 5:573-578.

[218] Nilsson, K., Birnbaum, L., Lygare, S., Linse, L., Schroder, D., Jeppson, D. ve Larsson, P-O., (1983). ''A general method for the immobilization of cells with preserved viability'', Eur J Appl Microbiol Biotechnol, 17:319-326.

[219] Lim, F., (1984). ‘’Microencapsulation of living cells and tissues - theory and practice in biomedical applications of microencapsulation’’, CRC Press, Boca Raton, 137-154.

[220] Tanaka, H., Masatoni, M. ve Vellky, I.A., (1984). ‘’Diffusion characteristics of substrates in Caalginate gel beads’’, Biotechnol Bioeng, 26:53-58.

[221] Bañó, M.C., Cohen S., Visscher, K.B., Allcock, H.R. ve Langer, R., (1991). ‘’A novel synthetic method for hybridoma cell encapsulation’’, Biothechnology, 9:468-471.

[222] Birch, J. ve Racher, A., (2006). ‘’Antibody production’’, Adv. Drug Deliv. Rev. 58:671–685.

[223] Chusainow, J., (2009). ‘’A study of monoclonal antibody producing CHO cell lines – what makes a stable high producer?’’, Biotechnol. Bioeng, 102:1182–1196.

[224] Lee, C., (2008). ‘’A clone screening method using mRNA levels to determine specific productivity and product quality for monoclonal antibodies’’, Biotechnol. Bioeng, 102:1107–1118.

[225] Crowell, C., (2007). ‘’Amino acid and manganese supplementation modulates the glycosylation state of erythropoietin in a CHO culture system’’, Biotechnol. Bioeng, 96:538–549.

[226] Wong, D., (2004). ‘’Impact of dynamic on-line fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation in CHO cell cultures’’, Biotechnol. Bioeng, 89:164–177.

[227] Matsunaga, N., (2009). ‘’Estimation of dissolved carbon dioxide stripping in a large bioreactor using model medium’’, J. Biosci. Bioeng, 107:49–424.

[228] Shukla, A. ve Kandula, J., (2008). ‘’Harvest and recovery of monoclonal antibodies from large-scale mammalian cell culture’’, Biopharm. Int, 7:34–45.

[229] Yigzaw, Y., (2006). ‘’Exploitation of the adsorptive properties of depth filters for host cell protein removal during monoclonal antibody purification’’, Biotechnol. Progr, 22:288–296.

[230] Evans, T.L. ve Miller, R.A., (1988). ‘’Large-scale production of murine monoclonal antibodies using hollow fiber bioreactors’’, Bio Techniques, 6:762-767.

[231] Randerson, D.H., (1985). ‘’Large-scale cultivation of hybrid om a cells’’, J BiotechnoI, 2:2451-255.

[232] Peters, J.H. ve Baumgarten, H., (1992). Monoclonal Antibodies, First Edition, Springer Lab Manuals, Göttingen.

[233] Mizrahi, A., (1986). ‘’Production of biologicals from animal cells - an overview’’, Proc Biochem Aug: 108-112.

[234] Reuveny, S., Velez, D., Macmilan, J.D. ve Miller, L., (1986). ‘’Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors’’, J Immunol Methods, 86:53-59.

[235] Jackson, L., Trudel, L., Fox, J. ve Lipman, N., (1996). ‘’Evaluation of hollow fiber bioreactors; as an alternative to murine ascites production for small scale monoclonal antibody production’’, J Immunol Methods, 189:217-231.

[236] Knazek, R., Gullino, P., Kohler, P. ve Dedrick, R., (1972). ‘’Cell culture on artificial capillaries’’, Science, 178:65,-67.

[237] Peterson, N. ve Peavey, J., (1998). ‘’Comparison of in vitro monoclonal antibody production methods with an in vivo ascites production technique’’, Contemporary Topics Lab Anim Sci, 37(5):61-66.

[238] Potter, M. ve Boyce, C.R., (1962). ‘’Induction of plasma cell neoplasms in strain BALBI c mice with mineral oil adjuvants’’, Nature, 193:1086-1087.

[239] Hendriksen, C. ve De Leeuw, W., (1998). ‘’Production of monoclonal antibodies by the ascites method in laboratory animals’’, Res Immunol, 149:535-542.

[240] Yokoyama, W. M. (1991). “Monoclonal antibody supernatant and ascites fluid production”, Current Protocols in Immunology, 2-6.

[241] Mechetner, E. (2007). “Development and characterization of mouse hybridomas”, Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols, 1-13.

