

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

**İNSAN SERUMLARINDA DİFTERİ ANTİTOKSİN
DÜZEYİNİN KANTİTATİF BİOASSAY YÖNTEMİ İLE ÖLÇÜLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tezi Hazırlayan : **BİO. BAŞAK KAYHAN**

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. TURGUT İMİR**

70530

ANKARA 1998

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM
DOKÜMAN**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM
DOKÜMAN**

İÇİNDEKİLER

<u>Bölüm Adı</u>	<u>Sayfa Numarası</u>
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	5
Corynebacterium diphtheriae	5
Antijenik Yapısı	7
Hastalandırıcılık Özellikleri	9
Yaptığı Hastalıklar	11
Difteri Toksini ve Yapısı	14
Difteri Toksini Etki Mekanizması	19
Difteri Toksini-Hücre Reseptörü İlişkisi	24
Aktiviteyi Etkileyen Faktörler	25
Difteriye Karşı Bağışıklık ve Eğilim	27
Aktif Bağışıklama	33
MATERYAL ve YÖNTEM	37
Materyal	37
Yöntem	41

BULGULAR	50
TARTIşMA	58
KAYNAKLAR	63
TABLO (EK)	70
ÖZET	71
SUMMARY	74
ÖZGEÇMİş	77

GİRİŞ ve AMAÇ

Corynebacterium sözcüğü Yunanca'dan alınmış olup, topuz şeklinde bakteriler demektir¹. Bu cinste bulunan bakteriler çomakçık şeklinde olmakla beraber uç veya orta kısımlarında şişlikler gösterirler. Corynebacteriumlar arasında, insan için patojen olması nedeni ile en önemlisi *Corynebacterium diphtheriae* 'dır². C.diphtheriae, halk arasında "kuş palazı" adı verilen difteri hastalığının etkenidir ve ilk olarak, 1871 yılında Bretonneau tarafından difteri hastalığının klinik tablosu açıklanmıştır³. C.diphtheriae dışında, Corynebacterium'ların bir kısmı hayvanlarda hastalık yapar ve bir çoğu saprofit olarak toprakta, bitkilerde, süt ve süt ürünlerinde yaşar¹.

C. diphtheriae basil formunda, difteri hastalığının etkeni olan bir bakteridir. Bu patojenik bakteri normalde üst solunum yollarına yerleşir, kan ve lenf dokularına geçmez. Ancak kalp, böbrek, akciğer olmak üzere çok çeşitli dokularda harabiyete neden olmaktadır. Bu harabiyetin nedeni de basil tarafından üretilen ekzotoksin'dir³.

Difteri hastalığında immün yanıt antikor bağımlıdır. Çünkü, difteri hastalığında ölüm basil tarafından üretilen toksinden kaynaklanmaktadır ve toksine karşı immün yanıt antikor ile sağlanmaktadır. Bu IgG tipindeki antikora antitoksin adı verilir. Antitoksin, vücut'ta kolaylıkla yayılabilmekte ve plasenta'dan geçerek yeni doğanların ilk bir kaç ayında immün savunma oluşturmaktadır⁴.

Sağlık uygulamaları gelişkin ülkelerde aşılama'nın etkisi ile toplumda oluşan bağışıklığa bağlı olarak *C. diphtheriae*'nin oluşturduğu difteri hastalıklarının sayısı önemli ölçüde azalmıştır. Dolayısı ile difteri aşısı uygulanmasının alışkanlık halinde bulunduğu toplumlarda 5'inci yaşa kadar uygulanan aktif bağışıklama sonucunda toplumdaki antitoksin düzeyi ergenlik çağına kadar yeterli yükseklikte olmaktadır. Bu nedenle ortaya çıkan klinik olguların sayısı da o oranda düşüktür. Bir çok erişkin kişinin kanında yeteri kadar antitoksin bulunmadığından yeniden difteriye karşı duyarlılaştıkları görülmektedir⁵.

Buna göre, herhangi bir kimsenin difteri toksinine karşı durumunu ortaya çıkararak, onun difteriye karşı eğilim ve direnç derecesinin saptanması büyük bir önem taşımaktadır. Bu olay üç yöntem ile gerçekleşir. Bunlardan birincisi Schick testi, ikincisi ELISA ve üçüncüsü de hücreler ile yapılan Bioassay yöntemidir. Bioassay yöntemine aynı zamanda in vitro nötralizasyon testi de denir¹.

Serumdaki antitoksin düzeyinin saptanmasında ELISA yöntemi sıklıkla kullanılmasına karşın, aşı üretim merkezlerinin bir çoğunda ELISA kadar doğru sonuçlar verebilen hücresel bioassay yöntemi kullanılmaktadır⁶.

Hücresel bioassay yönteminin temeli, hücre kültüründeki fenol kırmızısının rengindeki değişime dayanmaktadır. Difteri toksinin sitotoksik etkisi sonucunda hücre kültüründeki canlı memeli hücre sayısında azalmaya bağlı olarak besiyerinde renk değişimi meydana gelir⁴.

Biz çalışmamızda in vitro nötralizasyon testini bir tetrazolium tuzu olan MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5diphenyl tetrazolium bromide) maddesi kullanarak Vero hücrelerinin canlılık düzeyine göre antitoksin düzeyini saptamaya çalıştık. Canlı hücrelerdeki mitokondriyal süksinat dehidrogenaz aktivitesini gösteren MTT maddesi canlı hücrelerce indirgenip mor renkli formazana dönüşmesi sonucunda renk değişimleri meydana gelmektedir. Her dilüsyondaki renk değişimlerinin absorbans değerleri ölçülerek toksin ve antitoksin düzeyleri saptanabilmıştır.

Bu çalışmadaki amacımız, aşılama sonrası 2-6 yaş arasındaki çocukların serumlarındaki difteri antitoksin düzeyini hücresel bioassay yöntemi ile saptamaktır. Bunun için, serumdaki antitoksin düzeyine göre canlı kalan hücreleri, MTT maddesi kullandıktan sonra oluşan renk değişimine göre saptamaya çalıştık. Bu yöntem ile de difteri antitoksin düzeyi saptanmaya çalışılmıştır.

GENEL BİLGİLER

.CORYNEBACTERIUM DIPHThERIAE

İlk olarak 1883 yılında KLEBS tarafında pseudomembran'dan tespit edilen C.diphtheriae basil formunda, gram-positif, fakültatif anaerob bakteriler grubuna girer³. Çomakçık şeklinde olan bu bakteri yaklaşık 1-6 µm boy ve 0.5-1 µm enindedir. Kapsülsüz, sporsuz ve hareketsizdir. Oldukça fazla polimorfizm gösteren bir yapısı vardır. Görünüm tam silindir şeklinde olmayıp bazen düz, bazen hafif kıvrık ve çok kez bir veya iki ucunda şişlikler gösterir. Üreme anında birbirlerinden kopan difteri basilleri yan yana veya bir uçları birbirlerine yakın durumda kalırlar. Böylece organizmadan yapılan preparatlarda Çin harflerine benzer şekilde yan yana bulunan basiller görülür¹.

C. diphtheriae her ne kadar fakültatif anaerob ise de, oksijenli ortamda daha iyi ve bol ürer. Difteri basilinin üretimi daha çok Löffler besiyerinde ve % 0.4 potasyum tellürit konulmuş sistinli besiyerinde gerçekleşir. Löffler besiyerinde koloniler küçük, gri renkte ve dalgalı kenarlıdır. Potasyum tellüritli besi yerinde difteri basilleri, potasyum tellürit'i indirgeyerek siyah renkte tellürü açığa çıkarırlar ve bu besiyerinde üreyen difteri basillerinin kolonileri siyah renk alırlar. Bu özellik, *C. diphtheriae* 'yı başka bakteriler ile karışık ortamdan ayırmak için kullanılmaktadır. Tellüritli besiyerinde redüksiyon yapan başka bakteriler var ise de bunların kolonileri difteri basilininkiler kadar koyu siyah renkte değildir^{7,8}.

Difteri basilleri ısıya karşı dayanıksız olup 58 °C'de 10 dakikada ölürler. Gün ışığına karşı duyarlı, kuruluğa karşı ise dayanaksızdırlar. Besiyerinde uzun süre canlı kalabilirlerse de patojeniteleri azalabilirler. Dezenfektanlara karşı dayanıksızdırlar⁹. Difteri basilinin optimal üreme ısısı 35-37 °C 'dir. Optimal pH dercesi de 7.6 civarındadır¹.

.ANTİJENİK YAPISI

Corynebacterium diphtheriae antijenik özellik olarak son derece heterojendir. İçeriğinde, protein yapısında ve ısıya duyarlı olan K antijeni ile polisakkarit yapıda, ısıya dirençli O antijenini bulundurmaktadır¹⁰.

K antijeni patojeniteyi belirleyen bir antijendir. Antibakteriyel immünitede büyük rol oynar. K antijenleri glikolipid yapılı kord faktörü ile beraber difteri basilinin virölansını belli başlı determinantlardandır¹⁰.

O antijenleri polisakkarit yapıdadır ve tüm *Corynebacterium*'larda yer alırlar. *Mycobacterium* ve *Nocardia* arasında oluşan çapraz reaksiyonların nedeni bu antijenlerdir¹⁰.

Corynebakteriyel hücrelerin komponentleri mükemmel antijenik yapılardır. Bu yüzden bu yapılar, deney hayvanlarının immünizasyonunda adjuvan olarak fonksiyon görürler¹⁰.

Difteri basilinin ürettiği ekzotoksin, yapısı itibarıyla bir çok antijenik birimden oluşur. Difteri toksini yapısal olarak iki zincirden oluşur ki bunlar 'A' ve 'B' zincirleridir. 'A' zinciri hücre yüzeyinde toksik etkiden sorumludur. 'B' zinciri de toksinin hücre yüzeyine yapışmasını ve toksik etkiden sorumlu olan 'A' zincirinin transferini sağlar. 'A' zincirine karşı oluşan antikorlar toksik etkiyi nötralize edemezler, ancak 'B' zincirine karşı oluşan antikorlar yapışmayı önleyerek, toksik etkiyi nötralize ederler. Toksin ısıtılmakla ya da formaldehit ile etkileşimi sonrası etkisini kaybeder ve antijenik yapısını koruyan toksoid halini alır. Toksin 100°C'ye kadar ısıtıldığında 'B' fragmanın yapısında bozulma olurken, fragman 'A' yapısında bozulma olmaz. Toksin'in 20 µg/ml.'lik formol ile etkileşimi sonucunda toksin toksoid halini alır. Toksoid hayvanlara verilerek antitoksik serum hazırlanır⁹.

.HASTALANDIRICILIK ÖZELLİKLERİ

Corynebacterium diphtheriae insanlarda difteri hastalığını yapar. Difteri hastalığı daha çok çocuklarda görülen bir hastalıktır ve yaş ilerledikçe difteri hastalığına daha seyrek rastlanılır¹¹.

C.diphtheriae daha çok üst solunum yolu ile farinks mukozalarına yerleşir. Bazen gözde ve deride yara şeklindeki lezyonlara da yerleşebilmektedir. Organizma yerleştiği yerde ürer ve lokal bir enfeksiyon yapar. Organizmanın kan ve lenf yolu ile yayılması çok enderdir¹.

Bakteri bulunduğu mukozada üreme anında bir eksotoksin yapar. Toksin mukoza tarafından absorbe edilerek epitel tabakanın yapısında bozulmalara neden olur. Epitel tabakasındaki harabiyeti takiben gelişen iltihabi reaksiyonlar sonucunda fibrin içerisindeki epitel hücreler, lökositler, eritrositler ve bakteriler, birlikte gri renkli bir tabaka oluştururlar.

Tabana sıkıca yapışık olan bu tabaka kaldırılmak istendiğinde kapiller bir kanamaya yol açar. Bu nedenle bu gri renkli tabakaya pseudomembran ya da yalancı zar adı verilir. Bu zar bulunduğu ortamlarda zararlara neden olur. Özellikle larinks içerisinde bulunması soluk zorluğu, tıkanma ve konuşma bozuklukları gibi etkilere neden olabilir¹¹.

Her ne kadar bakterinin kendisi kan ve lenf dokularına geçmese de bakterinin ürettiği ekzotoksin kana geçer ve difteri hastalığında görülen genel belirtiler ortaya çıkar⁴.

Toksinin etkileri sonucunda çeşitli organlarda çeşitli değişiklikler görülebilir. Böbreklerde, böbrek üstü bezlerinde, karaciğerde ve kalp kaslarında parankim dejenerasyonu yağ infiltrasyonu ve nekroz görülebilir. Sinir ve kaslarda dejenerasyona bağlı olarak özellikle damak ve gözde olmak üzere kas felçleri ortaya çıkabilir¹.

