

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***LEISHMANIA TROPICA* PARAZİTLERİNDEN ELDE EDİLEN İMMÜNOJEN
MOLEKÜLLERE KARŞI TANIDA KULLANILMAK ÜZERE HİBRİDOMA
TEKNOLOJİSİNE DAYALI ANTİKOR ÜRETİLMESİ**

ASLI PINAR ZORBA

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

**DANIŞMAN
PROF. DR. ADİL ALLAHVERDİYEV
EŞ DANIŞMAN
DR. EMRAH ŞEFİK ABAMOR**

İSTANBUL, 2015

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEİSHMANİA TROPİCA PARAZİTLERİNDEN ELDE EDİLEN İMMÜNOJEN
MOLEKÜLLERE KARŞI TANIDA KULLANILMAK ÜZERE HİBRİDOMA
TEKNOLOJİSİNE DAYALI ANTİKOR ÜRETİLMESİ

Aslı Pınar Zorba tarafından hazırlanan tez çalışması 16.12.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ

Acıbadem Üniversitesi

Prof. Dr. Yaşar Ali Öner

İstanbul Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Sanayi Bakanlığı Tez Projeleri (SAN-TEZ) Koordinat6rl6ę6 tarafından 0254.STZ.2013-2 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması yolculuğum boyunca bilim dünyasına adım atmamı sağlayan, laboratuvarının kapısını açan ve engin bilgi ve tecrübelerini bir gün olsun esirgemeyen, enerjisiyle bizi ayakta tutan değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV'e, bir anne şevkiyle her zaman varlığını yanımda hissettiğim Değerli Hocam Yrd. Doç. Dr. Melahat Bağirova'ya, motivasyonumuzu sürekli destekleyen iyi kalpli Değerli Hocam Arş.Gör.Dr. Emrah Şefik Abamor'a, Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği'neki tüm arkadaşlarıma, özellikle Gülnaz Yıldırım, Özlem Ayşe Özyılmaz'a ve Bengü Ergenoğlu'na teşekkür ederim. Engin tecrübeleriyle bilim hayatıma örnek olmuş Olga Nehir Öztel'e, Serap Yeşilkır Baydar'a, Necati Fındıklı'ya, Serkan Yaman'a, Melike Ersöz'e, Hilal Toptaş'a desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim.

İlkokul öğretmenim Mahmut Kılınç başta olmak üzere, Ankara Kocatepe Mimar Kemal Lisesi ve Üçler çatısı altındaki tüm saygıdeğer hocalarıma minnettarım. Temel bilimler eğitimi İstanbul Üniversitesi'deki tüm değerli hocalarıma ve asistan hocalarıma sevgi ve saygıyla birlikte teşekkürü bir borç bilirim. Yıldız Teknik Üniversitesi Değerli Bölüm Başkanı'mız Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK başta olmak üzere Sayın Rektörümüz Prof. Dr. İsmail Yüksek'e ve Değerli Enstitü Müdürümüz Prof. Dr. İsmail Küçük'e ve bu ailenin parçası olan tüm biyomühendislikteki değerli hocalarıma teşekkür ederken; bölümümü kurarak bilimin gelişmesine sayısız katkıda bulunan Prof. Dr. Mustafa AKDESTE ve Prof. Dr. Huriye Kuzu'ya Allah'tan rahmet diliyorum.

Aynı yollarda omuz omuza yürüdüğüm Damla Aksoy, Oğuz Yılmaz, Arzu Erdem, Gözde Alagöz, Simge Uslu, Narin Cansever, Tuba Çalınur, Güven Merç, Sezgin Oğuz ve ailelerine; ayrıca sabrı ve tecrübesiyle yanımda olan Alptekin Kısasöz'e yürekten teşekkür ederim iyi ki varsınız.

0254.STZ.2013-2 no'lu SAN-TEZ projesi kapsamında tez çalışmamı maddi olarak destekleyen Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı'na ve ilgili birimlerine desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

"Eğer bir gün sözlerim bilim ile ters düşerse bilimi seçin." sözüyle yolumu aydınlatan Mustafa Kemal Atatürk'e binlerce kere rahmet diliyorum.

Yukarılardan beni izlediğine inandığım biricik dedelerim ve ananeme, hayatta olan değerli babanneme ve akrabalarıma desteklerinden ötürü teşekkür ederim. Karşılıksız sevgi ve güvenlerini bir gün olsun esirgemeyen, onların kızı olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim canım ailem Nuray Zorba'ya, Osman Zorba'ya ve cantanem birtanem kardeşim Ezgi Ecem Zorba'ya ne kadar teşekkür etsem azdır. İyi ki varsınız.

Aralık, 2015

Aslı Pınar ZORBA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ixx
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xix
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	5
1.3 Hipotez.....	6
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	8
2.1 Leishmaniasis.....	8
2.2 Leishmania'nın yaşam döngüsü.....	8
2.2.1 Promastigot Formu	10
2.2.2 Amastigot Formu	10
2.3 Leishmaniasis hastalığının formları	11
2.3.1 Visseral Leishmaniasis (Kala azar):	13
2.3.2 Mukokütanöz Leishmaniasis	13
2.3.3 Kütanöz Leishmaniasis	13
2.4 Kütanöz Leishmaniasisin Epidemiyolojisi	14
2.5 Hastalığın Tedavisi ve Kliniği.....	16
2.6 Leishmaniasisin İmmünitesi.....	17
2.6.1 İmmün Sistem	17
2.6.1.1 Doğal İmmünite.....	18
2.6.1.2 Adaptif immünite	18
2.7 Antikorlar (İmmünoglobulinler).....	19
2.7.1 Antikorların Yapısı	19
2.7.2 Antikor İzotipleri ve Fonksiyonlar	20

2.8 İmmün Sistemin Leishmaniasisteki Rolü ve Leishmaniasise Karşı İmmün Cevap	21
2.9 Leishmaniasis'in Laboratuvar Tanısında Kullanılan Yöntemler	23
2.9.1 Mikroskopik Tanı yöntemleri	23
2.9.2 Kültür Yöntemleri	23
2.9.3 Molekül Yöntemler	25
2.9.4 Serolojik Yöntemler	25
2.10 Poliklonal Antikor Teknolojisi	26
2.10.1 Poliklonal Antikorların Monoklonal Antikorlar ile Kıyaslanması..	27
2.10.2 Hibridoma Teknolojisi	27
2.10.2.1 İmmünizasyon İçin Seçilen Hayvanların Özellikleri.....	28
2.10.2.2 Füzyon Çalışmalarında Kullanılacak Hücrelerin Özellikleri	28
2.11 Adjuvanlar.....	29
2.11.1 Freund's Adjuvanı.....	30
2.11.2 Polioksidanyum Adjuvanı	30
2.12 Leishmaniasiste Hibridoma Çalışmaları	31
BÖLÜM 3	
DENEYSEL ÇALIŞMALAR	35
3.1 Materyal	35
3.1.1 Ekipman.....	35
3.1.2 Kimyasallar	37
3.1.3 Deneylerde Kullanılan Tampon, Kültür Ortamları ve Kimyasalların Hazırlanışı.....	39
3.1.3.1 Tamponlar	39
3.1.3.2 Besiyerleri	40
3.1.4 Deneylerde Kullanılan Deney Hayvanları.....	41
3.1.5 Deneyde Kullanılan Hücreler	41
3.1.5.1 Myeloma Hücre Hattı	41
3.1.5.2 Antikor üreten lenfosit hücreleri	41
3.1.5.3 Besleyici tabaka olarak fare periton makrofajları.....	41
3.1.5.4 J774 makrofaj hücre hattı	41
3.1.5.5 Antijen Eldesinde Kullanılan Leishmania oarazitleri	41
3.2 Metot.....	41
3.2.1 <i>Leishmania tropica</i> 'nın Kriyobanktan Çıkartılması, Kültürünün Yapılması ve Devamlı Kültürünün Elde Edilmesi	42
3.2.2 2 Parazitlerin Kriyoprezervasyonu	45
3.2.3 <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Büyük Ölçekli Kültürünün Yapılması.....	45
3.2.4 <i>L. tropica</i> Tüm Antijenlerinin Hazırlanması.....	45
3.3 Farelerin İmmünizasyonu	46
3.4 Antikor Seviyelerinin Belirlenmesi	47
3.5 Antikor Yanıtı Alınan Farelerin Sakrifikasyonu, Dalak Hücrelerinin İzolasyonu, Myeloma Hücreleri İle Füzyonunun Gerçekleştirilmesi	49

3.6	Makrofaj Hücre Hattının Kültüre Edildiği Medyumun Pasaj Zamanı Toplanması, Santrifüj Edilmesi ve Filtre Edilmesi Sonucu Besleyici Olarak Kullanılması	50
3.7	Periton Makrofajının Alınması	50
3.8	Dalak Hücrelerinin Hazırlanması	51
3.9	Myeloma hücrelerinin hazırlanması	52
3.10	Dalak ve Myeloma Hücrelerinin Sayımlarının Yapılması	53
3.11	Füzyon	54
3.12	Oluşan Hibridoma Hücrelerinin Ürettiği Antikorların Seviyelerinin Tayini.....	55
3.13	Yüksek Antikor Yanıtı Alınan Hibridoma Hücrelerinden Poliklonal Antikorların Elde Edilebilmesi İçin Alt Klonlama İşlemlerinin Gerçekleştirilmesi.....	55
3.13.1	Yöntem	55
3.13.2	Yöntem	56
3.14	Hibridoma Hücrelerinin Kriyoprezervasyonu	56
BÖLÜM 4		
DENEYSEL SONUÇLAR		58
4.1	İmmünizasyon Sonuçları	58
4.2	Füzyon Sonrası Oluşan Hibridoma Hücrelerinin Ürettiği Antikorların Seviyelerinin Tespiti.....	60
4.3	Kriyoprezervasyon Deney Sonuçları	65
4.4	Üretilen Antikoru <i>Leishmania</i> Yüzey Antijeni Olan LPG'ye ve <i>L.infantum</i> , <i>L.major</i> Gibi Farklı Türlerine Karşı Etkinliğinin İncelenmesi	60
BÖLÜM 5		
SONUÇLAR VE ÖNERİLER		68
KAYNAKLAR		75
ÖZGEÇMİŞ		85

SİMGE LİSTESİ

A260	260 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri
A280	280 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri
B6	Tirozinaz gen mutasyonlu albinodeney faresi Balb/c Albino laboratuvar soy deney faresi (Albino laboratory bred Mouse strain)
bp	Baz çifti cc Santimetre küp
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
Da	Dalton
J774	Faretümör monosit hücre hattı
kDa	kilo Dalton
M	Molar
Mb	Megabaz
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
Sb	Antimon
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ε	Epsilon
κ	Kappa
μ	Mü
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
°C	Santigrat Derece

KISALTMA LİSTESİ

AIDS	Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu (Acquired Immunodeficiency Syndrome)
AP	Alkalın Fosfataz
APRT	Adenin Fosforibozil Transferaz
APS	Amonyum per sülfat
BSA	Siğır 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
CH1	Antikor yapısında Ağır zincirdeki değişmez bölgenin 1. kıvrımı
CL	Antikor yapısında hafif zincirdeki değişmez bölge
CO ₂	Karbondioksit
COOH	Karboksilik asit DAT Direk Aglütinasyon Testi
Dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dTMP	Deoksitimidin monofosfat
dUMP	Deoksiüridin monofosfat
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	Siğır Fetal Serum (Fetal Bovine Serum)
Gp63	Leishmania yüzey membran metaloproteazı
H zinciri	Antikor yapısında ağır "heavy" zincir
H ₂ O	Su
HAT	Hipoksantin, Aminopterin, Timidin
HCl	Hidroklorik 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
IHA	İndirekt Hemaglutinasyon Testi (Indirect Hemagglutination Test)
IL-10	İnterlökin 10
IL-12	İnterlökin 12
IL-13	İnterlökin 13
IL-4	İnterlökin 4
IL-5	İnterlökin 5
IMP	İnozin monofosfat
K ₂ HPO ₄	Potasyum fosfat (di)
KATEX	Yeni Latex Aglütinasyon Testi (New Latex Agglutination Test)
KCl	Potasyum klorür
kDNA	Kinetoplasta ait deoksiribonükleik asit
KH ₂ PO 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 ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	Monosodyum fosfat
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NaN ₃	Sodyum azid
NFB	Nükleer faktör B
NH ₂	Amin
NK	Doğal öldürücü hücreler (Natural Killer cells)
NO	Azot monoksit (Nitrik Oksit)
OD	Optik Yoğunluk (Optical Density)
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate buffered saline)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

PEG	Polietilen Glikol
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi (Positron Emission Tomography)
pH	Potansiyel Hidrojen
PNNP	Para-Nitrofenilfosfat
PVDF	Poliviniliden florid (Polyvinylidene fluoride)
RFLP	Kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi
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)
SDS	Sodium Dödesil Sülfat
SPECT	Tek Foton Emisyon Bilgisayarlı Tomografi (Single Photon Emission Computerized Tomography)
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 Leishmania spp.'nın yaşam döngüsü : Kum sineği ve İnsan evresi.....	9
Şekil 2.2 Leishmania promoastigot formu	10
Şekil 2.3 Leishmania amastigot formu	11
Şekil 2.4 Ülkemizdeki dağılımı	16
Şekil 2.5 Antikor yapısı	20
Şekil 3.1 A <i>L.tropica</i> 'nın (MHOM/ TR/EP39) promastigot formu (Giemsa boyama, x100).....	43
Şekil 3.2 <i>L.tropica</i> promastigot kültürünün 75 cm ² 'lik flasklarda kültürünün yapılması	44
Şekil 3.3 <i>L.tropica</i> promastigot kültürünün 75 cm ² 'lik flasklarda kültürünün yapılması	44
Şekil 3.4 Balb/C farelere intraperitoneal enjeksiyon yapılması	47
Şekil 3.5 ELISA washer cihazı	48
Şekil 3.6 ELISA reader cihazı	49
Şekil 3.7 J774 makrafaj hücre hattının görüntüsü	50
Şekil 3.8 Dalaktan izole edilen B-lenfositlerinin görüntüsü	52
Şekil 3.9 Ag8 Myeloma hücre hatlarının görüntüsü.....	53
Şekil 4.1 <i>L. Tropica</i> antijenine karşı fare immun yanıtları	58
Şekil 4.2 Freund's adjuvanına karşı fare immun yanıtları	59
Şekil 4.3 Polioksidonyum adjuvanına karşı fare immun yanıtları	60
Şekil 4.4 Füzyon sonrası plaka içerisindeki hücrelerin görüntüsü	61
Şekil 4.5 Füzyon sonrası 10. Ve 20. gün antijen kaplamaya karşı alınan ELİSA sonuçları	61
Şekil 4.6 Füzyon sonrası 10. Ve 20. gün Freund's kaplamaya karşı alınan ELİSA sonuçları	62
Şekil 4.7 Füzyon sonrası 10. Ve 20. gün PO kaplamaya karşı alınan ELİSA sonuçları	62
Şekil 4.8 Füzyon sonrası 22. gün kolonizasyonun gözlenmesi	63
Şekil 4.9 Füzyon sonrası 23. gün kolonizasyonun gözlenmesi	63
Şekil 4.10 Füzyon sonrası 25. gün kolonizasyonun gözlenmesi	64
Şekil 4.11 Füzyon sonrası 27. gün kolonizasyonun gözlenmesi	64
Şekil 4.12 Kolonizasyon sonucunda uygulanan alt klon işleminin görüntüsü	65
Şekil 4.13 Kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası antikor miktarları	65

Şekil4.14	Kriyoprezervasyon sonrası açılan hibridoma kültürünün flasktaki görüntüsü.....	66
Şekil 4.15	Üretilen antikorun <i>Leishmania</i> yüzey antijeni olan LPG ile tüm parazit antijenine karşı spesifitesi	67
Şekil 4.16	Üretilen antikorun tüm parazit, LPG ve <i>L.infantum</i> , <i>L.major</i> gibi farklı türlerine karşı etkinliğinin incelenmesi	66

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Leishmania'nın Klinik Formları Ve Dünya'da Türlerine Göre Dağılımı12

LEISHMANIA TROPICA PARAZİTLERİNDEN ELDE EDİLEN İMMÜNOJEN MOLEKÜLLERE KARŞI TANIDA KULLANILMAK ÜZERE HİBRİDOMA TEKNOLOJİSİNE DAYALI ANTİKOR ÜRETİLMESİ

Aslı Pınar ZORBA

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Eş Danışmanı: Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Ülkemizin ve dünyanın ciddi halk sağlığı problemlerinden biri olan leishmaniasis zoonotic bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı veriler çerçevesinde her yıl yeni 2 milyon vaka ile beraber dünyada 350 milyon kişi bu hastalığın tehditi altında yaşamakta olup, 90 ülkede endemiktir. Leishmaniasisin kutanöz, mukokutanöz ve visseral olmak üzere üç formu mevcuttur. Türkiye'de kutanöz leishmaniasise *Leishmania tropica*, mukokutanöze *Leishmania major*, visseral leishmaniasise ise *Leishmania infantum* sebep olmaktadır. Tedavide kullanılan antimonyal ilaçlara ve vektörlerde ise kullanılan insektisistlere karşı direncin gelişmesi, şüana kadar etkin bir aşının geliştirilememesi ve ayrıca tanıdaki sorunların şimdiye kadar giderilememesi hastalığın geniş yayılım göstermesinin nedenleri arasında yer almaktadır. Leishmaniasisin tanısında mikroskopik, kültür ve mikrokültüre dayalı sistemler, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Mevcut tanı yöntemlerinin hastalığın farklı formlarına ve parazitin türüne karşı gösterdikleri duyarlılıkları birbirinden farklıdır. Bu yöntemler arasında daha yaygın kullanılan klasik mikroskopik yöntemlerin temelini Giemsa boyalı preparatlar oluşturmaktadır. Ucuz ama kısmen

uygulanabilir olan mikroskopik yöntemlerin dezavantajı, örneklerin içerdiği parazit sayısına bağlı olarak duyarlılık derecesinin değişimidir. Diğer bir yöntem olan kültür yönteminde, kapalı bir sistem içerisinde parazit gelişimin gözlenmesi mümkün olsa da bu hastalığın tanısının koyulabilmesi için 15-30 günlük uzun sürelerle gereksinim duyulmaktadır. Kültür yöntemlerinin bu dezavantajına karşın, sonraki yıllarda geliştirilen mikrokültür yöntemi ile daha kısa sürede (1-5 gün) daha yüksek duyarlılık sağlanmıştır. Bu yöntem sadece leishmaniasisin tanısında değil, donör kanlardan elde edilen örneklerde, aşı geliştirilmesinde, farelerin sakrifiye edilmeden çalışılmasında, kök hücre izolasyonu ve helikobakter tanısında da örnek bir model oluşturmuştur. leishmaniasisin tanısında kullanılmak üzere geliştirilen izoenzim analizleri, polimeraz zincir tepkimesi, gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi gibi moleküler tabanlı yöntemler de kullanılmaktadır. Bu yöntemlerinde dezavantajlarının başında, parazite bağlı duyarlılıkla beraber pahalı olması ve uzmanlık gerektirmesi gelmektedir. Leishmaniasis hastalığında, parazitin yüzey antijenlerini hedef alan antikor temelli diagnostik önem teşkil eden serolojik yöntemlerde bulunmaktadır. Erken tanı için avantaj sağlayan bu serolojik yöntemlerin başında immüno Floresans boyama tabanlı IFAT, ELİSA ve rK39 kitleri gelmektedir. Mevcut serolojik yöntemlerin temelini serumda bulunan antikorların tespiti oluşturmaktadır. Ticari olarak üretilen ve leishmaniasisin tanısında kullanılan rK39 kiti, visseral leishmaniasisli hastalarda daha yüksek duyarlılığa sahipken; kutanöz leishmaniasisli hastalarda duyarlılığın oranı %20 civarlarında kalmaktadır. Buna göre de kutanöz leishmaniasisde uygulanan serolojik yöntemlerin düşük duyarlılığı ancak lezyon bölgesinde parazite has antijenin bulunmasına dayandırılabilir. Dünya’da ve ülkemizde kutanöz leishmaniasisli hastaların tanısında kullanılmak üzere rK39 kitine benzer herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Bu tarz test kitlerinin hazırlanmasının temelinde ise; hibridoma teknolojisine dayalı antikorların üretilmesi gelmektedir. Hibridoma teknolojisi ile bir çok hastalığa karşı yüksek özgüllük ve afiniteyi sağlayan tanı sistemleri oluşturulmaktadır. Dünya’da leishmaniasise karşı hibridoma teknolojisine dayalı çalışmalar daha çok üretilen antikorların çapraz reaksiyonlarını incelemekle kalmış, etkili bir tanı sisteminin geliştirilmesine ait herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Daha önce laboratuvarımızda tamamlanan yüksek lisans tez çalışması kapsamında visseral leishmaniasis etkeni *L.infantum*’a karşı hibridoma teknolojisine dayalı monoklonal antikor üretilmiştir. Bu alandaki çalışmaların yetersiz olmasının nedenlerinden biri de immün yanıt oluşturmada yaşanan zorluklardır. Leishmaniasise karşı yapılan hibridoma çalışmalarının ortak noktalarından biri de immünizasyon aşamasında Freund’s adjuvanının kullanılmasıdır. Bu adjuvanın etkili ama toksik olduğu yapılan çeşitli çalışmalar ile belirtilmiştir. Sıklıkla kullanılan bu adjuvanın toksik özellikle olması yeni adjuvan gereksinimlerini beraberinde getirmektedir. Buna göre de bu tez çalışmasının amacı, *L.tropica* parazitlerinin immünojen moleküllerine karşı kutanöz leishmaniasisin tanısında kullanılmak üzere hibridoma teknolojisine dayalı antikor üretilmesi ve çeşitli adjuvanların antikor üretimi üzerindeki etkinliğinin incelenmesi olmuştur.

Amaca ulaşmak için *Leishmania tropica* parazitlerinden elde edilen yüzey antijen molekülleri ile aşılanan farelerin dalak hücrelerinden izole edilen B-lenfositleri ile kemik iliği kanser hücresi olan myelomaların füzyonu sonucunda oluşturulan hibridoma teknolojisini temel alan antikor üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu teknolojinin aşamaları

arasında yer alan immünizasyonda, *Leishmania tropica* tüm yüzey antijenleri ile literatürde sıklıkla kullanılan Freund's adjuvan kompleksi ve literatürden farklı olarak polimerik temelli, FDA onaylı ve toksik olmayan polioksidonyum (PO) adjuvanı kullanılarak, farelerde oluşan immün yanıtlar karşılaştırılmıştır. Yeterli yanıtların alındığı fareler servikal dislokasyon yöntemi ile kesilerek B-lenfositleri izole edilmiş ve kemik iliği kanser hücreleri olan myelomalarla füzyona uğratılmıştır. Hibridoma teknolojisi ile üretilen hibrit hücrelerin ürettikleri antikorlar ELİSA sistemi ile test edilmiştir. Ayrıca oluşturulan bu hibridoma hücrelerinin ürettikleri antikorlar yalnızca *Leishmania* parazitin karşı değil, aynı zamanda immünizasyon aşamasında kullanılan adjuvana karşı da oluşup oluşmadığı da ilk incelenmiştir. Hibridoma hücrelerinin ürettiği bu antikorun aynı zamanda parazitin yüzeyinde yer alan ve en immünojenik molekül olan lipofosfoglikana (LPG) ve *Leishmania*'nın diğer türleri olan *L. major* ve *L. infantum*'a karşı da oluşup oluşmadığı test edilmiştir.

Bununla birlikte hibridoma hücrelerinin literatürde yer alan dondurma protokolleri izlenerek, kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası ürettikleri antikor dinamiği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar çerçevesinde, Freund's adjuvanı ile immünize edilmiş farelerde 6. immünizasyon sonrasında, PO ile immünize edilmiş farelerde ise 8. immünizasyon sonucunda antikor düzeyinin kontrole göre yaklaşık 5.5 kat arttığı saptanmıştır. Ayrıca aynı serum örneklerinde adjuvana karşı yanıt oluşup oluşmadığı da test edilmiştir. Buna göre de 8. immünizasyon sonucunda adjuvan olarak Freund's kullanılan farelerin Freund's'a karşı oluşturduğu antikor yanıtının kontrole göre yaklaşık olarak 3 kat arttığı; PO adjuvan olarak kullanıldığı farelerde ise 8. immünizasyon sonucunda bu adjuvana karşı oluşan yanıtın kontrole göre anlamlı bir değişme göstermediği saptanmıştır. Sonraki aşama olan füzyon sonucu oluşan hibridomaların seçici besiyeri içerisinde kültürü yapılmış ve ürettikleri poliklonal antikor yanıtları ELİSA yöntemi ile tespit edilmiştir. Bu antikor yanıtlarına göre hibridoma kültürünün 10. ve 20. günlerinde *L. tropica*'ya karşı poliklonal antikor oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca bu antikorların etkinliği sadece antijen kaplamalarla değil; aynı zamanda adjuvan kaplamalar yapılarak da incelenmiştir. Freund's grubu hibridomalarının antijene özgü yanıtları 10. güne kıyasla 20. günde daha da azalmıştır. PO grubu hibridomalarının antijene özgü ürettikleri antikorlar 10. güne göre 20. günde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Freund's grubu hibrit hücrelerinin ürettikleri antikorun yalnızca antijene spesifik olmadığı, aynı zamanda adjuvanın kendisine de bir yanıt oluşturduğu tespit edilmiştir. PO ile yapılan kaplama sonuçlarında ise hibridomaların ürettikleri antikor yanıtlarının 10. güne karşı 20. günde daha da azaldığı görülmüştür. Üretilen antikorların tüm parazit *Leishmania* ve *Leishmania*'nın en immünojenik yüzey molekülü olan LPG'ye karşı oluşturduğu yanıt tespit edilmiştir. Hibridomaların antikor üretme yetenekleri kriyoprezervasyon öncesi ve sonrasında karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve üretilen bu antikorların sadece *L. tropica*'ya özgü değil, *L. infantum* ve *L. major*'e karşı da farklı duyarlılıkta etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmalar ışığında, üretilen antikorların ileride kutanöz leishmaniasisin tanısında kullanılmak üzere tanı kitlerinin geliştirilmesinde mümkün olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, deneysel değere de sahip olan bu antikorlar, parazitlerin besiyerleri içerisine eklenerek, üretildikleri antijenlerin, enfektivite özelliklerinin, promastigot-amastigot farklılaşması gibi evrimsel süreçlerinin incelenmesine olanak sağlamaktadırlar. Böylece bu çalışma kapsamında kutanöz leishmaniasise karşı hibridoma teknolojisine dayalı antikor üretiminde *L. tropica*

parazitlerden dondurup-çözme yöntemi ile elde edilen immünojen moleküllere karşı antikor üretilmesinde Freund's adjuvanına karşı ilk kez olarak toksik olmayan FDA onaylı PO daha etkin olduğu ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Leishmaniasis, antikor, hibridoma teknolojisi, adjuvan

ABSTRACT

GENERATION OF HYBRIDOMA TECHNOLOGY BASED ANTIBODIES AGAINST IMMUNOGEN MOLECULES ISOLATED FROM *LEISHMANIA* *TROPICA* PARASITES IN ORDER TO USE IN DIAGNOSIS

Aslı Pınar ZORBA

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEY

Co-Adviser: Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Leishmaniasis is a zoonotic disease which is one of the serious public health problem in our country and the world. Data released in the framework of the World Health Organization, 2 million new cases occur each year and in worldwide 350 million people are living under the threat of this disease is endemic in 90 countries. Cutaneous leishmaniasis is caused by *Leishmania tropica*, while *Leishmania major* causes Mucocutaneous, *Leishmania infantum* causes the Visceral Leishmaniasis. Antimonial drugs used in the treatment and vectors used in the development of resistance to insecticidal in failure to develop an effective vaccine until now and also that the diagnosis of these problems can not be solved until now it is among the causes of the disease show wide distribution. The diagnosis of leishmaniasis are used microscopy, culture and micro culture-based systems, serological and molecular methods. Sensitivity ratings given against parasite species and different forms of the disease is different in the current diagnostic methods. Giemsa stained preparations form the basis of the microscopic method. The most important disadvantage of the microscopic method which is cheap but partially applicable, depending on the number of samples contained parasites change the degree of sensitivity. In another method is culture

methods, the observation of parasite development in a closed system is also possible, although it is required to put the 15-30 days long in the diagnosis of this disease. Despite these disadvantages of the culture method, the micro-culture method developed in the following years and it was achieved more sensitive response in a shorter period of time (1-7 days). This method is not only used in the diagnosis of Leishmaniasis. This method has been a role model also used in the samples obtained from the donor blood, vaccine development, mice to study without being sacrificed, stem cell isolation and the diagnosis of *Helicobacter*. There are also molecular methods such as isoenzyme analyses, polymerase chain reactions, realtime polymerase chain reactions to diagnose Leishmaniasis. The biggest disadvantages of these methods are that they are susceptible to paracites and also very expensive. In the diagnosis of disease, serologic methods that targets the antigens on the surface of the parasites have become very important. The most used serologic methods that provide an early diagnosis are immunofluorescence colouring based IFAT, ELISA and rk39 kits. The underlying source in these serologic methods is the detection of antibodies in the serum. Commercially produced rk39 kits have a high susceptibility on patients with Visceral Leishmaniasis however their susceptibility level on patients with Cutaneous Leishmaniasis is 20%. According to this, it could be said that the low levels of susceptibility towards Cutaneous Leishmaniasis might be because the parasite has a particular kind of antigen in its lesion area. We have not come across a method like RK39 kits that is used to diagnose patients with Cutaneous Leishmaniasis in our country and in the world. Antibodies that are produced based upon hybridoma technologies are rooted in why these kinds of test kits are prepared. Diagnostics systems that have very high affinity and specificity towards many kinds of diseases have been developed with this technology. The studies that have used hybridoma technology against Leishmaniasis in the world has only examined the cross reactions of the produced antibodies but they did not develop an effective diagnostics system. Previously in the scope of a master's thesis, monoclonal antibody was produced to work against the factor L.infantum of Leishmaniasis in our laboratory. The reasons as to why the studies in this field are insufficient is because the difficulties in getting immune answers. One of the common subjects of hybridoma studies is the use of Freund's adjuvant in the immunisation stage. This adjuvant is established in some studies as effective but also toxic. This toxic nature brings the need to have new adjuvants. According to this, the purpose of this thesis study is to produce antibodies with hybridoma technology to use in the diagnostics of cutaneous leishmaniasis against the immunogen molecules of L.tropica parasites and to examine the effectiveness of this antibody production on various adjuvants. To achieve this goal, hybridoma technology created as a result of fusion based antibodies were produced by fusion of myelomas cancer cells with B-lymphocytes isolated from bone marrow of mice that are immunized with surface molecules obtained from Leishmania tropica.

