

AŞI ÜRETİMİNDE BİYOTEKNOLOJİ

Prof. Dr. Mustafa ARDA*

Araş. Gör. Hakan YARDIMCI*

Araş. Gör. Gengiz ÇETİN**

Bugün hem gelişmekte olan hem de az gelişmiş ülkelerde, insan ve hayvanlardaki ölümlerin nedenini infeksiyonlar oluşturmaktadır. Böyle ülkelerde doğan çocukların % 40 kadarı 5 yaşına gelmeden, direk ve indirek olarak, çeşitli infeksiyöz hastalıklardan ölmektedirler. Bu ülkelerde, hayvan ölümleri de hemen hemen aynı boyutlarda veya daha yüksek bulunmaktadır.

İnfeksiyöz hastalıklarda bakteriyel, viral ve paraziter ajanlar önemli rol oynarlar. Ölenler ile infekte hayvanlar büyük ekonomik kayıplara ve verim düşüklüklerine (et, süt, yumurta, döl verimi, vs.) neden oldukları gibi birçok hastalıkların, direk veya indirek yollarla, insanlara bulaşmasına da sebep olurlar. İnsanların hayvanlarla birarada veya yan yana yaşamaları, bulaşma riskini daha da arttırmaktadır. Bu nedenle insanlar ve evcil hayvanlar için, infeksiyon kaynağının en büyüğünü hayvanlar oluşturmaktadır.

Hayvanlarda infeksiyöz hastalıklarla mücadelede temel noktayı koruma oluşturur. Hastalıklardan korunmada, aşılamanın ucuz ve etkili olması nedeniyle özel bir önemi vardır. Şunu da önemle belirtmek gerekir ki, tek başına aşılama tam bir koruma sağlayamaz. Diğer önlemlerle birlikte uygulandığında daha etkili olur. Bu nedenle, aşılamaı ilkönce düşünmek ve diğer koruyucu önlemleri ikinci dereceye almak doğru değildir ve çok sakıncaları olabilir. Ancak, fakirlik, cahillik, konuya gerekli önemin verilmesi, kemoterapotik maddeler ve diğer korunma hizmetlerinin daha pahalı olması, vs. sebeplerle aşılamanın ön plana geçmesine

(*) A. Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

(**) Y. Y. Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.

ve korumanın genel olarak aşılama dayatılmasına yol açmaktadır. Adeta, koruma demek aşılama demektir, görüşü ağırlık kazanmış olmaktadır. Bu görüşün yalnız Türkiye'de değil birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde de geçerli olduğu görülmektedir.

Koruyucu amaçla kullanılan aşılar halen başlıca iki **konvansiyonel** yöntem ile hazırlanmakta ve pratiğe sevk edilmektedirler. Bu aşılarda mikroorganizmalar tam olarak (bütünü ile) aşı materialinde bulunurlar. Bunlar da :

- 1) İnaktif (ölü) aşılar, ve
- 2) Aktif (canlı, attenuue) aşılar.

İnaktif (Ölü) Aşılar

İnaktif aşılar, çeşitli infeksiyon etkenlerinin (bakteri, virus) fiziksel (ısı, UV-ışınları) ve kimyasal (formaldehid, Beta propiolakton, iminler, vs) maddelerle inaktive edilmesi ile elde edilirler. İnsan ve hayvanlarda inaktif aşılarından çok fazla yararlanılmaktadır.

Bu tür hazırlanan aşıların bazı dezavantajları da vardır. Bunlar da :

- 1) Çok miktarda kullanılırlar (1, 2, 5, 10 ml),
- 2) Genellikle, iki ve bazen de üç doz halinde verilirler,
- 3) Adjuvantlarla kullanılmaları etkinliklerini daha artırır,
- 4) Hazırlanmaları zor ve zaman alıcıdır,
- 5) Kısa süre bağışıklık verirler,
- 6) Postvaksinal yan ve zararlı etkileri vardır,
- 7) İnaktivasyonun iyi yapılamaması infeksiyonlara neden olabilir,
- 8) Muhafazaları sorun yaratabilir,
- 9) İçlerinde bulunan bakteri veya virusun yapısal bütünlüğü bozulabilir.