.YAPTIĞI HASTALIKLAR

Corynebacterium diphtheriae 'nın etken olduğu, klinik açıdan en sık karşılaşılan hastalık difteri anjinidir. Difteri anjini *C.diphtheriae*'nın boğaz mukozasına yerleşmesi ile ortaya çıkar. Hastalık, öksürük damlacıkları ile sağlam kişilere bulaşabilir. Difteri basilinin duyarlı kimseler tarafından alınmasından sonra basil konakçısında 2-5 günlük bir kuluçka dönemi geçirir ^{1,10} .

Bu dönem sonrasında halsizlik, kırıklık, yorgunluk hissi, hafif boğaz ağrısı ve 37 °C'lik ateş gibi hastalık belirtileri başlar. Enfeksiyondan 24 saat sonra pseudomembran oluşumu gözlenir ve yayılır. Pseudomembran beyaz, gri-beyaz ya da gri-yeşil renkte olabilir. Ağır difteri olgularında burun, nazofarinks ve farinks mukozaları pseudomembran ile örtülüdür. Lenf düğümleri çok kez şişmiş ve boyun duvarları ödemlidir. Ağız kötü kokar ¹⁰.

Toksinin kalp kasının parankim dokusundaki dejenerasyonu ve nekroz gibi etkilerinden dolayı kalp atım sayısında ve atım düzeninde bozulmalar meydana gelir. Difteri hastalığında erken veya geç dönemde oluşan miyokardit önemli bir komplikasyondur. Erken miyokardit 3 ve 7'ci günlerde ortaya çıkarak ölüme neden olabilir. Geç miyokardit ise 5 ve 14'cü günlerde ortaya çıkar. Ağır durumlarda koma da görülebilir¹.

Hastalığın gelişmesi sonucunda larinks ve trakeayı yalancı zarlar kaplar. Larinks ve trakea difterisi adı verilen bu klinik formda diğer belirtilere ek olarak ateşin daha çok yükselmesi, nabız ve solunum sayısının artması, çift sesli öksürük ve ses kısıklığı ortaya çıkar. Boğulma hissini takiben önlem alınmaz ise boğulma sonucu ölüm görülebilir¹.

C. diphtheriae 'nın etkeni olduğu diğer klinik şekiller ise şunlardır;

a) Burun Difterisi : Daha çok küçük çocuklarda görülen ve ilk bakışta tek taraflı, daha sonra çift taraflı nezle benzeri akıntılar ile kendini gösteren bir hastalıktır. Bazen yayılım gösterip farinks ve larinks mukozasına geçebilir³.

b) Vulva-Vagina Difterisi : Çoğunlukla sekonder olarak difterili çocukların elleri aracılığı ile genital bölgelerini enfekte etmeleri sonucunda ortaya çıkar³.

c) Göz Difterisi : Hasta kimselerin ve yakınlarının bulaşmış elleri aracılığı ile difteri basillerinin göze yerleşmesi ile olur. Enfeksiyona başka bakteriler eklenirse körlük dahi olabilir. Difterili çocukları muayene eden doktorların gözlerine öksürük damlacıklarının sıçraması sonucunda göz difterisine yakalanmaları olağandır³.

d) Yara ve Deri Difterisi : Çeşitli tipte yaraların kirli el veya öksürük damlacıkları aracılığı ile basil tarafından enfekte edilmesi sonucunda oluşur³.

.DİFTERİ TOKSİNİ ve YAPISI

Corynebacterium diphtheriae, insanlarda difteri hastalığı nedeni olan eksotoksini ürettiği, 1888 yılında Roux ve Yersin tarafından açıklanması ile, bu gruptaki diğer bakterilerden daha fazla ilgi görmeye başlamıştır ⁴.

Difteri toksini 535 aminoasit dizisinden oluşan bir polipeptid zinciri olarak *C.diphtheriae* tarafından salgılanır. *C. diphtheriae* ile toksini üreten faj arasında lizojenik bir etki mevcuttur. β - corynebakteriyofaj adı verilen bu faj çift iplikli DNA fajıdır. Bu fajın uzaklaştırılması ile bakteri patojenik özelliğini kaybeder ¹².

Proteolitik enzimler ve tripsinizasyon yöntemi ile difteri toksini iki fragmana ayrılır. Bunlar, 24 bin Dalton ağırlığında olan ve toksinin amino ucunu (NH) oluşturan fragman A ile 38 bin Dalton ağırlığında olup toksinin karboksil ucunu (COOH) oluşturan fragman B'dir. Her iki yöntem ile fragmanlar 190, 192 veya 193'üncü aminoasitlerin bulunduğu bölgelerden ayrılırlar ¹³.

Difteri toksininin yapısı 'Y' şeklini andıran üç bağımsız bölgeden oluşmaktadır. Bunlar katalitik bölge, transmembran bölge ve reseptör bağlanma bölgeleridir. Bu 'Y' şeklinin temel kısmını transmembran bölge oluştururken, bu yapının bir kolunu katalitik bölge, diğer kolunu ise reseptör bağlanma bölgesi oluşturur ¹³ (Şekil-1).

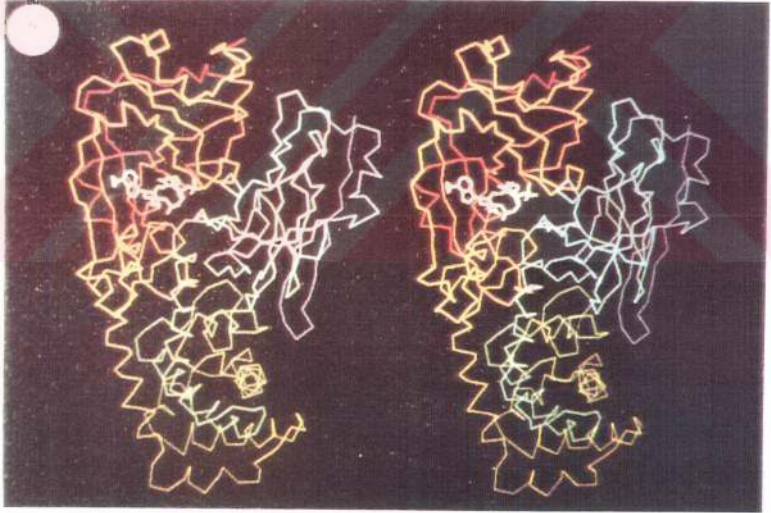
Toksinin amino ucunu katalitik bölge, karboksil ucunu reseptör bağlanma bölgesi ve bu iki bölge arasındaki yeri ise transmembran bölge oluşturur. Bunlar sırası ile 1-193, 386-535, 205-378 aminoasit dizilimlerini içerirler. Her üç bölgenin de ayırtedici özellikleri vardır¹⁴.

a. Katalitik Bölge : Katalitik bölge 8 tane β - ipliksi yapı ve 7 tane α - helikal yapı içermektedir¹³. Aktif bölgeyi oluşturan yapısal yarıkları içermesi ile karakteristiktir. ApUp (Adenylyl-(3',5')-uridine 3'-monophosphate) adı verilen bu bölge dinükleotid yapısı bağlaması ile tanımlanır. Özellikle bu yapının kendisi toksinden ayrı olarak hücre yüzeylerine yapışma özelliği bulunmaktadır. Bu da ApUp 'un bir parçasının reseptör bağlanma bölgesinde olduğunu göstermektedir¹⁵. Bu aktif bölgedeki aminoasit dizileri arasında yıkım olayında büyük rol oynayan, Glu148 ve NAD^+ bağlanmasında büyük pay sahibi olan His21 ve Tyr65 bulunmaktadır^{13,16}.

b. Transmembran Bölge : Transmembran bölge iki veya daha çok paralel olmayan dokuz helikal yapıdan oluşur. Buna benzer bir yapı Colicin A'nın yapısında da bulunmaktadır. Bu bölge pH değişikliklerinin neden olduğu membran geçişlerine sebebiyet vermektedir¹³.

c. Reseptör Bağlanma Bölgesi : Reseptör bağlanma bölgesi

on tane β -ipliksi yapı içermektedir. Reseptör bağlanma bölgesi, yapısal olarak TNF ve immünglobulinlerin değişken bölgelerine benzemektedir. Daha çok bu benzer bölgeler ile reseptör tanıma gerçekleşmektedir¹.



Şekil-2 : Difteri toksininin yapısında yer alan aktif bölgeler gösterilmektedir. Sarı bölge katalitik bölgeyi, yeşil bölge transmembran bölgeyi, mavi bölge reseptör bağlanma bölgesini temsil etmektedir. Yapının ortasında beyaz renkli bölge ApUp adı verilen aktif bölgeyi gösterir.

.DİFTERİ TOKSİNİNİN ETKİ MEKANİZMASI

Proteinlerin biyolojik membranlardan nasıl geçtiği sorusunun cevabı, çeşitli araştırmalar ile bulunmaya çalışılmıştır. Özellikle proteinlerin mitokondriye ve endoplazmik retikulumu aktarılmaları konusundaki çalışmalar bu konuya ışık tutmuştur. Bunun sonucunda da üç karakteristik özellik açığa çıkartılmıştır. Bunlar;

(i) Translokasyona maruz kalan protein molekülünün, membran reseptörlerince tanınan, yani hedefi oluşturan amino ucu bulunmaktadır.

(ii) Protein translokasyonu esnasında bir dizi metabolik reaksiyonlar ile membran potansiyeli bu olaya hareket kazandırmaktadır.

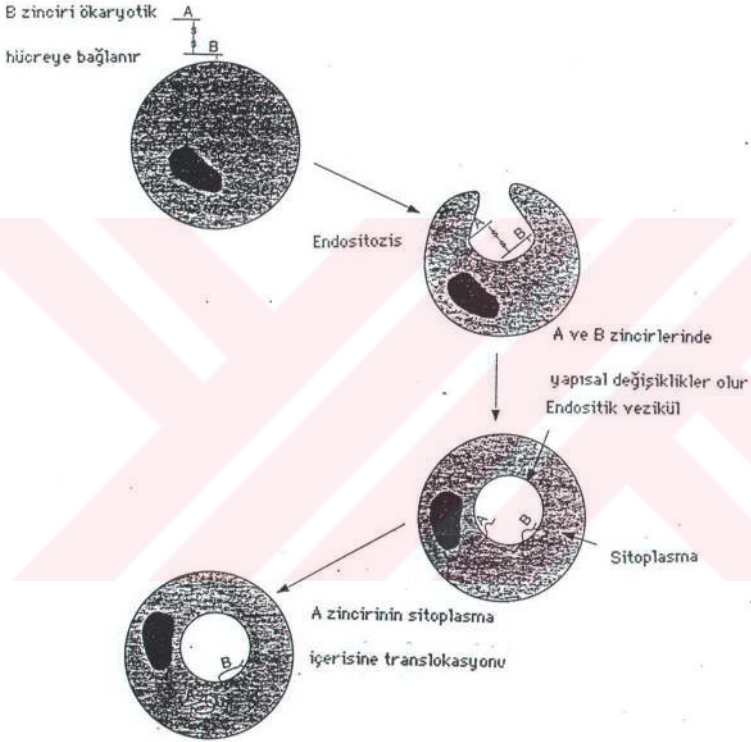
(iii) Translokasyon olayının başarısı için proteinlerin gevşek olarak tutulmuş olması gerekmektedir¹⁷.

Bir çok protein yapısındaki toksinler katalitik bölgelerini ökaryotik hücrelerin sitozollerine aktarırlar. Bu aktarma olayının moleküler mekanizmasını anlayabilmek için çalışmalar difteri toksini üzerine yoğunlaşmıştır.

Difteri toksini, 58 kDa'lık bir polipeptid olarak *Corynebacterium diphtheriae* tarafından salgılanır. Düşük konsantrasyonlardaki tripsin ile etkileşimi sonucunda toksin, birbirlerini disülfid bağları ile bağlı tutan iki fragman'a bölünür. Bunlar, 'A' ve 'B' fragmanlarıdır. Difteri toksininin hücre içerisine girişinde, hücre yüzeyindeki özgül reseptörlere bağlanan 'B' fragmanı büyük rol oynar. Hücre yüzeyine bağlanmayı endositoz takip eder ve endozomlardaki düşük pH, 'A' fragmanının endozomlardan sitosol içerisine aktarılmasına neden olur¹⁸.

Difteri toksininin sitotoksik aktivitesi sırası ile şu basamaklar ile gerçekleşir;

1. Toksinin, hücre yüzeyindeki özgül reseptörlerine bağlanması,
2. Toksin-reseptör kompleksinin hücre içerisine girişi,
3. Toksinin 'A' fragmanının hücre içerisine aktarılması,
4. ADP-Ribose grubunun EF-2'ye aktarılması ve protein sentezinin durdurulması¹².