In the steps of this technology, the immune mice responses against all-surface antigens of Leishmania tropica with Freund's adjuvant complex that is frequently used in literature or unlike literature using new polymeric based Polioksidony I (PO) adjuvant that is FDA approved and non-toxic, were compared. The Mice with sufficient response is sacrificed by cervical dislocation method and B-lymphocytes isolated to used in the fusion studies with myeloma bone marrow cancer cells. Antibody produced by the

hybrid cell produced by hybridoma technology were tested by ELISA system. Also secreted that antibodies produced by hybridoma cells not only against *Leishmania* parasites, has also been examined against the adjuvant which used in the immunization step. These antibodies produced by hybridoma cells is also tested against the *L. major*, *L. infantum* and the parasite's surface and the immunogenic molecule lipophosphoglycan (LPG). However, the amount of antibody produced by hybridoma cells was examined before and after cryopreservation depending on freezing protocols in the literature. Within the framework of the obtained results, FREUND after'S mice immunized with adjuvant 6. immunization in mice immunized with PO 8. It is found that immunization resulted in increased approximately 5.5 times compared to the control antibody level. Also the same serum samples were also tested against the adjuvant. Accordingly to this 8. Immunization result in Freund's adjuvant as compared to the control mice used in the antibody response generated against Freund's it was determined that approximately three-fold increase. But the mice immunized against Polyoxidonium adjuvant, there was no significant changes in responses compared the control after 8. Immunization. The next step resulting from the fusion of hybridomas cultured in selective medium and produced polyclonal antibody responses were determined by ELISA method. According to the these antibody responds, polyclonal antibodies against the *L.tropica* was observed in hybridoma cultures in the 10th and 20th days. Furthermore the effectiveness of antibody were examined not only against to the antigen coating but also the adjuvant coatings. Freund's group hybridoma cell responses (antigen-specific) were more decreased 20th day compared to 10th day. PO group of hybridoma cells produced specific antibodies to the antigen was detected 20th days higher than 10th day. Freund's group of the antibody produced by the hybrid cells is not only specific to the antigen, the adjuvant also has been found to create a response to it. The PO coated ELISA plate results, produced by the hybridoma cell antibody response, 10th day versus 20th days was seen more reduced. Produced antibodies by Hybridomas have been identified to generate the response against whole *leishmania* lysate and *Leishmanias*' most immunogenic surface molecules; LPG. Hybridoma cells' antibody producing ability before and after cryopreservation were comparatively analyzed and this antibody response not just for *L.tropica* has also been found to show effects in the different susceptibility to *L.infantum* and *L.major*. In the light of this study, suggested the use of these antibodies in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. In addition, the experimental value of having these antibodies also added into the medium of parasite antigens were produced, the properties of infectivity, as they allow to investigate the evolutionary process promastigote-amastigote differentiation.

Keywords: Leishmaniasis, antibody, hybridoma technology, adjuvant

1.1 Literatür Özeti

Leishmaniasis, 20'den fazla türe sahip olan *Leishmania* protozoonlarının neden olduğu, *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* cinsi sinekler aracılığıyla taşınan zoonotic bir hastalıktır [1], [2], [3], [4], [5]. 90 ülkede yaklaşık 350 milyon yetişkin insan ve çocuk Leishmaniasis tehditi altında yaşamakta olup; Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre 12 milyon enfekte kişi bulunmaktadır. Her yıl dünyada yeni 2 milyon vaka görülmektedir. Her yıl görülen bu vakaların 1-1,5 milyon kişi kutanöz Leishmaniasise, 500.000 kişi ise visseral Leishmaniasise yakalanmaktadır [6]. Endemik olarak görülen bölgelerin başında Asya ve Avrupa'nın batısı, Hindistan, Çin, ve Akdeniz Bölgesi gelmektedir [5]. Bu hastalık ülkemizde ciddi halk sağlığı problemlerinden biridir. Ülke sınırlarımız içerisinde 20 milyon insan Leishmaniasise yakalanma riski ile karşı karşıyadır. Hastalığın geniş yayılım göstermesinin nedenleri arasında tedavide kullanılan antimonyal ilaçlara ve vektörlerde ise kullanılan insektisistlere karşı direncin gelişmesi, şimdiye kadar etkin bir aşının geliştirilememesi ve ayrıca tanıdaki sorunların şimdiye kadar giderilememesidir [3][4][7]. Bir hastalığın tanısı, doğru tedavinin uygulanabilmesi için oldukça önemlidir. Leishmaniasisin tanısında farklı yöntemler kullanılmakta olup; bu yöntemlerin çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemler arasında mikroskopik, kültür tabanlı, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılsa da, hala altın standartları içeren bir yöntem geliştirilememiştir. Var olan mevcut yöntemler kendi aralarında kıyaslandığında, hastalığın farklı formlarına ve parazitin türüne karşı gösterdikleri duyarlılık derecelerinin de farklı olduğu görülmektedir. VL ve KL tanıları klasik olarak

kemik iliği ve deri lezyonundan hazırlanan Giemsa boyalı yayma preparatların mikroskopik olarak incelenmesi sonucu koyulmaktadır. Diğer yöntemlere göre daha sade, ucuz ve kısmen uygulanabilir olması bu yöntemin avantajlarını oluştururken, dezavantajları arasında parazit sayısına bağlı olan duyarlılık ve uygulanabilirlikte deneyimli personele ihtiyaç duyulması gelmektedir. Leishmaniasisin tanısında kullanılan diğer yöntemlerden biri de kültür yöntemidir. Kültür yöntemlerinin temelini kültür ortamında bulunan amastigotların hareketli promastigotlara dönüşümü oluşturmaktadır ki bu da mikroskopik olarak kolaylıkla görülebilmektedir. Tür tayini ve karakterizasyonda önemli bir yöntem olan kültür yöntemi; pahalı, zaman alıcı, teknik destek ve uzmanlık gerektiren dezavantajları içermektedir. Ayrıca parazit sayısına bağlı olarak duyarlılığın azalması ve tanı koyulabilmesi için uzun sürelerle gereksinim duyulması (1-6 aya kadar) diğer dezavantajlarını oluşturmaktadır. Kültür yöntemlerinin başında gelen NNN Agar ortamında, hareketli promastigot kültürünün gözlemlenebileceği kapalı bir sistemi oluştururken; sonucu net olarak değerlendirmek için 15-30 gün gibi uzun sürelerle gereksinim duymaktadır. Son yıllarda Leishmaniasisin tanısında ve leishmania parazitlerinin saflaştırılmasında kullanılmak üzere kültüre dayalı mikrokültür yöntemi geliştirilmiştir. Yüksek duyarlılığa sahip, kolay uygulanabilir ve ucuz olan bu mikrokültür yönteminin temelini, mikroaerofilik niş içerisinde parazit gelişiminin incelenmesi oluşturmaktadır. Klasik kültür yönteminden farklı olarak mikrokültür yönteminde tanının konulabilmesi için 15-30 güne karşı olarak aynı gün veya maksimum 1 hafta içerisinde son karar verilebilmektedir. Sonraki yıllarda isemikrokültür yöntemi asemptomatik Leishmaniasisde, donör kanlarından elde edilen örneklerde, aşı geliştirme çalışmalarında, farelerin sakrifiye edilmeden çalışılmasında, kök hücre izolasyonunda ve helikobakterin tanısında uygulanabilirliği gösterilmiş olup, dünyanın çeşitli yerlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Leishmaniasisin tanısında kullanılan moleküler yöntemler de oldukça önemlidir. Bunların başında izoenzim elektroforezi en çok tercih edilen yöntem olmakla birlikte, polimeraz zincir tepkimesi (PZT), gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi (GZ-PZT), kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi yöntemi (RFLP) de kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin dezavantajları örnekteki parazit sayısına bağlı olması, pahalı teknik ekipman ve uzman

kişiler tarafından uygulanabilir oluşu gelmektedir [8]. Leishmaniasisin tanısında parazitin yüzey antijenlerini hedef alan primer veya sekonder antikor temelli geliştirilmekte ve uygulanmakta olan serolojik yöntemlerde bulunmaktadır. Erken tanı için avantaj sağlayan bu serolojik yöntemlerin başında immünofloresans boyama tabanlı IFAT, ELİSA ve rK39 kitleri gelmektedir. Bu yöntemler hastalığın farklı formlarına karşı ayrı yüzdeliklerde duyarlılık sağlamaktadırlar. Bu yöntemler arasında yer alan Montenegro testi epidemiyolojik yayılım gösteren kutanöz Leishmaniasis hastalarında duyarlılık açısından öne çıkmaktadır. Ancak dezavantajları arasında enfeksiyonun önceye ya da şüana ait olup olmadığı ile ilgili çelişkili sonuçlar vermekte olduğu tespit edilmiştir. Antikor- antijen temelli bir başka serolojik yöntem olan ELİSA yöntemi de sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak Leishmaniasisin tanısında kullanılan antikor temelli kitlerin özellikle visseral Leishmaniasisli hastalardan elde edilen örneklerle karşı daha duyarlı olduğu, kutanöz Leishmaniasisli hastalarda ise bu duyarlılığın %20'den düşük olduğu rapor edilmiştir. Bu çıktılar, kutanöz Leishmaniasisin tanısında geliştirilecek olan tanı yöntemlerinin temelini örnekte bulunan antijen içeriğine dayandırmaktadır. Genellikle serolojik yöntemlerin ister antijen ister antikor saptanma prensibine bağlı olmadan geliştirilenbilen ve uygulanan herhangi bir yöntemin daha hızlı, daha duyarlı ve spesifik; aynı zamanda çöl koşullarında bile uygulanabilir olmasına imkan sağlamaktadır. Şuanda ticari olarak piyasada bulunan rK39 testi genellikle VL tanısında daha olumlu sonuçlar vermekte olup, KL karşı spesifik herhangi bir kit bulunmamaktadır [9] [10]. Son yıllarda paraziter hastalıkların tanısında kullanılmak üzere üretilen poliklonal ve monoklonal antikorlar, analitik, terapatik ve diagnostik öneme sahip yapılardır. 20. yüzyılın sonlarında in vitro koşullar içerisinde antikor üreten hücrelerin ömürlerini uzatmak için çeşitli araştırma grupları farklı yöntemler üzerinde çalışmışlardır. Kohler ve Milstein (1975), başarılı bir melez hücre hattı için gerekli olan antikor üretme yeteneği gösteren B-lenfositler ile sürekli bölünme yeteneğindeki kemik ilgi kanser hücresi olan myelomaları sendai virüs aracılığıyla füzyona uğratarak; in vitro koşullarda sürekli antikor üreten ve çoğalan hibrit hücre hattı elde etmişlerdir [10], [11], [12]. Afinite yetenekleri ve özgüllükleri bakımından önem kazanan bu antikorların özellikle Leishmaniasisin tanısında, hibridoma

teknolojisi kullanılarak üretilmesine önem verilmektedir [13]. Hibridoma teknolojisine dayalı geliştirilen tanı kitlerinin en büyük avantajı örnekte antikorun değil, parazite has herhangi bir antijen molekülünün bulunmasına dayanmaktadır. Böyle bir temele dayanan yaklaşım kan örneklerinde düşük duyarlılığa sebep olan kutanöz Leishmaniasisli hastaların tanısındaki bu ciddi problemin giderilmesine yol açabilir. Literatürde konuyla ilgili yapılan çalışmalar oldukça az sayıda olup ağırlıklı olarak 80'li yıllara aittir. Bu çalışmalarda Leishmania'nın farklı türlerine karşı üretilen monoklonal ve poliklonal antikorların elde edildiği parazit türünden farklı olarak çapraz reaksiyon etkilerine ve alt klonlama işlemleri sonucu üretilen antikorun yüzey antijenlerinin hangi bölgesine spesifik olduğuna bakılmıştır. Bu yıllarda leishmaniasise karşı hibridoma teknolojisi ile üretilen antikor çalışmaları, modern hibridoma çalışmaları ile karşılaştırılırsa en başta immünizasyon aşamasındaki farklılıklar öne çıkmaktadır. Canlı promastigot kültür ile immünize edilmiş farelerin dalak hücrelerinden B-lenfosit izolasyonları gerçekleştirilmiş ve myeloma hücreleri ile füzyona uğratılmıştır [14], [15], [16]. Daha sonraki çalışmalarda bu görüşler pek destek bulamamıştır. Literatür incelemesinde bu yıllardan sonra günümüze kadar bu alanda pek çalışmaya rastlanmamıştır. Ülkemizde 2012 yılına ait laboratuvarımızda tamamlanan yüksek lisans tez çalışması kapsamında visseral leishmaniasis etmeni *L.infantum*'a karşı monoklonal antikor üretilmiştir [17]. Ancak kutanöz Leishmaniasis ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Leishmaniasise karşı bu alanda yapılan çalışmaların yetersiz olmasının esas nedenlerinden biri de yeterli immün yanıtın oluşturulmasının mümkün olmaması olabilir. İmmünojen moleküllerin immünojenliğinin arttırılmasında çeşitli adjuvanlar kullanılmaktadır. Bu adjuvanların kullanılmasının, en zayıf immünojen molekülü bile immünojenitesi daha yüksek molekülden daha immünojenik hale getirdiği bilinmektedir. Leishmaniasise karşı hibridoma çalışmalarında sadece Freund's adjuvanının kullanıldığı incelenmiştir. Freund's adjuvanının mevcut adjuvanlardan farklı olarak daha toksik olduğu ve yeterince etkin olmadığı bilinmektedir. Buna göre de, hibridoma teknolojisine yönelik çalışmalarda FDA onaylı ve daha etkin bir adjuvanın seçilmesi ve incelenmesi oldukça önemlidir. Son yıllarda aşı geliştirilmesinde kullanılan daha etkin , FDA onaylı ve toksik olmayan adjuvanların kullanımına yönelik çalışmalar

giderek artmaktadır. Laboratuvarımızda tamamlanan yüksek lisans ve doktora tez çalışmalarında ilk kez olarak PO'nun , dondurulmuş-çözölmüş ve otoklavlanmış antijenler ile etkili kombinasyonlarının yüksek immünojen etki gösterdiği saptanmıştır [18], [19]. Ancak literatürde hibridoma teknolojisinde PO'nun kullanımına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Hibridoma teknolojisi ile oluşturulmuş hibrit hücrelerinin antikor üretmesinde toksik olmayan adjuvanların kullanılması oldukça önem taşımaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Günümüzde bir çok faktöre bağılı olarak geniş bir yayılım göstermekte olan kutanöz leishmaniasise karşı etkili bir tanı sisteminin geliştirilememiş olması ve mevcut tanı sistemlerinin pahalı, duyarlılık açısından yetersiz ve her koşulda uygulanabilirliğinin düşük olması nedeni ile yüzey antijenlerini hedef alarak üretilen antikor temelli serolojik tanı sistemleri önem kazanmaktadır. Buna göre de bu tezin amacı, *L.tropica* parazitlerinin immünojen moleküllerine karşı kutanöz leishmaniasisin tanısında kullanılmak üzere hibridoma teknolojisine dayalı antikor üretilmesi ve çeşitli adjuvanların antikor üretimi üzerindeki etkinliğinin incelenmesi olmuştur. Amaca ulaşmak için;

- *L.tropica* kültürünün büyük ölçekte üretilmesi,
- Üretilen kültürden dondurup-çözme yöntemi ile antijen elde edilmesi,
- Literatürde sıklıkla kullanılan Freund's adjuvanı ve literatüre alternatif olarak sunduğumuz FDA onaylı PO, antijen ile etkili kombinasyonları oluşturularak ilk kez olarak hibridoma teknolojisinde kullanımı ve antikor üretimine etkisi,
- 6-8 haftalık Balb/c farelerinin oluşturulan adjuvant-antijen kompleksleri ile düzenli aralıklarla immünizasyonu,
- Füzyon için literatürde uygun görölen P3-X63-Ag8.653 myeloma hücre hattının kültürünün çoğaltılması, J774 fare monosit tümör makrofaj kültürünün çoğaltılması ve aynı zamanda hibrid hücrelerinin gelişimini desteklemek amacıyla kullanılması için makrofaj metabolitlerinin toplanması,

- İmmünizasyonun sonlandırılması sonucu deney hayvanlarının sakrifikasyonu, dalaklarının çıkarılması ve B-lenfosit izolasyonu,
- Deney hayvanlarından elde edilen periton makrofaj hücrelerinin füzyon öncesi besleyici tabaka olarak plaklara ekilmesi, , izole edilen B-lenfositlerinin ve myeloma hücrelerinin PEG aracılığıyla füzyonunun gerçekleştirilmesi,
- Füzyon sonucu oluşan hibridomaların seçici besiyeri içerisinde kültürünün yapılması ve belirli aralıklar ile ürettikleri poliklonal antikor yanıtlarının ELİSA yöntemi ile tespit edilmesi,
- *Leishmania* antijenine karşı ELİSA sonuçlarında pozitif yanıt veren kuyucukların seçilmesi sonucu kolonizasyonunun takibi, hibridomaların çoğaltılması, alt klonlanması ve kriyoprezervasyonu,
- Kriyoprezervasyon sonrası pasaj sayısına bağlı olarak değişen antikor yanıtlarının tespiti,
- Ayrıca üretilen poliklonal antikorların *Leishmania* parazitlerinin en önemli yüzey antijeni olan LPG molekülüne ve *L. infantum*, *L. major* gibi farklı türlere özgü spesifikliğin belirlenmesi gibi işlemlerin yapılması planlanmıştır.

1.3 Hipotez

Şimdiye kadar aşı geliştirilmesinde yapılan çalışmalarda daha yüksek düzeyde immün yanıt oluşturmak için çeşitli adjuvanlar kullanılmakta olup; en yüksek yanıt oluşturabilecek, en az toksisiteye sahip adjuvanlara önem verilmektedir. Gerek *Leishmaniasis* gerekse de diğer enfeksiyonlara karşı hibridomaların oluşturulabilmesi için deney hayvanlarının immünizasyonunda Freund's adjuvanının kullanıldığı bilinmektedir. Ancak bu toksik özellik gösteren adjuvanın antijen ile birlikte iyi bir immün yanıt oluşturduğu bilinse de, hibridoma çalışmalarında devamlı olarak antikor üreten hibrit hücrelere nasıl bir etki gösterdiği ile ilgili literatürde herhangi bir açıklama bulunmamaktadır. Ayrıca daha önce laboratuvarımızda yapılan yüksek lisans ve doktora tez çalışmalarında toksik olmayan, FDA onaylı Polioksidonyumun *Leishmania* parazitleri ile yüksek bir adjuvan etkinliği gösterdiği saptanmıştır. Böylece bir taraftan hibridoma

teknolojisinde Freund's gibi toksik özelliğe sahip olduğu bilinen adjuvanın kullanılması, diğer yandan ise FDA onaylı toksik olmayan PO molekülünün şimdiye kadar hibridoma teknolojisinde kullanılmaması önerilen tez çalışmasının hipotezini oluşturmaktadır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Leishmaniasis

Leishmaniasis, 20'den fazla türe sahip olan *Leishmania* protozoonlarının neden olduğu zoonotic bir hastalıktır. Bütün türleri hücre için parazit olup dişi kum sinekleri aracılığıyla, Eski Dünya için *Phlebotomus*; Yeni Dünya için ise *Lutzomyia* cinsi [1] insanları enfekte etmektedir [2], [3], [4], [5].

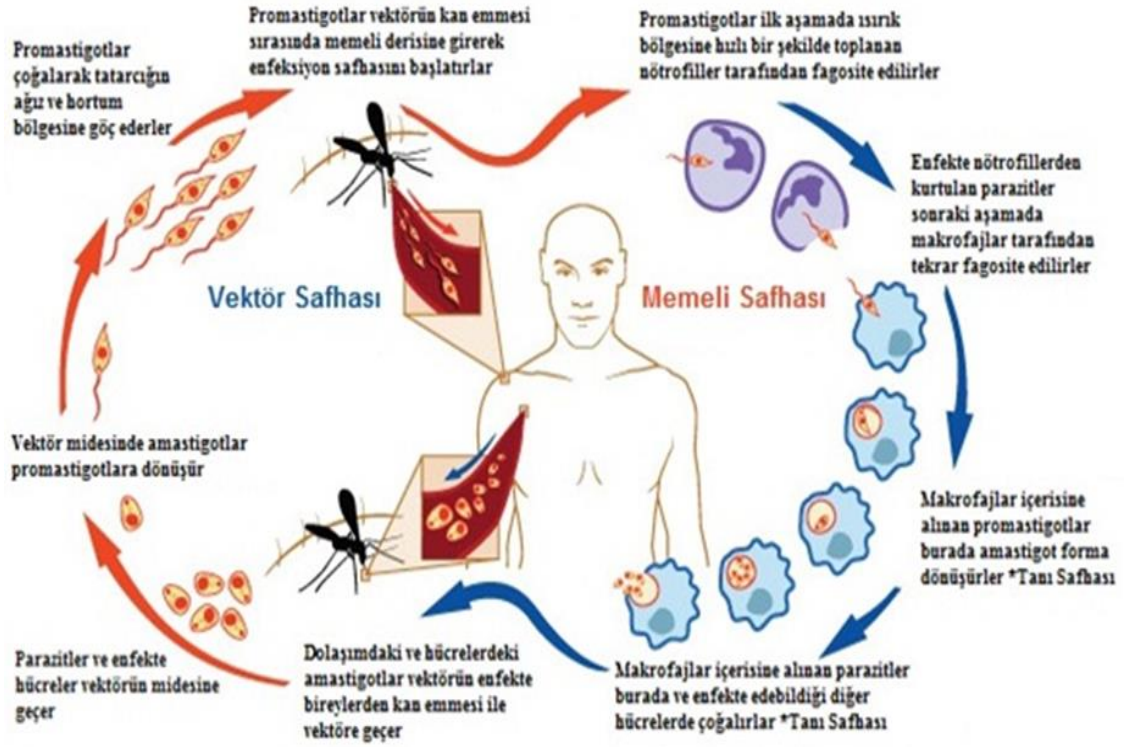
Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı verilere göre 90 ülkede yaklaşık 350 milyon yetişkin insan ve çocuk Leishmaniasis tehditi altındadır. Günümüzdeki verilere göre 12 milyon insan enfekte iken; her yıl 2 milyon yeni vaka görülmektedir[3][4]. Bu vakaların 1-1,5 milyon kişisi kutanöz Leishmaniasise, 500.000 kişisi ise visseral Leishmaniasise yakalanmaktadır. Endemik olarak görülen bölgelerin başında Asya ve Avrupa'nın batısı, Hindistan, Çin, ve Akdeniz Bölgesi gelmektedir [20], [22].

2.2 *Leishmania*'nın Yaşam Döngüsü

Leishmania paraziti, makrofaj ve dendritik hücreleri hedefleyen, bağışıklık sisteminin hücre içi patojenidir. *Leishmania* türleri evrimsel süreçlerini iki konak içerisinde tamamlarlar: Omurgasız vektör konağı olarak kullandığı phlebotomus sineği (*Phlebotomus sergenti*, *P. papatasi*, *P. major*, *P. syriacus*) ve omurgalı konağı olan insandır. Phlebotominae vektörle, vertebralı konak arasında birbirini takip eden bir

döngüde, Phlebotomus veya Lutzomyia cinsi kum sinekleri Leishmaniasisli omurgalı konaktan kan emerken içinde parazit bulunan makrofajları da alırlar [21].

Bu iki aşamada da hareket organeli olan flagellum ve çekirdek-kinetoplast konumlarına göre farklı morfolojilere sahiptir. Öte yandan temel olarak promastigot form ve amastigot form olarak iki sınıflandırmaya ayrılır.



Şekil 2.1 *Leishmania spp.*'nin yaşam döngüsü : Kum sineği ve İnsan evresi [24], [25]

İnsan Evresi : Bu evrede parazit “tanı” aşaması olarak kabul görmektedir.

- 1) Kum sineklerine yüklenen promastigot form, bu vektör aracılığıyla cilde inokule olur ve ciltte yaralar açar.
- 2) Fagositik nötrofiller ısırılan bölgeye ulaşarak parazitlerin invaginasyonuna sebep olur.
- 3) Makrofajların içine girerek promastigot formdan amastigot forma dönüşen parazitler bu aşamada basit ikiye bölünme hareketleriyle çoğalarak diğer mononuklear fagositik hücreleri de enfekte eder.
- 4) Makrofajlar nötrofillere parazit taşır.

5) Enfekte n6trofiller parazitleri serbest bırakır ve makrofajlar t6kenir.

Kum Sineği Evresi : Bu evre “enfektif” evre olarak adlandırılır.

1) Makrofajların içinden çıkan parazitler kanla beslenir.

2) Amastigotlar kum sineğinin orta bağırsak b6lgesine gelerek promastigot forma d6n6ş6rler.

3) Promastigotlar, 6n ve arka bağırsak b6lgesinde ikiye b6l6nerek çoğalmaya devam ederler.

2.2.1 Promastigot Formu

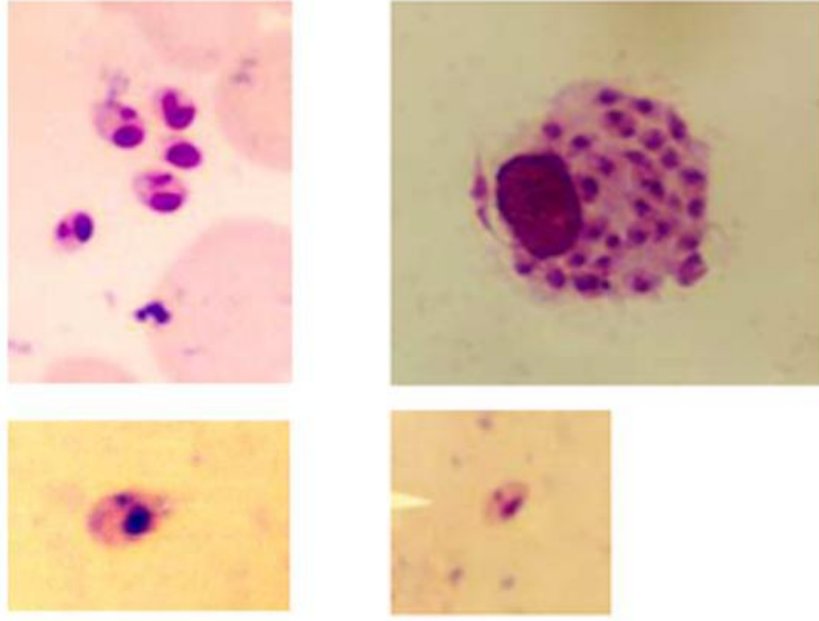
H6creğışı form olarak da bilinen promastigotlar omurgasız konak olarak kullandıkları kum sinekleri içerisinde 27°C’de yaşarlar. Flagelluma (20-22 6m) sahip oldukları için hareketli formlardır. H6cre boyutları 15-30 6m boyunda ve 5 6m enindedir. Enine ikiye b6l6nme şeklinde çoğalırlar.



şekil 2.2 Leishmania promastigot form [25].

2.2.2 Amastigot Formu

H6cre içi form olan amastigotlar, omurgalı konağı v6cut ısısına uygun olarak 37°C’de hareketsiz olarak yaşamını s6rd6r6r. Kamısı yoktur, boyu 3-6 6m iken; eni 1,5-3,0 6m arasındadır. oğalmaları boyuna ikiye b6l6nme şeklindedir [26].



Şekil 2.3 Leishmania amastigot form [25]

2.3 Leishmaniasis Hastalığının Formları

Leishmaniasis'in temel olarak şekil bozukluğuna yol açan ve zamanında tedavi edilmediğinde iz bırakarak iyileşen kutanöz Leishmaniasis (KL) ve tedavi edilmediğinde ölümcül olan visseral Leishmaniasis (VL) veya kala-azar olarak isimlendirilen iki klinik formu bulunmaktadır.

VL, Hindistan ve çevresi ülkelerde *L.donovan*, Akdeniz Havzası ülkelerde *L.infantum* ve Yeni Dünya ülkelerinde *L.chagasi* tarafından oluşturulmaktadır. Eski Dünya'da *L.major* ve *L.tropica* KL'e, Yeni Dünya'da ise; *L.braziliensis* ve *L.mexicana* komplekslerinde yer alan türler KL ve KL'nin diğer şekillerine sebep olmaktadır. *L.infantum* ayrıca Akdeniz Havzası ülkelerinde KL'ye sebep olabilmektedir [27].