Aktif (Canlı) Aşılar

Aktif aşılar, doğal veya suni olarak çeşitli yöntemler uygulanarak virulensi zayıflatılmış (attenuue edilmiş) mikroorganizmalardan hazırlanırlar. Attenuasyonda, bakteri ve virusların, kendilerinin alışık olmadığı besi yerlerinde, hücrelerde, yumurtalarda ve hayvanlarda devamlı pasajları yapılmak suretiyle virulensleri azaltılır.

İnsan ve hayvanlardaki birçok infeksiyonları önlemede aktif aşılardan kullanılmaktadır. Bu tarzda hazırlanan aşılardan da bazı sakıncaları bulunmaktadır. Bunlar da :

- 1) Vücutta üreyerek subklinik infeksiyonlara ve bazen de hastalıklara neden olabilirler,
- 2) Üretildikleri ortamlardan (doku kültürü, embriyolu yumurta, deneme hayvanları, diğer besi yerleri, vs) yabancı virus ve bakteri ile kontamine olabilirler,
- 3) Bu kontaminatlardan bazıları insan ve hayvanlar için tehlikeli infeksiyonlara yol açabilir,
- 4) Muhafazaları kısa sürelidir,
- 5) Titrelelerinin ayarlanmasında zorluklar vardır,
- 6) Suşların bazıları geriye mutasyonla virulens kazanarak tehlikeli infeksiyonların çıkmasına neden olabilir,
- 7) Bazen de, aşı suşlarının antijenik yeteneklerini kaybetmesi sonu hiç bir bağışıklık oluşmayabilir,
- 8) Suni attenuasyonlar oldukça zor ve zaman alıcıdır,
- 9) Postvaksinal virus ve bakterinin başka şahıslara bulaşma riski bulunmaktadır,
- 10) Aşı kombinasyonları genellikle sınırlıdır.

Yukarıda kısaca belirtildiği gibi mikroorganizmaların tüm yapılarını içeren, inaktif veya aktif olarak hazırlanan aşılardan başlıca sakıncaları, biyoteknolojik yöntemlerle üretilen aşılardan ortadan kaldırılmakta ve aşı elde etme metodlarına yeni ufuklar ve yeni boyutlar getirmektedir.

Bu yeni yöntemle aşı hazırlanmasında başlıca 4 strateji uygulanmaktadır :

- 1) İnfeksiyon etkenlerinin immunojenik olan komponentlerinin sentezlerini kodlayan genlerin klonlanması sonucu elde edilen gen ürünlerinin aşı olarak kullanılması (**Rekombinant DNA Aşılardan**)
 - a) Rekombinant bakteriyel aşılardan
 - b) Rekombinant viral aşılardan
 - c) Rekombinant paraziter aşılardan

- 2) İnfeksiyon etkenlerinin immunojenik komponentlerini oluşturan proteinlerin kimyasal sentezleri ile elde edilen peptidlerin aşı olarak kullanılmaları (**Sentetik Peptid Aşılari**)
 - a) Sentetik bakteriyel aşılari
 - b) Sentetik viral aşılari
 - c) Sentetik paraziter aşılari
- 3) İnfeksiyon etkenlerinin veya antijenlerin immunojenik komponentlerinde bulunan epitoplari gibi aktiviteye sahip olan monoklonal anti-idiotip antikorların aşı olarak kullanılması (**Anti-idiotip Antikor Aşılari**)
 - a) Bakteriyel anti-idiotip antikor aşılari
 - b) Viral anti-idiotip antikor aşılari
 - c) Paraziter anti-idiotip antikor aşılari
- 4) İnfeksiyon etkenlerinin genomlarında bulunan ve patojeniteyi sağlayan genlerin çıkarılması suretiyle elde edilen virulensi zayıflatılmış mutantların aşı olarak kullanılması (**Mutant Aşılari**).