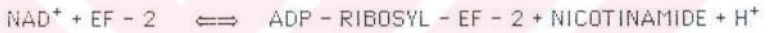


Şekil-3 : Difteri toksininin etki mekanizması.

Toksinin 'B' fragmanında yer alan reseptör bağlanma bölgesi, hücre yüzeyindeki bir reseptöre bağlanır. Bu reseptör ile tam bağlanmayı sağlayan kısım 482-535'inci aminoasitlerin yer aldığı bölgedir ¹⁹. 'B' fragmanı 'A' fragmanı ile de ilişkilidir; böylelikle 'A' fragmanının hücre sitoplazmasına aktarılmasına destek olur. Toksin hücre yüzeyine bağlandıktan sonra hücre, toksini endositoz yolu ile veziküller içerisine alır. Toksin aktivitesinde endositozis önemli bir basamaktır çünkü vezikül oluştuktan sonra buradaki düşük pH değeri translokasyon olayını mümkün kılmaktadır ²⁰.

Endositik veziküller içerisinde pH değeri 5 civarına düştüğü zaman asidik amino asitler protonlanırlar ve bu da pH 7 civarında globular form'da bulunan toksini az da olsa hidrofilik duruma getirir. Yük dağılımındaki değişiklikler hem 'A' hem de 'B' fragmanlarında kısmi ayrılmalara neden olur. 'A' ve 'B' fragmanlarını bir arada tutan disülfid bağlarının kopması ile sadece 'A' fragmanı sitoplazma içerisinde yer alır. Bu da 'B' fragmanının membran boyunca yer almasına ve sadece 'A' fragmanının sitoplazmada bulunmasına olanak sağlar ²¹.

Difteri toksininin 'A' fragman'ı ökaryotik hücrelerde bir enzim gibi hareket ederek NAD^+ ve zincir uzatma faktörü EF-2 arasında inaktif bir ADP-Riboz-EF-2 kompleksi oluşturmakta ve bu olay translokasyonu engelleyerek hücrelerde protein sentezini inhibe etmektedir²².



ADP-ribosyl grubunun bağlanması alışılmadık bir histidine türevi ile olur ve buna diphthamide histidine adı verilir. Bu değişik histidine türevini oluşturan nükleotid dizilimi EF-2'nin translokasyonundan sonra gerçekleşir ve tüm ökaryotik hücre tiplerinde yer alır. Diphthamide'in ökaryotik hücrelerdeki görevi tam olarak anlaşılamamasına rağmen, diğer hücresel proteinlerde değil de sadece EF-2'de yer alması difteri toksinindeki 'A' fragmanının niçin özellikle EF-2'yi inaktive ettiğini açıklayan bir neden olabilir¹².

.DİFTERİ TOKSİNİ – HÜCRE RESEPTÖRÜ İLİŞKİSİ

Difteri toksininin 'B' fragmanının hücrelerce tanınması yıllarca gizemliliğini koruyan bir konu idi. Bu gizemin çözülmesi 'A' fragmanının translokasyonunun açıklanabilmesi için gereklidir. Çünkü, 'B' fragmanı ile hücre yüzey reseptörünün ilişkisi sonucu, bağlanan toksinde yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Toksindeki yapısal değişiklikler ve endositik veziküllerde meydana gelen değişiklikler translokasyonu gerçekleştirir. Ayrıca difteri toksininin aktivitesindeki duyarlılık hücre yüzeyinde bulunan fonksiyonel reseptörlerin sayısı ile orantılıdır²³.

Difteri toksini ve hücre ilişkisini sağlayan reseptörün, hücre gelişmesi ve farklılaşması için önemli bir sinyal görevi gören heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) olduğu saptanmıştır.

HB-EGF ilk olarak hücre yüzeyine nakil edilir ve ardından hücre membranına girer. Proteolitik parçalanma sonrası reseptörün aktif kısmı hücre yüzeyinden ayrılır ve aktivitesinide yitirir. Toksinin 'B' fragmanınca tanınan, HB-EGF reseptörünün parçalanmamış şeklidir ¹².

.AKTİVİTEYİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Difteri toksininin hücre yüzeyine yapışmasına ve bunu takiben hücre sitoplasması içerisine geçişine engel olan in vivo ve in vitro etkenler mevcuttur. Bu etkenler;

a. Endositozik veziküller içerisindeki pH değeri beş civarında iken, toksin yapısal değişikliğe maruz kalır. Bu değişiklikleri membran yüzeyinde deliklerin oluşumu takip eder ve ardından 'A' fragmanının hücre membranı boyunca transferi gerçekleşir ²¹.

b. Fe^{++} konsantrasyonunun, bakterilerden toksin salınımı için optimum 0.14 μ gr/ml. olması gerekir ²³.

c. Özellikle, toksinin hücreler üzerine sitotoksik etkisi üzerinde çalışırken, hücre yoğunluğu ile toksin aktivitesi arasında ters orantılı bir ilişkinin olduğunu unutmamak gerekir. Ortamdaki hücre yoğunluğu arttıkça toksin ile etkileşimde bulunacak olan reseptör sayısı azalacaktır²⁴.

d. Aminoasitlerin toksinin yapısındaki yeri ve özellikle konumları toksinin aktivasyonu açısından önemlidir. Prolin345 ve prolin308 translayon olayının gerçekleşmesinde diğer aminoasitlere göre daha etkindir. Özellikle prolin345 üzerinde yapılan değişiklikler aktivitesini yitirmiş toksinin elde edilmesinde kullanılmaktadır¹⁶. Ayrıca, histidine21 ve glutamindenin de lizis olayında önemli rol aldıkları belirtilmektedir²⁵.

e. Ayrıca, in vitro koşullarda 12-o-teradecaoylphorbol 13-acetate (TPA), salisilat ve Florid'in reseptörlerde fosforilasyona neden olarak, difteri toksinine karşı hücreleri koruyucu bir etkisi olduğu belirtilmiştir²⁶.

.DİFTERİYE KARŞI BAĞIŞIKLIK ve DİFTERİYE EĞİLİM

Difteri hastalığı geçiren kimselerde uzun süreli bir bağışıklık meydana gelir. Bağışık kimseler yeniden difteri basilleri ile enfekte olabilirler fakat toksine karşı dirençli olduklarından difteri hastalığı ortaya çıkmaz. Yani bu bağışıklık antitoksik bir bağışıklıktır. Difteri hastalığı esas olarak difteri toksininin etkileri ile oluştuğundan, hastalığa karşı direnç, kanda ve dokuda bulunan antitoksine bağlıdır^{1,27}.

Bir kimsenin herhangi bir andaki difteri toksinine karşı durumunu ortaya çıkararak, onun difteriye karşı eğilim ve direnç derecesi ölçülebilir. Bu durum iki yoldan incelenir¹.

1. Serumda bulunan antitoksin miktarının saptanması,
2. Difteri toksinine karşı duyarlılığın belirlenmesi .

1- Serumda Bulunan Antitoksin Miktarını Saptamak

a) In vivo Nötralizasyon Yöntemi : İnsandan alınan serum, titresi bilinen difteri toksini ile karıştırıldıktan sonra hayvanlara enjekte edilir. İnsan serumlarında bulunan çok küçük miktarlardaki antitoksini ortaya çıkarmak için serum ve toksin karışımları kobayların derilerinin içerisine verilir. Kobay derisi içerisine verildiğinde şişme, eritem ve en son nekroz meydana getiren toksin miktarı bulunur. Bu toksin miktarına deri reaksiyon dozu veya deri nekroz dozu (Lr) adı verilir ki bu miktar Minimum Öldürme Dozunun (M.Ö.D.) 1/250 - 1/500 kadardır ^{1,3}.

Bir tüp içerisine standart toksinin bir reaksiyon dozu (Lr) kadar miktarları konur. Üzerlerine kanındaki antitoksin miktarı belirlenmek istenen kişinin serumundan her tüp içerisine değişik miktarlarda katılır. Tüpler 2 saat 37 °C, 22 saat +4 °C 'de ve tekrar yarım saat 37 °C 'de bekletildikten sonra her tüpten alınan 0.1ml.'lik miktarlar aynı kobayın derisi içerisine ve ayrı ayrı noktalardan verilir. Böylelikle bir doz toksini nötrale edebilecek antitoksinin ne kadar serum içerisinde bulunduğu saptanarak, antitoksin miktarı belirlenmiş olur ⁴.

b) İn vitro nötralizasyon testi : Bu metod difteri toksininin memeli hücrelerin gelişimini engellemesi olayıdır. Toksininin bu etkisi, serum örneklerinde bulunan difteri antitoksinince engellenmektedir. Serum örnekleri, toksisite düzeyi bilinen toksin ile karıştırıldıktan sonra, plastik titrasyon plaklarında değişik dilüsyonları yapılır. Kısa bir inkübasyon süresinden sonra üzerlerine HeLa veya Vero hücre süspansiyonları eklenir. 3-4 günlük inkübasyon süresinden sonra titrasyon plaklarında renk değişimleri saptanır ⁴.

Vero hücresi difteri toksinine son derece duyarlı bir hücredir ve toksin ile ilişki kurabileceği çok fazla reseptör içermektedir. Serum dilüsyonu çok miktarda antitoksin içeriyor ise hücreler gelişimlerini sürdürürler ve besiyerindeki renk, kırmızıdan sarıya dönüşür ²⁸.

c) Hemaglütinasyon : Tannik asit ile muamele edilmiş ve yalnız toksin ile duyarlılaştırılmış eritrosit süspansiyonları ile difteri antikorlarının aglütinasyonudur. Hemaglütinasyon testi ucuz olması, çabuk sonuç alınabilmesi ve duyarlılığının yüksek olması gibi nedenlerden dolayı tercih edilmektedir ⁴.

d) ELISA : Difteri toksini gibi eksotoksinler lipofilik yapılarından dolayı tüplerin zeminlerini kolaylıkla kaplayabilirler. Direkt ELISA sonuçlarına göre antikor düzeyi 0.1 IU/ml. den yüksek bulunan sonuçlarda ELISA testinin in vivo ve in vitro nötralizasyon testlerinin sonuçları ile korelasyon göstermektedir. ELISA testinin avantajı sadece difteriye özgü IgG antikorlarının ölçülmesidir ^{14,29}.

2-Difteri Toksinine Karşı Duyarlılığın Belirlenmesi

Belli oranda sulandırılmış standart difteri toksininden belli bir miktar deri içerisine verildiği zaman bu kimselerin kan ve dokularında bulunan antitoksin titresine göre farklı reaksiyon sonuçları alınır. Serumlarında yeterli düzeyde antitoksin bulunan kişilerde enjekte edilen toksin nötralize edileceğinden hiç bir reaksiyon görülmez. Bağışıklığı olmayan kişilerde eritemden nekroza kadar giden reaksiyonlar ortaya çıkar. Bu esasa dayanan bir test ilk olarak Bela Schick tarafından bulunmuş ve bu test de Schick testi olarak adlandırılmıştır ⁴.

Schick testinde toksinin 1/50 minimum öldürücü dozu 0.1 ml. sıvı hacminde ön kol derisi içerisine verilir. Diğer kola kontrol olarak aynı miktarda ısıtılmış toksin veya toksoid verilir. Sonuçlar 24'üncü ve 48'inci saatler ile 4 ve 6'ıncı günlerde incelenir. Test yapılan kişinin bağışıklık derecesine göre 4 tip reaksiyon ortaya çıkabilir. Schick test dozu 0.001 ünite standart antitoksin ile karıştırıldıktan sonra kobayda deri içine enjekte edildiğinde 10 mm. çapında eritemli bir lezyon oluşturan toksin miktarı olarak belirlenmiştir⁴.

Olumlu reaksiyon; test yapılan kişide toksini nötralize edebilecek miktarda antitoksin bulunmadığı zaman görülen ve toksin verilen kolda önce kızarıklık sonra şişlik şeklinde ortaya çıkan, en yüksek sınıra 4'üncü gün ulaştıktan sonra daha sonraki günlerde esmer bir leke bırakarak kaybolan reaksiyondur. Tepkime, toksinin deri hücreleri üzerine olan öldürücü etkisine bağlıdır. Kontrol kolunda hiç bir reaksiyon meydana gelmez. Bu kişilerde bağışıklık ve allerji yoktur³.

Olumsuz reaksiyon, kişide yeterli miktarda antitoksin var ise enjekte edilen toksin nötralize edileceğinden hem testin yapıldığı yerde hem de kontrol kolunda reaksiyon görülmez. Bu kişiler difteriye karşı bağışık olup, allerjik değildirler³.