Çizelge 2.1 Leishmania'nın Klinik Formları Ve Dünya'da Türlerine Göre Dağılımı [10]

Klinik formu	Türü	Ülke ve Bölgesi
Kütanöz Leishmaniasis	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. infantum</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. donovani</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. peruviana</i>	<i>Afghanistan, Azerbaijan, Egypt, Ethiopia, Turkey</i> Afghanistan, Azerbaijan, Egypt, Ethiopia India, Iran, Iraq, Kenya, Morocco, Nigeria, Pakistan, Tunisia, and Yemen <i>Albania, Bulgaria, China</i> <i>Ethiopia, Kenya</i> Cyprus, Israel Belize, Colombia, Mexico <i>Argentina, Brazil, Bolivia, Colombia, Mexico, Panama, Paraguay and Peru</i> Argentina, Brazil, Guyana, Peru and Venezuela <i>Colombia, Costa Rica, Ecuador, Honduras and Panama</i> Peru
Muko-kütanöz Leishmaniasis	<i>L. braziliensis</i> <i>L. major</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i>	Argentina, Bolivia, Brazil, Colombia, Mexico, Paraguay, Peru <i>America, Mexico</i> Colombia, Costa Rica, Honduras, Panama Peru
Difüze kütanöz Leishmaniasis	<i>L. aethiopica</i> <i>L. Mexicana</i> <i>L. amazonensis</i>	Ethiopia, Kenya <i>America, Costa Rica, Ecuador, Mexico Guatemala</i> Bolivia, Colombia, Ecuador, Venezuela
Visseral Leishmaniasis	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i>	Africa, Bangladesh, India, Sudan <i>Afghanistan, African Republic, Albania, Brazil, Central Asia, Central Iraq, France, Mediterranean basin, Tunisia and Turkey</i> New World
Post-kala-azar Dermal	<i>Leishmaniasis</i> <i>L. donovani</i>	Bangladesh, Ethiopia, India, Nepal, Sudan

Hastalıkların klinik görünümündeki farklılıkların parazitteki genetik çeşitliliğin bir sonucu olarak ortaya çıkmış olabileceği düşünülmekte olup; sadece bir bölümünün enfeksiyona neden olan parazit türü ile açıklanabilmektedir. Bildirilen Leishmaniasis

olguları da aslında gerçekten hastalığa yakalanmış olan insan sayısını tam olarak vermemektedir. Bunun nedeni ; paraziti her alan kişide enfeksiyon gelişmemekte veya enfeksiyon başlasa bile her insanda hastalık ilerlemeyebilmektedir. Hastalığın oluşmasında malnütrisyon, stres ve immün bozukluklar önemli rol oynamaktadır. Bu yüzden VL'in epidemik olarak bulunduğu yerler genelde fakirliğin, açlığın, savaşın ve immün süpresyonun görüldüğü yerlerdir. KL'de olasılıkla etken leishmania türüne bağlı olarak birkaç klinik şekilde görülmektedir. Bunlar genellikle tedavi edilmeden iyileşen lokalize KL, tedavisi çok zor olan diffüz KL (DKL) ve yüzde şekil bozukluğu ve sakatlanmalara yol açan lezyonlar oluşturan mukokutanöz Leishmaniasisdir (MKL) [28].

2.3.1 Visseral Leishmaniasis (Kala azar):

İç organlarında görülen enfeksiyon çeşiti olup tedavisi yoktur. Mide bulantısı, yüksek ateş, kilo kaybı, anemi, dalak ve karaciğer büyümesi gibi çeşitli semptomlarla birlikte iki yıl içerisinde öldürücü olabilmektedir[20]. Hastalığın %90'ı Bangladesh, Brezilya, Hindistan, Nepal ve Sudan'da görülmektedir [25].

2.3.2 Mukokutanöz Leishmaniasis :

Ağız, burun ve boğaz gibi mukozal bölge zarlarının üzerinde tahrişle birlikte kalıcı organ kayıplarına sebep olabilen formudur [20]. Hastalığın insidansının %90'ı Bolivya, Brezilya ve Peru'da görülmektedir [9].

2.3.3 Kutanöz Leishmaniasis

Cildin yüz, bacak, kol gibi görünen bölgelerinde meydana gelir. Yaraların iyileşmesi aylar sürebilirken izleri kalıcıdır[20]. Hastalığın insidansını Afganistan, Brezilya, İran, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye oluşturmaktadır[9]. Türkiye'de halk arasında Güzellik Yarası olarak da adlandırılan bu hastalık, 1833'de Unat tarafından Türkiye'nin Asya'sında rastlanarak rapor edilmiş olmakla beraber, Reinhart ve Server Teyfik tarafından 1910'da tanıtıcı broşürler basılmıştır. 1911 yılında parazitin ilk kültürünü gerçekleştiren Türk bilim insanı Hulusi Behçet, tanının önemini de vurgulamıştır [29].

2.4 Leishmaniasisin Epidemiyolojisi

Sürekli değişen epidemiyolojik verilere göre bu hastalığın dinamik bir hastalık olduğu görülmektedir. Bir çok ülkede yeni odaklar tanımlanmaktadır. Özellikle Akdeniz ülkelerinde insan enfeksiyonu riskini arttırabileceği düşünülen kedi gibi yeni hayvan rezervuarlar ortaya çıkmaktadır.

HIV enfeksiyon ile ilgili ilk Leishmaniasis olgusu 1985'te bildirilmiş ve olgu sayısı Güney Avrupa'da hızla artmıştır. HIV enfeksiyonu endemik bölgelerde VL gelişimini 100 ile 2,320 kez daha çok arttırmakta, tedaviye yanıt olasılığını düşürmekte ve relaps olasılığını yüksek oranda arttırmaktadır [30], [31]. AIDS hastalarında artan VL'nin sonucu olarak ilaç bağımlılarında ve kan donörlerindeki intravenöz geçiş yolu gibi hastalığın yeni bulaş yolları tanımlanmaktadır [32].

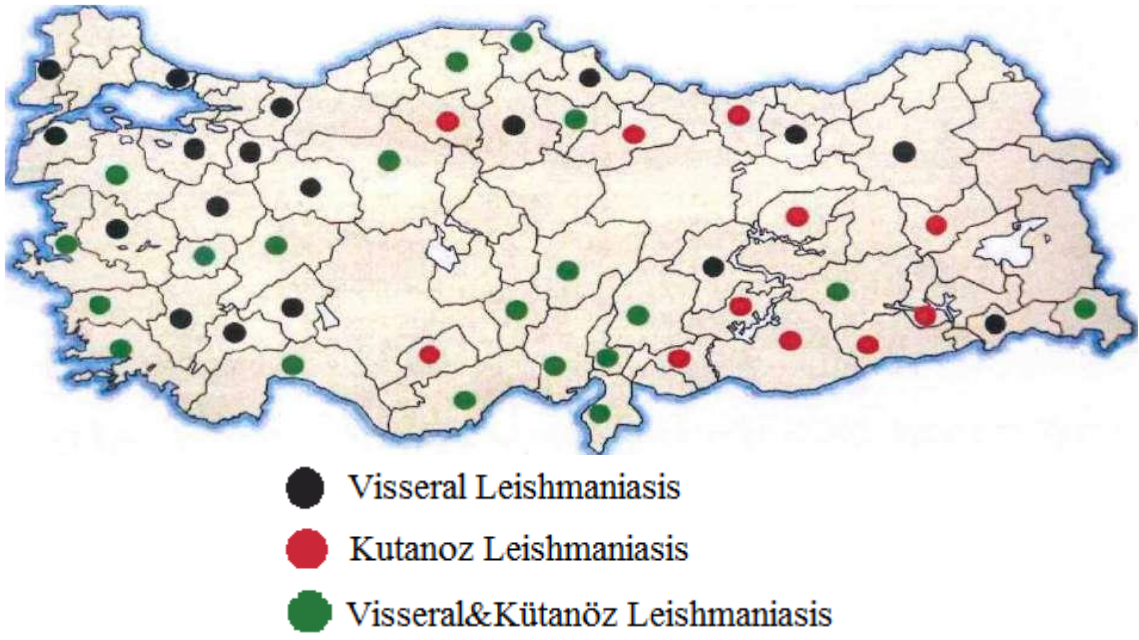
Rezervuar çalışmalarının epidemiyolojik açıdan önemi Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) sayesinde daha da anlam kazanmış olup; köpek ve kedilerdeki leishmaniasis enfeksiyonunun saptanmasında, mikroskopi ve kültür yöntemlerine oranla daha hassas olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle de PZT epidemiyolojik açıdan tarama testi olarak önem kazanmaktadır [33].

Leishmania cinsinin 1903'te tanımlanmasından bu yana türlerin sayısı değişmiştir. "Multilocus Enzyme Electrophoresis" (MLEE, izoenzim elektroforezi) halen leishmania için tür ve tür içi düzeyinde referans tanımlayıcı yöntemdir. Farklı genomik hedeflerdeki nükleotid polimorfizmlerine dayalı filogeni Akdeniz Bölgesi'ndeki endemik olan iki tür gibi bazı istisnalar dışında izoenzim elektroforezine dayalı *Leishmania* cinsi taksonomisini doğrulamaktadır. İzoenzim analizi ile VL etkeni *L.infantum*'un Sudan'da *L.donovani* ve *L.archibaldi* gibi iki visserotrofik suş ile birlikte olduğu düşünülmekteydi. Ancak bir çok değişik moleküler belirtece dayalı son çalışmalar Sudan'da visseralize olan türün bir tek *L.donovani* ve Akdeniz ve Güney Amerika'daki *L.infantum*'dan farklı olduğunu göstermiştir [34]. Tür içindeki farklılıkların sınıflandırılabilmesi için standart izoenzim analizi sınırlı derecede yararlıdır [35]. *Leishmania*'nın farklı hibrit özelliklerinin ortaya çıkabildiği bildirilmiş olup ; üç kıtanın ortasında kavşak pozisyonunda bulunan ülkemizde de hibrit suşlar bulunabileceği düşünülerek

planlanan çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, KL etkeni olan *L.tropica*'nın yayılım gösterdiği şanlıurfa ili ile *L.tropica* ve *L.infantum*'un etken olduğu Hatay ilinden alınan hasta örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen bu izolatlar referans izolatlar ile birlikte, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (GZ-PZT), izoenzim analizi, gen dizi analizi, iki boyutlu protein jel elektroforezi, MALDI-TOF ile incelenmiş, farklı bulunan proteinlere gen dizi analizi uygulanmış ve farelerle in vivo çalışmalar yapılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre ; şanlıurfa'daki izolatin tümünün *L. tropica* olduğu ve fare modelinde deri tutulumu ile sınırlı bir tablo oluşturdukları saptanırken; Hatay'dan alınan izolatların 1'inde *L.major* olduğu ve fare modellerinde deri tutulumu ile sınırlı olduğu , 5'inde ise *L.tropica* olduğu belirlenmiştir. Bu 5 *L.tropica* suşundan yalnızca 1'nde deri tutulumu gözlenirken, diğer fare modellerinde deri + visseral tutumu gözlenmekte olup 6 farklı protein bulunmuştur. Kalan diğer izolatlarda ise referans suşa göre göre 7 farklı protein bulunmuş ve fare modellerinde deri + visseral tutumu birlikte gözlemlenmiştir [36]. Leishmaniasisin yayılımı küresel ısınma ve insanların davranışsal faktörleri ile ilişkili ısı değişikliklerinin sonucu olan çevresel değişikliklerden büyük ölçüde etkilenebilmektedir. Küresel ısınma sonucunda Leishmaniasis hava ısısının kum sineğinin üreme mevsimlerinin uzamasına yol açan rakım olarak daha yüksek bölgelere ve kuzeye doğru yayılacak gibi görünmektedir[36].

Bazı doğu ve güney Akdeniz bölgelerinde insan hareketlerine bağlı büyük çaplı çevresel değişiklikler oluşmaktadır. Nüfus artışı, şehirleşme, politik karışıklıklar, Filistin ve İsrail'i büyük ölçüde etkilemektedir. Son raporlara göre *L.tropica* bu bölgelerde hızla yayılmaktadır. Moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla İsrail'de birbirine komşu iki *L.tropica* endemik bölgesinde vektörlerin ve parazitlerin genotiplerinin farklılığı ortaya çıkarılmıştır [37].

Aynı durum komşu lkelerimizde yaşanan iç savaş ve gler sonucunda ülkemizi de etkisi altında bırakmaktadır.



Şekil 2.4 Ülkemizdeki dağılımı [38].

Ülkemizde Şanlıurfa ilinde endemik bir hastalık olan KL, mevsimsel açıdan daha çok Ekim ile Aralık aylarında, 10-19 yaş aralığında olan kadınlarda, vücudun açık olan bölgeleri olan kafa, kol ve bacaklarda rapor edilmiştir [39].

2.5 Leishmaniasis Hastalığının Kliniği ve Tedavisi

Parazit polimorfizminin enfeksiyonun sonuçlanmasında önemli rolü olduğu bildirilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, parazit genotipinin tür içi düzeyde bile hastalığı etkilediğini göstermiştir. Kolombiya’da belirli *L. braziliensis* suşlarının insanlarda daha çok mukozal yayılıma neden olduğu bildirilmiştir[43]. Diğer bir çalışmada da “randomly amplified polymorphic DNA” (RAPD) yöntemiyle birbirinden farklı gruplara ayrılan parazit genotipleri ile oluşan klinik hastalık (KL, MKL, DKL gibi) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu saptanmıştır [40].

Bu hastalığın tedavisine bakılacak olursa; KL sıklıkla kendiliğinden iyileşir. Ancak, derideki lezyonlar görünümü bozacak şekilde ise veya VL’de tedavi endikasyonu vardır. VL’de ilk seçilecek tedavi organik antimon bileşiği olan sodyum stiboglukonat ve meglümin antimonattır. Çeşitli araştırmacılar [23] sodyum stiboglukonat ve meglümin antimonatın günde 20 mg/kg dozda 20-30 gün süre ile yavaş intravenöz kullanılmasıyla tedavide başarılı olunacağını bildirmişlerdir. Dirençli vakalarda pentamidin isetiyonat

kullanılabilir. 1-4 ay süresince 12 saatlik periyodlar ile oral yolla günde 10-20 mg/kg dozda alınan Allopürinol'ün de tedavide başarılı olabileceği bulunmuştur. Amfoterisin-B 0,75-1,0 mg/kg dozunda 15 gün süre ile infüzyon şeklinde kullanılarak, tek başına antimon bileşiğine yanıt vermeyen VL'de onunla birlikte ya da ondan sonra kullanılır. Pentamidin ve amfoterisin-b içeren ilaçların toksik etkileri fazla ve bununla beraber pahalı olduklarından kullanımları kısıtlıdır. KL'de flukanazol ve ketokonazol da kullanılabilir. Ketokonazol oral yolla günde 3 defa 200 mg ile 4 hafta süreyle kullanılır. 60 yıldan uzun süreden bu yana Sb (V) tuzları bütün Leishmania formlarında ilk kullanılan tedavi ilaçlarıdır [41].

Leishmaniasisde tedavinin başarısızlığı genellikle hastanın ilacı kullanmaması ya da ulaşamamasına bağlı olsa da Leishmania spp. parazitlerinin başta antimonlar Sb (V) olmak üzere kullanılan ilaçların çoğuna direnç geliştirdikleri de bilinmektedir. Hindistan'da VL'de Sb (V)' ye > %60 primer yanıtızlık oranı saptanmaktadır. Akdeniz Bölgesi'nde kitle tedavisi uygulanan L.infantum ile enfekte köpeklerde Sb (V)'ye düşük hassasiyet görülmekte ve Sb(V)'ye yanıt vermeyen insan VL olguları bulunmaktadır [41]. KL'de antimon tedavisindeki başarısızlık dirençli parazit suşlarını göstermektedir. Evrimsel olarak farklı türlerden ilaca dirençli suşların bildirilmesi parazitin ilaca paralel ve karşıt mekanizmalarla adapte olduğunu düşündürmektedir [42].

2.6 Leishmaniasisin İmmünitesi

2.6.1 İmmün Sistem

Patojen mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyon hastalıklarına karşı koyma görevini üstlenen immün sistem, vücudun doku, organ ve sistemleriyle bir bütünlük halindedir. İmmün sistem lenfosit adı verilen hemopoetik hücre kökenli olan hücrelerden oluşmakta olup bu hücreler çeşitli enfeksiyonlara karşı savunma sistemi şeklinde görev yapmaktadır. Lenfoid dokularda, lenf sisteminde ve dolaşımda yer alan bu hücreler, vücudun herhangi bir patojenik özellik gösteren bir yapıyla karşılaşması sonucu aktif hale gelir [13]. İmmün sistemin çeşitli patojenlere karşı sahip olduğu temel iki mekanizma vardır : Doğal İmmünite ve Adaptif İmmünite [14].

2.6.1.1 Doğal İmmünite

İlk savunmayı temsil eden ve spesifik olmayan yanıt özelliğini taşır. Deri ve müköz membranların fiziksel bariyerleri, kan ve dokularda bulunan fagositik hücreler (makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, doğal öldürücü hücreler (natural killer hücre= NK), akut faz proteinleri, sitokinler ve kompleman sistemi doğal immün sistemin başlıca elemanlarıdır. .. Doğal bağışıklık yanıtları enfeksiyonlara karşı erken savunma sağladığı gibi, enfeksiyona yol açan yabancı maddelere karşı gelişen adaptif immün yanıtların oluşmasında da görev alırlar [15].

2.6.1.2 Adaptif İmmünite

Antijene spesifik oluşu ve hafıza oluşturmaları bakımından iki belirgin özelliğe sahiptir. Adaptif immün yanıtın değişik tipteki mikroorganizmalarla savaşmak üzere özel mekanizmaları mevcuttur. Adaptif immünitenin bileşenleri lenfositler (B ve T hücreleri), antijen sunan hücreler (makrofajlar, B hücreleri, dendritik hücreler) ve plazma hücreleri (farklılaşmış B hücreleri) gibi hücrelerdir [15]. Yabancı bir ajan ile karşılaşmada uyarılarak spesifik yanıt veren, aynı ajanla tekrar karşılaşmada hafızası olduğundan, tanıyıp daha kuvvetli yanıt veren bir sistemdir. Adaptif immün cevabın iki ana alt yanıt sınıfı vardır. .Antikor ve T hücreleri ile uzun süreli bir bağışıklık sağlarlar. Bu iki alt sınıf adaptif immün yanıtın iki ana hücre grubu tarafından yönetilir. Antikor bağımlı humoral yanıtta, B hücrelerinden üretilen antikorlar vasıtasıyla hücre dışı (humoral sıvı vs.) patojenler, hücre bağımlı immün yanıtta ise T lenfositler vasıtasıyla hücre içinde yaşayan patojenler yok edilir. Adaptif immünitenin humoral yanıt aşamasında antikorlar dolaşıma ve diğer vücut sıvılarına salgılanırlar. Vücut sıvılarında bulunan antikorlar özel olarak üretildikleri toksin, antijen, patojen ve virüs benzeri yapılara bağlanarak bu patojenlerin etkisiz hale getirilmesini veya immün sistem hücreleri tarafından fagosit edilmesini sağlarlar [16].

Antikorlar, B hücrelerinin aktivasyonu antijene özgül hücrelerin çoğalması ve antikor salgılayan efektör hücrelere dönüşmesi ile üretilirler. Birincil yanıtta periferik lenfoid organlardaki naif B hücreler, antikor salgılayan hücrelere ve bellek hücrelerine farklılaşmak ve çoğalmak üzere aktive olurlar. İkincil yanıtta ise, bellek hücreleri hızlı bir

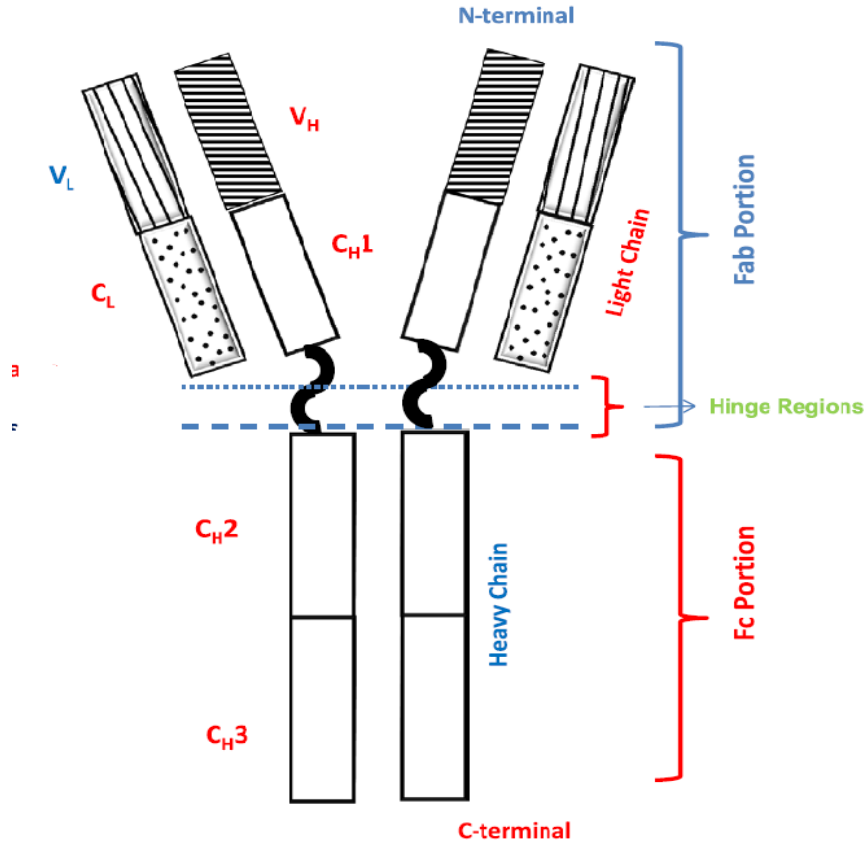
şekilde aktive olurlar. Bazı antikor salgılayan plazma hücreleri ise kemik iliğine göç ederek burada uzun süre yaşayabilir. Daha sonra protein yapısındaki antijenlerle tekrarlanan karşılaşmalar yüksek antijen afiniteli antikorların üretimine neden olur [43].

2.7. Antikorlar (İmmünoglobulinler)

Antibodies are one of the most important components of humoral immune response. They protect a host against infections. Plazma ve serumda bulunan, antikor olan globular protein grupları immünoglobulinler olarak bilinmektedir. Her antijene özgü özgül antikor oluşumu gerçekleşir. Antikor ve immünglobulin kelimelerinin kullanımı literatürde birbirleri yerine geçebilmektedir. İmmünglobulin terimi, antikora bakılmaksızın antijen bağlama özgüllüğü yerine kullanılabilir. Antikorlar B lenfositleri tarafından Y-şeklinde üretilen moleküllerdir. B lenfositlerinin terminal ucu, immünoglobulin ürünlerinin büyük kaynak bölgesidir. İmmünoglobülinlerin protein bölgelerinin %90-95'i benzerlik gösterirken; değişkenlik gösteren kısım aminoasit kalıntılarının olduğu %5-10'luk kısmı içermektedir [44].

2.7.1 Antikorların Yapısı

Her immunoglobulinin benzer yapıda olmasına rağmen; kendine özgü hassasiyeti vardır. Oligosakkarit gruplarına kovalent bağ ile bağlanmış, ikisi özdeş ağır zincir (H) ve iki özdeş non-glycosylated (L) hafif zincirden oluşur. Bir disülfid bağı ağır zincir ve hafif zinciri bir arada tutar. Disülfid bağları *hinge* adı verilen alanlarda konumlanmışlardır. Bu 12 aminoasitlik bölge, kimyasal veya enzimatik bölünme sonucu ortaya çıkmıştır. Küre biçimindeki her bir alan polipeptidlerin katlanmasıyla formunu oluşturmuştur. Dört polipeptid zinciri de sabit "C" ve değişken "V" bölümler içerir. Ağır ve hafif zincirler bir V bölümüne sahiptir. Hafif zincir aynı zamanda bir C bölümüne sahiptir. Ağır zincir ise üç C bölümü içerir. Ağır ve hafif zincirlerin her ikisindeki V bölümü de iki özdeş antijen bağlama alanı bulundurur (bu alan antikorun antijene bağlandığı alandır). Antikorda plasental transport veya antijen bağlanmış hücreler toksikler gibi önemli fonksiyonların gerçekleştiği yapısal kısım immunoglobulinin Fc bölümüdür [43].



Şekil 2.5 Antikor Yapısı [46]

2.7.2 Antikor İzotipleri ve Fonksiyonlar

Memelilerde IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM olmak üzere 5 sınıf antikor bulunmaktadır [47]. İmmunoglobülinlerdeki Ağır (H) zincirlerinin yapısı o immunoglobülinin tipini belirler.

IgG: sekonder immün yanıtta en baskın olarak görülen, fetusa geçerek fetusun pasif olarak bağışıklanmasını sağlayan tek immünoglobülin tipidir ve serum antikorlarının yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır. IgG sahip olduğu gama sabit zincirinin izotiplerine göre; IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 olmak üzere 4 alt sınıfa ayrılmaktadır. IgG ayrıca lökositlerde bulunan Fc reseptörleri vasıtasıyla opsonizasyon, kompleman bağlanması ve fagositlerin aktifleştirilmesi gibi işlevlerde de iş görmektedir [47], [48], [49].

IgA: Mukozal immün sistemin antikor tipidir ve genellikle virüslere karşı etki mekanizmasında iş görürler. Antikorları dimer yapısında olduğundan dolayı yapısındaki H ve L zincirleri daha çok sayıdadır.

IgM: Çoğu antijene karşı oluşturulan erken immün cevabın baskın antikor tipidir. Aynı zamanda B lenfositlerinin yüzeyinde pentamerik yapıda reseptör olarak bulunmaktadır. Aktifleşen B hücrelerince salgılanan ilk antikor tipidir. B hücreleri daha sonra sınıf değişimi yaparak diğer tip antikorları salgılamaya başlarlar.

IgD: IgD serumda çok az miktarda bulunan monomer yapıda bir antikordur. IgM ile birlikte B lenfositlerinin yüzeyinde de bulunmaktadır. IgD nin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte B lenfositlerinin gelişimleri ve farklılaşmaları sırasında görev aldığı ileri sürülmektedir.

IgE: Genel olarak alerjilerden sorumlu antikor tipidir. IgE mast hücrelerinin reseptörlerine bağlanarak antijeni ile bağlantı kurduğu hücrenin üzerine mast hücreleri tarafından degranülasyon yapılmasını sağlar. IgE tipi antikorlar genelde hücre dışı parazitik enfeksiyonlara karşı etkilidir. IgE moleküllerinin Fc bölgeleri dokulardaki mast hücrelerinin ve kandaki bazofillerin Fc reseptörüne yüksek afinite ile bağlanır. Antijenin bağlanması bu hücrelerin çok çeşitli sitokinler salgılamalarını ve biyolojik olarak aktifleşmelerini sağlar [50], [51].

2.8 İmmün Sistemin Leishmaniasisteki Rolü ve Leishmaniasise Karşı İmmün Cevap

Paraziter enfeksiyonlar boyut bakımından diğer patojenlere göre daha büyük olmaları sebebiyle çok sayıda antijen içeriğine sahiptirler. Bu nedenle hem hücresel hem de antikor yanıtını uyarabilirler ancak bunlardan hangisinin etkili olacağı parazitin kendisi ve enfeksiyonun evresi ile belirlenir. İçerdikleri antijenler zamanla değişiklik gösterebilir. Bu tür antijenik değişimler enfeksiyonun içinde bulunduğu evreyle ilişkili olduğu için, bir evrede üretilen antikorlar diğer evredeki paraziti etkilemeyebilir [52].

Leishmaniasise karşı oluşan direncin T hücreleri aracılığıyla immün yanıt oluşturduğu bilinmekte olup; bunu destekleyen çalışmalarda Leishmania enfeksiyonu öncesi farelerin T hücreleri hasara uğratarak, parazite karşı direnç oluşturup oluşturmadıkları incelenmiştir. Hasarlı hücrelerde enfeksiyon sonrası bu hayvanlarda direnç oluşmazken; T hücrelerinin transferi ile direncin tekrar oluştuğu tespit edilmiştir. Aynı çalışma B lenfositleri eksik olan hayvanlarda enfeksiyon sürecinin etkilenmediği görülmüştür. Anti- IgM ile antikorların baskılanmasının enfeksiyonun seyrinde herhangi

bir etki yaratmadığına ait de çalışmalar bulunmaktadır [53]. CD4+ taşıyan T hücreleri dirençte; CD8+ markırı taşıyan T hücreleri ise hafıza olaylarında etkilidir. Aynı zamanda bu markırların *L.major* türünde dirençte de rol aldığı literatürde belirtilmiştir. İnsanda KL'e karşı direncin, yardımcı T hücreleri aracılığıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. IFN- γ üreten hücrelerin yoğun olduğu KL vakalarında iyileşmenin süregeldiği gözlenirken ; kronik ve mukozal lezyonlarda Th1 ve Th2 hücrelerinin fazla olduğu ve IL-4 ve IL-10 üretiminin gerçekleştiği görülür. Bu moleküllerden IL-4'ün artışı VL'de hastalık seyri miktarca artış gösterdiği, iyileşme döneminde ise IFN- γ ve IL-4'de anlamlı azalmalar saptanmıştır[54].

Makrofajların *Leishmania* enfeksiyonunda özgül hücresel yanıt düzenlenmesinde ve antijen sunumunda önemli rol üstlenmektedir[55]. T hücreleri tarafından salınan IFN- γ lenfokininin parazit içeren makrofajları uyardığı bilinmekte ve makrofajlardan NO salgılatarak hücre içindeki parazitin ölümüne neden olmaktadır. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF α), IL-4, IL-3, IL-7 gibi sitokinlerinde makrofajların antimikrosidal etkilerinin arttırdığı bildirilmiştir [56]. Sitokinlerden IL-4'ün, Th-2 hücrelerinden salınan IL-10 ile birlikte makrofajların fonksiyonlarını azaltan etki yarattığı gösterilmiştir. Uyarılmış T hücreleri aynı zamanda yüksek miktarda makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF) mRNA'sı ve proteini eksprese ettikleri tespit edilmiştir [57]. KL'de epidermis lezyonlarında ICAM-1 sunulumu yetersiz olmakla beraber, bu hastaların langerhans hücrelerinde ve keratinositlerinde MHC II sunulumunun olmadığı tespit edilmiştir. MKL'de ise ICAM-1 ve MHC II sunulumu artmıştır, aynı zamanda langerhans hücrelerine rastlanmamıştır. KL'de düşük CD4/CD8 ve hafıza/naif T hücre oranı, az sayıda gamma delta hücreleri olduğu gözlenmiş ve LFA-1 yönlendiren reseptör sunumunda ise bozukluk saptanmıştır [58]. Aynı zamanda Leishmaniasisde etkili bazı moleküllerin parazitin lenf nodlarında, deride ve dalakta kontrol edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Bunlardan bir tanesi; patern tanıma reseptörleri olarak geçen Toll-like reseptörler (TLR) , antijen sunumunda görevli olan miyeloid ve plasmastoid dendritik hücreler, sitokinlerden özellikle IL-12 ve IFN- β , aynı zamanda sinyal ileti yollarından Tyk 2 sinyalinin parazitin ilk kez yabancı olarak algılanmasında ve parazite

karşı etkin bir doğal öldürücü hücre (NK) yanıtı gelişmesinde önemli olabileceğini ortaya koymuştur [59].