[242] Marx, U., (1998). ‘’Membrane-based cell culture technologies: a scientifically and economically satisfactory alternative to malignant ascites production for monoclonal antibodies’’, Res. Immuno, 149:557-559.

[243] Lipman, N., (1997). ‘’Hollow fibre bioreactors: An alternative to the use of mice for monoclonal antibody production’’, Alternatives in Monoclonal Antibody Production. Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing Technical Report, 8:10-15.

[244] Davies, D. R. ve Metzger, H. (1983). “Structural basis of antibody function”, Annual Review of Immunology, 1: 87–117.

[245] Presta, L., (2003). “Antibody engineering for therapeutics”, Current Opinion in Structural Biology, 13(4): 519–525.

[246] Wang, W., Singh, S., Zeng, D. L., King, K. ve Nema, S. (2007). “Antibody structure, instability, and formulation”, Journal of pharmaceutical sciences, 96(1): 1-26.

[247] Furtado, P.B., Whitty, P.W., Robertson, A., Eaton, J.T., Almogren, A. ve Kerr, M.A., (2004). ‘’Solution structure determination of monomeric human IgA2 by x-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained modelling: a comparison with monomeric human IgA1’’, Journal of Molecular Biology, 338(5):921–941.

[248] Zhang, X., Zhang, L., Tong, H., Peng, B., Rames, M. J., Zhang, S. ve Ren, G., (2015). "3D structural fluctuation of IgG1 antibody revealed by individual particle electron tomography", Scientific reports, 5: 9803.

[249] He, Y., Honnen, W.J., Krachmarov, C.P., (2002). ''Efficient isolation of novel human monoclonal antibodies with neutralizing activity against HIV-1 from transgenic mice expressing human Ig loci'', J. Immunol., 169:595–605.

[250] Liu, B., Huang, L., Sihlbom, C., Burlingame, A. ve Marks J.D., (2002). ''Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by phage display'', J. Mol. Biol., 315:1063–1073.

[251] Proske, D., Blank, M., Buhmann, R. ve Resch, A., (2005). ''Aptamers—basic research, drug development,and clinical applications'', Appl. Microbiol. Biotechnol., 69:367–374.

[252] Hudson, P.J. ve Souriau, C., (2003). ''Engineered antibodies'', Nat. Med., 9:129–134.

[253] Soccol, V., Pandey, A. ve Resende, R., (2016). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications, 1st Edition, Elsevier.

[254] Shukla, A.A., Hubbard, B., Tressel, T., Guhan, S. ve Low, D., (2007). ''Downstream processing of monoclonal antibodies—application of platform approaches'', Journal of Chromatography B, 848:(1), 28-39.

[255] Keller, K., Friedmann, T. ve Boxman, A., (2001). ''Trends'', Biotechnol., 19:(11)438.

[256] Hanna, L.S., Pine, P., Reuzinsky, G., Nigam, S. ve Omstead, D.R., (1993). ''Biopharm'', Int., 1:33.

[257] Ghose, S., (2009). Integrated polishing steps for monoclonal antibody production'', In Process Scale Purification of Antibodies, First Edition, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, New Jersey.

[258] Tugcu, N., (2008). ''Maximizing productivity of chromatographic steps for purification of monoclonal antibodies'', Biotechnol. Bioeng. 99:599–613.

[259] Jiang, C., (2009). ''A mechanistic study of Protein A chromatography resin lifetime'', J. Chromatogr, A 1216:5849–5855.

[260] Gupta, V., Jain, A.D.K., Gill, N.S. ve Gupta, K.,(2012). ''Development and validation of HPLC method - a review'' , Int. Res J Pharm. App Sci., 2:(4)17-25.

[261] Swartz, M.E.. Ahuja, S. ve Rasmussen, H., (2007). HPLC method development for pharmaceuticals, First Edition, Elsevier, New York.

[262] Azim, M.S., Mitra, M. ve Bhasin, P.S., (2013). ''HPLC method development and validation: A review'', Int. Res. J. Pharm, 4:(4)39-46.

[263] Bhardwaja, S. K., Dwivedia, K. ve Agarwala, D. D. (2016). "A Review: GC Method Development and validation", International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry, 6(1): 1-7.

[264] Sofer, G. (2003). “Virus inactivation in the 1990s-and into the 21st century”, Biopharm international, 27.

[265] Brorson, K., Krejci, S., Lee, K., Hamilton, E., Stein, K. ve Xu, Y. (2003). “Bracketed generic inactivation of rodent retroviruses by low pH treatment for monoclonal antibodies and recombinant proteins”, Biotechnology and bioengineering, 82(3): 321-329.