Yalancı reaksiyon ise, enjeksiyon yapılan kolların her ikisinde de 6-18 saat sonra görülen ve 2-4'üncü günü kaybolan reaksiyonlar vardır. Bu reaksiyon, toksin dışındaki diğer maddelere karşı kişinin aşırı duyarlılığını gösterir. Aşırı duyarlılık toksinin elde edilmesi işleminde ortamda bulunan proteinlere karşı oluşmuştur. Bu reaksiyon daha önce difteri hastalığı geçirerek difteri basillerinin proteinlerine karşı duyarlılık kazanmış kişilerde daha çok görülür. Olumsuz reaksiyon gibi değer taşır³.

Birleşik reaksiyonda, hem olumlu hem de yalancı reaksiyonlar beraber gelişir. Kişide önce yalancı reaksiyondaki gibi her iki kolunda da kızarıklık ve şişlik ortaya çıkar. Fakat 2-4 gün içerisinde kontrol kolundaki bulgular ortadan kalkmasına karşılık toksin verilmiş koldaki bulgular olumlu reaksiyonlar gibi gelişir. Bu kişilerde bağışıklık yoktur ancak bir aşırı duyarlılık vardır. Olumlu sonuç gibi değerlendirilir³.

.AKTİF BAĞIŞIKLAMA

Difteri hastalığı toksinin yaptığı bir hastalık olduğuna göre aktif bağışıklığın da toksinden hazırlanmış aşılarla sağlanması gerekir. Günümüzde iki tip aşı sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar, sıvı toksoid tipi ve alum ile presipite edilmiş toksoid tipidir⁵.

Sıvı toksoid, kuvvetli bir toksinin içerisine % 0.3-0.4 oranında formalin eklenmesinden sonra 37 °C'de bir ay bekletilmesi ile elde edilmektedir. Bu sıvının antijen özelliği bozulmadığı halde toksik etkisi ortadan kalkmıştır. Bu nedenle, organizmaya verildikten sonra oluşan antikorlar esas toksin ile birleşip onun toksik etkisini ortadan kaldırırlar. Formol toksoid aşısı bugün difteriye karşı aktif bağışıklamada ülkemizde yaygın olarak kullanılmaktadır^{1,5}.

%1-2 potasyum alum ile presipite edilmiş toksoid, formol toksoide göre daha yüksek bağıışıklık vermektedir. Bunun nedeni presipite edilmiş toksoid suda erimediğinden deri altında uzun süre kalarak bağıışıklamaya ve bağıışıklılığın uzamasına neden olmaktadır⁵.

Aşılama yöntemi ile aktif bağıışıklama alışkanlığı bulunmayan toplumlarda gerek in vitro ve gerekse Schick testi yöntemleri ile yapılan araştırmalar sonunda difteriye karşı eğilimin yaşa bağılı olarak belirli bir değışiklik gösterdiği ortaya konulmuştur. Yeni doğanlarda, anne kanından plasenta yolu ile geçmiş olan IgG yapısındaki antikorlara bağıımlı bir direnç saptanmıştır^{1,5}.

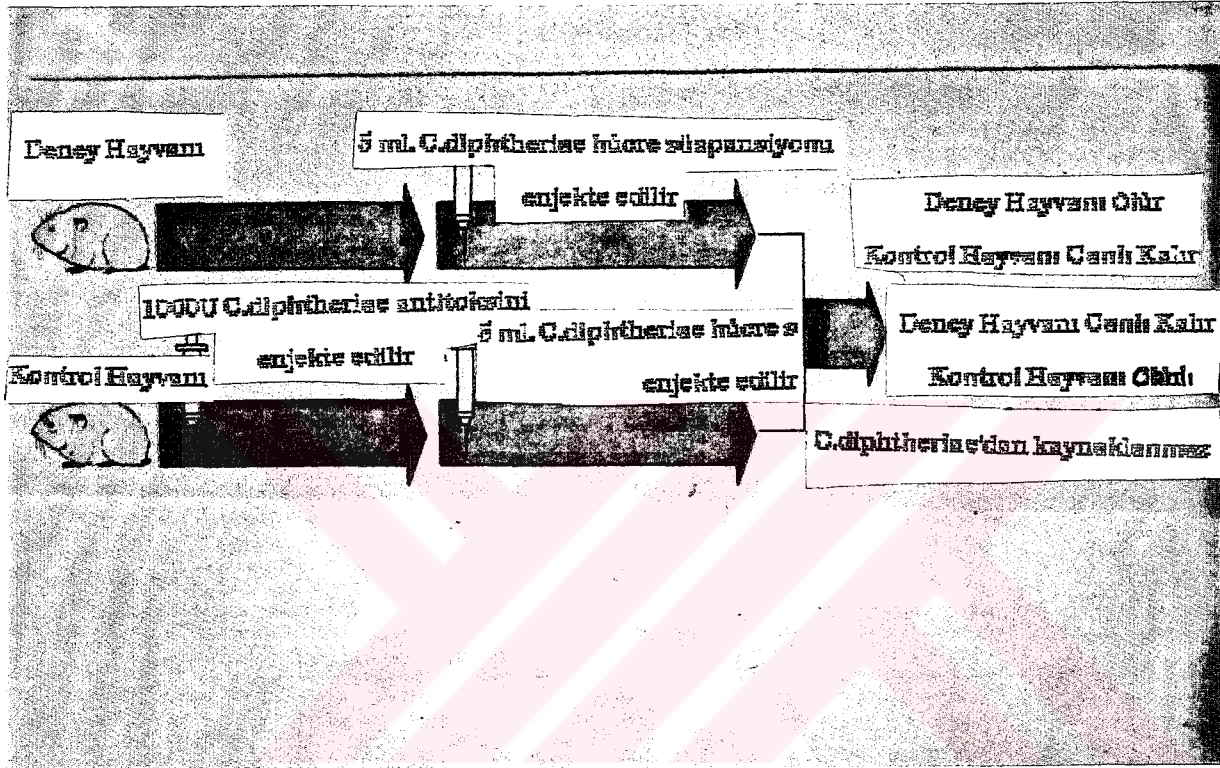
Bu direnç birinci yaşın sonuna doğru, gittikçe azalmaktadır. Bir yaşından sonra 14 yaşına kadar insanların kanındaki antikor miktarı az olup zaman zaman iniş ve çıkışlar göstermektedir. Buna göre difteriye karşı eğilimin en çok bulunduğu yaşlar bu yaş grupları olup difteri olguları en çok 5-14 yaşları arasında ortaya çıkar. 14'üncü yaştan sonra ise genel olarak antikor titresinin yükselmesi ve hastalığa karşı eğilimin düşmesi saptanır^{1,4}.

Difteri aşısının uygulanmasının alışkanlık halinde bulunduğu toplumlarda ise 5'inci yaşa kadar uygulanan aktif bağışıklama sonucunda toplumdaki antitoksin düzeyi ergenlik çağına kadar yeterli yüksekliktedir. Bu nedenle ortaya çıkan klinik olguların sayısı da o oranda düşüktür⁵.

.TANI

Difteri benzeri organizmaları, kesin difteri tanısı koyabilmek amacı ile *Corynebacterium diphtheriae* 'dan ayırabilmemiz gerekir. Bu amaç ile iki farklı yol takip edilir. Bunlar in vivo ve in vitro testlerdir³⁰.

1. In vivo testi, kobayın deri altlarına 4-5 ml. süspansiyon enjekte edilmesi ile gerçekleşir. Süspansiyonun enjekte edilmesini takiben kobaylardan birine iki saat önceden 250 ünite antitoksin verilir. Anititoksin verilmeyen kobay 2-3 günde ölürken, antitoksin verilen hayatta kalır⁷.



Şekil-4 : In vivo yöntem ile antitoksin düzeyinin ölçümü⁷

in vitro testinde ise, 20 at serumu içeren agar plağına antitoksin ile iyice dogurulmuş filtre kağıdı yerleştirilir. Şüpheli bakteriler bu filtre kağıtlarına dik olacak şekilde bloklar halinde ekilir. İnkübasyon süresi sonunda, bakterilerde toksin üretimi söz konusu ise presipitasyon zonları oluşur. Bu teste ELEK testi denir⁷.

MATERYAL VE YÖNTEM

.1-MATERYAL:

A-Besi yeri:

RPMI-1640, (Sigma Chemical Co.MO,USA)

MEM, (Sigma Chemical Co.MO,USA)

Fetal Calf Serum, (FCS, Seromed, GmbH, Germany)

56⁰C'lik su banyosunda 30 dakika tutularak inaktif duruma getirildi.

B-Cihazlar:

Santrifüj, Hermle ZK-380 (Hermle AG Germany)

Laminar Flow, (Nuair Class 2 Type A/B3)

Su Banyosu (Techne TE 8J)

Binoküler Mikroskop, (Nikon Labophot-2)

Elisa okuyucusu, (Pasteur Diagnostics, LP 400)

%5 CO₂ ve 37⁰C'lik ortam içeren etüv, (Nuair)

C- Kimyasal Maddeler

Difteri Toksini (Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Aşı Geliştirme ve Üretim Merkez'inden temin edildi.)

Difteri Antitoksini (Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Aşı Geliştirme ve Üretim Merkezinden temin edildi.)

Trypan Blue, %0.2'lik NaCl içinde. (Merck, Darmstad Germany)

Isopropyl Alcohol (Merck, Darmstad Germany)

%0.9 NaCl içeren serum fizyolojik solusyonu

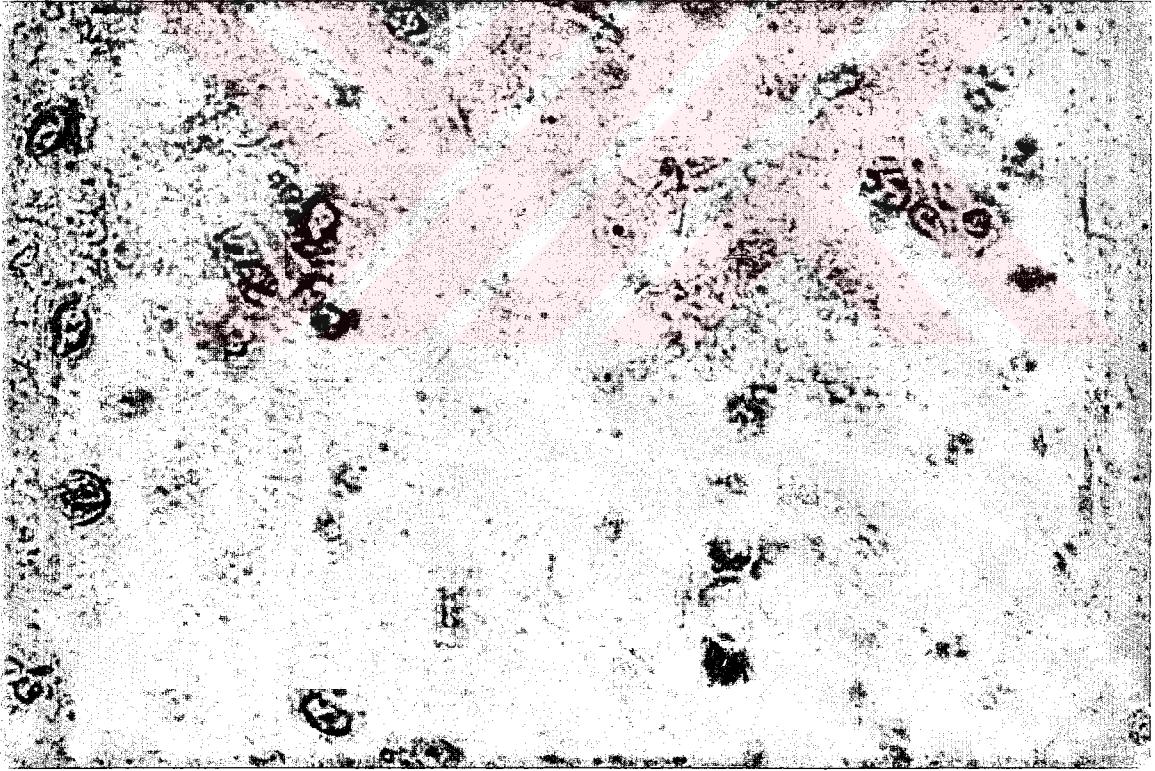
3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5diphenyl tetrazolium bromide; MTT (Sigma,M2128)

Trypsin-EDTA solusyonu (Seromed Biochrom KG, L2153)

D-Hedef Hücre

Vero (Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücresi, ATCC

CCL81)



Şekil-5 : Vero hücrelerinin MEM besiyerindeki fotoğrafı.(x400)

E-Diğer Malzemeler

Pipet (Costar)

Steril, düz tabanlı, kapaklı, 96 çukurlu mikrotitrasyon plağı (Corning, 25861, New York, U.S.A.)