2.9 Leishmaniasis'in Laboratuvar Tanısında Kullanılan Yöntemler

Duyarlı ve avantajlar sağlayan kimliklendirme metodları, tanı ve tedavide önemli bir faktör olmakla beraber, bu hastalığın tanısında uygulanan yöntemler arasından altın standartların tümünü barındıran metod henüz geliştirilememiştir. Ülkemizde VL ve KL tanıları klasik olarak kemik iliği ve deri lezyonundan hazırlanan Giemsa boyalı yayma preparatların mikroskopik olarak incelenmesi sonucu koyulmaktadır. Parazit izolasyonu için mikrokültür ve NNN agar yöntemi tercih edilmektedir. Belirli tanı merkezlerinde In-house olarak hazırlanan IFAT yöntemi kullanılırken, hızlı tanı kiti olarak da rk39 testi, aynı zamanda çeşitli moleküler yöntemlerde henüz araştırma amaçlı kullanılmaktadır [60].

Bu yöntemleri başlıklar halinde sıralayacak olursak; mikroskopik, klasik kültür, yeni mikro kültür, moleküler ve serolojik yöntemler olarak ayrılabilir. Ancak bu yöntemlerin herbirinin avantajlarının yanında çeşitli dezavantajları bulunmaktadır.

2.9.1 Mikroskopik Tanı Yöntemleri

Mikroskopik yöntemler özellikle MKL ve KL'de altın standartlara sahip olmalıdır. Burada kullanılan yöntemler arasında smear ve aspirat biyopsilerinin Giemsa boyamalı preparatları, lezyon biyopsisinin histopatolojik incelenmesi ya da triturat veya aspirat biyopsi kültürleridir. Mikroskopik yöntemlerde duyarlılık örneğin içerdiği parazit sayısına bağlı kalmakta olup, ayrıca bu yöntemlerin uygulanmasında deneyimli personele gereksinim duyulmaktadır. Bunun yanı sıra dezavantajlar arasında bu yöntemlerin pahalı ve endemik bölgelerdeki sağlık düzeylerinin birincil, ikincil ve üçüncül olarak nadiren sınıflandırma sistemine sahip olması yer almaktadır [61].

2.9.2 Kültür Yöntemleri

Kültür yöntemleri tür tayini ve karakterizasyonda bilgilendirici bir yöntem olmasına rağmen; pahalı, zaman alıcı, teknik destek ve uzmanlık gerektiren tanı yöntemlerinden biridir. Bu yöntemlerin hassasiyeti düşük olmakla birlikte, biyopsi örneklerindeki

parazit sayısına, dağılımına, teknik bilgi ve uygulayan kişinin becerisine oldukça bağlıdır[62]. Dezavantajlar arasında ayrıca, teşhis için örnek alınması invaziv olarak gerçekleştirilmekte ve örnekler dalak, karaciğer ve kemik iliğinden alınmaktadır. Bu işlem ise bazı komplikasyonlara yol açmaktadır. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda, duyarlılığının örnekteki parazit sayısına bağlı olarak azaldığı ve tanı koyulabilmesi için uzun sürelerle gereksinim duyulduğu (1-6 aya kadar) rapor edilmiştir.

NNN (Novy-MacNeal-Nicolle Medium) Agar Kültür Yöntemi

Elde edilen örnekler %15 tavşan kanı içeren NNN Agar besiyerine ekimi gerçekleştirilir ve 27°C'de inkübe edilir. NNN agar besiyerinin hazırlanması için 15-20ml defibrine edilmiş tavşan kanı alınır. 4,5 gr Bacto Agar 100ml distile su ile karıştırılır ve 20 dakika 121°C'de otoklav edilir. Otoklav sonrası agarın sıcaklığı 50°C'ye düşünce, agara 250µl gentamisin ilave edilir ve karıştırılır. Cam tüplere dökülen agar eğik konumda soğumaya bırakılır. Hazırlanan tüpler 10 dakika 37°C'lik etüvde bekletilir. Sonrasında buzdolabında (+4°C) muhafaza edilir.

Kutanöz leishmaniasisin tanısında kullanılan bu kültür yöntemde sıvı bir medyum içerisinde hareketli promastigotların gözlenebilir olabileceği kapalı bir sistem olması bu yöntemin avantajları arasında yer alır. Dezavantajları arasında 15-30 günlük inkübasyon sürelerinin pozitif reaksiyonlar için gerekli olması yer almaktadır[63], [64], [65].

Mikrokültür Yöntemi

Allahverdiyev ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları mikroaerofilik niş içerisinde parazit gelişiminin ve tanısının incelendiği bir kültür yöntemidir. Aspirasyon yöntemi ile alınan lezyon örnekleri steril %15'lik FBS çeren RPMI ya da Schneider Drosophila medium içerisine 1:1 oranında aktarılır. Steril edilip kurutulmuş mikrohmatokapiler tüpler içerisine bu örneklerden yaklaşık 25-50ul alınarak inoküle edilir ve kapiller tüplerin ağzları eritilmiş mum ile kapatılır. Kapiler tüp içerisinde hava kalmamasına dikkat edilir ve bu tüpler 27 °C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılır. NNN agar yöntemi ile karşılaştırmalı olarak incelenen mikrokültür metodunun daha kısa sürede daha duyarlı olduğu saptanmıştır [7].

Lezyonlardan Yayma Hazırlanması

Elde edilen örnekler, lamaların üzerine yayılarak kuruması için beklenir. Kuruduktan sonra lamalar fiksasyon amacıyla metanolde bekletilir. Fiksasyon işleminin ardından lamalar 20-25 dakika %10'luk giemsa boyası ile muamele edilir. Son olarak lamalar su ile yıkanır ve üzerine immersiyon yağı eklenerek invert mikroskop altında incelenir.

2.9.3 Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler arasında izoenzim elektroforezi, polimeraz zincir tepkimesi (PZT), gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi (GZ-PZT), kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi yöntemi (RFLP) yer almaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu leishmaniasis tanısında spesifik yöntem olarak bilinmektedir. Ancak bu yöntemin dezavantajı örnekte parazit sayısı az olduğundan duyarlılığın azalması ve ayrıca hastada bulunan ölü parazit DNA'sından dolayı yanlış pozitif sonuç verebilmesidir. Ayrıca bazı kültür pozitif asemptomatik örneklerde PCR negatif sonuç verebilmektedir. Gerekli ekipmanların yanı sıra uzmanlık gerektiren ve pahalı olan tanı yöntemlerinden biri olup, yüksek duyarlılığın elde edilebilmesi için çeşitli standartizasyon ve optimizasyon yöntemlerinin tam olması gerekmektedir [66]. PZT teknolojisi, akut KL hasta örneklerinde %86-95 duyarlılık gösterir iken; kronik hasta örneklerinde bu duyarlılık %45,5'lere düşmektedir [67], [68]. ML hasta örneklerinde ise bu yöntem %50-70 duyarlılık göstermektedir [69].

2.9.4 Serolojik Yöntemler

Spesifiklik ve duyarlılık açısından KL ve MKL tanı yöntemleri arasında sıklıkla kullanılan yöntemlerdir[18 diagnosis children]. Montenegro cilt testi epidemiyolojik yayılım gösteren KL vakalarında oldukça yüksek duyarlılık arz etmiş bir test olarak kayda geçmiştir ancak; enfeksiyonun önceye ya da şüana ait olup olmadığıyla ilgili hatalı sonuçlar vermektedir [47].

Leishmaniasis tanısında; Enzim-bağlı immünassay (ELISA) testi, western blot(WB), rk39 immünkromatografik tanı testi (ICT), İmmünfloresan antikor testi (IFAT), gibi serolojik yöntemler de kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin temel prensibi, hasta serumunda veya idrarında parazite karşı oluşan antikor veya antijenlerinin belirlenmesine dayanan invaziv olmayan yöntemler olmalarıdır [70], [71], [72], [73], [74].

Serolojik yöntemler temel olarak parazitin yüzey antijenlerini hedef alan primer veya sekonder monoklonal antikor temelli olarak geliştirilmekte ve erken tanı için büyük bir avantaj sağlamaktadır. Fakat, Leishmaniasis'in tanısında kullanılan monoklonal antikorlara dayalı tanı kitleri yalnızca Visseral Leishmaniasis'in teşhisine spesifik olup Kütanöz Leishmaniasis'in tanısında yetersiz sayılmaktadır. KL tanısında ELİSA sistemine dayalı duyarlılığın %20'den düşük olduğu rapor edilmiştir [23]. Ticari olarak satılan rK39 KalazarDetect hızlı testinde de 20ul serum örneği buffer ile karıştırılarak pedin üstüne mikropipet yardımı ile koyulur. İki bant görülmesi durumunda bu serolojik testin pozitif reaksiyon verdiği anlaşılır; sadece kontrol bandının varlığı negatif sonuçlanmasına işaret eder [75]. Farklı titrelerdeki serum örneklerinde yer alan IgG antikorunun, la yüzeyine tespit edilmiş *Leishmania* parazitlerine karşı floresans mikroskop altında gösterdiği mikroskopik incelemeye dayalı bir sistemdir. Ateş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IFAT testinde 1/128 oranında dilüsyonu gerçekleştirilmiş kan bankasından alınan serum örneklerinde de immüno floresans etkiye dayalı ışımaya saptandığı tespit edilmiştir [75].

2.10 Poliklonal Antikor Teknolojisi

Poliklonal antikorların analitik, terapatik ve diagnostik önemi olan uygulamalara sahiptir. 1894 yılı gibi erken bir tarihten difteri gibi enfeksiyon etkenlerine karşı koruma amaçlı kullanılmışlardır. Afinite yetenekleri ve özgüllükleri poliklonal antikorların en değerli özelliklerini oluşturmaktadır. Poliklonal antikor üretiminde en önemli unsur hayvanda duyulan gereksinimlerdir. Büyük miktarda antiserum elde edebilmek için büyük hacimli hayvanlar gerekebilir. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanımı önerilen deney hayvan gruplarının başında kuşlardan tavuklar gelmektedir. Kullanım kolaylığı açısından tercih edilen fare, sıçan gibi memelilerde ise sürekli olarak antiserum miktarını arttırabilmek için yükseltgeyicilere ihtiyaç duyulur. Adjuvanlar, antijenlerin yavaş salınımına neden olarak bağışıklık yanıtının daha tutarlı olmasını sağlar. Poliklonal antikorların avantaj ve dezavantajları aşağıdaki gibidir:

- 1) Antiserum olarak bilinmektedirler.
- 2) B-lenfosit ürünleridir.
- 3) Hayvan kaynaklı olup sadece in vivo üretilirler.

- 4) Doğaldırlar ancak; başka antijenlere karşı çapraz reaksiyon gösterebilirler.
- 5) Üretimi güçlendirici tekrarlanan enjeksiyon gerektirirler.
- 6) Poliklonal antikor teknolojisi in vivo'da güçlü bir teknoloji olarak kabul gördüğünden sınırlı insan gücü gerektirir ve sofistike aletler olmaksızında üretilebilir.
- 7) Homojenizasyon açısından karışık olduklarından karakterizasyon işlemleri uzun süreçler gerektirebilir.
- 8) Polimorfizm ve glikolizasyon gibi epitop değişikliklerinden etkilenebilir.
- 9) Bozunmuş ya da denatüre antijenlerin tespitinde kullanılabilir.
- 10) Çeşitli hastalıklara özgü immünolojik testlerde yakalama olasılığı bakımından iyi bir seçimdir.
- 11) Pasif bağışıklığı sağlamak için kullanılabilir [46].

2.10.1 Poliklonal Antikorların Monoklonal Antikorlar ile Kıyaslanması

Poliklonal antikorların toplanmasından önce hayvanlara her seferinde güçlendiriciler vermek gerekmektedir. Bunların sakıncalarına karşı çözüm olarak monoklonal antikorlar keşfedilmiştir. Kohler ve Milstein tarafından bulunan monoklonal antikorlar, antikorların daimi kaynakları olmakla birlikte; tutarlılık, özgüllük ve afinite özellikleri sergilemektedirler. Monoklonal antikorların keşfi sadece immünoagnostik için değil sağlık bilimleri açısından da bir devrim yaratmıştır. Klinik tedavilerde, biyomedikal araştırmalarda ve endüstride yaygın uygulama alanı bulunmaktadır. Tek bir epitopa özgü oluşları açısından poliklonal antikorların dezavantajlarını ortadan kaldırmaktadır ancak; teknolojisi bakımından karakterizasyon ve saflaştırma işlemlerinde olağanüstü insan gücü ve hassasiyet gerektirmektedir [46].

2.10.2 Hibridoma Teknolojisi

20. yüzyılın son çeyreğinde in vitro antikor üreten hücrelerin ömürlerini uzatmak için çeşitli araştırma grupları farklı yöntemler üzerine çalışmışlardır. Bu hedeflere yönelik pratik çözümler fare hücreleri üzerinde test edilerek gerçekleştirilmiştir. Kohler ve Milstein (1975), başarılı bir melez hücre hattı için gerekli olan antikor üretme yeteneği

gösteren B-lenfositler ile sürekli bölünme yeteneğindeki kemik ilgi kanser hücresi olan myelomaları sendai virüs aracılığıyla füzyona uğratarak; in vitro koşullarda sürekli antikor üreten ve çoğalan hibrit hücre hattı elde etmişlerdir [76], [77], [78].

2.10.2.1 İmmünizasyon İçin Seçilen Hayvanların Özellikleri

6-8 haftalık antijene karşı etkinliği yüksek genç Balb/C türü fareler seçilir. 5-10 arası fare immünizasyon için yeterlidir. Fare antijene karşı antikor üretimini ortaya çıkarmak için antijen ile en az 3-4 kez immünize edilir. Cinsiyet ayrımı açısından dişi farelerin tercih edilme sebebi erkek farelere göre sosyal gelişim sürecinde daha uysal olmalarıdır.

2.10.2.2 Füzyon Çalışmalarında Kullanılacak Hücrelerin Özellikleri

Hibridomalar farklı türlerden elde edilen hücreler ile oluşturulabilmesine rağmen uygulanabilir hibridomaların sayısını arttırmak adına aynı türlerin hücrelerinin füzyona uğratılması antikor üretiminde de daha başarılı sonuçlar sağlar. Bu nedenle yaygın olarak kullanılan Balb/C türü farelerden elde edilen myelomalar ile aynı türe uygulana immünizasyon sonucu izole edilen B-lenfositler füzyona uğratılır.

Teorikte myeloma hücreleri ile B-lenfositleri füzyona uğratılırken herhangi bir füzyogen kullanılabilirken; pratikte polietilen glikol aracılığıyla yapılmaktadır. Peg'in ilk kullanımı Pontecorvo tarafından 1975 yılında gerçekleştirilmiştir. Peg bu iki hücre hattının plazma membranlarını birleştirerek iki ya da daha fazla çekirdek ile tek bir hücre oluşumunu sağlamaktadır. Mitoza kadar bu çekirdek yapısı korunur. Mitoz süresince kromozomlar arasında seçim gerçekleşirken eğer antikoru sentezleyen kromozom kaybedilirse; sürekli bölünme yeteneğinde ancak antikor üretmeyen hibrit hücreler oluşur.

İlk kez 1964 yılında Littlefield tarafından rapor edilen bilgilere göre; myeloma hücreleri genel olarak pürin nükleotid biyosentez enziminde bir mutasyona sahiptir. Myeloma hücrelerinde görülen en yaygın mutasyon purin biyosentezinde yer alan görevli bir enzimin hipoksantin fosforiboziltransferaz (HGPRT) mutasyonudur. Hücreler genellikle pürin ve primidin sentezi aracılığıyla DNA yaparlar. Bu iki maddeden birinin olmaması DNA sentezinin bloke olmasına neden olur ve hücreler ölür. Bu nedenle aminopterin

gibi ilaçlar de novo sentez nükleotid yolunu bloke ederek, hibridoma seçim sürecini çalışır hale getirir [79].

2.11 Adjuvanlar

Aşılanmanın nihai prensibi, enfeksiyon hastalıklarına karşı güçlü bir immün yanıt oluşturmaktır. Aşıda kullanılan adjuvanlar, immün yanıtı arttırmaya yardımcı olarak kullanılmaktadır. Adjuvan kavramı ilk kez Ramon tarafından 1926 yılında, abse yerine inoküle edilen adjuvanın yüksek antikor oluşturmaya ile gözlemlenmiştir. Genel olarak adjuvanlar çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır [80].

1. Doğal formunda herhangi bir antijenin bağışıklık yanıtını arttırabilir.
2. Koruyucu immünite için, çoklu immünizasyon protokollerini azaltır. Özellikle tek aşılama geliştirmek ve maliyeti düşürmek için kullanılırlar.
3. İmmün yanıtı baskılanmış yaşlı yetişkin veya çocukların bağışıklık tepkisini ortaya çıkarmak ve geliştirmek amacıyla kullanılır [81].

90'lı yılların sonlarına doğru alüminyum ve kalsiyum tuzlarını içeren, insanlar üzerinde kullanımı lisanslı olan birçok adjuvan geliştirilmiştir [81].

Aşılama da yeni bir dönem olarak kabul edilen MF 59 ve ASO4 kullanımı yardımcı madde olarak literatüre girmiştir [82]. Çünkü yüksek toksisiteye sahip hiçbir adjuvanın insan üzerinde kullanımı lisanslı değildir. Edelman'ın 1980'de yaptığı listeye göre iyi bir adjuvan toksisite, aşırı duyarlılık reaksiyonları, kanserojenlik ve teratojenite bakımından incelenmesi gerekmektedir. İdeal bir adjuvan, toksik olmayan, biyobozunur, ucuz, uzun raf ömrüne sahip ve immünolojik olarak inert, immün sisteme uygulanabilir ve destekleyici olmalıdır [83]. Adjuvanların etkinliği, uygulama yollarına göre farklılık göstermektedir. Örneğin; mukozal ve parental yollar. Bu sebeple, yeni vektörlerin, antijen taşıyıcı sistemlerin ya da adjuvan bileşiklerinin en uygun uygulama yolları belirlenmelidir [84]. Deri altı ve deri içi immünizasyonlar, kas içi yollardan daha çok uyarıcı etkiye sahip olmasına rağmen; bölgesel toksisiteye neden olduğu için daha çok kas içi immünizasyon uygulanmaktadır [85]. Literatürde kullanılmış ve hala kullanılmakta olan birçok adjuvan vardır. Bunlar; mineral tuzlar (alüminyum tuzu, alüminyum hidroksit ve alüminyum fosfat, kalsiyum tuzu, yağ emülsiyonları, immün

stimüle edici kompleks (ISCOM), bakteri türevleri, karbonhidrat adjuvanları, lipozomlar, sitokinler, virüs benzeri parçalar ve polimerik mikropartikül adjuvanlardır [86].

2.11.1 Freund's Adjuvanı

Yağ içinde su, su içinde yağ şeklinde olan emülsiyon adjuvanların başında gelen ve literatürde en sık kullanılan adjuvanlardan biridir. 1916 yılında Le Moignic and Piony, öldürülmüş *Salmonelle typhimurium* süspansiyonu ile mineral yağların emülsiyonunun immün yanıtı arttırdığını göstermişlerdir [87]. Emülsiyon adjuvanların mekanizması, infeksiyon bölgesini depolamasını içermesidir [88]. Plazma hücrelerinin antikor üretmesini stimüle eder. Bu adjuvanlar oldukça toksik olmakla beraber, önleyici tedavi aşılarında sıklıkla kullanılmaktadır. Freund ve arkadaşları, 1937, öldürülmüş *Mycobacteria*'yı parafin yağı ile karıştırarak Tamamlanmış Freund (FCA) ve *Mycobacteria* kullanmadan sadece parafin yağı ile hazırlanmış Tamamlanmamış Freund (FIA) olarak isimlendirilen iki çeşit adjuvan hazırladılar [89]. Freund's, enjeksiyon bölgelerinde depolanması, antijenin yavaş salınımı ve düşük immünomodülatör etkisi özelliklerine sahiptir. FIA formu, grip ve öldürücü çocuk felci aşısı gibi aşılarla kullanılsa da [90] enjeksiyon bölgesinde gralünom görülmesi karsinojenik etkisini göstermektedir [91], [92], [93]. FCA ise, *Mycobacterium tuberculosis* ile emülsiyonun kombinasyonu olduğu için TH1 ve TH2 için oldukça uyarıcı niteliktedir. Ancak bu maddelerin kombinasyonları aynı zamanda toksik olması yönünden dezavantaj içermektedir [94].

2.11.2 Polioksidonyum Adjuvanı

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, toksik olmayan yapılar olması sebebiyle ameliyat iplikleri ve ilaç taşıyıcı sistemler gibi yapılarda kullanılmaktadırlar. Biyouyumlu, doku ile ikincil reaksiyona sebep olmayan, biyobozunur, geçirgen, işlenmesi kolay ve *in vitro* koşullarda antijen stabilitesini sağlamaktadırlar [86]. Polimerik adjuvanlar, nanometre veya milimetre boyutlarındaki antijenlerin kontrollü salınımını yardımcı ideal yapılardır [95]. Tek dozu bile etkili olabilen, Freund's ya da alüminyum tuzları gibi depolama etkilerinden uzak, haftalar ya da aylara bağlı olarak antijenin kontrollü olarak salınımını sağlayabilen sistemlerdir. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılanlarından biri Polylactide co-glycolide (PLG) mikroartiküldür

[96]. Bu partikül antijen yüzeylerini absorblayarak antijen sunan hücrelere (APC) taşır [97]. Bakteriyal ya da viral antijenlerin tek başına yeterli yanıt oluşturmaması, sentetik polielektrolit tabanlı adjuvan sistemlerinin gelişmesine ve immün yanıtın artırılmasına sebep olmuştur. Bu yapıların konjugatlar ile ilgili etkili doz araştırmaları oldukça önemli olmakla beraber; toksik olmayan, 1,4-etilenpiperazin, 1,4-etilenpiperazin-N-oksit ve (N-carboxymethylene)-1,4-etilenpiperazinum üçlü kopolimeri yani PolioksidonyumTM geliştirilmiştir. Hemaglutinin ve nöroaminidaz, influenza virüsünün protein alt ünitesi, ile birlikte ile Polioksidonyum konjugatı, Rusya'da ilk kez olarak 50 milyon enfekte insan üzerinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Yapısında bulunan poliaminlerin toksik olma özelliklerine karşı, Polioksidonyum'un daha az toksik olmasının nedeni, N-oksit gruplarının bu toksisiteyi azaltmasıdır. Çünkü N-oksit pozitif yüklerin doğrusal yoğunluğunu düşürür [98]. Rusya'da yapılan bir çalışmada immünomodülatör olan Polioksidonyum'un lökositler ile in vitro ortamda 1 saatlik inkübasyonu sonucunda, *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerinde lökositlerin öldürücü etkisinin arttığı tespit edilmiştir. Bu arttırıcı etki , hem sağlıklı insanlardan alınan lökositler üzerinde hem de kronik granülomatoz hastalarından alınan lökositlerle denenmiştir. Polioksidonyumun antioksidan özellik gösterdiği dozu belirlenerek, lökositler üzerindeki kemolüminesans etkisi 1251 Lüminometre adı verilen cihaz ile ölçülmüştür. Bakterilerin Nitrik oksit (NO) bağlı olarak ölümünün arttığı, bakteriyosidal mekanizmaların O₂ aktivasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma kapsamında Polioksidonyum'un antioksidan etkisinin uygun konsantrasyonda söz konusu olabileceği ve NO gibi *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum* ve diğer patojenik organizmaların öldürülmesinde değerli olduğu ve bu bağlamda Polioksidonyum'un kullanımının uygun olabileceği öne sürülmüştür [99] .

2.12 Leishmaniasisde Hibridoma Çalışmaları

1982 yılında yayınlanan Leishmania türlerinin kimliklendirilmesinde kullanılan monoklonal antikorlara dayalı çalışmada farklı türler arasındaki çapraz reaksiyonlar incelenmiştir. Bu çalışmada immünizasyon aşamasında 7 haftalık Balb/C fareler intradermal olarak 5x10⁶ L.tropica(LRC-L137) promastigotları ile immünize edilmiştir.

40 gün sonra farelerde enfeksiyon bölgesinde ünser benzeri yaraların görülmesinin ardından intraperitoneal olarak 5×10^7 sıcaklığa maruz bırakılarak öldürülmüş parazit inoküle edilmiştir. 3 gün sonra dalak alınarak B-lenfosit izolasyonu yapılmış ve myeloma hücreleri ile 1:1 oranında PEG aracılığıyla füzyona uğratılmıştır. Seçici besiyerleri içerisinde gelişimleri gözlenen hibridoma hücrelerinin alt klonlama işlemleri yapıldıktan sonra uygun klonlar seçilerek daha çok üremesini sağlamak için farelere intraperitoneal ya da subkutanöz olarak inoküle edilmiştir. Enjeksiyon bölgesinde 10 ile 20 gün arasında tümör oluşumu gözlenmiştir. Bir kısım hibridomanın 0.5ml fetal dana serumu içeren %10luk dimetilsülfoksit (DMSO) aracılığıyla kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiştir. *L.tropica* paraziti yüzey antijenleri katı-faz radyoimmünoanaliz (RIA), Direkt olmayan immünofloresans antikor testi (IFAT) ile analiz edilmiş; ayrıca bu parazitlerin periton makrofajı enfeksiyonu test edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, üretilen hibridoma hücrelerinin parazitin hem promastigot hem de amastigot membran antijenlerine karşı antikor ürettiği RIA ve İFA testi ile tespit edilmiştir. Ancak üretilen antikorlardan dört tanesinin yalnızca enfekte makrofaj hücrelerine spesifik olduğu İFA ile belirlenmiştir. Kontrol olarak süpernatant örneklerinin myeloma hücreleri üzerindeki etkinliği de incelenmiş ancak; herhangi bir veri alınamamıştır. Promastigot kültüre subtilisin ve pronaz uygulanarak monoklonala tedavi ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca saptanan bu antikorların *L.tropica* dışında *L.mexicana*, *L.donovani*, *L.enriettii* ve *C.fasciculata* ile çapraz reaksiyonları incelenmiş ve *L.tropica*'ya karşı üretilen bu monoklonal antikorlar içerisinde diğer türlerle ortak olarak etkileşim gösteren üç monoklonal antikorun tespiti gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda tanımlanan monoklonal antikorlar makrofaj membranı üzerindeki leishmania yüzey reseptörleri ile antijen ilişkisinin daha detaylı aydınlatılmasında önem kazanmaktadır [100]. Bu çalışmanın ardından Leishmaniasise karşı antikor üretim çalışmaları artmıştır. Aynı yıllar içerisinde yapılan bir başka çalışmada da aynı immünizasyon süreçleri izlenmiştir. *L.mexicana amazonensis* 5×10^7 promastigot kültürü farelere 2. Ve 6. haftalarda ve sakrifikasyondan 4 gün önce inokule edilerek immünizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yanıt alınan farelerin dalakları alınarak B-lenfosit izolasyonu yapılmıştır. B-lenfositleri ile SP/2 myeloma hücreleri PEG aracılığıyla füzyona

uğrattılmıştır. Seçici besiyeri içerisinde gelişimlerini sürdüren hibridoma hücrelerinin kolonizasyonları gözlemlenerek ELİSA testi ile antikor tayinleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra yanıt alınan kuyuların alt klonlama işlemi yapılmış ve hemen ardından 24'lük well plakalar, kültür flaskları ve intraperitoneal olarak inoküle edilerek in vivo ortamda büyük ölçek üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca %5'lik DMSO içeren FBS'li ortamda kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda üretilen antikorların *L.mexicana amazonensis* promastigotlarına özgü olduğu hem ELİSA hem de İFA testi ile belirlenmiştir. Ayrıca İFA testinde antikorlar 1:200 oranında sulandırılarak tekrar incelenmiş ve hala immünofloresans ışına gösterdiği saptanmıştır. Üretilen antikor çeşitlerinin yalnızca promastigot kültürü üzerinde tkisi görülürken, amastigot kültürün yüzey antijenleri ile immünopresipitasyonu gerçekleşmemiştir. Bu nedenle amastigottan promastigota farklılaşma aşamasında bu antikorların etkinliğine bakılması bu makale kapsamında gerçekleştirilmiş ve farklılaşma üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. *L.mexicana amazonensis*'e karşı üretilen bu antikorum *L.tropica* karşı üretilenler ile aynı spesifik bölgeyi içerdiği raporlanmasına karşın [100] bu çalışma kapsamında İFA ile yapılan çapraz reaksiyon incelemelerinde ne *L.tropica*, *L.donovani*, *L.braziliensis* *braziliensis*'e karşı etkileşim gösterdiği ne de amastigotların promastigotlara farklılaşmasını etkilediği ortaya koyulmuştur [101]. 2004 yılında gerçekleştirilen *L.major*'un hem promastigot hem de amastigot formunda görülen ve yüzey antijenlerinden biri olan glikofosfolipid yapılı Antijen-2 molekülüne özgü monoklonal antikor üretilmiştir. Literatürde Leishmaniasise karşı hibridoma teknolojisine dayalı en güncel çalışma olmakla beraber, 1982 yılında yapılan bu alandaki çalışmalar ile immünizasyon aşamasında benzerlikler taşımaktadır. Bu çalışmada da immünizasyon işleminde 500ul 10^7 promastigot/ml literatürde sıklıkla kullanılan "Compleate Freund's" adjuvanı ile intraperitoneal olarak verilmiştir. 4 hafta sonra aynı miktarda antijen "Incomplate Freund's" ile birlikte fareler immünize edilmiştir. 4 hafta sonra ELİSA ile IgG analizi yapılarak 200ul son doz antijen intravenöz olarak inoküle edilmiştir. 3 gün sonra kurban edilen Balb/C farelerden B-lenfosit izolasyonu gerçekleştirilmiş ve SP2/0 fare myeloma hücreleri ile PEG 1500 aracılığıyla füzyona uğrattılmıştır. *L.major* antijenleri ile kaplanan ELİSA sonuçlarına göre seçilen

kuyulara iki kez kademeli seyreltme işlemi yapılarak alt klonlama gerçekleştirilmiştir. Bundan sonraki aşamalarda Tx-114 deterjanı ile muamele edilmiş *L.major* durağan ve logaritmik fazdaki promastigotların ayırma işlemi gerçekleştirilir. Pozitif reaksiyon veren alt kuyu süpernatantları, deterjanla yıkanan durağan ve logaritmik faz promastigot örnekleri ile aynı zamanda rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen gp63 ve *L.tropica*, *L.infantum* ve *L.major*'un aksenik amastigot formları arasında çapraz reaksiyon gösterip göstermedikleri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda üretilen antikorda 50,58, 80 ve 96 kDa ağırlıklarında dört polipeptit görülmüştür ki; bu polipeptitler ne rgp63 ne de *L. infantum* ya da *L.tropica* ile çapraz reaksiyona rastlanmamıştır. Yalnızca *L.major*'un durağan ve logaritmik fazındaki deterjan ile yıkanan antijenleri ve yine *L.major*'un aksenik amastigot formu ile reaksiyon verdiği saptanmıştır [102]. 1994 yılında İsrail'de gerçekleştirilen *L.major*'un integral membran proteini olan Antijen-2'ye karşı üretilen monoklonal antikorunda da 50,80 ve 96kDa'luk polipeptit yapılarına sahip olduğu ancak; bunların yalnızca *L.major*'e spesifik olmadığı aynı zamanda *L.tropica* ve *L.donovani* ile de etkileşime girdiği tespit edilmiştir [103]. Böylelikle bu çalışma kapsamında da özellikle Leishmaniasise karşı yapılan aşı çalışmalarında parazit komponentlerinin kimliklendirilmesinin oldukça önemli olduğu ortaya koyulmuştur. *Leishmania* promastigotlarının hücre yüzeylerinde yer alan moleküller, memeli konak hücrelerinde yer alan reseptör bölgelerine bağlanma ve enfeksiyon açısından kritik role sahiptirler. *Leishmania* parazitlerinin yüzey antijenleri incelendiğinde iki önemli sınıf yer almaktadır: glikofosfolipit yapısını içeren lipofosfoglikanlar (LPG) ki bunlar konak makrofajların enfekte edilmesinde bağlanma bölgelerini içermektedirler [104]. Bunların dışında ikinci sırada gelen yüzey molekülleri arasında glikoproteinler yer almaktadır. Özellikle *L.major*'den izole edilerek tanımlanmış yüzey proteazı olan Glikoprotein 63 (gp63) ve parazit yüzey antijeni-2 (PSA-2) önemli rollere sahiptir [103], [105].