[266] Ireland, T., Lutz, H., Siwak, M. ve Belton, G. (2004). “Viral filtration of plasma-derived human IgG”, Biopharm international, 17(11): 38-44.

[267] Van Reis, R., Goodrich, E. M., Yson, C. L., Frautschy, L. N., Dzengeleski, S. ve Lutz, H. (1997). “Linear scale ultrafiltration”, Biotechnology and bioengineering, 55(5): 737-746.

[268] Corthell, J. T., (2014). Basic Molecular Protocols in Neuroscience: Tips, Tricks, and Pitfalls, First Edition, Elsevier Science Publishing Co Inc, United States.

[269] Kurien, B. T., Scofield, R. H. ve Oklahoma City, O. K. (2015). Electrophoresis–Blotting Techniques, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, Elsevier, Oklahoma City, USA.

[270] Margulies, D.H., (2005). ‘’Monoclonal antibodies: Producing magic bullets by somatic cell hybridization’’, The Journal of Immunology, 174:2451–2452.

[271] Vitetta, E.S. ve Ghetie, V.F., (2006). ‘’Immunology, considering therapeutic antibodies’’, Science, 313:(5785)308–309.

[272] Brekke, O.H. ve Sandlie, I., (2003). ‘’Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century’’, Nature Reviews Drug Discovery, 2:52–62.

[273] Chan, C.E., Chan, A.H.Y., Hanson, B.J. ve Ooi, E.E., (2009). ‘’The use of antibodies in the treatment of infectious diseases’’, Singapore Medical Journal, 50:663–673.

[274] Francis, R. J. ve Begent, R. H. J., (2003). Monoclonal antibody targeting therapy: An overview, Targeted Therapy for Cancer, Oxford University Press, New York.

[275] Hommel, M., Peters W., Ranque, J., Quilici, M. ve Lanotte, G., (1978). ‘’The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis’’, Ann. Trop. Med. Parasito., 2:213-218.

[276] Raj, V.S., Ghosh, A., Dole V.S., Madhubala, R., Myler, P.J. ve Stuart, K.D., (1999). ‘’Serodiagnosis of leishmaniasis with recombinant ORFF antigen’’, Am.J. Trop. Med. Hyg., 61:482-487.

[277] Senaldi, G., Xiao, S.H., Hoessli, D.C. ve Bordier, C., (1996). ‘’Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by a dot-enzyme immunoassay for the detection of a Leishmania donovani-related circulating antigen’’, J. Immunol. Methods, 193:9- 15.

[278] Boelaert, M., El Safi, S., Jacquet, D., De Muynck, A., Van der Stuyft, P. ve Le Ray, D., (1999). ‘’Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis’’, Am. J. Trop. Med. Hyg, 60:129-134.

[279] Mbati, P.A., Githure, J.I., Kagai, J.M., Kirigi, G., Kibati, F., Wasunna, K. ve Koech, D.K., (1999). ‘’Evaluation of a standardized direct agglutination test (DAT) for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya’’, Ann. Trop. Med. Parasitol., 93:703-710.

[280] Singla, N., Singh, G.S., Sundar, S. ve Vinayak, V.K., (1993). ‘’Evaluation of direct agglutination test as an immunodiagnostic tool for kala-azar in India’’, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 87:276–278.

[281] Roffi, J., Dedet, J.P., Desjeux, P. ve Garre, M.T., (1980). ‘’Detection of circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)’’, Am. J. Trop. Med. Hyg., 29:183-189.

[282] Harith, A.E., Kolk, A.H.J., Kager , P.A., Leeuwenburg, J., Muigai, R., Kiugu, S. ve Laarman, J.J., (1986). ‘’A simple and economic direct agglutination test for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis’’, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 80:583-587.

[283] Joshi, A.B., Singhasivanon, P., Khusmith, S., Fungladda, W. ve Nandy, A., (1999). ‘’Evaluation of direct agglutination test (DAT) as an immunodiagnostic tool for diagnosis of visceral leishmaniasis in Nepal’’, Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 30:583-585.

[284] Katzin, A.M., Kincira, E.S., Claudio, O.P., Alexander, M. ve Valrumos, A.M.S., (1991). ‘’Detection of antigen in urine of patients with acute falciparum and vivax malaria infections’’, Am. J.Trop. Med. Hyg., 45:453-462.

[285] Etten, L.V., Folman, C.C., Eggelte, T.A., Kremsner, P.G. ve Deelder, A.M., (1994). ‘’Rapid diagnosis of schistosomiasis by antigen detection in urine with a reagent strip’’, J. Clin. Microbiol., 32:2404-2406.