15 ve 50 ml'lik polypropilen, steril, kapaklı, konik tabanlı tüpler (Greiner, Germany)

Plastik petri kabı (Greiner, Germany)

Hücre sayım lam ve lameli

75 cm²'lik hücre kültür flask'ları (Greiner, Germany)

F- ÖRNEKLER

Serumlar, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı Sağlam Çocuk Polikliniğindeki 2-5 yaşları arasındaki 6 aşıllı çocukdan alınan kanların santrifüj edilmesi ile sağlanmıştır. Bu serumlar deneyler öncesinde 56 °C 'lık su banyosunda yarım saat bekletilerek inaktive edilmiştir.

.II YÖNTEM:

A-Hedef Hücrenin Hazırlanması :

İnsan serumlarında difteri antitoksin düzeyinin saptanması amacı ile ATCC'den alınan, VERO (Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücreleri, ATCC CCL 81) hücreleri kullanıldı. Hücreler çalışma planı yapılmaya kadar özel tüpler de sıvı azot içerisinde bekletilerek saklandı. Hücre kültürü yapılmadan önce sıvı azot içerisinde çıkarılan tüpler, içeriklerinin çözülmesi amacı ile birkaç dakika 37 derecelik ortamda muhafaza edildi. Tüplerdeki içerik 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktararak üzerleri RPMI-1640 ile 15 ml.'ye tamamlandı ve 1400 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Hücreler 14 ml %5 FCS içeren RPMI-1640 ile süspanse edilerek 75 cm² 'lik hücre kültür flasklarına aktarıldı. İki günde bir besi yeri değiştirilmek koşulu ile 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı³¹.

B-Difteri Toksinin ve Antitoksinin Hazırlanması ve

Kullanılması:

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Aşı Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda elde edilen difteri toksinin 440 Lf/ml.'lik toksin dozu çok yüksek olduğundan, kullanabileceğimiz düzey olan 200 Lf/ml.'lik toksin düzeyine getirildi. Bunun için 440 Lf/ml.'lik liyofilize difteri toksini üzerine 2.2 ml. RPMI-1640 koyuldu. Böylelikle, toksinin toksin düzeyi 200 Lf/ml.'lik düzeye indirilmiş oldu. Daha sonra, 2.2 ml.'lik içerik 0.2 µ'luk filtreden geçirilerek steril edildi.

Difteri toksini ve antitoksini ile yapılan çalışmalar 4 basamaktan oluşmaktadır. Bu basamaklar sırası ile;

- 1.Difteri toksininin Vero hücresi üzerine etkisi ve aynı zamanda ham difteri toksininin dilüsyon oranının saptanması,
- 2.Difteri toksininin minimum sitotoksik doz (M.S.D) düzeyinin saptanması,

3.Hücre ölümüne engel olan standart antitoksin düzeyinin saptanması,

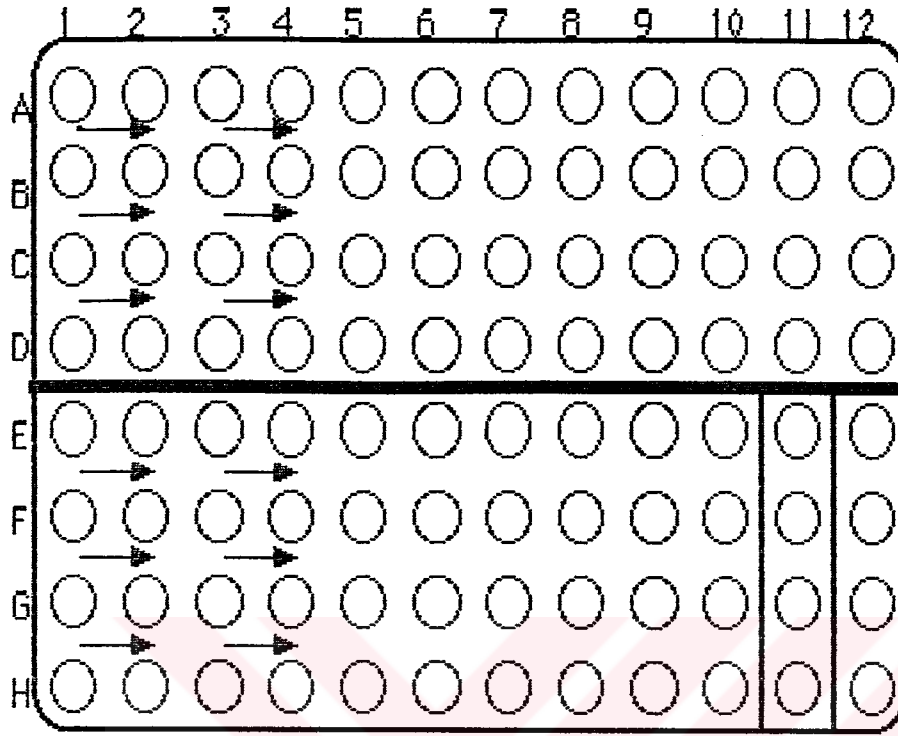
4.Hücrelerin ölümüne neden olan serum ve toksin düzeylerinin saptanması'dır.

Birinci basamakta, difteri toksinin Vero hücresi üzerine toksik etkisi araştırıldı. Bunun için 96 çukurlu düz tabanlı kapaklı, steril mikrotitrasyon plağında toksinin 1:2 oranından başlayıp 1:8388608 oranına kadarki 1/2 seri dilüsyonları RPMI-1640 kullanılarak yapılmıştır.

Dilüsyonların ayarlanması tamamlandıktan sonra kuyucuklara hücrelerin dağıtımı yapıldı. Bu aşamada, 75 cm²'lik hücre kültür flaskındaki besiyeri dökülüp flask'ın içi %0.9'luk serum fizyolojik ile yıkanarak besiyerinde bulunan iki değerlikli atomlar uzaklaştırıldı. Bu işlem sonrasında, flask yüzeyine yapışmış olan hücreleri ayırmak amacı ile flask içerisine, 1:10 oranında serum fizyolojik ile dilüe edilmiş Trypsin-EDTA solusyonundan 10 ml. eklenerek hücreler 37⁰C'lik ortamda 3-5 dakika bekletildi. Flaskın kenarlarına hafifçe vurularak zemine yapışan hücrelerin ayrılması sağlandı ³².

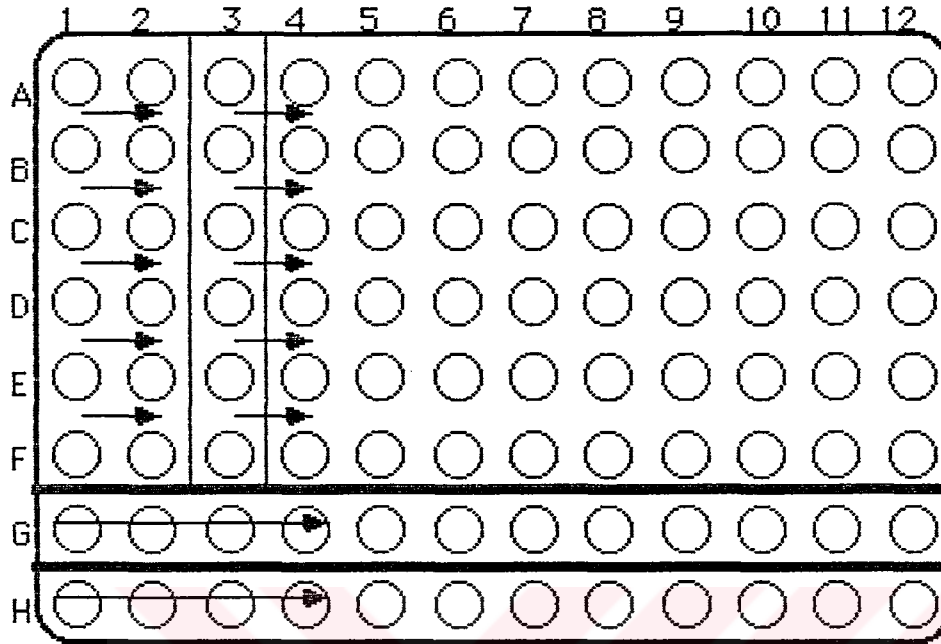
Hücre ile Trypsin-EDTA karışımı içeren süspansiyon, 50 ml.'lik tüp içerisine boşaltılarak, üzerine %0.9'luk serum fizyolojik eklendi ve 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi sonucunda hücreler Trypsin-EDTA solusyonundan temizlenmiş olur. Hücre çökeleği %10 FCS içeren RPMI-1640 ile süspansiyonu yapıldıktan sonra Thoma lamında sayılarak, hücre sayısı 2×10^5 hücre/ml. ye ayarlandı. Bu hücre süspansiyonundan 100'er μ l. tüm kuyucuklara dağıtıldı ve içerisinde toksinle beraber 200 μ l./kuyu içerik bulunduran deney plağı dört gün boyunca 37 °C ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı.

Dördüncü gün sonunda her çukura steril şartlarda 20 μ l. MTT koyularak 37 °C de 4 saatlik inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda, plak 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi ve ardından kuyucuklardaki süpernatantlar zemine yapışmış hücreleri kaldırmadan çok kanallı pipet yardımı ile alındı. Bu işlem sonrasında zaman kaybetmeden her bir çukura 200 μ l. isopropyl alkol koyularak deney seti +4°C'de 24 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda 550 nm. filtreli Elisa okuyucusunda tüm çukurlardaki optik dansite değerleri elde edildi.



Şekil-6 : Difteri toksininin sitotoksik düzeyinin saptanmasını gösteren deney seti.11 ve 12'inci sütunların E, F, G, H sıraları sırası ile Vero ve besiyeri kontrolleridir.

Birinci basamakta bulunan değer, ikinci basamaktaki deneylerde kullanılan difteri toksininin maksimum sitotoksik dozu olarak kullanıldı. Buna göre, ikinci basamakta saptanacak olan minimum sitotoksik doz (M.S.D), birinci basamakta olduğu gibi difteri toksinin 96 çukurlu, steril, kapaklı, düz tabanlı mikrotitrasyon plağında dilüsyonları yapılarak bulundu. Hücreler, birinci basamakta olduğu gibi tripsinizasyon, yıkama ve sayım işlemleri sonrasında 2×10^5 hücre/ml.'lik süspansiyondan tüm kuyucuklara 100'er μ l. dağıtıldı. Dilüsyon oranları 1:2 oranından başlayıp 1:2048'e kadar çıkartıldı.



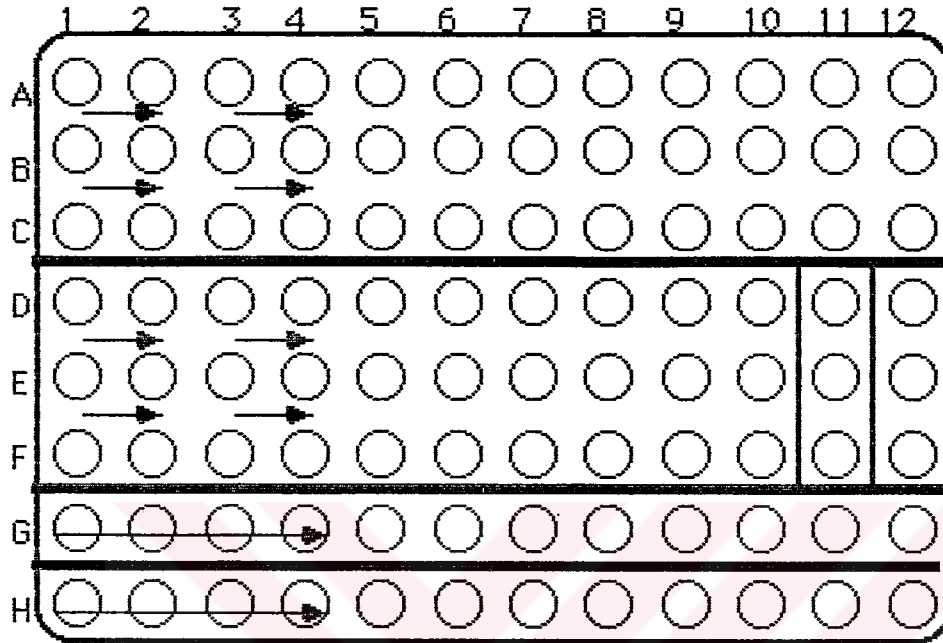
Şekil- 7 : Difteri toksininin %100 öldürme dozu olan en yüksek titrasyonun saptandığı deney seti. G sırası hücre kontrol ,H sırası toksin kontrol sıralarıdır.

Bu deney sonucunda saptanılan doz, minimum sitotoksik dozdur. Bu da kullanılan toksinin %100 ölüme neden olan maksimum titrasyondaki dozunu göstermektedir. Bu titrasyondaki doz kullanılarak standart antitoksin düzeyi saptanabilir.