3.1 MATERYAL

3.1.1 Ekipman

- Steril hücre kültür odası
- Hava akımlı kabinler (Laminar flow -Thermo Scientific Hera safe, Faster BH-EN 2006)
- Karbondioksitli inkübatör (New Brunswick scientific CO-150 37°C, FrioCell 111 25 °C)
- İnverted mikroskop (Olympus CKX41)
- Işık mikroskobu (Olympus)
- Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR3000)
- pH metre (HANNA instruments)
- Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
- Buz makinesi (Scotsman AF100)
- Vortex (LMS(laboratuvarı medical supplies) VTX-3000L)
- Su banyoları (GFL (gessellschaft für labortechnik) mbH, Kerman)
- Isıtıcı karıştırıcı (Heidolph instruments)
- ELISA çoklu plak yıkama cihazı (Thermo)
- SDS-PAGE jel elektroforez sistemi (Hoefer)
- Güç kaynağı (Hoefer)

- Dondurucular (Beko(+4,-20°C), Arçelik(+4,-20°C), GFL(-40°C))
- -195°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)
- Blotlama cihazı (Hoefer)
- Fraksiyon ayırım makinesi, (Fraction Collector BIO-RAD)
- 10, 50, 100, 1000 µl'lik mikropipetler (Thermo, Pippetman)
- 100,300 µl 'lik çok kanallı pipetler (Thermo)
- 1-10, 10-100, 100-1000 µl'lik tek kullanımlık pipet uçları (AxyGen)
- Santrifüj tüpleri -1, 2, 15, 50 ml. (Eppendorf , IsoLAB)
- ELISA 96 kuyulu plakları (TPP)
- Hücre kültürü plakları (TPP)
- Hücre kültür flaskları -25 cm², 75 cm² (TPP, Corning)
- Serolojik pipet tabancası (Thermo)
- Serolojik pipetler -1,5,10 ml (Blau Brand Germany)
- Steril pastör pipeti -3ml (LP ITALIANA SPA)
- 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)

- 1-2,5-5-10-50 cc'lik enjektör (Ayset)
- 0,22 µm ve 0,45 µm'lik şırınga filtreleri (MILLIPORE, TPP, Sartorius)
- Lateks eldiven (Broche)

3.1.2 Kimyasallar

- Anti-fare polyvalen-AP konjugatı(Sigma)
- Anti-fare IgG-AP konjugatı (Millipore)
- Protein ladder (low range) (Thermoscientific)
- Anti-fare polivalent immünoglobulin-AP konjugatı (Sigma)
- Freund's complete adjuvan (Sigma)
- Polioksidonium
- Hidroklorik asit, HCl (Riedel-de Haën)
- Protein G immün afinite kolonu (Sigma-P7700)
- BSA bovine serum albümin (Sigma)
- Tripan mavisi (Biological Industry)
- 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, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (merck)
- Sodyum klorür, NaCl (Sigma)
- Sodyum bikarbonat, NaHCO_3 (Merck)
- Glisin, (Fluka)

- Magnezyum klorür, MgCl_2 (Fluka)
- Çinko Klorür, ZnCl_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, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Disodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4 (Merck)
- KCl (Sigma)
- Akrilamid (Sigma)
- Trizma-Baz(Sigma)
- β -Merkaptoetanol (Fluka)
- EDTA (AppliChem)
- Bromofenol mavisi (aMReSCO)
- Sodyum dödesil sülfat (SDS) (Sigma)
- Sükroz (MERCK)
- Amonyum persülfat (MERCK)
- N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED) (Sigma)
- Metanol (Merck)
- Formalin (Sigma)
- Mouse immunoglobulin subisotyping Kit (Thermoscientific)
- Lumi-phos WB kemilüminesasn substrat (Thermoscientific)
- Tween-20 (MP Biomedicals LLC)

- Paranitrofenil fosfat (Sigma)
- RPMI-1640 (Fenol redli ve fenol redsiz) besiyerleri (GIBCO Invitrogen)
- HEPES (AppliChem)
- FBS-fetal bovine serum (GIBCO Invitrogen)
- Bis-akrilamid (Sigma)
- Tris (Sigma)
- DMSO (AppliChem)
- Gentamisin (GIBCO)

3.1.3 Deneylerde Kullanılan Tampon, Kùltür Ortamları ve Kimyasalların Hazırlanışı

3.1.3.1 Tamponlar

PBS Tamponu

8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 1,8 g Na₂HPO₄.2H₂O ve 2 g KCl tartılıp distile su eklenerek pH'ı 7,4'e ayarlandı, ardından 1 lt'ye tamamlanarak süzùldü ve otoklavlandı.

PBS-Tween 20 Tamponu

Hazırlanan fosfat tamponuna (PBS) %0,05 (hacim/hacim) olacak şekilde tween-20 eklendi.

Kaplama Tamponu (pH; 9,6)

1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃ ve 0,2 g NaN₃ tartılarak pH'ı 9,6'ya ayarlandı, ardından distile su ile 1lt'ye tamamlandı.

Bloklama Çözeltisi

100 ml kaplama tamponuna %2 (ağırlık/hacim) olacak şekilde yağsız süt tozu eklendi.

PBS/Tween20/süt tozu

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

Substrat Tamponu (pH:10,4)

0,02 g ZnCl₂, 0,04 g MgCl₂ ve 1,5 g glisin tartılarak distile su ile çözüldü pH; 10,4'e ayarlandı ve 200 ml'ye tamamlandı.

Substrat Çözeltisi

25 mg paranitrofenil fosfat 25 ml substrat tamponunda (pH:10,4) çözdürüldü.

Bloklama Tamponu

5 g yağsız süt tozu tartılarak % 0.05 tween-20 içeren (hacim/hacim) PBS ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.2 Besiyerleri**Kültür Besiyeri**

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

Seçici Besiyerleri

A) HAT; Hipoksantin aminopterin timidin (50X HAT) supplement (GIBCO) 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) supplement 1 lt besiyerine 10 ml. olacak şekilde eklendi. Kullanıma hazır ve ışık görmeyecek şekilde steril olarak +4°C'de muhafaza edildi.

Dondurma Besiyeri

%80 FBS, %10 RPMI-1640 ve %10 DMSO olacak şekilde hazırlandı.

3.1.4 Deneylerde Kullanılan Deney Hayvanları

Füzyon çalışmaları için istenen antijene olumlu immün cevap verebilen 6-8 haftalık dişi Balb/c fare ırkları hibridoma ve immünizasyon çalışmalarında lenfosit donörü olarak kullanıldı.

3.1.5 Deneylerde Kullanılan Hücreler

3.1.5.1 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 P3-X63-Ag8.653 myeloma hücre hattı kullanıldı.

3.1.5.2 Antikor üreten lenfosit hücreleri

Periyodik olarak immünize edilmiş Balb/c farelerin dalak lenfosit hücreleri füzyon çalışmalarında antikor kaynağı hücreler olarak kullanıldı.

3.1.5.3 Besleyici tabaka olarak fare periton makrofajları

Füzyon sonrası destekleyici katman olarak Balb/c farelerin periton bölgesinden izole edilen makrofaj hücreleri kullanıldı.

3.1.5.4 J774 makrofaj hücre hattı

Hibridoma hücrelerinin sınırlayıcı dilüsyonları sırasında destekleyici metabolit sağlayıcı olarak J774 makrofaj hücre hattı kullanıldı.

3.1.5.5 Antijen eldesinde kullanılan *Leishmania* parazitleri

İmmünizasyonda kullanılmak üzere antijen elde etmek amacıyla *L. tropica* (MHOM/TR/EP39) parazitleri hücre antijen kaynağı olarak kullanıldı.

3.2 Metot

- *L.tropica*'nın kültürünün büyük ölçek üretilmesi,
- Üretilen kültürden dondurup-çözme yöntemi ile antijen elde edilmesi,
- Adjuvan olarak kullanılan Freund's ve PO'nun antijen ile etkili kombinasyonlarının oluşturup hazırlanması,
- 6-8 haftalık Balb/c farelerine oluşturulan adjuvan-antijen komplekslerinin düzenli aralıklar ile immünizasyonu,
- Füzyon için literatürde uygun görülen P3-X63-Ag8.653 myeloma hücre hattının kültürü ve çoğaltılması,

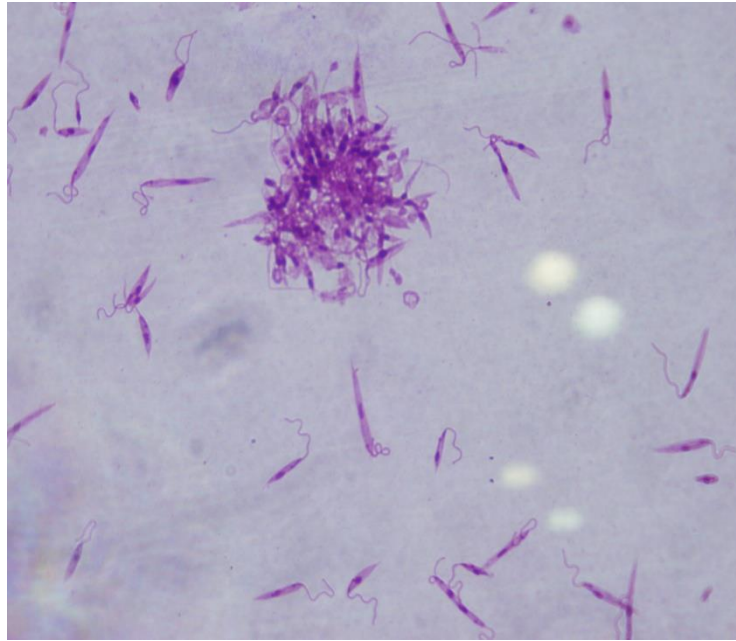
- J774 fare monosit tümör makrofaj kültürünün çoğaltılması ve hibrid hücrelerinin gelişimini desteklemek amacıyla kullanılması için metabolitlerinin toplanması ,
- İmmünizasyonun sonlandırılması sonucu deney hayvanlarından dalağın çıkarılması ve B-lenfosit izolasyonu,
- Farelerden alınan periton makrofaj hücrelerinin füzyon öncesi besleyici tabaka olarak plakalara ekilmesi
- PEG 1500 aracılığıyla, izole edilen B-lenfositlerinin ve myeloma hücrelerinin füzyonunun gerçekleştirilmesi,
- Füzyon sonucu oluşan hibridomaların seçici besiyeri içerisinde kültürünün yağılması ve belirli aralıklar ile ürettikleri poliklonal antikor yanıtlarının ELİSA yöntemi ile tespit edilmesi,
- Leishmania antijenine karşı ELİSA sonuçlarında pozitif yanıt veren kuyucukların seçilmesi sonucu kolonizasyonunun izlenmesi , çoğaltılması, alt klonlamasının yapılması ve kriyosunun gerçekleştirilmesi,
- Kriyoprezervasyon sonrası pasaj sayısına bağlı olarak değişen antikor yanıtlarının tespiti,
- Üretilen poliklonal antikorların farklı leishmania türlerinden hazırlanmış antijen kaplamaları ile etkileşimin incelenmesi

3.2.1 *Leishmania tropica*'nın Kriyobanktan Çıkartılması, Kültürünün Yapılması ve Devamlı Kültürünün Elde Edilmesi

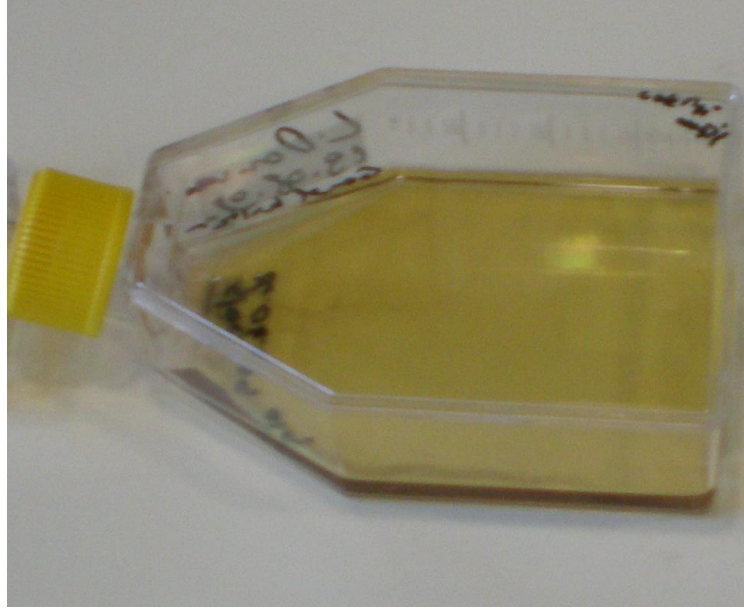
Laboratuvarımızda bulunan daha önce kültürü yapılmış ve kriyobankta saklanan Kütanöz Leismaniasis etkeni *L.tropica* promastigotları, sıvı azottan (-196 °C) çıkartılarak hızlı bir şekilde 37 °C'de çözündürüldü ve içerisinde 5 ml %10 FBS'li RPMI 1640 (GIBCO) besiyeri bulunan flaska (25 cm²) aktarıldı. Parazitlerinin kültürü 27 °C soğutmalı etüvde yapıldı. Parazitlerin gelişimi, hareketliliği ve morfolojik durumu ters mikroskopta günlük olarak incelendi. Aynı zamanda kültürün kontaminasyon kontrolü gerçekleştirildi. Bu

amaçla kültür ortamından alınmış örnekler kanlı agara ve sabouraud agara ekim yapılarak kültürün bakteri veya mantarla kontamine olup olmadığı kontrol edildi. 2-3 haftalık takip sonucunda, kültürde *Leishmania* parazitleri dışında bakteri ya da mantar kontaminasyonunun olmadığı belirlendi.

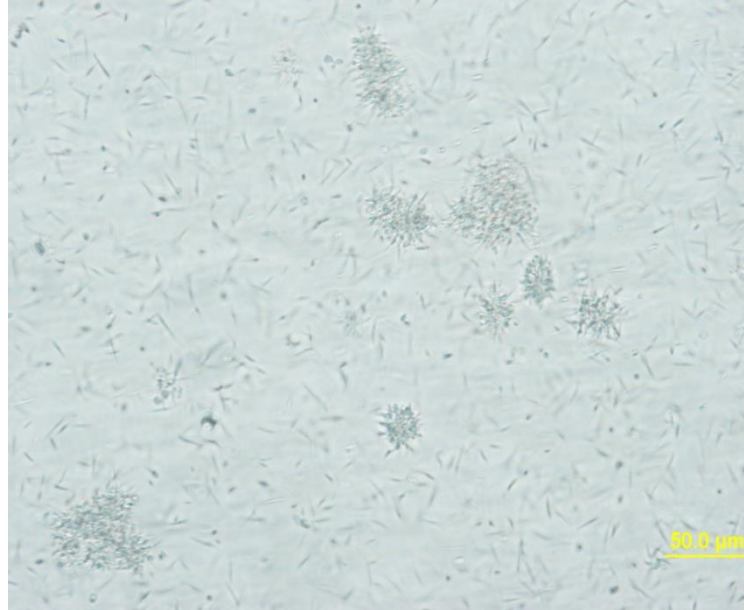
Mikroskopik inceleme sonucunda, parazitler kültüre alındıktan bir hafta sonra promastigotların kültür ortamına adapte oldukları ve hızla çoğaldıkları gözlemlendi. Thoma lamı kullanılarak yapılan sayım sonrası, $5-8 \times 10^6$ parazit/ml sayısına ulaşan *L.tropica* promastigotlarının bir kısmı aşağıdaki protokole göre donduruldu. Geri kalanı da büyük ölçekli kültürde kullanıldı.



Şekil 3.1 *L.tropica*'nın (MHOM/ TR/EP39) promastigot formu (Giemsa boyama, x100)



Şekil 3.2 *L.tropica* promastigot kültürünün 75 cm²'lik flasklarda kültürünün yapılması



Şekil 3.3 Kültür ortamında bulunan promastigotların invert mikroskoptaki görüntüsü (20X)

3.2.2 Parazitlerin Kriyoprezervasyonu

RPMI 1640 besiyeri ortamına adapte olmuş kültürden elde edilen parazitler invert mikroskop ile incelendikten sonra, thoma lamında sayımları gerçekleştirildi ve ml 'de 10^6 parazit olacak şekilde süspansiyon halindeki kültürden 1,8 ml alınarak kriyotüpe aktarıldı ve üzerine 0.2 ml steril DMSO yavaşça eklendi. Kriyotüpler 1 saat 4 °C'de, 24 saat -40 °C'de bekletildikten sonra sıvı azot tankına konuldu.

3.2.3 *L.tropica* Promastigotlarının Büyük Ölçekli Kültürünün Yapılması

Prokaryotlardan farklı olarak, *Leishmania* parazitlerinin kültürünün yapılması daha zordur ve zaman alıcıdır. Parazit antijenlerinin yeterli miktarda elde edilebilmesi için büyük ölçekli kültürde yoğun bir şekilde üretilmesi gerekmektedir. LPG molekülü gibi parazitin yüzeyinde bulunan immünojenik moleküller genellikle parazitin metasiklik evresinde en yoğun olarak bulunduğundan, parazitin büyüme kinetiğinde bu evrenin tam olarak tespit edilebilmesi için, parazitin büyüme eğrisi çıkartıldı. 5 ml RPMI 1640 (GIBCO) besiyeri içeren flasklarda (25 cm²) kültürü yapılan parazitin sayısı 5×10^6 parazit/ml olduğunda besiyeri 2 katına çıkartıldı. Besiyeri ekleme aşamasından sonraki 4. günde parazitler 10^7 parazit/ml'ye ulaştığında, 75 cm²'lik flaska aktarımı gerçekleştirildi. Parazit sayısı tekrar ml'de 10^7 'ye ulaştığında promastigotlar, RPMI 1640 besiyerine zenginleştirici olarak ilave edilen FBS'nin pahalı olması nedeniyle, maliyeti daha düşük olan beyin kalp infüzyon besiyerine adapte edildi. Bu amaçla kültür büyük ölçeğe aktarılırken parazit sayısı/hacmi göz önünde bulundurularak, total hacimleri 300 ml olacak şekilde 1 litrelik cam erlen mayere aktarıldı.

L. tropica promastigotları inkübasyon süresi boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. 4 günlük inkübasyon süresi sonunda erlen üzerine 300-350 ml beyin kalp infüzyon besiyeri eklenerek total hacmi yaklaşık olarak 700 ml'ye tamamlandı.

3.2.4 *L.tropica* Tüm Antijenlerinin Hazırlanması

Öncelikle, metasiklik fazdaki *Leishmania tropica* promastigot kültürü (250×10^6 parazit) 3000 rpm'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülerek pellet yaklaşık 3 ml PBS ile süspanse edilip tekrar aynı şartlarda santrifüj edilmiştir. PBS ile yıkama işlemi iki kez tekrarlanmıştır. Bu işlem sonrasında süpernatant atılan pellet

500 ul PBS ile tamamlanarak 1,5 ml'lik ependorfa aktarılmıştır. Ependorfta bulunan tüm parazitlerin parçalanması için önce -196 °C'de 5 dakika tutulan ependorf tüpü 37°C'lik su banyosuna alınıp 5 dakika da burada bekletilmiştir. Dondurup çözme yöntemi denilen bu işlem 5 kere tekrarlanmıştır. Son tekrarın ardından 10.000 rpmde 15 dk santrifüj edilen tüpten süpernatant kısmı alınarak -40°C derecede immünizasyonun yapılacağı güne kadar saklanmıştır. Ancak alınan süpernatantın UV ölçümleri sonrası antijen miktarının yeterli sayıda olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle dondurup çözme yönteminde değişikliğe gidilmiştir. Aynı miktarda parazitin santrifüjü sonrası -196 °C'de ve 37 °C'lik su banyosuna bekletilme süreleri 10'ar dakikaya çıkarılarak yine 5 kez tekrar edilmiştir. Dondurup çözme yönteminde yapılan bu değişiklik sonucu antijen miktarı UV spektrofotometrede ölçülmüştür ve daha yüksek miktarda antijen elde edildiği tespit edilmiştir.

3.3 Farelerin İmmünizasyonu

L.tropica promastigot kültüründen dondurma çözme yöntemiyle elde ettiğimiz antijenler ile seçmiş olduğumuz farklı adjuvanlar fiziksel karışımlar halinde 6 haftalık 6 adet dişi BalB/c fare üzerinde uygulanmıştır. Bezm-i Alem Vakıf Üniversitesi'nde yürütülen bu ön çalışmada Balb/C türü 6 haftalık dişi fareler, her grupta 3 fare olacak şekilde 2 gruba ayrılmıştır. Bu gruplara uygulanan antijen adjuvan kombinasyonları şu şekildedir:

1. Kombinasyon için: Tüm *Leishmania* antijeninden 100 ug alınarak, 250ug PO adjuvanı ile fiziksel karışım hazırlanmıştır. Daha önce laboratuvarımızda tamamlanan yüksek lisans tezinde, seçilen bu konsantrasyonların, toksik olmadığı belirlenmiştir. Böylelikle kullanılan adjuvan konsantrasyonu tüm antijen ile fiziksel karışım halinde farelere verilmiştir.

2. Kombinasyon: Literatürde sıklıkla kullanılan Freund's adjuvanı kullanılmıştır. Adjuvanın iteratürde uygulanan konsantrasyonu dikkate alınarak, 1:1 oranında 100 ug tüm antijen ile 100ug Freund's adjuvan fiziksel karışımı hazırlanarak 2. grup farelere verilmiştir.

İmmünizasyon işlemleri bittikten sonra immün yanıtındaki artışı tespit edebilmek için, ilk immünizasyon öncesi farelerin kalbinden kan alınmıştır. Alınan kanlar EDTA'sız tüplere aktararak, santrifüj edilmiş ve serumları ayrılmıştır. Daha sonrasında 2 hafta ara ile intraperitoneal yolla tüm *Leishmania* antijeni+adjuvan kombinasyonları farelere enjekte edilmiştir.



Şekil 3.4 Balb/C farelere intraperitoneal enjeksiyon yapılması

Farelerde immün yanıt artışını yeterli seviyeye çıkarabilmek için, 5 kez immünizasyon yapılmıştır. Bundan sonraki aşamada antikor seviyesini belirlemek amacıyla oluşturduğumuz gruplardaki farelerden kan alınarak ELISA yapılmıştır.

3.4 Antikor Seviyelerinin Belirlenmesi

Uyguladığımız Dolaylı ELISA yönteminin aşamaları aşağıdaki gibidir:

96'lık Platede Kuyucukların Kaplanması

0,05 M karbonat kaplama solüsyonu(coating buffer) (pH: 9,6) içinde antijen hazırlanır. Bunun için 9ml kaplama solusyonuna 1ml (100ug) antijen süpernetantı eklenir.

-100µl kuyucuklara eklenir.

-4°C'de gece boyu inkübe edilir.

-PBS /Tween20 ile 3 defa ELISA yıkama cihazında yıkanır.

Bloklama

-Yıkama işleminin ardından %2'lik süt tozu (coating buffer içinde) 150µl kuyucuklara eklenir.

- 37°C'de 1 saat inkübe edilir.

-3 kere PBS/Tween 20 ile ELISA yıkama cihazında yıkanır.

Serumlar ile muamele

-Serum örnekleri istenilen dilüsyonlarda (genelde 50, 100, 200, 300 seyreltmelerde) %2 PBS/Tween20/Milk içinde sulandırılır.

-Kuyulara 120µl eklenir. (Negatif ve pozitif örneklerde sulandırılarak eklenir.)

-1 saat 37°C'de(nemli) inkübe edilir.

-3 kere PBS/Tween20 ile ELISA yıkama cihazında yıkama yapılır.

İkincil Antikor ile Muamele

- Alkalin fosfat (AP) konjuge IgG veya Polivalen anti-anti monoklonal antikorlar 1/1000 oranında PBS/Tween20 ile sulandırılarak her kuyuya 100µl eklenir.

-1 saat 37°C'de oda sıcaklığında inkübe edilir.

-PBS/Tween20 ile ELISA yıkama cihazında 5 yıkama yapılır.



Şekil 3.5 ELISA washer cihazı

Enzimatik Muamele ve Analiz

Her kuyuya substrat ilaveli substrat tamponundan 100 µl eklenir 30-45 dk. oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilir. ELISA plate okuyucuda 405 nm’de okuma gerçekleştirilir ve sonuçlar alınır.



Şekil 3.6 ELISA reader cihazı

Uygun immun yanıt seviyesine ulaşarak yeterli miktarda antikor üreten farelerde immunizasyon işlemi durdurulmuş ve hibridoma protokollerine dayanarak hibrid hücreler oluşturmak amacıyla farelerin sakrifikasyonu gerçekleştirilmiş, dalakları alınmış ve dalak hücreleri izole edilmiştir.

3.5 Antikor Yanıtı Alınan Farelerin Sakrifikasyonu, Dalak Hücrelerinin İzolasyonu, Myeloma Hücreleri İle Füzyonunun Gerçekleştirilmesi

Füzyon işlemine başlamadan önce bu aşamada kullanılacak olan besiyerleri hazırlandı.

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

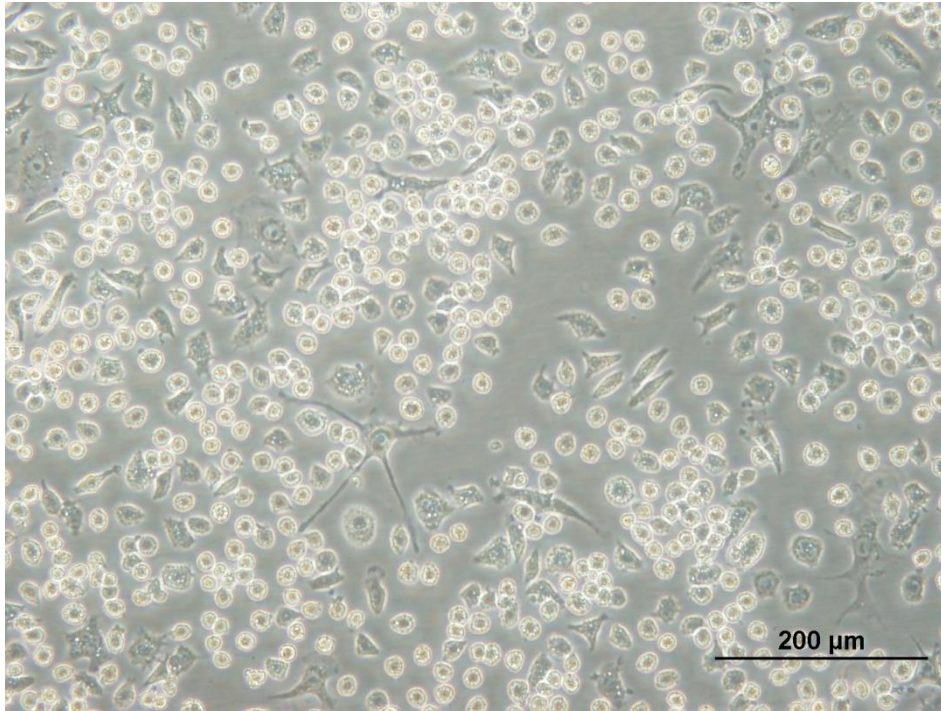
HT; Hipoksantin timidin (100X HT) supplement 1 lt besiyerine 10 ml. olacak şekilde eklendi. Kullanıma hazır ve ışık görmeyecek şekilde steril olarak +4°C'de muhafaza edildi.