[286] Ramaprasad, P. ve Harinath, B.C., (1995). ‘’Use of fractionated urinary filarial antigen in the diagnosis of human filariasis’’, J. Trop. Med. Hyg., 98:35-40.

[287] Coler, R.N. ve Reed, S.G., (2005).“Second-generation vaccines against leishmaniasis”, Trends Parasitol, 21 : 244 – 249.

[288] Sukumaran, B. ve Madhubala, R., (2004). “Leishmaniasis: current status of vaccine development”, Curr. Mol. Med., 4 : 667 – 679.

[289] Noazin, S., (2008). “First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials”, Vaccine, 26: 6759–6767.

[290] Coffman, R. L., Sher A. ve Seder, R. A., (2010). “Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work”, Immunity, 33: 492–503.

[291] Reed S. G., Orr M. T. ve Fox C. B., (2013). “Key roles of adjuvants in modern vaccines”, Nat. Med, 19: 1597–1608.

[292] Reed, S. G., Coler R. N., Mondal , D., Kamhawi, S. ve Valenzuela, J. G., (2016). "Leishmania vaccine development: exploiting the host–vector–parasite interface", Expert Rev. Vaccines, 15: 81–90.

[293] Oliveira, F., (2015). "A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates", Sci. Transl. Med, 7: 290ra90.

[294] Olsson, L. ve Kaplan, H. S. (1980). "Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity", Proceedings of the National Academy of Sciences, 77(9): 5429-5431.

[295] Takahashi, M. ve Fuller, S. A. (1988). "Production of murine hybrid-hybridomas secreting bispecific monoclonal antibodies for use in urease-based immunoassays", Clinical chemistry, 34(9): 1693-1696.

[296] Cuello, A. C., Galfre, G. ve Milstein, C. (1979). "Detection of substance P in the central nervous system by a monoclonal antibody". Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(7): 3532-3536.

[297] Haugen, A., Groopman, J. D., Hsu, I. C., Goodrich, G. R., Wogan, G. N. ve Harris, C. C. (1981). "Monoclonal antibody to aflatoxin B1-modified DNA detected by enzyme immunoassay", Proceedings of the National Academy of Sciences, 78(7): 4124-4127.

**EK-A**

---

**ETİK KURUL RAPORU**

BEZMİÂLEM
VAKIF ÜNİVERSİTESİ

**T.C.**
**BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ**
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**
**KARAR METNİ**

SAYI: 2013/ 42 20.02.2013
KONU: Sn. Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

**Sayın Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV,**

Başlığı "Kütanöz Leishmaniasis'e Neden Olan L.Tropica'dan İzole Edilen Lipofosfoglikan Moleküllerine Karşı Monoklonal Antikor Teknolojisine Dayalı Tanı Kitinin Geliştirilmesi" olan projeniz 19.02.2013 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

| | | |
|---|---|---|
| Doç. Dr. Ülkan Kılıç<br>Etik Kurul Başkanı | Prof. Dr. Ahmet Belce<br>Üye | Prof. Dr. Serdar Üşümez<br>Üye<br>Katılmadı |
| Prof. Dr. Erhan Ayşan<br>Üye | Yrd. Doç. Dr. Mahmut Gürgan<br>Üye | Yrd. Doç. Dr. Ömer Uysal<br>Üye |
| Uzm. Vet. Hek. Öznur İnan<br>Üye | Muhsin Ceylan<br>Üye | Ahmet Sivil<br>Üye |

# ÖZGEÇMİŞ

**KİŞİSEL BİLGİLER**


**Adı Soyadı** : Hilal ŞENTÜRK

**Doğum Tarihi ve Yeri** : 16.10.1992, İstanbul

**Yabancı Dili** : İngilizce

**E-posta** : hilalsenturk1@gmail.com


**ÖĞRENİM DURUMU**

| Derece | Alan | Okul/Üniversite | Mezuniyet Yılı |
|---|---|---|---|
| Y. Lisans | Biyomühendislik | Yıldız Teknik Üniversitesi | 2017 |
| Lisans | Biyomühendislik | Yıldız Teknik Üniversitesi | 2015 |

**YAYINLARI**

**Makale**


1. Bagirova, M., Allahverdiyev, A. M., Abamor, E. S., Ullah, I., Cosar, G., Aydogdu, M., Senturk, H., Ergenoglu, B. (2016). "Overview of dendritic cell-based vaccine development for leishmaniasis", Parasite Immunology, *38*(11): 651-662.