Üçüncü basamakta, hücre ölümüne engel olan standart difteri antitoksin düzeyinin saptanması için toksin miktarı sabit tutularak, standart difteri antitoksininin 1:2 oranından başlayıp 1:2097152 oranına kadar 1/2 seri dilüsyonları yapıldı.

Bu aşamada deneylerin yapılabilmesi için 10^3 IU/ml.'lik standart difteri antitoksini bir gün önceden 56°C 'lik su banyosunda 30 dakika tutularak inaktif duruma getirildi. Elimizdeki 10^3 IU/ml.'lik antitoksin 1:10 dilüe edildikten sonra 0.2 μ 'luk filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Steril durumdaki standart antitoksin 1:15 dilüe edilerek kullanılabilir düzey olan 20 IU/ml.'lik düzeye getirildi. Bu 20 IU/ml.'lik standart antitoksinin 1:2 oranından 1:2097152 oranına kadarki 1/2 seri dilüsyonları hazırlanarak 96 çukurlu, steril, kapaklı mikrotitrasyon plağında dağıtımı yapıldı. Bu işlem esnasında difteri toksininin toksisite düzeyi ve kuyucuklardaki miktarı sabit tutuldu.

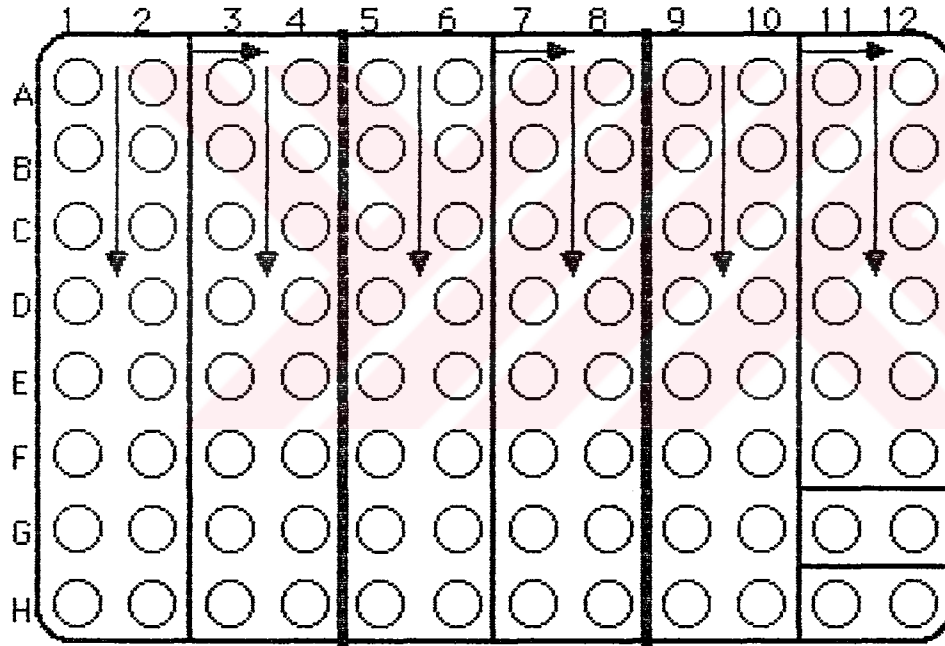
Kullanılan hücre sayısı 2×10^5 hücre/ml'de olacak şekilde ayarlanarak her kuyucuğa 100'er μ l. gelecek şekilde dağıtıldı. Böylece her kuyucuktaki toplam içerik 200 μ l oldu.



Şekil-8 :Difteri antitoksin düzeyinin saptandığı deney seti. G sırası toksin kontrol ve H sırası antitoksin kontrol sıralarıdır.11. ve 12. sütunların D, E, F, sıraları hücre ve besiyeri kontrol sıralarıdır.

Dördüncü basamakta ise, 2-5 yaş arasındaki aşılı çocukların serumlarındaki difteri antitoksin düzeyleri, standart difteri antitoksin dilüsyonları ile karşılaştırılarak değerlendirilmeye çalışıldı. Bunun için, kullanılacak serumlar ilk önce 56⁰C 'lık su banyosunda 30 dakika tutularak inaktive edildi. Daha sonra her çukura 50 µl hacimde dağıtılan difteri toksini üzerine 1:2 oranından başlayıp 1:32768 oranına kadar dilüe edilmiş serumlardan 50 µl dağıtıldı.

Bu 100 μ l'lik içeriğin üzerine 2×10^5 hücre/ml.'lik süspansiyondan 100 μ l tüm kuyucuklara dağıtıldı. Deney plakları 4 günlük inkübasyon süresince 37 $^{\circ}$ C'lik %5 CO₂ içeren etüvde muhafaza edildi.



Şekil-9 : Örneklerin difteri antitoksin düzeylerinin saptandığı deney

seti.

BULGULAR

Birinci basamakta deneyler esnasında kullanılacak difteri toksininin toksisite düzeyini tespit etmeye çalıştık. Bunun için toksin düzeyi 200 Lf/ml. olan difteri toksininin 1:2 oranından başlayıp 1:8388608 oranına kadar 1/2 seri dilüsyonları yapıldı. Bu dilüsyon oranlarındaki toksinin Vero hücreleri üzerine sitotoksik etkisi optik dansite değerleri ile ve ayrıca görsel olarak da belirlendi.

Tablo-1'de görüldüğü gibi altıncı kolonun E,F,G,H sıralarından itibaren optik dansite değerlerinde yükselme gözlenmektedir. Bu yükselme canlı kalan hücrelerin sayısındaki artışa bağlıdır. Bu artış da toksinin etkisini kaybetmeye başladığını göstermektedir. Buna göre canlı hücre sayısındaki artışın başladığı kuyucuklar altıncı kolonun E,F,G,H kuyucuklarıdır. Bu sıradan itibaren difteri toksini toksik etkisini yitirmeye başlamıştır. Her ne kadar, Dular'ın yaptığı çalışmada toksin düzeyi 0.0013671 Lf/ml. alınmış ise de maksimum sitotoksik dozun düşük değerlerde tutulması ile saptanılabilir antitoksin düzeyinin sınırı da artmaktadır³¹.

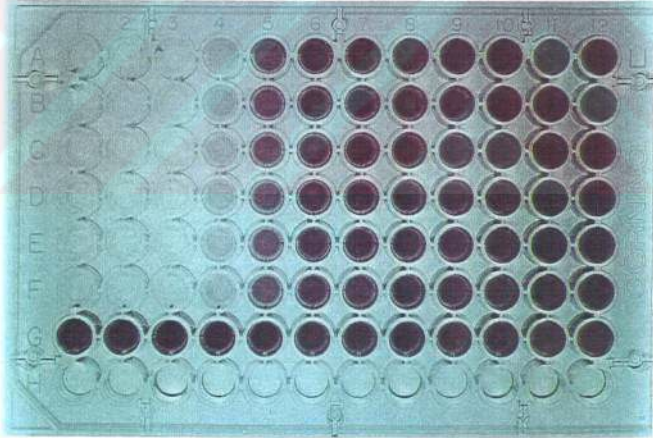
Bu yüzden toksin miktarını yedinci kolonun E, F, G, H sıralarındaki $7,629 \times 10^{-4}$ Lf/ml. 'lik toksin düzeyine yakın bir değer olan 8×10^{-4} Lf/ml.'lik düzeyi kabul ettik. Bu sıralardaki toksin düzeyi de $7,629 \times 10^{-4}$ Lf/ml. olarak saptanmıştır. Bu sonucu göz önüne alarak, bundan sonraki deneylerde kullanacağımız toksin düzeyini 8×10^{-4} Lf/ml. olarak kabul ettik.

Tablo-1: Difteri toksininin sitotoksisite düzeyinin ölçüldüğü deney setindeki değerleri göstermektedir.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
40	40	38	39	36	53	37	43	52	51	46	47
41	41	44	44	44	50	48	42	49	53	43	43
42	42	40	44	45	44	43	41	49	51	45	46
43	45	43	46	47	35	42	44	47	49	41	40
41	40	40	41	42	112	274	275	295	355	1015	1012
43	47	46	42	43	81	366	260	175	381	1171	987
41	41	51	39	39	80	286	172	260	198	1102	1018
41	40	41	38	40	179	164	181	303	383	1146	1168

İkinci basamakta ise, 2×10^5 hücre/ml.'lik hücre sayısı deney setinin her kuyucuğunda sabit tutuldu. Bu hücreler üzerine 8×10^{-4} Lf/ml.'lik difteri toksininin 1:2 oranından başlayıp 1:2048 oranına kadar olan dilüsyonları dağıtıldı.

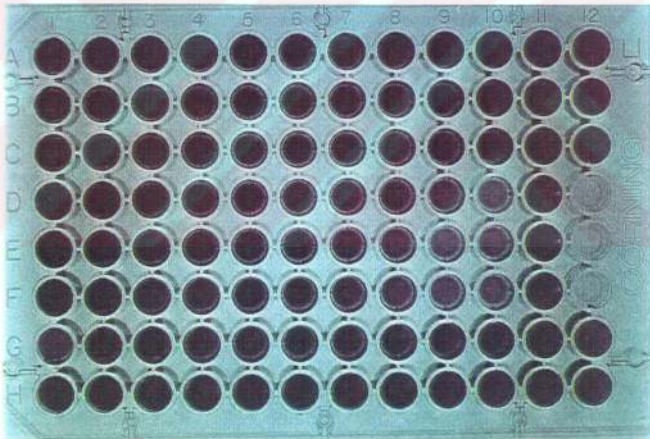
Bu işlem sonucunda minimum öldürme dozu (M.C.D) olarak adlandırılan, kuyucuklardaki hücrelerin %100 ölümünün görüldüğü en yüksek dilüsyon oranındaki toksinin düzeyi bulundu. Bu toksin düzeyi, 8×10^{-4} Lf/ml.'lik toksinin 1:4 oranındaki dilüsyonu sonucu bulunan değerdir. Bu toksin değer 2×10^{-4} Lf/ml.'dir. (Şekil-7-10)



Şekil-10 : % 100 ölüme neden olan en düşük dilüsyondaki difteri toksininin düzeyi. Üç numaralı kolondaki A,B,C,D,E,F sıraları %100 ölümün görüldüğü kuyucuklardır. Plaktaki G sırası Vero hücre kontrolünü, H sırası da toksin kontrolünü göstermektedir.

Üçüncü basamakta ise, difteri toksininin minimum öldürme dozu sabit tutularak standart antitoksinin 1:2 oranından başlayıp 1:2097152 oranına kadar 1/2 seri dilüsyonları yapıldı.

Bağılılıkla standart antitoksinin 2×10^{-4} Lf/ml.'lik M.C.D değeri karşısında etkisini kaybettiği ilk doz saptanmaya çalışıldı. Sonuçta, dokuz numaralı kolonun D,E,F kuyucuklarında bulunan standart antitoksinin değeri 0.00976525 IU/ml. olarak saptandı.(Şekil-11)



Şekil-11 : Standart antitoksinin kullanılabilecek düzeyinin saptandığı deney plağı. Plakta 11. kolon'un D,E,F sıraları Yere hücre kontrolünü, 12. kolon'un D,E,F sıraları toksin kontrolünü göstermektedir. G sırası antitoksinin hücre üzerine etkisinin olmadığını göstermektedir.

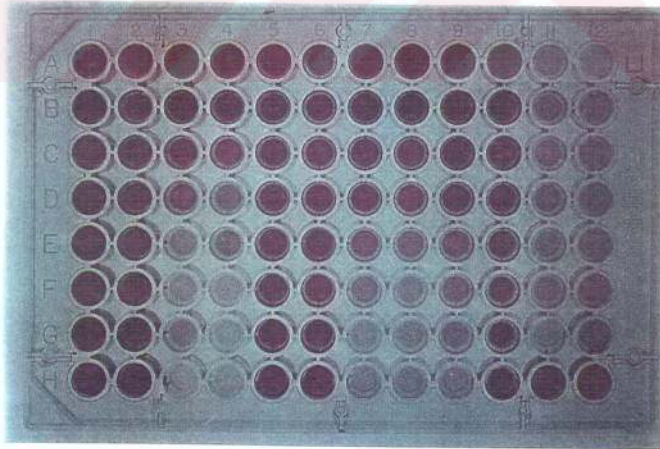
Tüm bu hazırlık basamaklarının ardından 2-5 yaş arasındaki aşıllı çocukların serumlarındaki difteri antitoksin düzeyi standart antitoksin değerleri ile karşılaştırılarak, aşılama sonrası serumlardaki antitoksin düzeyleri değerlendirildi.