Dondurma Besiyeri: %80 FBS, %10 RPMI-1640 ve %10 DMSO olacak şekilde hazırlandı.

PEG'in Hazırlanışı: Hazır olarak sipariş edilen PEG 1500 (Sigma-for hybridoma technology) kullanılmıştır.

3.6 J774 Makrofaj Hücre Hattının Kültüre Edildiği Medyumun Pasaj Zamanı Toplanması, Santrifüj Edilmesi ve Filtre Edilmesi Sonucu Besleyici Olarak Kullanılması

J774 hücre hattının pasaj zamanı içindeki süpernatantın 3/4'ü alınarak 15 ml'lik ependorf içerisine koyulur ve 1000 rpmde 5 dk boyunca 25 °C'de santrifüj edilir. Süpernatant kısmı 10'luk enjektör ile çekilerek 0,22 µm'lik filtreden geçirilir ve hibridoma besleyici süpernatantı olarak kullanımı sağlanır.



Şekil 3.7 J774 Makrofaj hücre hattının görüntüsü

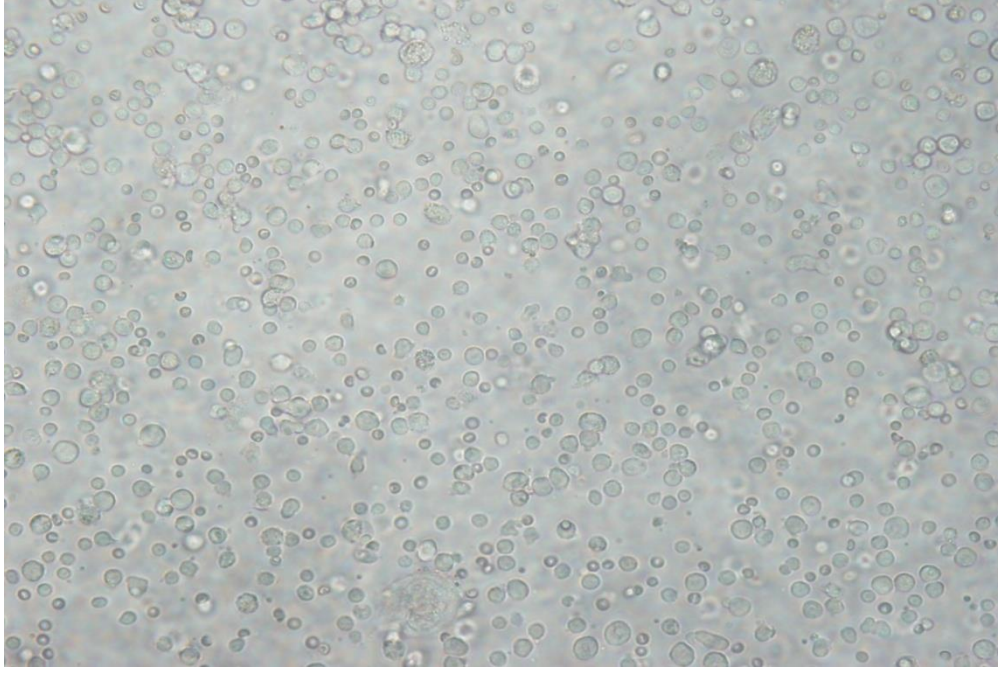
3.7 Periton Makrofajının Alınması

Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde Sorumlu Veteriner Hekim Mert Çelikten yardımıyla füzyondan bir gün önce, enfekte olamamış

10 haftalık Balb/C fare servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildikten sonra karın bölgesi traşlanmış ve periton dikkatlice kesilmiştir. Periton bölgesine enjektör yardımı ile verilen RPMI besiyeri geri alınmış ve bu işlem birkaç kez uygulanmıştır. Toplanan periton sıvısı laboratuvarımızda santrifüj edildikten sonra 24'lük well plakalar içerisine ekimi gerçekleştirilmiştir.

3.8 Dalak Hücrelerinin Hazırlanması

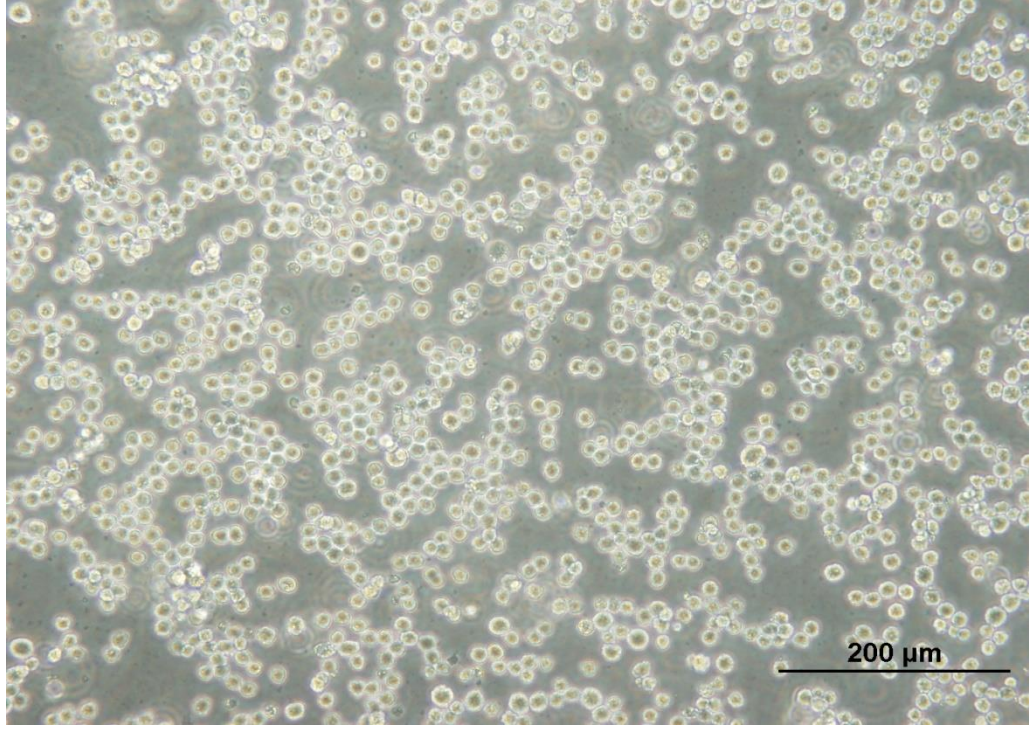
Tüm parazit antijenlerinin vurulduğu fareler servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülerek sakrifiye edildi ve dalak izole edildi. Farelerden alınan dalak, serum fizyolojik içeren 15 ml'lik steril falkon içerisine alındı. Laminar akışlı kabin içerisinde steril petri içerisine alınan dalak, serum içermeyen RPMI ile yıkandı. İlk yıkama aşamasından sonra 5ml 'lik enjektör ile alınan serum içermeyen RPMI dalağın birkaç yerinden dalak içerisine enjekte edilerek kan hücrelerinden arındırıldı. Bir diğer steril petri içerisine alınan dalağın üzerine steril neşter yardımıyla kısa kesikler atıldı ve tekrar serum içermeyen RPMI ile yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, steril petriye alınan dalak 0,70µm'lik filtre üzerinde enjektörün tersi ile ezilerek üzerine serum içermeyen RPMI eklendi. Steril petri içerisinde biriken hücreler serolojik pipet yardımı ile steril falkonlara aktarıldı. Falkonlara toplanan hücreler 800 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Bu işlem 3 kere tekrar edildi. En son santrifüjden sonra hücreler serum içermeyen medyum ile süspanse edildi ve füzyon için gerekli sayım Thoma lamı ile yapıldı.



Şekil 3.8 Dalaktan izole edilen B-lenfositlerinin görüntüsü

3.9 Myeloma hücrelerinin hazırlanması

Füzyon çalışmalarında kullanılacak myeloma hücre hattı lenfositlerin alındığı kaynak ile uyumu açısından önemlidir. Bundan dolayı füzyon çalışmalarında genellikle Balb/c fare ırklarından kaynaklanan myeloma hücre hatları kullanılmaktadır. Kültüre alınan P3-X63-Ag8.653 myeloma hücrelerinin besiyerleri 2-3 günde bir gerekli miktarda değiştirilerek ters mikroskop (Olympus) ile gelişimleri takip edildi. Tripan mavisi ile hücre sayımları yapılan hücrelerin 5×10^5 hücre/ml yoğunluğuna ulaştığında pasajları gerçekleştirildi. Füzyon günü, flasklardan kaldırılan hücreler 50 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve 1200 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant pipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve hücre pelleti serum içermeyen RPMI ile süspanse edildi. Bu işlem 3 kere tekrar edildikten sonra hücreler serum içermeyen RPMI ile süspanse edilerek füzyon için gerekli sayım yapıldı. Başarılı bir füzyon işleminin gerçekleşmesi için myeloma hücrelerinin canlılığının yüksek olması gerekir (>%95).



Şekil 3.9 Ag8 Myeloma hücre hatlarının görüntüsü

3.10 Dalak ve Myeloma Hücrelerinin Sayımlarının Yapılması

Hücreler 1:10 oranında karıştırılmaktadır.

1: myeloma hücresi

10: dalak hücresi

Freund's adjuvanı ile immunize olan farelerin sakrifiye edilmesi ile yapılan füzyon ve sayımlar

Dalak hücresi: Thoma lamında 70 sayıldı.

17.500.000 dalak hücresi ile 1.750.000 myeloma hücresi birleştirilmiştir.

Myeloma hücresi $50/2 = 25$

$25 \times 50 \times 10000 = 12\,500\,000$

Hücre süspansiyonundan 1 750 000 hücre alınabilmesi için 140 µl alınmıştır. Kuyu başına 10000 hücre düşecek şekilde ekim yapılmıştır.

Sol dalak hücre sayımı; $(167+106)/2 = 136,5$

$$136,5 \times 10000 \times 50 = 68\,500\,000$$

$$\text{Sağ dalak hücre sayısı; } (183+112)/2 = 147,5$$

$$147,5 \times 50 \times 10\,000 = 73\,750\,000$$

$$\text{Myeloma sayısı} = (51+47)/2 = 49$$

$$49 \times 50 \times 10\,000 = 24\,500\,000$$

60.000.000 dalak hücresi ile 6.000.000 myeloma hücresi füzyon yapılmıştır.

3.11 Füzyon

PO grubu fareler sakrifiye edilerek füzyon gerçekleştirilmiştir. Bu füzyon aşamasında 40 000 000 dalak hücresi ile 4 000 000 myeloma hücresi kullanılmıştır. Füzyon işleminden sonra hücrelerin ekimi için 96 well plate yerine 24 well plakalar kullanılmıştır. Plakaların kenarlarında kalan kuyucuklara hücre besiyeri yerine PBS eklenmiştir. Füzyon yapılan hücre süspansiyonu HAT içeren besiyeri içerisinde sulandırılmıştır ve her bir kuyuya 1 ml olacak şekilde her bir kuyucuğa ekim yapılmıştır.

Füzyon için gerekli olan hücre sayımları gerçekleştirildikten sonra, birleştirilmek istenen hücre miktarı kadar hücre solüsyonu mikropipet yardımıyla alındı ve hücre solüsyonları 50ml'lik steril falkon içerisinde toplandı. Hücre süspansiyonu 10 dk boyunca 1250 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra oluşan süpernatant uzaklaştırıldı. Süpernatantın tamamen uzaklaştırılması füzyon sırasında PEG'in seyrelememesi açısından çok önemlidir.

Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti tapping yaparak süspanse edildi. Devamındaki işlemlerin rahat ilerlemesi açısından kronometre kullanıldı. Hücre pelletinin içerisine 1 ml PEG solüsyonu yavaşça ve 1 dk boyunca damlatarak eklendi. Diğer 1 dk boyunca hiç karıştırılmadan beklendi. Geçen 1 dk'dan sonra hücreler yavaşça pipet ucuyla karıştırıldı. Füzyon karışımına 4 ml serum içermeyen RPMI eklendi. 4 dakika boyunca oda sıcaklığında pipet yardımıyla yavaşça karıştırıldı. Daha sonra hücrelere yavaşça 10 ml serum içermeyen RPMI eklendi. 15 dk su banyosunda 37°C 'de inkübe edildi. Yavaşça 30 ml %20 FBS içeren RPMI eklendi ve 1250 rpm'de 7 dk boyunca santrifüj edildi. PEG'in uzaklaştırılması için süpernatant uzaklaştırıldı ve

seçici besiyeri ile süspanse edildi. (%25 makrofaj st suyu, %20 FBS, %1 penisilin-streptomisin, 20µg/ml glutamin ve %2 HAT besiyeri). Süspanse edilen hücre pelleti her kuyuya 150 µl olacak şekilde 96 well plate'e aktarıldı. 7-10 gün boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

Hibridoma besiyerleri toplamda iki kere HAT ve iki kere HT medyumunu ile değiştirilmektedir. Bu süreç içerisinde süpernatantların üzerinden 50 µl besiyeri alınarak ELISA yapılmaktadır. Antikor yanıtı yüksek olan kuyular takip edilir.

3.12 Oluşan Hibridoma Hücrelerinin rettiği Antikorların Seviyelerinin Tayini

Hibridomaların 10. ve 20. gün süpernatantlarından hem tüm parazite karşı hem de immunizasyon aşamasında kullanılan adjuvanlarına karşı oluşturdukları antikor yanıtları ELISA ile test edilmiştir.

3.13 Yüksek Antikor Yanıtı Alınan Hibridoma Hücrelerinden Poliklonal Antikorların Elde Edilebilmesi için Alt Klonlama işlemlerinin Gerçekleştirilmesi

Alt klonlama yöntemi mevcut iki protokol kullanılarak yapılmıştır:

3.13.1 Yöntem 1

Pasajlanan flasklardan birtanesi seçilerek içerisinde bulunan hücreler pipetaj yöntemi ile kaldırılıp santrifüj edilmiştir (1000rpmde 5 dk). Süpernatant dökülerek pellet 1ml'ye tamamlanmış ve hücre sayımı tripan blue yöntemi ile sayılmıştır. 1 ml içerisinde $5,5 \cdot 10^6$ hücre sayılmıştır. Hazırlanan taze medyundan 10ml falkon içerisine koyulmuştur. Sayılan hücrelerden 0,2µl alınarak (2500 hücre) bu falkon içerisine koyulmuştur ve 96'lık plak içerisine dağıtılmıştır.

Kullanılan protokol aşağıdaki gibidir:

- 1000 adet canlı hücre içeren 10 ml'lik süspansiyon hazırlanır.
- 100 adet canlı hücre içeren farklı bir 10 ml'lik süspansiyon hazırlanır.
- Hücre süspansiyonları 96'lık plak içerisine eşit olarak dağıtılır.
- Plak 4-7 gün boyunca medyumunu hiç değiştirilmeden inkübe edilir. Büyüyen klonların gözlemlenmesi beklenir.

3.13.2 Yöntem 2

Titrasyon yöntemi uygulanarak da alt klonlama işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk kuyuya 300µl içerisinde 75 hücre koyulmuş ve kademeli olarak 9 kere seyreltilmiştir. Tüm kuyuların 2 kere tekrarı yapılmıştır. İlk iki tekrarın içerisinde yer alan sıvılar aynı zamanda mikrokapilere koyularak etüve kaldırılmıştır.

Bu yöntemin amacı, her bir kuyucuğa 1-10 adet hücre düşecek şekilde dilüsyon yapılması, bu hücrelerin eşit olarak dağılmasının sağlanmasıdır. Yeterli sayıya ulaşan hücrelerin üst sıvıları toplanarak ELISA yöntemi ile tüm parazit antijenine en yüksek reaksiyon gösteren kuyucuklar seçilmiştir. Bu kuyucuklarda antijene özgü reaksiyonun hassasiyetini arttırabilmek için alt klonlama işlemi bir kere daha tekrar edilmiştir.

Bu hücreler daha sonra 24'lük plak içerisinde çoğaltılarak, yeterli sayıya ulaşınca 25 cm²'lik flasklara aktarılmıştır. Ayrıca, çoğalma aşamasında flask içerisinde toplanacak olan üst sıvılar antikor saflaştırılması ve karakterizasyon aşamalarında kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.14 Hibridoma Hücrelerinin Kriyoprezervasyonu

Kolonizasyon sonrası çoğalan hibridoma hücrelerinin antikor üretme yetkinliklerini kaybetmeden dondurulması gerekir. Bu proses çerçevesinde yeterli doluluğa ulaşan flasklar içerisindeki hibridoma hücrelerin yaklaşık olarak 3/4'u dondurulur. Yarı süspanse halde olan hibridomalara yavaşça pipetaj yapılarak tutunan hücrelerin kaldırılması gerçekleştirilir ve falkona toplanan hücreler 1000 rpm'de 5 dk sentrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülerek pellet süspanse hale getirilir. Genel olarak %10'luk DMSO konsantrasyonunu içeren kriyoprotektant hücrelere 1:1 oranında yavaşça inokule edilerek pipetaj yapılır. Pipetajın sonucunda kriyotüplere aktarılan hücre - kriyoprotektant karışımı yavaş dondurma protokolüne göre öncelikle +4 °C'de 1 saat, -20 °C'de yaklaşık 2 saat, sonrasında ise 1 gece bekleyecek şekilde -40 °C'ye koyularak; ertesi gün kriyobanka kaldırılır.

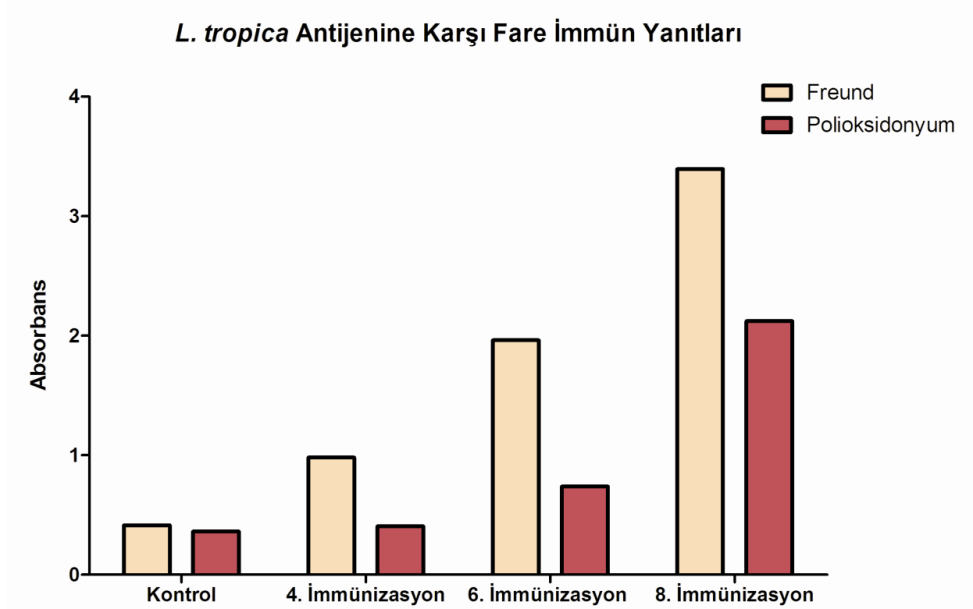
Kriyoprezervasyon sonrası hibridoma hücrelerinin antikor üretme yeteneklerinde de azalmalar görülürken etkili kriyoprezervasyon yöntemlerinin seçilimi tıpkı embrio dondurma protokollerindeki gibi hibridoma teknolojisinde de önem kazanmaktadır.

Ayrıca klasik yöntem olarak DMSO ile gerçekleştirdiğimiz kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası hibridoma hücrelerinin ürettikleri antikor yanıtları da karşılaştırılmış olup; kriyosonrası pasaj sayısına da bağlı olarak antikor miktarındaki azalışın tespiti yapılmıştır.

DENEYSEL SONUÇLAR

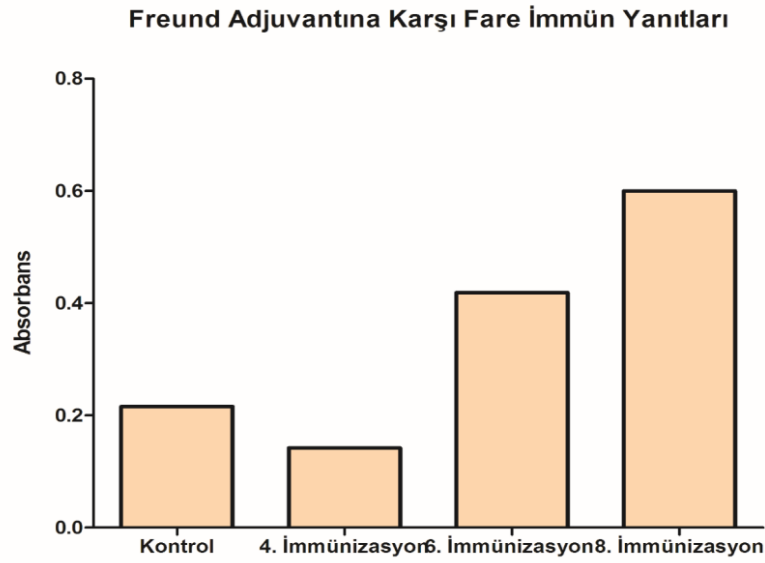
4.1 İmmünizasyon Sonuçları

Farelerden alınan kan serumlarında *L. tropica* antijenlerine karşı oluşan antikor yanıtının kontrole göre belirgin bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. FREUND'S adjuvanı ile immünize edilmiş farelerde 6.immünizasyon sonrasında, PO ile immünize edilmiş farelerde ise 8.immünizasyon sonucunda antikor düzeyinin kontrole göre yaklaşık 5.5 kat arttığı saptandı.



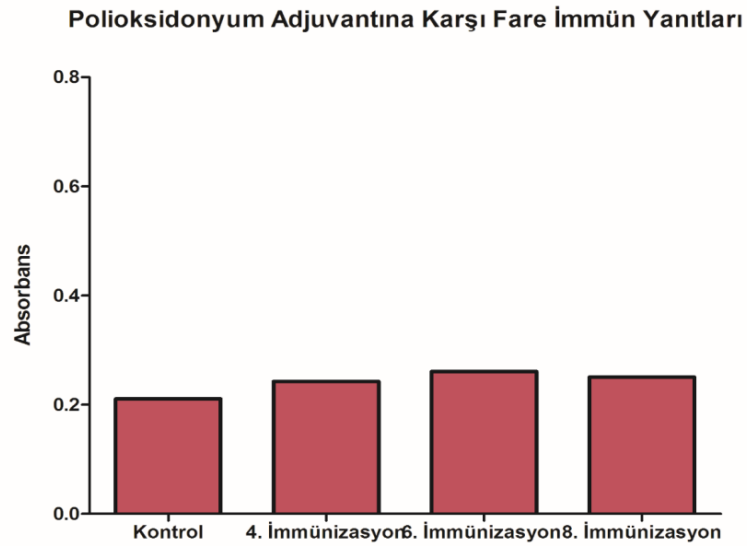
Şekil 4.1 *L. tropica* antijenine karşı fare immün yanıtları

Yukarıdaki bilgilere ek olarak, belirli immunizasyon dönemlerinde alınan kanların serumlarında, immunizasyon aşamasında *L. Tropica* antijenleri ile birlikte kullanılan adjuvanlara karşı oluşan antikor yanıtları da aşağıda gösterilmektedir. 8. İmmünizasyon sonucunda adjuvan olarak Freund's kullanılan farelerin Freund's karşı oluşturduğu antikor yanıtının kontrole göre yaklaşık olarak 3 kat arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.2 Freund's adjuvanına karşı fare immün yanıtları

Polioksidonyumun adjuvan olarak kullanıldığı farelerde 8. İmmünizasyon sonucunda bu adjuvana karşı oluşturduğu yanıtın kontrole göre anlamlı olarak bir değişme göstermediği belirtilmektedir.

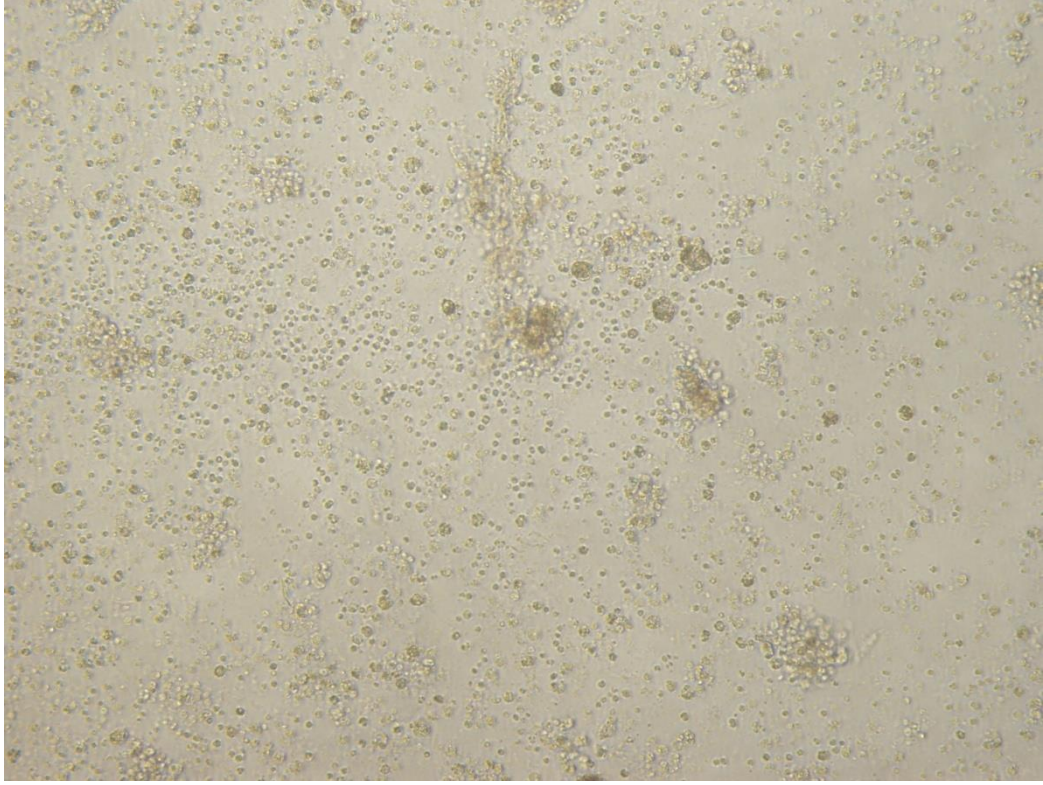


Şekil 4.3 Polioksidonyum adjuvanına karşı fare immün yanıtları

Elde edilen bu veriler, 8. İmmünizasyon sonucu uygulanan adjuvanlara karşı oluşturduğu antikor yanıtlarının Freund's adjuvan olarak kullanıldığı grupta, PO'nun adjuvan olarak kullanıldığı gruba göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4.2 Füzyon Sonrası Oluşan Hibridoma Hücrelerinin Ürettiği Antikorların Seviyelerinin Tayini

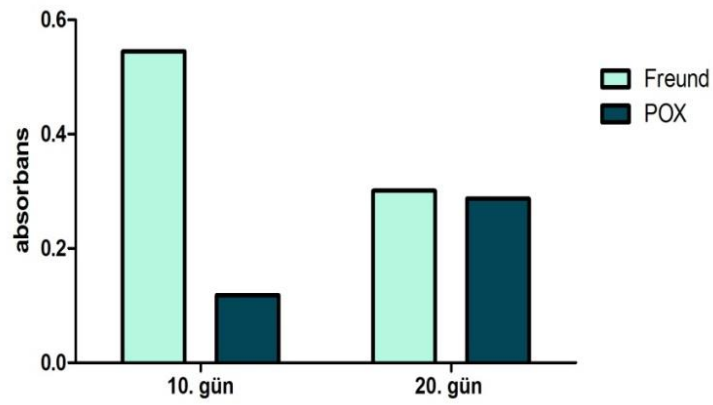
Her iki gruptan elde edilen hibridoma kültürünün 10. ve 20. günlerinde *L.tropica*'ya karşı poliklonal antikor oluşumu gözlemlendi. Ayrıca bu antikorların etkinliği sadece antijen kaplamalarla değil; aynı zamanda adjuvan kaplamalar yapılarak da incelenmiştir. Freund's ile immünize edilmiş farelerden elde edilen B-lenfositlerinden üretilen hibrit hücrelerinin ürettikleri antikorun yalnızca antijene spesifik olmadığı, aynı zamanda adjuvanın kendisine de bir yanıt oluşturduğu tespit edilmiştir. Oluşan bu yanıtın 20. günde 10. güne karşı daha yüksek olduğu ELİSA ile ölçülmüştür. Freund's grubu hibridomalarının antijene özgü yanıtları ise 10.güne kıyasla 20. Günde daha da azalmıştır. PO ile yapılan kaplama sonuçlarında ise hibridomaların ürettikleri antikor yanıtlarının 10. güne karşı 20. günde daha da azaldığı görülmüştür. Ayrıca PO grubu hibridomalarının antijene özgü ürettikleri antikorlar 10. güne göre 20. günde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.4 Füzyon sonrası plaka içerisindeki hücrelerin görüntüsü

Bu sonuçlara çerçevesinde aşağıdaki grafikler elde edilmiştir:

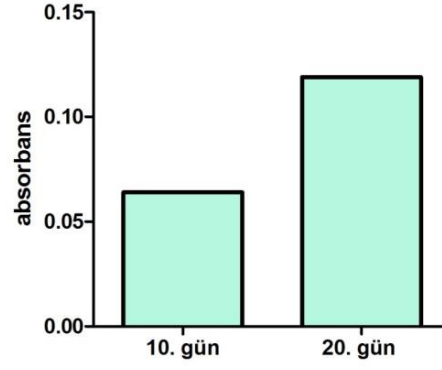
10. ve 20. gün Hibridoma Antikor yanıtları



Şekil 4.5 Füzyon sonrası 10. Ve 20. gün antijen kaplamaya karşı alınan ELİSA sonuçları.