Buna göre Tablo-2'de birinci ve ikinci serum örneklerinin toksin ile etkileşimi sonrasında alınan optik dansite değerleri görülmektedir. Tablolarda aynı şekilde işaretlenmiş olan bölgeler standart antitoksin düzeyleri ile serumlardaki antitoksin düzeylerinin yakın olduğu bölgeleri göstermektedir. Bu işaretli bölgelerdeki antitoksin değerleri standart antitoksin miktarının dilüsyon faktörüne bölünmesi ile bulunur. Buna göre, dilüe edilmemiş örneklerin total antitoksin düzeyi işaretli bölgedeki antitoksin düzeyi ile örneğin dilüsyon faktörünün çarpımına eşittir.

Tablo-2 : Örneklerin ve standart antitoksinin optik dansite değerleri.

Tablo'da benzer işaretli bölgeler karşılaştırılacak optik dansite değerlerini göstermektedir.

	ÖRNEK-1		ÖRNEK-2		STANDART ATX	
A	1.404	1.881	1.599	1.920	2.040	.452
B	1.562	1.470	1.389	1.645	2.019	.432
C	1.384	.976	1.202	1.218	1.755	.430
D	1.407	.633	1.178	.984	1.071	.406
E	1.622	.581	1.267	.844	.843	.400
F	1.941	.336	1.319	.479	.607	.390
G	1.910	.339	1.519	.344	.524	DTX kor 463
H	1.573	.250	1.419	.347	.440	Vero kor 1.536

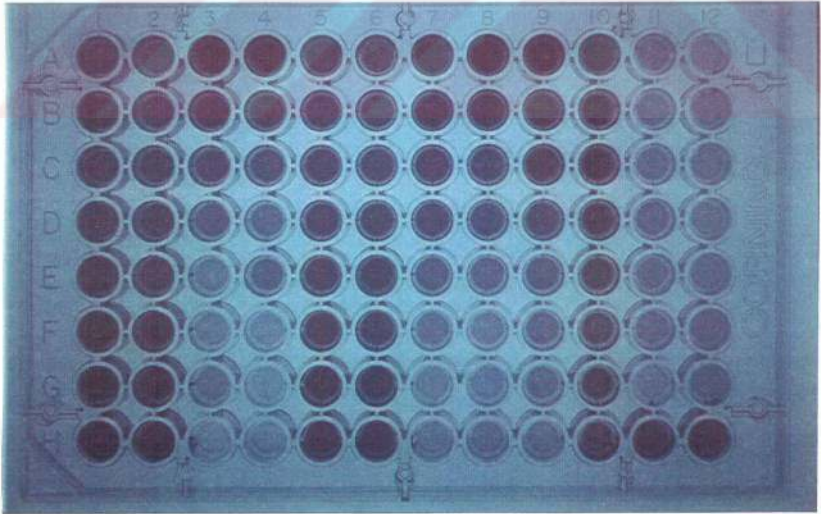


Şekil-12 : Örnek bir ve iki'nin deney seti.

Tablo-3 : Örnek üç ve dört'ün optik dansite değerlerini göstermektedir.

İşaretili bölgeler karşılaştırılacak optik dansite değerlerini göstermektedir.

	ÖRNEK-3		ÖRNEK-4		STANDART ATX	
A	1.495	.808	1.768	1.270	1.263	.252
B	1.157	.446	1.521	1.231	1.333	.206
C	1.171		1.411	1.167	1.292	.209
D	1.335	.193	1.280			.187
E	1.227	.146	1.170	.440	.342	.169
F	1.281	.145	1.360	.217		.199
G	1.212	.140	1.300	.236	.239	DTX kon. .141
H	1.097	.140	1.280	.255	.292	Vers 2 kon. 1.228



Şekil-13: Üç ve dört numaralı örneklerin bulunduğu deney seti.

Tablo- 4 : Örnek beş ve altı'nın optik dansite değerlerini göstermektedir.

İşaretti bölgeler standart antitoksin ile karşılaştırılacak bölgeleri göstermektedir.

	ÖRNEK-5		ÖRNEK-6		STANDART ATX	
A	1.620	1.005	1.523	1.218	1.091	.226
B	1.212	.425	1.231	1.421	1.414	.216
C	1.134	.209	1.361	1.147	1.208	.224
D	1.152	.199	1.146	.772	.755	.249
E	1.189	.153	1.214	.438	.457	.217
F	1.202	.138	1.322	.214	.425	.238
G	1.034	.141	1.389	.243	.335	DTX kon. .137
H	1.072	.140	1.533	.231	.219	VERO ko 1.724

Buna göre, Tablo-5'de örneklerin antitoksin değerleri gösterilmektedir.

Tablo-5 : Örneklerin IU/ml. birimine göre antitoksin değerleri.

ÖRNEK :	1	2	3	4	5	6
ANTİTOKSİN DÜZEYİ (IU/ml.)	1.28	2.56	0.32	2.56	0.16	0.16

TARTIŞMA

Difteri hastalığı, tedaviye yönelik önlemler alınmadığı takdirde ölümcül olabilen önemli bir çocuk hastalığıdır. Difteri hastalığı esas olarak difteri toksininin etkileri ile oluşmaktadır². Difteri toksini, basille lizojenik etkide bulunan β -corynebakteriyofaj isimli çift iplikli DNA fajından oluşur¹⁰.

Toksine karşı içlerinde difteri antitoksini bulunan bağışık serumlar kullanılır. Bu yüzden hastalığa karşı dirençte kanda ve dokuda bulunan antitoksin büyük önem taşımaktadır⁵. Difteride antitoksin uygulamasına erken başlamanın önemi büyüktür. Çünkü, toksin bir kez hücre reseptörlerine yapışır ise onu oradan ayırmak olanaksızdır¹.

O halde, özellikle aşılama sonrası yeni doğanların ve erişkinlerin toksine karşı durumlarını ortaya çıkararak onların difteriye karşı eğilim ve direnç derecelerinin saptanması büyük bir önem taşımaktadır¹.

Etkin bir aşının varlığından dolayı, difteri toksini bakteriyel toksinler arasında en rahat çalışılabilecek toksin olmasının yanında, toksinlerin ökaryotik hücrelerin sitoplazmasına giriş yollarınında araştırılabileceği model bir toksindir¹⁴.

Günümüzde insan serumlarındaki difteri antitoksin düzeyinin ölçülebildiği birden fazla yöntem mevcuttur. Ancak aralarında sadece ELISA ve toksin antitoksin düzeylerinin ölçüldüğü hücresel metod veya in vitro nötralizasyon metodu sıklıkla kullanılmaktadır. Günümüzde in vitro nötralizasyon testi bir tarama testinden çok aşı üretim ve standardizasyonunda kullanılmaktadır³³.

Bu konuda yapılan çalışmalarda Miyamura ve arkadaşları hücresel metodu, tavşan deri testi ile karşılaştırmışlar ve hücresel metodun tavşan deri testine göre daha ekonomik ve daha kullanışlı olduğu saptanmıştır³³.

Aggerbeck ve Heronun yaptıkları çalışmada fenol kırmızısına bağlı olarak sonuç almışlar ve hatta bu sonuçlar ile istatistiksel bir Vero programı da geliştirmişlerdir. Böylelikle fark edilmeyecek olan renk nüanslarının yarattığı dezavantajı ortadan kaldırmışlardır. Ayrıca bu yöntemin ELISA kadar duyarlı bir metod olduğunu belirtmişlerdir⁶.

Gupta ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da Vero hücresel metodunun etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmalarında, Vero hücrelerine karşı kullandıkları toksinin minimum sitotoksik dozu bizim çalışmamızdaki 4×10^{-4} Lf/ml.'lik değer ile benzerlik göstermektedir³⁴. Ancak, Miyamura ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kullanılan toksinin toksisite düzeyinin zaman içinde değiştiğini saptamışlardır. Buna göre, taze hazırlanmış toksinin minimum sitotoksik dozu bekletilmiş toksinlere göre daha yüksek olmaktadır²⁸.

Yine Gupta ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada difteri toksinine karşı kullandıkları antitoksinin düzeyi bizim çalışmamızda bulduğumuz 0.00976525 IU/ml.'lik değere çok yakındır. Gupta ve ark.'larının buldukları değer 0.001 IU/ml. dir³⁴. Antitoksin dozu olarak, Miyamura ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kullanılan doz da bizim çalışmamızdaki ile benzer değerleri göstermektedir³³.

Dular, yaptığı çalışmada in vivo nötralizasyon testi ile in vitro nötralizasyon testini karşılaştırmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, in vitro nötralizasyon testinde saptanılabilcek en küçük değer 0.3 IU/ml. olduğu belirtilmiştir. In vivo nötralizasyon testinde saptanılabilcek en küçük değer ise 2.0 IU/ml. olduğu belirtilmiştir³⁰.

İn vitro nötralizasyon testinde, serumlardaki en düşük antitoksin değerini saptayabilmek için kullanılacak minimum sitotoksik dozun düşürülmesi gerektiği veya kuyucuk başına düşen serum hacminin artırılması gerektiği Miyamura ve arkadaşlarının belirtilmiştir. Ayrıca, in vitro nötralizasyon deneyinde toksin ve antitoksin dilüsyonlarının ayrı bir plakta yapılması tavsiye edilmektedir. Çünkü, tek bir plakta yapılan dilüsyonlar düz tabanlı plağın tabanına zarar verebilmekte bu da hücrelerin zemine yapışıp yayılmasına etki edebilmektedir²⁸.

Gelişmiş ülkelerde, çocuklar rutin olarak difteriye karşı aşılandıklarından bu hastalık toplum sağlığı açısından büyük bir tehlike oluşturmamaktadır. Aşı, difteri toksininin toksoid versiyonudur ve Difteri-Boğmaca-Tetanoz üçlü aşı ile beraber verilir. Periyodik rapeller yapılarak uzun süreli immünite kazandırılmaktadır⁵. Son zamanlarda bu üçlü aşıya Hepatit-B aşısını ekleme yönünde çalışmalar yapılmaktadır³⁵. Bütün bunlara karşın, dünyamızda ekonomik nedenlerden dolayı rutin aşılamaların yapılamadığı bir çok ülke mevcuttur. Bu ülkelerde difteri, yeni doğanlarda ve çocuklarda ölümcül bir hastalık olma özelliğini korumaktadır¹.

Difteri antitoksin düzeyinin ölçümünde hücresel bioassay yöntemi, ELISA kadar duyarlı bir testdir. Ancak, ELISA kadar IgG antikoruna özgül olacak şekilde duyarlı sonuçlar verememektedir. Ayrıca hücresel bioassay yöntemi, teknik açıdan yüksek düzeyde laboratuvar şartlarının bulunduğu merkezlerde yapılabilir. Bu da, bioassay yöntemini tarama testi olmaktan uzaklaştırmaktadır. Bütün bunlara rağmen Vero hücreleri ile difteri toksin ve antitoksin düzeylerinin saptanması aşı üretim standardizasyon merkezlerinde sıklıkla tercih edilmektedir.

REFERANSLAR

1. HAKKI, Bilgehan; Klinik Mikrobiyoloji, 9. Basım, 311, Barış Yayınevi, İzmir, Eylül (1995)
2. JAWETZ, E. , MELNICK, J. , ADELBERG, E. , BROOKS, G. , BUTEL, J. , ORNSTON, L. ; Medical Microbiology, Appleton-Lange Inc., 639, 18th Ed. , Middle East Edition, Los Altos, California,(1989).
3. NELSON, W. ; Textbook of Pediatrics, 1356, 8th Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, London,(1964).
4. GALAZKA, A.; The Immunological Basis for Immunization, Diphtheria, World Health Organization, Geneva, (1993).
5. BAŞKAN, S. , BULUT, B. ; Bağışıklama El Kitabı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pasteur Merieux, 38, Ankara, (1996).
6. AGGERBECK, H. , HERON, I. ; Improvement of a Vero Cell Assay to Determine Diphtheria Antitoxin Content in Sera, Biologicals, 19 , 71-76,(1991).

7. KONEMAN, E. , ALLEN, S. , JANDA, W. , SCHRECKENBERGER, P. , WINN, W.Jr. ; Diagnostic Microbiology , 4th Ed., 492, J.B. Lippincott Company, Philadelphia ,(1992).

8. ISENBERG, H. ; Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol.1,1.1.20, American Society for Microbiology Washington D.C., (1992).

9. KILIÇTURGAY, K. , GÖKIRMAK, F. , TÖRE, O. , GEDİKOĞLU, S. GÖRAC, G. , HELVACI, S. ; Klinik Mikrobiyoloji, 2.Basım, 44, Bursa Güneş ve Nobel Kitapevi, Bursa, (1994).