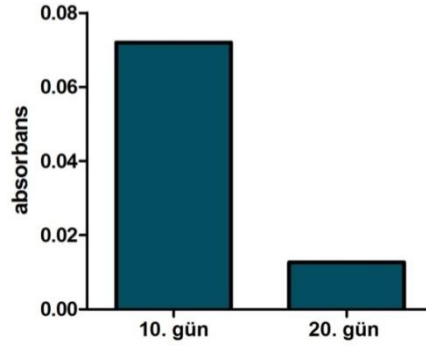
Ayrıca hibridoma üst sıvıları immunizasyon aşamasında kullanılan adjuvanlara karşı da test edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki gibidir;

Freund Adjuvantına Karşı Hibridoma Antikor ELISA Sonuçları



Şekil 4.6 Şekil 4. 5 Füzyon sonrası 10. Ve 20. gün Freund's kaplamaya karşı alınan ELISA sonuçları

Polioksidonyum Adjuvantına Karşı Hibridoma Antikor ELISA Sonuçları

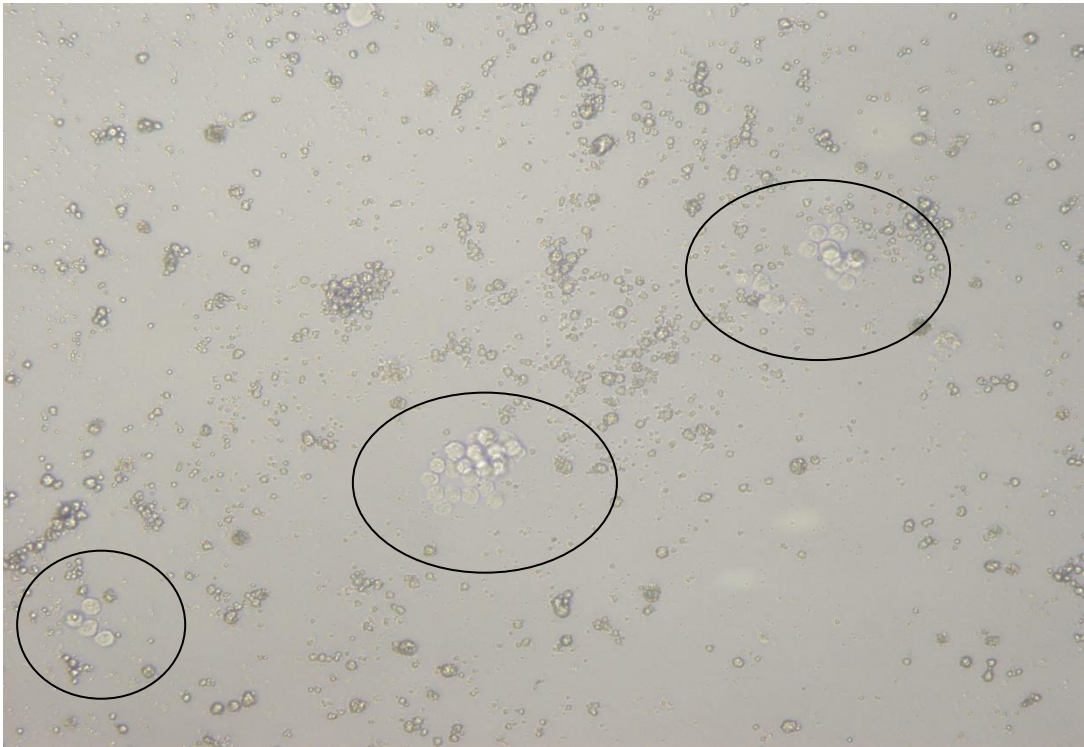


Şekil 4.7 Füzyon sonrası 10. Ve 20. gün PO kaplamaya karşı alınan ELISA sonuçları.

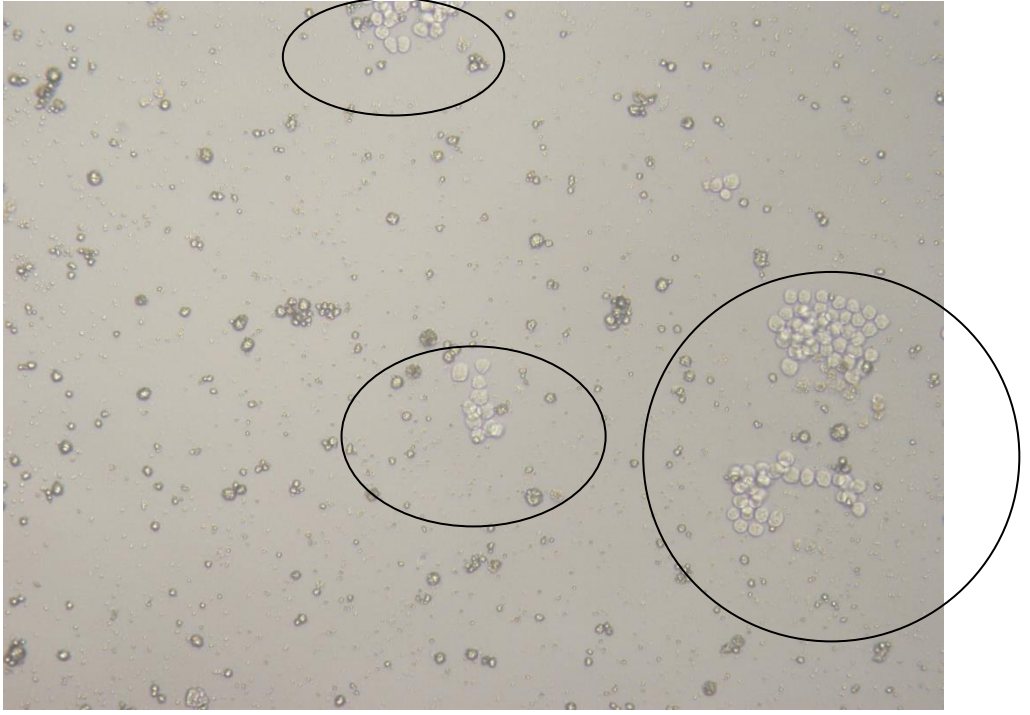
Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı dondurulur bir kısmı ile alt klonlamaya gidilir. Antikor ürettiği tespit edilen hibridomaların kolonizasyonlarının görüntüleri aşağıdaki gibidir:



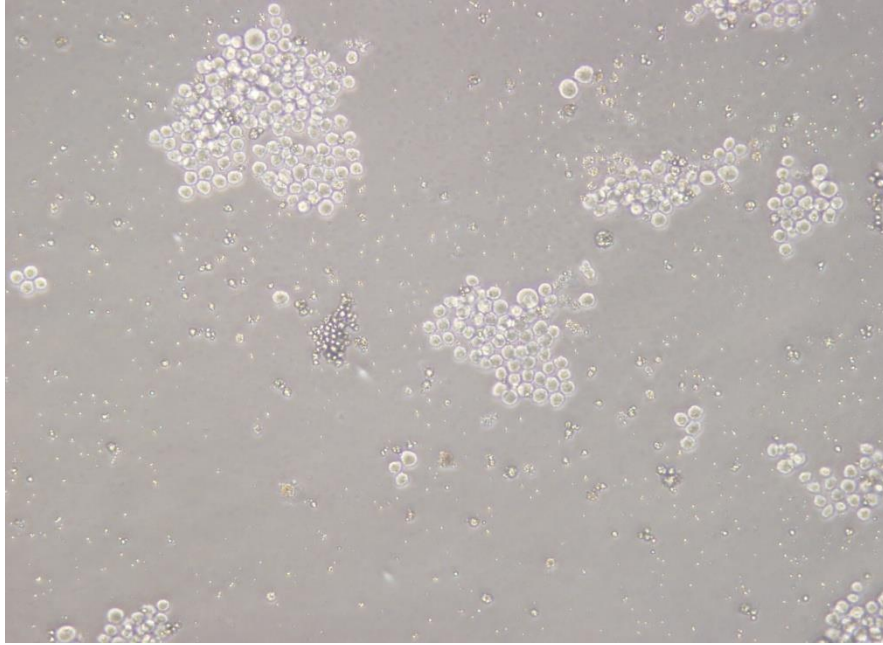
Şekil 4.8 Füzyon sonrası 22. gün kolonizasyonun gözlenmesi



Şekil 4.9 Füzyon sonrası 23. gün kolonizasyonun gözlenmesi



Şekil 4.10 Füzyon sonrası 25. gün kolonizasyonun gözlenmesi



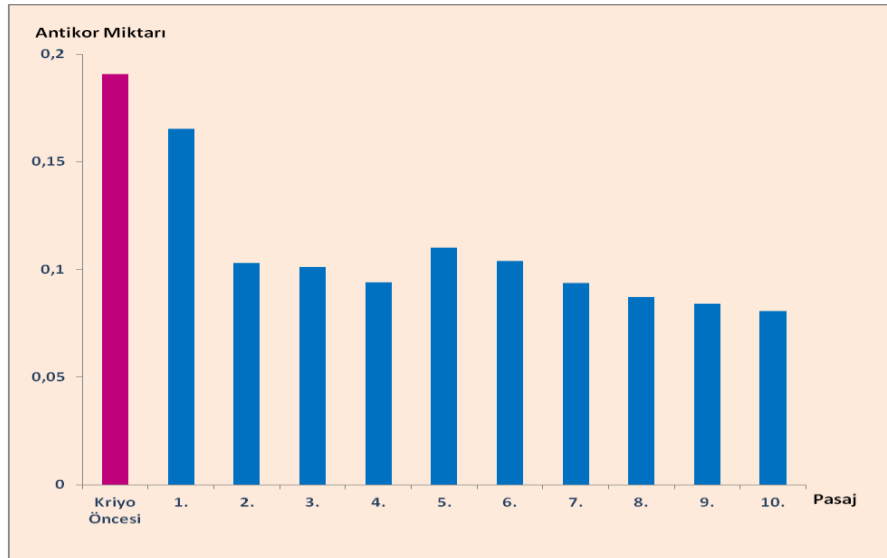
Şekil 4.11 Füzyon sonrası 27. gün kolonizasyonun gözlenmesi



Şekil 4.12 Kolonizasyon sonucunda uygulanan alt klon işleminin görüntüsü.

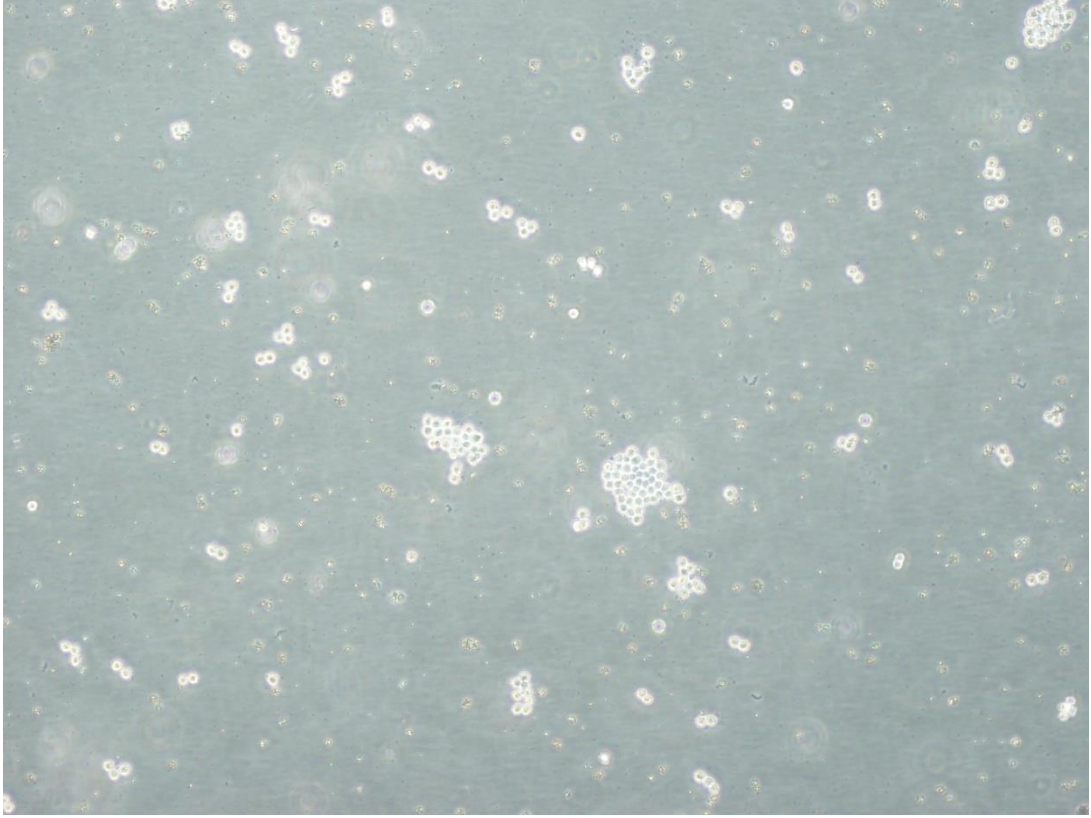
4.3 Kriyoprezervasyon Deney Sonuçları

Kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası ELİSA yöntemi ile tespit ettiğimiz antikor yanıtları karşılaştırılarak aşağıdaki grafik oluşturulmuştur. Bu grafiğe göre kriyo sonrası pasaj sayısına da bağlı olarak antikor miktarında kriyo öncesine göre %60'a varan azalma tespit edilmiştir.



Şekil 4.13 Kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası antikor miktarları.

Şekil 4.13 ile verilen grafikte ilk sütun füzyon sonrası elde edilen hibridoma hücrelerinin kriyoprezervasyon öncesi antikor yanıtı iken; sonraki sütunlar sırasıyla kriyoprezervasyon sonrası pasaj sayısına bağlı antikor yanıtlarını temsil etmektedir.

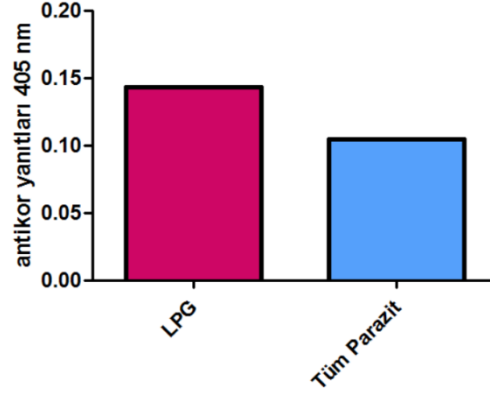


Şekil 4.14 Kriyoprezervasyon sonrası açılan hibridoma kültürünün flastaki görüntüsü (X10)

4.4 Üretilen Antikorun *Leishmania* Yüzey Antijeni Olan LPG'ye ve *L.infantum*, *L.major* Gibi Farklı Türlerine Karşı Etkinliğinin İncelenmesi

Leishmania yüzeyinde en çok bulunan antijen olan LPG, sadece bu türe özgü bulunmaktadır. Yapılan bu deneyde Elisa kaplamalar hem tüm parazit antijeni hem de *L.tropica*'dan izole edilen LPG ile kaplanarak, hibridomaların ürettikleri antikorun LPG'ye spesifikliğı, tüm parazit antijenleri ile karşılaştırılmıştır.

Hibridoma Antikor Yanıtlarının Spesifitesi

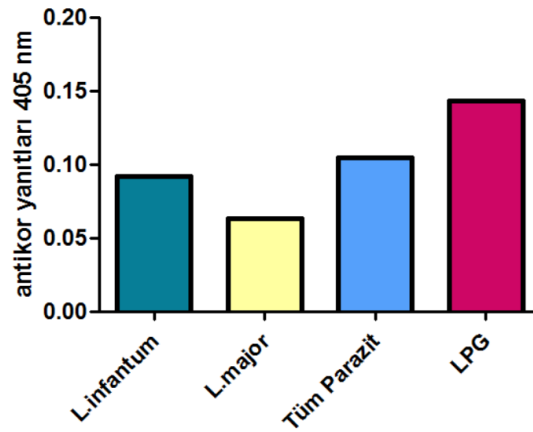


Şekil 4.15 Üretilen antikorun *Leishmania* yüzey antijeni olan LPG ile tüm parazit antijenine karşı spesifitesi.

Bu çalışma kapsamında elde ettiğimiz hibridomaların ürettikleri antikorun *L.tropica* tüm antijenlerinden daha spesifik olarak *L.tropica*'nın yüzeyinde bulunan LPG molekülüne karşı olduğu belirlenmiştir. Üretilen antikorlar tüm parazit antijenlerine göre LPG ile yaklaşık %73 daha fazla etkileşim göstermiştir.

Aynı zamanda üretilen bu antikorun farklı *Leishmania* türlerine özgü gösterdiği etkileşim de incelenmiştir. *Leishmania* türleri arasından *L.infantum* ve *L.major*'den dondurup çözme yöntemi ile elde edilen tüm yüzey antijenleri ile ELİSA kaplamalar yapılmıştır. ELİSA sonuçlarına göre aşağıdaki grafik elde edilmiştir:

Hibridoma Antikor Yanıtlarının Spesifitesi



Şekil 4.16 Üretilen antikorun tüm parazit, LPG ve *L.infantum*, *L.major* gibi farklı türlerine karşı etkinliğinin incelenmesi.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Leishmaniasis, 20'den fazla türe sahip olan makrofaj ve dendritik hücreleri hedefleyen *Leishmania* protozoonlarının neden olduğu zoonotic bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı verilere göre Tropikal Hastalıklar listesinde sıtmadan sonra 2. sırada gelen bu hastalık, Asya ve Avrupa'nın batısı, Hindistan, Çin, ve Akdeniz Bölgesi'nde yer alan 90 ülkede endemik olmakla beraber, ülkemizde ciddi halk sağlığı problemlerinden biridir [106]. Leishmaniasisin, malarya, miliyer tüberkülozu, bruselloz, lenfoma ve lösemi gibi hastalıklar ile benzer semptomlar göstermesi nedeniyle klinik tanısının önemi ortaya çıkmaktadır [107]. Bu nedenle bu hastalığın tanısında bir çok yöntem izlenmesine rağmen her bir yöntemin avantajlarının yanısıra ciddi dezavantajları olması da, son yıllarda yapılan çalışmalarda antijen temelli serolojik yöntemlerin önemini ortaya koymaktadır. Enfeksiyon henüz başlamadan önce bile hastada tayin edilebilmesine olanak sağlayan antijen temelli tanı sistemleri, Leishmaniasisin tanısında da oldukça önemlidir[108]. Dünya'da Leishmaniasis'in visseral formuna yönelik hibridoma teknolojisi kullanılarak rK39 strip testi üretilmiştir. Bütün *Leishmania* türlerinde ortak olarak bulunan 230 kDa'lık LcKin proteininin 39 aminoasitlik tekrar bölgesi rk39 antijenidir ve sadece *L. chagasi* ve *L. donovani* türlerinde yüksek oranda korunmaktadır [109]. Bu strip test kiti visseral Leishmaniasis etmeni olan parazit türleri arasında bile farklı duyarlılık gösterdiğinden dolayı, kutanöz leishmaniasise karşı kullanımı çelişkili sonuçlar doğurmaktadır. Laboratuvarımızda 2012 yılında tamamlanan yüksek lisans çalışmasında

visseral leishmaniasis etmeni *L. infantum*'a karşı hibridoma teknolojisine dayalı monoklonal antikor üretimi gerçekleştirilmiştir [17]. Dünya'da hibridoma teknolojisi kullanılarak kutanöz leishmaniasis etkeni *L.tropica*'ya karşı yapılan çalışmaların başında 1982 yılında Avusturalya'da yayınlanan bir çalışma gelmektedir ve bu çalışma leishmaniasise karşı hibridoma teknolojisi kullanılarak üretilen antikorlar çalışmalarının öncüsü olmuştur. Bu çalışma örnek alınarak *Leishmania*'nın farklı türlerine karşı poliklonal ve monoklonal antikorlar üretilmiştir. Bu çalışmaların benzer yönlerinin başında immünizasyon aşamasında canlı promastigot kültürlerin kullanılması gelmektedir. İmmünizasyon aşamaları yıllara bağlı olarak değişiklik göstermiş ve son yıllarda dondurup-çözme, otoklavlanmış ya da ölü parazit antijenlerinin etkili adjuvan sistemleriyle kombinasyon halinde verilmesi gündeme gelmiştir. Aynı yıllar içerisinde ve günümüzde literatüre uygun olarak sıklıkla kullanılan antijenin antijenik özelliğini arttırmaya yardımcı adjuvanların kullanımında Freund's oldukça geniş yer tutmaktadır. Ancak literatürde de Freund's adjuvanının oldukça toksik olduğu bilinmektedir. Buna karşı Leishmaniasise karşı yapılan mevcut aşı çalışmaları göstermiştir ki dondurup/çözme yöntemi ile elde edilmiş tüm çözümler *Leishmania* antijenlerinin koruyucu epitoplarını içermesi, farklı MHC molekülleriyle etkileşime girerken immünizasyon aşamalarında oldukça büyük önem kazanmaktadır. Ancak elde edilen antijenlerin tek başına yeterli immün yanıt oluşturmaması etkili adjuvanlar ile uygun kombinasyonlarının önemini ön plana çıkarmakta olup, mevcut çalışmalarda sıklıkla kullanılan Freund's adjuvanının toksik olması gibi dezavantajlarına karşı, toksik olmayan adjuvanların arayışını beraberinde getirmektedir. Laboratuvarımızda tamamlanan yüksek lisans ve doktora aşı çalışmaları bize göstermiştir ki dondurup-çözme yöntemi ile hazırlanan *Leishmania* antijenlerinin polimerik tabanlı immünstimülan özellik gösteren adjuvanlar ile etkili kombinasyonlarının immünizasyon aşamasında daha etkin sonuçlar doğurduğunu ortaya koymaktadır. Geçmişten günümüze kadar yapılan leishmaniasise karşı hibridoma teknolojisine dayalı antikor üretim çalışmalarında genellikle üretilen antikorların üretildiği antijen dışında farklı türlere karşı gösterdikleri çapraz etkileşimler incelenmiş olsa da oldukça yetersizdir. Ayrıca bu çalışmalarda hastalığın tanısına yönelik değil; daha çok *Leishmania* türleri arası yüzey antijen bölgelerinin benzerliklerini aydınlatmaya yönelik araştırmalara dayanmaktadır. Ayrıca, ülkemizde kutanöz leishmaniasise karşı hibridoma teknolojisine dayalı poliklonal ya

da monoklonal antikor üretimine rastlanmamıştır. Böylece bu tez çalışması kapsamında tezin amaç ve hipotezine uygun olarak aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- Daha önce laboratuvarımızda tamamlanan, *L.donovani*'nin büyük ölçek üretilmesine yönelik çalışma esas alınarak, parazitlerin logaritmik fazını arttırıcı kademeli büyük ölçek üretme yöntemi gerçekleştirilmiş ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Aşı Bilimleri Kongresinde sunulmuştur.
- Yine laboratuvarımızda tamamlanan doktora ve yüksek lisans tezlerindeki yöntemler izlenerek, leishmaniasis karşı literatürde yer alan hibridoma çalışmalarından farklı olarak, antijen elde etmede en etkili yöntemlerden biri olan dondurup-çözme yöntemi ile antijen eldesi gerçekleştirilmiştir.
- Literatürde sıklıkla kullanılan ve toksik olan Freund's adjuvanı ile literatüre alternatif olarak sunduğumuz FDA onaylı PO'nun , antijen ile etkili kombinasyonlarının oluşturup, ilk kez olarak hibridoma teknolojisinde kullanımı ve bu adjuvanların antikor üretimine etkisi incelenmiştir. 6-8 haftalık Balb/c farelerine oluşturulan adjuvan-antijen komplekleri yine literatürden farklı olarak iki hafta arayla intraperitoneal olarak inoküle edilmiş ve her iki kombinasyonun etkinliği farelerden alınan yanıtlara göre karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda immünize olan fare kan serumlarından elde edilen yanıtlara bağlı olarak *L. tropica* antijenlerine karşı oluşan antikor yanıtının kontrole göre belirgin bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. FREUND'S adjuvanı ile immünize edilmiş farelerde 6.immünizasyon sonrasında, PO ile immünize edilmiş farelerde ise 8.immünizasyon sonucunda antikor düzeyinin kontrole göre yaklaşık 5.5 kat arttığı saptanmıştır. Ayrıca aynı serum örneklerinde adjuvana karşı yanıt oluşup oluşmadığı da test edilmiştir. Buna göre de 8. immünizasyon sonucunda adjuvan olarak Freund's kullanılan farelerin Freund's'a karşı oluşturduğu antikor yanıtının kontrole göre yaklaşık olarak 3 kat arttığı; PO'nun adjuvan olarak kullanıldığı farelerde ise 8. immünizasyon sonucunda bu adjuvana karşı oluşan yanıtın kontrole göre anlamlı bir değişme göstermediği saptanmıştır.
- Füzyon için literatürde uygun görülen P3-X63-Ag8.653 myeloma hücre hattının kültürünün çoğaltılması, J774 fare monosit tümör makrofaj kültürünün çoğaltılması

gerçekleştirilmiştir. J774 fare monosit tümör makrofaj kültürünün metabolitleri toplanarak hibrid hücrelerinin gelişimini desteklemek amacıyla kullanılması amaçlanmıştır. Periton makrofajlarının besleyici tabaka olarak kullanılmasının yanı sıra literatürde buna karşılık myelome hücrelerinin kültür ortamında ürettikleri metabolitler de kullanılmıştır. Bu durum farklı hücre hatlarının da kullanılabileceğini gündeme getirmiştir. Ayrıca periton makrofajlarının alınması sırasında doğabilecek kontaminasyon sorunlarına karşın alternatif bir yöntem olarak düşünebilir. Laboratuvarımızda yapılan yüksek lisans tezi kapsamında ilk kez olarak periton makrofajı yerine J774 makrofaj hattının kendisi flaskların içine ekilerek besleyici tabaka olarak kullanılmış. Ancak bu kanserleşmiş makrofaj hücreleri, hibrit hücrelerinden daha hızlı çoğaldıkları için bu yöntemden vazgeçilmiştir. Bu nedenle literatüre karşılık olarak bu tez çalışması kapsamında da J774 makrofaj hücrelerinin metabolitleri hibrit hücrelerini desteklemek amacıyla seçici besiyerleri içerisine eklenerek kullanılmıştır. Buna ek olarak enfekte makrofaj hücrelerinin metabolitlerinin mi yoksa enfekte olmayan makrofajların ürettikleri metabolitlerin mi hibrit hücrelerinin proliferasyonunda daha etkili olduğu ilerdeki çalışmalarda araştırma konusu olabilir.

- Farelerden alınan periton makrofaj hücrelerinin füzyon öncesi besleyici tabaka olarak plakalara ekilmiştir. Servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülen farelerin dalakları alınmış ve B-lenfosit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen B-lenfositlerinin ve myeloma hücrelerinin füzyonunu PEG 1500 aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Literatürde yapılan hibridoma çalışmalarında myeloma ile B-lenfosit hücrelerinin birleştirilme oranları (1:5 , 2:5, 1:10) ve PEG'in farklı moleküler ağırlıklarının kullanımına yönelik çelişkili bilgiler yer almaktadır. Bu tez çalışması kapsamında hibridoma protokolleri tek tek incelenerek en uygun olanlardan hazırlanan bir optimize protokol oluşturulmuştur. Bu protokolün oluşturulmasında günümüzde manuel olarak yapılan hibridomalarının yanısıra, "Stem Cell Clonal Kit" adı verilen ticari bir ürünün protokolleri de incelenmiştir. Hibridoma teknolojisinin kullanıldığı güncel çalışmaların birçoğunda bu kitin kullanımı tercih edilse de, kitin ülkemiz sınırları içerisinde üretilmemesi ve oldukça pahalı olması kullanım alanını sınırlamaktadır.

- Füzyon sonucu oluşan hibridomaların seçici besiyeri içerisinde kültürü yapılmış ve belirli aralıklar ile ürettikleri poliklonal antikor yanıtlarının ELİSA yöntemi ile tespit edilmiştir. Seçici besiyerlerine eklenen J774 makrofaj metabolitleri ile hibrit hücrelerin gelişimleri desteklenmiştir. Bu antikor yanıtlarına göre hibridoma kültürünün 10. ve 20. günlerinde *L.tropica*'ya karşı poliklonal antikor oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca bu antikorların etkinliği sadece antijen kaplamalarla değil; aynı zamanda adjuvan kaplamalar yapılarak da incelenmiştir. Freund's ile immünize edilmiş farelerden elde edilen B-lenfositlerinden üretilen hibrit hücrelerinin ürettikleri antikorun yalnızca antijene spesifik olmadığı, aynı zamanda adjuvanın kendisine de bir yanıt oluşturduğu tespit edilmiştir. Oluşan bu yanıtın 20. günde 10. güne karşı daha yüksek olduğu ELİSA ile ölçülmüştür. Freund's grubu hibridomalarının antijene özgü yanıtları ise 10. güne kıyasla 20. günde daha da azalmıştır. PO ile yapılan kaplama sonuçlarında ise hibridomaların ürettikleri antikor yanıtlarının 10. güne karşı 20. günde daha da azaldığı görülmüştür. Ayrıca PO grubu hibridomalarının antijene özgü ürettikleri antikorlar 10. güne göre 20. günde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında Kutanöz Leishmaniasis etmeni *L.tropica* parazitlerinden elde edilen dondurup-çözölmüş tüm parazit antijenlerine karşı hibridoma teknolojisi ile üretilen poliklonal antikorların farklı adjuvanlar ile etkinliği karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir.
- *Leishmania* antijenine karşı ELİSA sonuçlarında pozitif yanıt veren kuyucukların seçilmiş ve kolonizasyonu mikroskopik olarak gözlenmiştir. 22.gün itibariyle belirli kuyularda kolonizasyon görölmüştür. Bu kuyulardaki hücrelerin 1/2'sinin kriyoprezervasyonu gerçekleştirilerek laboratuvarımızda kutanöz leishmaniasis etmeni *L.tropica*'ya karşı üretilen poliklonal antikor üreten hibridoma hücrelerinin kriyobankı oluşturulmuştur. Geri kalan hibridoma hücrelerinin 1/4'ü 24'luk well plakalardan 6'lık well plakalara alınarak kademeli olarak büyütölmüş ve belirli aralıklar ile süpernatantları toplanmıştır. Geriye kalan hibridomalar ise mevcut yöntemler izlenerek sınırlandırıcı sulandırma işlemi ile alt klonlaması gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan alt klonlarında süpernatantları toplanarak çeşitli analizlerde kullanılmak üzere etiketlenip saklanmıştır. Kriyoprezervasyona ait literatürde çelişkili bilgiler yer almaktadır. Mevcut

olarak kullanılan yöntemlerin başında %10'luk DMSO konsantrasyonu ile dondurulan hibridoma hücrelerinin antikor üretme etkinliklerinin kriyoprezervasyon sonrası azaldığı yapılan diğer çalışmalarda da gösterilmiştir.

- Kriyoprezervasyon öncesi ve sonrasında hibridomaların ürettikleri antikorlar ELİSA yöntemi ile tespit edilmiştir. Kriyoprezervasyon sonrası 10. pasaja kadar üretilen hibridomaların kriyoprezervasyon öncesine göre yaklaşık %50'ye varan antikor yanıtında azalma tespit edilmiştir. Bu durum, oldukça zor bir teknikle üretilen hibridomaların en kritik noktalarından birini oluşturmaktadır. Hibrit hücrelerinin kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası antikor yanıtlarını koruması için kriyoprezervasyon işlemlerinin geliştirilmesi ve optimize edilmesi gerekmektedir. Literatürde bu konuyla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.
- Ayrıca üretilen poliklonal antikorların *Leishmania*'da yüzey antijeni olarak en çok bulunan LPG molekülüne ve *L. infantum*, *L. major* gibi farklı türlerine özgü spesifikliğinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Üretilen antikorum *Leishmania*'nın yüzeyinde en çok bulunan LPG molekülüne karşı oluşan yanıtın tüm antijen kaplama ELİSA sonuçlarına kıyasla yaklaşık %60 daha spesifik bir yanıt oluştuğu belirlenmiştir. Ayrıca bunun dışında gerçekleştirmiş olduğumuz *Leishmania*'nın farklı türlerini içerek ELİSA kaplamalar ile de üretilen poliklonal antikorum sadece *L. tropica*'ya karşı tepkime göstermediği başka türlere karşı da etkileşim gösterdiği saptanmıştır.

Bu sonuçlar çerçevesinde ülkemizde ilk kez olarak *L. tropica* parazitlerinden dondurup-çözme yöntemi ile elde edilen immünojen moleküllere karşı hibridoma teknolojisine dayalı poliklonal antikor üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca immünizasyon aşamasında Freund's adjuvanının dezavantajları gözününde bulundurularak, toksik olmayan, FDA onaylı PO adjuvanının kullanımı alternatif olarak sunulmuş; aynı zamanda literatürde ilk kez olarak hibridoma teknolojisinde farklı adjuvanların hibrit hücreler üzerindeki etkinliği incelenmiştir. Üretilen antikorların tüm parazit *Leishmania* ve *Leishmania*'nın en immünojenik yüzey molekülü olan LPG'ye oluşturduğu yanıt tespit edilmiştir. Hibridomaların antikor üretme yetenekleri kriyoprezervasyon öncesi ve sonrasında karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve üretilen bu antikorların sadece *L. tropica*'ya özgü

değil, *L.infantum* ve *L.major*'e karşı da farklı duyarlılıkta etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmalar ışığında, üretilen bu antikorların saflaştırılması, farklı büyük ölçek üretim teknikleri ile üretimi ve kutanöz leishmaniasisin tanısında kullanımı önerilebilir. Ayrıca, deneysel değerede sahip olan bu antikorlar, parazitlerin besiyerleri içerisine eklenerek, üretildikleri antijenlerin, enfektivite özelliklerinin, promastigot-amastigot farklılaşması gibi evrimsel süreçlerinin incelenmesine olanak sağlamaktadırlar.

KAYNAKLAR

- [1] Roque, A.L. ve Jansen, A.M., (2014). "Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas", International Journal for Parasitology Parasites and Wildlife, 3: 251-262.
- [2] Ertuğ, S., Gültekin, B. ve Doyuran, E.S., (2002). "2001 Yılında Aydın İl Sağlık Müdürlüğü'ne İhbar Edilen İç Organ ve Deri Leishmaniasis Olguları", ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 3: 9 – 12.
- [3] Handemir E., Öncel, T. ve Kamburgil, K., (2004). "İstanbul Sokak Köpeklerinde Visseral Leishmaniasis Seroprevalansı", Türkiye Parazitoloji Dergisi, 28: 123-125.
- [4] Organization WH, (2010). "Expert Committee on the Control of Leishmaniases." In: Technical Report Series 949.
- [5] Serin, S.M., Dağlıoğlu, K., Bağırova, M., Allahverdiyev, A., Uzun, S., Vural, Z., Kayar, B., Tezcan, S., Yetkin, M., Aslan, G., Emekdaş, G. ve Köksal F., (2005). "Rapid diagnosis and genotyping of Leishmania isolates from cutaneous and visceral Leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mini exon region", Diagnosis Microbiology and Infectious Disease, 53: 209-214.
- [6] Dujardin, J.C., Campino, L., Canavate, C., Dedet, J.P., Gradon, L., Soteriadou, K., Mazeis, A., Ozbek, Y. ve Boelaert, M., (2008). "Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis", Europe. Emerg Infect Dis, 14: 1013-1018.
- [7] Allahverdiyev, A.M., Uzun, S., Bağırova, M., Durdu, M. ve Memişoğlu, H.R., (2004). "A Sensitive New Microculture Method For Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis", Am J. Tro. MEd. Hyg., 70: 294-297.

- [8] Tsokana, C.N., Athanasiou, L.V., Valiakos, G., Spyrou, V., Manolakou, K. ve Billinis, C.,(2014). "Molecular diagnosis of Leishmaniasis, species identification and phylogenetic analysis" Chapter 8.
- [9] Gurel, M.S., Ulukanlıgil, M. ve Ozbilge, H., (2002). "Cutaneous Leishmaniasis in Sanliurfa: epidemiologic and clinical features of the las four years (1997-2000)", Int J Dermatol, 41: 32-37.
- [10] Mathur, P. ve Samantaray, J.C., (2004). "The first probable case of platelet transfusion- transmitted visceral Leishmaniasis" Transfusion medicine (Oxford, England), 14: 319-321.
- [11] Rezaei Azizi, S.N., (2008). "Bodrum Yarımadasında Leishmaniasis Epidemiyolojisinin Araştırılması". Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İzmir.
- [12] Ashutosh ve Goyal 2007; Kukal ve ark 2007; Sundar ve Chatterjee 2006; Hepburn 2003; Ok ve ark 2002; Davidson 1999; Davidson 1998.
- [13] Miller, J., (1996). "The thymus in immunity", Principles of Medical Biology, 6: 1-20.
- [14] Paul, W. E., (1993). The Immune System: An Introduction, Fundamental Immunology 3rd Ed., W. E. Paul (Ed), Raven Press Ltd, New York.
- [15] Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R. ve Roitt, I.M., (2011). Roitt's essential immunology, Wiley-Blackwell, New Jersey.
- [16] Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. ve Shlomchik, M., (2005). Immunobiology: The Immune System in Health & Disease, Garland Science, New York.
- [17] Yaman, S., (2012). Visseral Leishmaniasis Etmeni Karşı *L.infantum* Antijenine Karşı Hibridoma Teknolojisine Dayalı Monoklonal Antikor Üretilmesi, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [18] Özyılmaz, Ö.A., (2014). Aşı Geliştirilmesinde Kullanılmak Üzere Çeşitli Yöntemlerle Elde Edilen *L.infantum* Antijenlerinin İn Vivo Oluşturduğu İmmün Yanıtın Karşılaştırılmalı Olarak İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [19] Elçiçek, S., (2012). İmmunostimulan Polimerler İle Attenüe Edilmiş Leishmania Parazitlerinin Aşı Olarak Etkinliğinin İn Vitro ve İn Vivo İncelenmesi, Doktora Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- [20] Selvapandiyan, A., Duncan, R., Mendez, J., Kumar, R., Salotra, P., Cardo LJ, Nakhasi HL (2008). "A Leishmania minicircle DNA footprint assay for sensitive detection and rapid speciation of clinical isolates." *Transfusion* 48(9):1787-1798.
- [21] Ateş, F., Or, E., Körpınar, M.A., Gönül, R., ve Bahçeci T., (2011). "Leishmaniasisin Tedavisinde Antimon Bileşiklerinin Kullanımı" *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22: 53 – 57.
- [22] Selvapandiyan, A., Duncan, R., Mendez, J., Kumar, R., Salotra, P., Cardo, L.J. ve Nakhasi, H.L., (2008). "A Leishmania minicircle DNA footprint assay for sensitive detection and rapid speciation of clinical isolates" *Transfusion*, 48: 1787-1798.
- [23] S.H., El Safi ve Evans, D.A., (1989). "A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of Leishmaniasis in the Sudan", *Trans R Soc. Trop. MEd. Hyg*, 83: 334-337.
- [24] Cardo, L.J., (2006). "Leishmania: risk to the blood supply", 46: 1641-1645.
- [25] Ashutosh ve Goyal 2007; Kukal ve ark 2007; Sundar ve Chatterjee 2006; Hepburn 2003; Ok ve ark 2002; Davidson 1999; Davidson 1998.
- [26] Allahverdiyev, A.T.K., Bagirova, M., Abamor, E. S., Oktem Okullu, S., Aytekin Unubol, N., Cakir Koc, R., Canim Ates, S., Miraloglu, M., ve Serhat Elcicek, (2014). "Basis of Anti-Infective Therapy against Leishmaniasis and Future Perspectives. In: *Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery*", Edited by Atta Ur R, Bentham Science Publishers, 3: 194-316.
- [27] Özensoy Töz, S. ve Özbek, Y., (2009). "Leishmanias'nın Moleküler Biyolojisi", *Parazitlerde Moleküler Biyolojik Yapı ve Çalışmaları*.
- [28] Alvar ve arkadaşları, 2008, "The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. *Clin Microbiol Rev*, 21 (2): 334-359].
- [29] OK, Ü.Z, Balcıoğlu, İ.C, Taylan Özkan, A., Özensoy, S. ve Özbek Y., (2002). "Leishmaniasis in Turkey", *Acta Tropica*, 84: 43-48.
- [30] Alvar ve arkadaşları, (2008). "The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years", *Clin Microbiol Rev*, 21: 334-359.
- [31] Lopez-Velez L ve arkadaşları, (1998). Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfectd with human immunodeficiency virus Leishmania in an area of Madrid, Spain", *Am J Trop MEd Hyg*, 58: 436-443.

- [32] Hommel, M., (1999). "Viseral Leishmaniasis: Biology of the Parasite". J Infect, 39: 101-111.
- [33] Schonian G ve arkadaşları, (2008). "Leishmania vianna in Colombia", Am J Trop Med Hyg, 66: 738-744.
- [34] Lukes J ve arkadaşları, (2007). "Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy", Proc Natl Acad Sci, 104: 9375-80.
- [35] Moleküler Parazitoloji Kitabı, 2009, Yayın no: 22.
- [36] Özbilgin, A., Çulha, G., Zeyrek, F.Y., Akyar, I., Ural, İ.Ö., Kurt, Ö., Kocagöz, T., Gündüz, C., Töz, S., Çavuş, İ. ve Özbel, Y., (2015). "Türkiye'de kutanöz leishmaniyaz hastalarından elde edilen farklı Leishmania suşları" Poster Bildirisi: 23, 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Ekinokokkozis Sempozyumu Erzurum, Sayfa : 125.
- [37] Svobodova ve arkadaşları, (2006). "Distinct transmission cycles of Leishmania tropica in 2 adjacent foci", Northern Israel Emerg Infect Dis., 12: 1860-1868 .
- [38] Rezaei Azizi, S.N., (2008). "Bodrum Yarımadasında Leishmaniasis Epidemiyolojisinin Araştırılması", Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İzmir.
- [39] Memişoğlu ve arkadaşları, (1995). "Cryotherapy in cases with Leishmaniasis cutis", J.Eur Acad. Dermatol. Venereol., 4: 9-13.
- [40] Scfiefer ve arkadaşları, (2008). "Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human Leishmaniasis." Curr Opin Infect Dis, 21: 483-488.
- [41] Gradoni ve arkadaşları, (2008). "Drug regimens for visceral Leishmaniasis in Mediterranean countries" Trop Med Int Health, 13: 1272-1276.
- [42] Hadighi ve arkadaşları, 2006, "Unresponsiveness to Glucantimetreatment in Iranian cutaneous Leishmaniasis due to drug-resistant Leishmania tropica parasites, PLoS Med, 3(5):e162
- [43] Abbas, A.K., Lichtman, A.H. ve Baker, D.L., (2004). Basic immunology: functions and disorders of the immune system, Saunders Company Ltd, Newberg.

- [45] Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. ve Shlomchik, M., (2005). Immunobiology: The Immune System in Health & Disease, Garland Science, New York.
- [46] Singh, A., Chaudhary, S., Agarwal, A. ve Verma, A.S., "Antibodies: Monoclonal and Polyclonal". Chapter 15, Amity Institute of Biotechnology, Amity University Uttar Pradesh, Noida, U.P., India.
- [47] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, P., (2002). Molecular biology of the cell, Garland Science, New York: 1227-1242.
- [48] Lefranc, M.P. ve Lefranc, G., (2001). The immunoglobulin factsbook, Academic Press, California.
- [49] Minn, A. ve Quintans, J., (1996). Designer antibodies, JAI Press, Greenwich.
- [50] Walsh, G. ve Headon, D.R., (1994). Protein biotechnology, John Wiley & Sons, New Jersey.
- [51] Kontermann, R., (2010). Antibody engineering, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- [52] Gödekmerdan A., İlhan F., 2009, Moleküler Parazitoloji Kitabı sayfa :81.
- [53] Onji, M., Akbar, S.M.F., (2008), Dendritic Cells in Clinics, Second Edition, Springer, Japan.
- [54] Allahverdiyev, A., Bağirova, M., Koç, R.Ç., Öztel, O.N., Elçiçek, S., Ateş, S.C. ve Karaca T.D., (2010). "Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesinde yaklaşımlar ve problemler", Türkiye Parazitoloji Dergisi, 34: 122-130 .
- [55] Kozacı, D.L., Ertuğ, S., Kavak, T., Okyay, P., Chikanza, I.C. ve Ertabaklar, H., (2005). "Kutanöz Leishmaniasisli olgularda serum makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MİF) değerlerinin araştırılması", Türkiye Parazitoloji Dergisi, 29: 145-148.
- [56] Juttner, S., Bernhagen, J., Metz, C., Rollinghoff, M., Bucala, R. ve Gessner, A., (1998). "Migration inhibitory factor induces killing of Leishmania major by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alfa", J Immunol, 161: 2383-2390.
- [57] Bacher, M., Metz, C., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T. ve Bucala, R., (1996). "An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation", Proc Natl Acad Sci USA, 93: 7849-7854.

- [58] Castes, M. ve Tapia, F.J., (1998). "Immunopathology of American tegumentary Leishmaniasis", *Acta Cient Venez*, 49: 42-56.
- [59] Liese, A., (2008). "The innate immune response against Leishmania", *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 8: 279-288.
- [60] Gurel, M.S., Ulukanlıgil, M. ve Ozbilge, H., (2002). "Cutaneous Leishmaniasis in Sanliurfa: epidemiologic and clinical features of the last four years (1997-2000). *Int J Dermatol*, 41: 32-37.
- [61] Escobar, M.A., Martinez, F., Scott Smith, D. ve Palma, G.I., (1992). "American cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis (tegumentary): a diagnostic challenge. *Trop. Doct*, 22: 69-78.
- [62] Rashid, M., "Diagnosis of Leishmaniasis in Children", Chapter 11, [dx.doi.org/10.5772/58237](https://doi.org/10.5772/58237).
- [63] Navin, T.R., Arana, F.E., de Merida, A.M., Arana, B.A., Castillo, A.L. ve Sivers, D.N., (1990). "Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods", *AmJ Trop Med Hyg*, 42: 36-42.
- [64] Romero, G.A., Guerra, M.V., Paes, M.G., Cupollillo, E., Bentin Toaldo, C., Macedo, V.O. ve Fernandes, O., (2001). "Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania (Vianna) guyanensis*", *Acta Trop*, 79: 225-229.
- [65] Lightner, L.K., Chulay, J.D. ve Bryceson, A.D., (1983). "Comparison of microscopy and culture in the detection of *Leishmania donovani* from splenic aspirates", *Am J Trop. Med Hyg*, 32: 296-299.
- [66] Tsokana, C.N., Athanasiou, L.V., Valiakos, G., Spyrou, V., Manolakou, K. ve Billinis C., "Molecular diagnosis of Leishmaniasis, species identification and phylogenetic analysis" Chapter 8, [dx.doi.org/10.5772/57448](https://doi.org/10.5772/57448).
- [67] Andresan, K., Gaafar, A., El-Hasan, A., İsmail, A., Dafaila, M., Theander, T.G. ve Kharazmi A., (1996). "Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous Leishmaniasis"
- [68] Aviles, H., Belli, A., Armijos, R., Monroy, F. ve Harris, E., (1999). "PCR detection and identification of leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador : a comparison with classical diagnostic methods", *J Parasitol*, 85:181-187.
- [69] Reithinger, R., Jean-Claude, D., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. ve Brooker S., (2007). "Cutaneous Leishmaniasis", *Lancet*, 7: :581-596.

- [70] Özensoy, S., Ozbel, Y., Turgay, N., Alkan, M.Z., Gul, K., Gilman-Sachs, A., Chang, K.P., Reed, S.G. ve Ozel, M.A., (1998). "Serodiagnosis and epidemiology of visceral Leishmaniasis in Turkey", *Am J Trop Med Hyg*, 59: 363-369.
- [71] El Roufaie Mohammed, E.A., Wright, E., Kager, P.À., Laarman, J. ve Pondman, K., (1985). "ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of kala-azar", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 344-350.
- [72] Gavvani, A.S.M., Vatan, S.K. ve Ghazanchaei, A., (2008). "KAtex antigen-detection test as a diagnostic tool for latent visceral Leishmaniasis cases", *African Journal of Biotechnology*, 7:852-859.
- [73] Boelaert, M., Bhattacharya, S., Chappuis, F., El Safi, S.H., Hailu, A., Mondal, D., Rijal, S., Sundar, S., Wasunna, M. ve Peeling, R.W., (2007). "Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral Leishmaniasis", *Nature Reviews Microbiology*, 5: 30-39.
- [74] Mary, C., Lamouroux, D., Dunan, S. ve Quilici, M., (1992). "Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic.
- [75] Ateş, S.C., Bağirova, M., Allahverdiyev, A.M., Baydar, S.Y., Koç, R.Ç., Elçiçek, S., Abamor, E.Ş. ve Öztel, O.N., (2013). "Detection of antileishmanial antibodies in blood sampled from blood bank donors in İstanbul", *Future Microbiology*, 7: 774-779.
- [76] Özlem, B., Tamer, Y., Arzu, F., Tuba, Y., Nevzat, Y., (2011). "Anti-Salmonella Enteritidis Antikorları Salgılayan Fare Hibridomalarının Geliştirilmesi ve Ön Karakterizasyonları" *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17: 667-670.
- [77] Cho, Y.J., Lee, D.H., Kim, D.O., Min, W.K., Bong, K.T., Lee, G.G., Seo, J.H., (2005). "Production of a Monoclonal Antibody against Ochratoxin A and Its Application to Immunochromatographic Assay", *J. Agric. Food Chem.*, 53: 8447-8451.
- [78] Volkova, O., Guselnikov, S., Mechetina, M., Chikaev, N., Baranov, K., Kulemzin, S., Reshetnikova, E., Najakshin, A. ve Taranin, A., (2014). "Development and Characterization of Domain-Specific Monoclonal Antibodies Produced Against Human SLAMF9." DOI: 10.1089/mab.2014.0010.
- [79] Ethan, A. ve Lerner, B.A., (1981). "How to Make a Hybridoma", *Yale Journal of Biology and Medicine*, 54: 387-402.

- [80] Aguilar, J.C. ve Rodriguez, E.G., (2007). "Vaccine adjuvants revisited", *Vaccine*, 25: 3752-3762.
- [81] Achal, P., Nicholas, M.V. ve Jerry, B.U., (2005). "Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants", *Nat. Med.*, 11: 63–S68.
- [82] Tagliabue, A. ve Rappuoli, R., (2008). "Vaccine adjuvants: the dream becomes real", *Hum. Vaccine*, 4: 347–349.
- [83] Edelman, R., (1980). "Vaccine adjuvants", *Rev. Infect. Dis.*, 2: 370–383.
- [84] Neutra, M.R., PRingault, E. ve Kraehenbuhl, J.P., (1996). "Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses", *Annu Rev Immunol*, 1996: 275-300.
- [85] Aguilar, J.C. ve Rodriguez, E.G., (2007). "Vaccine adjuvants revisited", *Vaccine*, 25: 3752-3762.
- [86] Sivakumar, S.M., Safhi, M.M., Kannadasan, M. ve Sukumaran, N., (2011). "Vaccine adjuvants – Current status and prospects on controlled release adjuvancity", *Saudi Pharmaceutical Journal*.
- [87] Le Moignic, P., (1916). "Application to man of vaccines consisting of emulsions in fatty substances (lipo-vaccines)", *Compt. Rend. Soc. Biol.* 29: 352–358.
- [88] Aguilar, J.C. ve Rodriguez, E.G., (2007). "Vaccine adjuvants revisited", *Vaccine*, 25: 3752-3762.
- [89] Freund, J., (1956). "The mode of action of immunological adjuvants", *Adv. Tuberc. Res.*, 7: 130–148.
- [90] Davenport, F.M., (1968). "Seventeen years' experience with mineral oil adjuvant influenza virus vaccines", *Ann. Allergy*, 26: 288–292.
- [91] Murray, R., Cohen, P. ve Hardegree, M.C., (1972). "Mineral oil adjuvants: biological and chemical studies", *Ann. Allergy*, 30: 146–151.
- [92] Potter, M. ve Boyce, C.R., (1962). "Induction of plasma-cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants", *Nature*, 193: 1086–1087.
- [93] Gupta, R.K., Relyveld, E.H., Lindblad, E.B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S. Ve Gupta, C.K., (1993). "Adjuvants – a balance between toxicity and adjuvanticity", *Vaccine*, 11: 293–306.

- [94] Aucouturier, J., Dupuis, L., Deville, S., Ascarateil, S. ve Ganne, V., (2002). "Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines", *Expert Rev. Vaccines*, 1: 111–118.
- [95] Eldrige, J.H., Staas, J.K., Meulbrock, J.A., Tice, T.R. ve Gilley, R.M., (1991). "Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system", 28: 287-90.
- [96] Topuzogullari, M., Koc, R.C., Isoglu, S.D., Bagirova, M., Akdeste, Z., Elcicek, S., Oztel, O.N., Baydar, S.Y., 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*.
- [97] Singh, M., Kazzaz, J., Ugozzoli, M., Malyala, P., Chesko, J. ve Ohagan, D.T., (2006). "Polyactide-co-glycolide microparticles with surface adsorbed antigens as vaccine delivery systems", *Curr Drug Deliv*, 3:115-20.
- [98] Kabanov, V.A., (2004). "From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines", *Pure Appl. Chem.*, 76: 1659-1677.
- [99] Dambaeva, S.V., Mazurov, D.V., Golubeva, N.M., Dyakonova, V.A., Pinegin, B.V. ve Khaitov, R.M., (2003). "The effect of polyoxidonium on the phagocytic activity of human peripheral blood leukocytes", *Central European Journal of Immunology*, 28.
- [100] Handman, E. ve Hocking, R.E., (1982). "Stage-Specific, Strain-Specific and Cross-Reactive Antigens of *Leishmania* Species Identified by Monoclonal Antibodies", *Infection and Immunity*, 28-33.
- [101] Fong, D. ve Chang, K.P., (1982). "Surface antigenic change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: Identification by monoclonal antibodies", *Proc.Natl.Acad. Sci.*, 79: 7366-7370.
- [102] Khabiri, A.R., Bagheri, F., Naddaf, S.R., Assmar, M. ve Hosseini Taghavi, A., (2004). "Characterization of a Monoclonal Antibody Specific for the Parasite Surface Antigen-2 of *Leishmania major*", *Iranian Journal of Public Health*, 33: 10-14.
- [103] Symons, F.M., Murray, P.J., Osborn, A.H., Cappai, R. ve Handman, E., (1994). "Characterization of a polymorphic family of integral membrane proteins in promastigotes of different *Leishmania* species".
- [104] Russel, D.G. ve Talamos-Rohana, P., (1989). "Leishmania and macrophages: a marriage of inconvenience", *Immunol Today*, 10: 328-34.

- [105] Handman, E., Osborn, A.H., Symons, F., Van Driel, R. ve Cappai, R., (1995). "The Leishmania promastigotes surface antigen 2 complex is differentially expressed during the parasite life cycle", *Mol Biochem parasitol*, 74: 189-200.
- [106] World Health Organisation , Leishmaniasis, Essential Leishmaniasis Maps, http://www.who.int/Leishmaniasis/Leishmaniasis_maps/en/index.html, 12 nisan 2010.
- [107] Herwaldt, BL., (1999). "Leishmaniasis", *The Lancet*, 354: 1191-1199.
- [108] 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.
- [109] 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 African and American visceral Leishmaniasis", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 775.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Aslı Pınar ZORBA
Doğum Tarihi ve Yeri : 01.05.1989 / Ankara
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : aslipinarzorba@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	
Lisans	Biyoloji	İstanbul Üniversitesi	2012
Lise	Fen Bilimleri	Ankara Kocatepe Mimar Kemal Yabancı Dil Ağırlıklı Lise	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2011	Max Planck Institute for Molecular Genetics, Molecular Biology of Metabolism , Dr. Markus Ralser Lab.	Yaz Stajeri (summer student)
2011	T.C Adli Tıp Enstitüsü Biyolojik İhtisas Dairesi	Stajyer
2010	İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü Moleküler Tıp Bölümü	Stajyer

YAYINLARI

Makale

1. The effect of CO₂ laser beam welded AISI 316L austenitic stainless steel on the viability of fibroblast cells, *in vitro*. *Materials Science and Engineering: C* Volume 60, 1 March 2016, Pages 211–218. doi:10.1016/j.msec.2015.11.035

Bildiri

1. “LEİSHMANİASİS’İN TANISINDA KULLANILMAK ÜZERE ÜRETİLEN HİBRİDOMALARIN ANTİKOR ÜRETİMİNE KRİYOPREZERVASYONUN ETKİSİNİN İNCELENMESİ” 19.Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu, Erzurum,2015
2. “Leishmaniasis’in tanısına yönelik mikrokültür yöntemi” Workshop, 19.Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu, Erzurum,2015
3. “LEİSHMANİASİS’E KARŞI YÜZEY MOLEKÜLLERİNE DAYALI AŞI GELİŞTİRMEK ÜZERE L. TROPİCA PARAZİTLERİNİN BÜYÜK ÖLÇEKLI ÇOĞALTILMASININ OPTİMİZASYONU”, Ege Üniversitesi, Aşı Bilimleri Kongresi, İzmir,2015
4. “HİBRİDOMA TEKNOLOJİSİNE DAYALI L.TROPİCA’YA KARŞI POLİKLONAL ANTİKOR ÜRETİLMESİNDE FARKLI ADJUVANTLARIN ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ “ Ege Üniversitesi, Aşı Bilimleri Kongresi, İzmir,2015
5. “KUTANÖZ LEİSHMANİASİS’E KARŞI TANI KİTİ OLUŞTURMAK ÜZERE HİBRİDOMA TEKNOLOJİSİNE DAYALI POLİKLONAL ANTİKORLARIN ÜRETİLMESİ” Ege Üniversitesi, Aşı Bilimleri Kongresi, İzmir,2015

Proje

1. “Kütanöz Leishmaniasis’e Neden Olan L. tropica’dan İzole Edilen Lipofosfoglikan Moleküllerine Karşı Monoklonal Antikor Teknolojisine Dayalı Tanı Kitinin Geliştirilmesi”, Proje No: 2013-2-STZ-0254
2. “Farklı Doku Kaynaklarından Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücreler ile İnsan Meme Kanseri Hücreleri Arasındaki Etkileşimin İncelenmesi” PROJE NO 2015-07-04-KAP04

ÖDÜLLERİ

1. “HİBRİDOMA TEKNOLOJİSİNE DAYALI L.TROPİCA’YA KARŞI POLİKLONAL ANTİKOR ÜRETİLMESİNDE FARKLI ADJUVANTLARIN ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ “ Ege Üniversitesi, Aşı Bilimleri Kongresi Poster 3.lük Ödülü