10. JOKLIK, W. , WILLETT, H. , AMOS, B. , WILFERT, C. ; Zinsser Microbiology , 19th Ed. ,1367, Appleton-Lange , California ,(1988).

11. BARON, E. , PETERSON, L. , FINEGOLD, S. ; Diagnostic Microbiology,9th Ed. , 220-462, Year-Book, Inc. , Toronto,(1994).

12. ABIGAIL, A. , SALYERS, W. , DIXIE, W. ; Bacterial Pathogenesis, A molecular Approach, 1st Ed., 113, ASM Press, Washington D.C., (1993).

13. CHOE, S., BENNETT, M., FUJII, G., CURMI, P. , KATHERINE, K., EISENBERG, D., COLLIER, J. ; The Crystal Structure of Diphtheria Toxin , Nature , 357 , 216-222,(1992).

14. SHIER, T., MEBS, D.; Handbook Of Toxicology, 290, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, (1990).

15. BARBIERI, J., COLLINS, C., COLLIER, J. ; Diphtheria Toxin can Simultaneously Bind to Its Receptor and Adenylyl-(3',5')-Uridine 3'-Monophosphate, Biochemistry, 25, 6608-6611, (1986).

16. JOHNSON, V., NICHOLLS, P., HABIG, W., YOULE, R. ; The Role of Proline 345 in Diphtheria Toxin Translocation, J.Biol.Chem., 268, 3514-3519, (1993).

17. FALNES, P., CHOE, S., MADSHUS, I., WILSON, B., OLSNES, S. ; Inhibition of Membrane Translocation of Diphtheria Toxin A-Fragment By Internal Disulfide Bridges, J. Biol. Chem., 269, 8402-8407, (1984).

18. DRAZIN, R., KANDEL, J., COLLIER, R. ; Structure and Activity of Diphtheria Toxin, J.Biol.Chem., 246, 1504-1510, (1971).

19. EIDELS, L., ALMOND, B. ; The Cytoplasmic Domain of the Diphtheria Toxin Receptor (HB-EGF Precursor) is not Required for Receptor Mediated Endocytosis, J.Biol.Chem., 261, 1562-1569, (1986).

20. LONDON, E. ; How Bacterial Protein Toxins Enter Cells:The Role of Partial Unfolding in Membrane Translocation, 6, 3277-3282, (1992).

21. BLEWITT, M., CHUNG, L., LONDON, E. ; Effect of pH on the Conformation of Diphtheria Toxin and Its Implications for Membrane Penetration , Biochemistry , 24 , 5458-5464, (1985).

22. GÖZÜKARA, E. ; Biyokimya, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi , Malatya, (1989).

23. OLSNES, S., SANDVIG, K. , Interactions Between Diphtheria Toxin Entry and Anion Transport in Vero Cells , J.Biol.Chem. , 261 , 1553-1561,(1986).

24. SCHAEFER, E., MOEHRING, J., MOEHRING, T. ; Binding of Diphtheria Toxin to CHO-K1 and Vero Cells is Dependent on Cell Density , J.Cell.Physiol, 135, 407-415, (1988).

25. JOHNSON, V., NICHOLLS, P. ; Histidine-21 does not Play a Major Role in Diphtheria Toxin Catalysis , J.Biol.Chem. , 269, 4349-4354, (1994).

26. OLSNES, S., CARVAJAL, E., SANDVIG, K. ; Interactions Between Diphtheria Toxin Entry and Anion Transport in Vero Cells , J.Biol.Chem. , 261, 1561-1569, (1986).

27. STITES, D., TERR, A. ; Basic and Clinical Immunology , 7th Ed. , 181, Appleton-Lange , California , (1991).

28. MIYAMURA, K. , SHIGEKU, N. , ITO, A. , MURATA, R. , KONO, R. ; Microcell Culture Method for Determination of Diphtheria Toxin and Antitoxin Titres Using Vero Cells, J.Biol.Stand., 2, 189-201, (1974).

29. DIPHTHERI ELISA , for detection of IgG antitoxin antibodies in human serum , GENZYME VIROTECH GmbH.

30. DULAR, U.; Comparative Studies of the In Vivo Toxin Neutralization and the In Vitro Vero Cell Assay Methods For Use in Potency Testing of Diphtheria Component in Combined Vaccines/Toxoids, Biologicals, 21, 53-59, (1993)

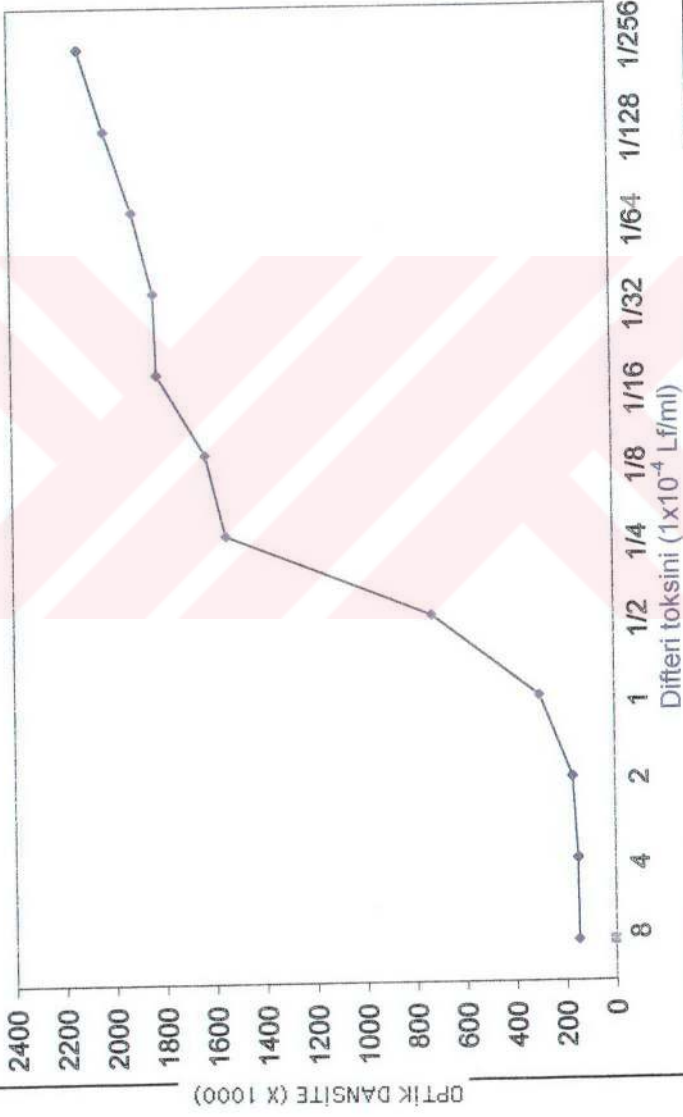
31. SLADOWSCOLIGAN, J., KRUISBEEK, A., MARGULIES, D., SHEVACH, E., STROBER, W. ; Current Protocols In Immunology, Vol-2, A.3.15, John Willey and Sons, Inc., U.S.A., (1991).

32. SIGMA BIOSCIENCES CELL CULTURE 1997 CATALOGUE
and PRICE LIST;Technical Information;203;1997

33. MIYAMURA, K., TAJIRI, E., ITO, A., MURATA, R., KONO, R.;
Microcell Culture Method For Detenmination of Diphtheria Toxin and
Antitoxin Titres Using Vero Cells, J.Biol.Stand., 2 , 203-209, (1974).
FUNKE, G., GRAEVENITZ, A., CLARRIDGE, J.III, BERNARD,K.; Clinical
Microbiology of Coryneform Bacteria, Clin.Microb.Reviews, 10,
125-159, (1997).

34. GUPTA, R., HIGHAM, S., GUPTA, C., ROST, B., SIBER, G. ;
Suitability of the Vero Cell Method for Titration of Diphtheria
Antitoxin in the United States Potency Test for Diphtheria Toxoid,
Biologicals, 22, 65-72, (1994).

35. DELGADO, J., LORENTE, M., LOPEZ, T., VANDEPAPELIERE,
P., GONZALEZ, A. ; Assessment of the Safety and Immunogenecity of
Combined Tetravalent Diphtheria, Tetanus, Whole-Cell B.Pertusis,
Hepatitis B Vaccine (DTPwHBV) Compared With Diphtheria, Tetanus,
Whole-Cell B.Pertusis Vaccine (DTPw) in Infants, SmithKline
Beecham Biologicals, SmithKline Beecham, Madrid, Spain, (1996).



TABLO (Ek): Minimum sitotoksik doz tespitinde azalan toksin düzeyine

karşılık artış gösteren optik dansite değerleri canlı hücre sayısı hakkında

fikir vermektedir.

ÖZET

Difteri toksini tek bir polipeptid zinciri olarak salgılanır. 'A' ve 'B' zinciri olmak üzere iki zincire sahiptir. 'A' zinciri toksinin enzimatik kısmını içerirken 'B' zinciri toksinin bağlanma bölgesini içerir.

Difteri toksini ökaryotik hücrelerde protein sentezini inhibe ederek etki gösterir. Difteri toksininin 'A' fragmanı ökaryotik hücrelerde bir enzim gibi hareket ederek NAD^+ ve zincir uzatma faktörü EF-2 arasında inaktif bir ADP-Riboz-EF-2 kompleksi oluşturmakta ve bu olay translokasyonu engelleyerek hücrelerde protein sentezini inhibe etmektedir.

Günümüzde difteri toksini aşısı üretiminde ve standardizasyonunda kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden bir tanesi de in vitro nötralizasyon testidir. Bu test, kültür ortamındaki Vero hücrelerinin metabolik aktivitesinin difteri toksinince inhibe edilmesine ve serumlardaki antitoksinin toksin etkisini nötralize etmesi olayına dayanmaktadır.

Biz araştırmamızda in vitro nötralizasyon yöntemini 2-5 yaş arasındaki aşıllı 6 çocuğun serumlarındaki antitoksin miktarına göre canlı hücre miktarını MTT maddesi kullanarak spektrofotometrik sonuçlar yardımı ile saptamaya çalıştık.

Araştırmamızın ilk basamağında, kullandığımız toksinin minimum sitotoksik dozunu bulmaya çalıştık. Birinci aşamada toksinin %100 öldürme dozunu 4×10^{-4} Lf/ml. olarak saptadık. İkinci aşamada ise %100 öldürme dozundaki toksini nötralize eden standart antitoksin düzeyi bulundu. Kullandığımız antitoksinin düzeyi 0.00976525 IU/ml. olarak saptandı. Üçüncü aşamada ise, 2-5 yaşları arasında bulunan 6 aşılı çocuğun serumlarındaki antitoksin düzeyleri saptandı. Buna göre, örneklerin antitoksin düzeyleri sırası ile 1.28, 2.56, 0.32, 2.56, 0.16, 0.16 IU/ml. olarak saptandı.

SUMMARY

Diphtheria toxin is secreted as a single peptide and then cleaved to an A chain and B chain. The A chain contains the enzymatic site and the B chain contains the translocation and binding sites of the toxin.

Diphtheria toxin expresses its toxicity by inhibiting eukaryotic cellular protein synthesis. The inhibition results from inactivation of a cytoplasmic enzyme required for protein synthesis, elongation factor 2. The A chain of diphtheria toxin is a transferase which links the ADP-ribose portion of NAD^+ to elongation factor 2, ADP-ribosylated elongation factor 2 is inactivate at protein synthesis.

Nowadays, diphtheria toxin is used in vaccine production and standardisation. In this event, one of the method that is used is in vitro neutralization test. This test depends on neutralizing the toxin's effect on Vero cells by using serum that contains antitoxin.

In our investigation, we used MTT in Vero cell assay which is based on the conversion of the yellow tetrazolium salt to the coloured formazan product by mitochondrial enzymes in viable cells. The concentration of the coloured product can be measured spectrophotometrically and is proportional to the number of viable cells according to the amount of the antitoxin amounts in serum samples.

In the first step of our investigation we tried to fix the minimum cytotoxic dose of diphtheria toxin. In this step, we found 100% lethal dose effect of toxin as 4×10^{-4} Lf/ml. In the second step, we found the amount of antitoxin that is neutralized the 100% lethal dose effect of toxin. So, the amount of antitoxin which we used is 0.00976525 IU/ml. In the third step, we found the amount of antitoxin at the serum samples as 1.28IU/ml., 2.56IU/ml., 0.32IU/ml., 2.56IU/ml., 0.16IU/ml., 0.16IU/ml. in order.

ÖZGEÇMİŞ

Ankara 1973 doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi T.E.D. Ankara Kolejinde tamamladım. 1991 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde eğitimime başladım ve 1995 yılında bu bölümden mezun oldum. Mezun olduktan sonra aynı yıl, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı İmmünoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimine başladım.