Bu yeni aşılari konvansiyonel yöntemlerle elde edilenlerin birçok dezavantajlarını ortadan kaldırmaktadır. Bu tür aşılarda, mikroorganizmalar tüm olarak kullanılmamaktadırlar. Özellikle, etkenlerde bulunan ve sadece antijeniteyi kodlayan genlerin DNA segmentlerinden yararlanılmaktadır.

Bu nedenle de diğer gereksiz ve bazen de zararlı etki yaratan proteinleri, toksik substansları, vs kodlayan genlerden, bunlara karşı vücutta oluşan antikorlardan ve zararlı yan etkilerden kaçınılmış olunmaktadır. Bu tür aşılari içinde aktif bir DNA bulunmadığından vücutta herhangi bir infeksiyon oluşmadığı gibi geriye mutasyonla virulans kazanma gibi tehlikeli durumlar da ortadan kalkmaktadır. Yeni protein aşılari liyofilize edilerek uzun süre saklamak ve uzak bölgelere göndermek mümkün olmaktadır. İyi bir tarzda elde edildiklerinde konvansiyonel aşılardan daha güvenlidirler ve iyi bağışıklık verebilirler.

REKOMBİNANT DNA AŞILARI

İnfeksiyöz etkenlerin, genellikle, immunojenik olan yüzey proteinlerini, antijenik determinantlarını, virulens faktörlerini, tok-

sinlerini, vs kodlayan genlerin hücre içinde veya konakçı bir hayvanda klonlanması ve genin ekspresyonu (transkripsiyon ve translasyonu) sonu elde edilen gen ürünlerinin aşı olarak kullanılması rekombinant DNA aşularının esasını oluşturmaktadır.

Bu yöntem yardımıyla, DNA üzerinde bulunan önemli bir gen, özel restriksiyon enzimleri ile (Örn. **EcoRI**, **PstI**, **Hind III**, vs) buradan çıkarıldıktan, taşıyıcı (vektör) bir DNA ile (plasmid, bakteriyofaj, virus, bakteri) birleştirildikten sonra bu rekombinant plasmid (veya faj, virus) özel yöntemlerle konak alıcı bir hücreye (bakteri, hücre) veya hayvana aktarılarak burada ekspresyonunu sağlamak olanak dahiline girmiştir.

Rekombinant DNA teknolojisi, aynı zamanda, genomları RNA karakterinde olan viruslardan istenilen genin çıkarılmasına (reverse transkriptase enzimi ve sonra da polimerase-I enzimi ile çift iplikçikli komplementer DNA'ya çevrildikten sonra) ve ekspresyonuna da yardımcı olmaktadır.

Rekombinant DNA teknolojisinde kullanılan vektörler arasında plasmidler (pBR 322, pSC 101, vs), bakteriyofajlar (lambda, MS13, vs), viruslar (vaksinia, SV40, adenovirus, retrovirus, vs) ve bakteriler son yıllarda (**BCG**, **S. typhi**, **S. typhimurium**, **E. coli**, vs) fazlaca kullanım alanı bulmuşlardır. Konakçı hücre olarak genin ekspresyonunu sağlamak amacıyla bakterilerin kullanıldığı (özellikle, **E. coli**) durumlarda, bakteri hücresi içinde bulunan çeşitli toksik substanslar ve metabolitlerle de kontamine olabildiği gibi protease'lar tarafından da hidrolize edilebilirler. Bu durum, gen ürününün zamanında elde edilmesini ve purifikasyonunu zorunlu hale getirmektedir. Rekombinant plasmidleri ve fajları klonlamada prokaryotiklerden **E. coli**, **B. subtilis** ve ökaryotiklerden de **S. cerevisiae**; rekombinant virusları klonlamada da devamlı hücre hatları (cell line) ve konak hayvanlar kullanılmaktadırlar.

Gen ürünü protein yeterli miktarda ve saf olarak elde edildikten sonra etkinliği, antijenitesi ve diğer özellikleri (yan etkileri, vs) çok dikkatli olarak kontrol edilir.

Rekombinant Bakteriyel Aşular

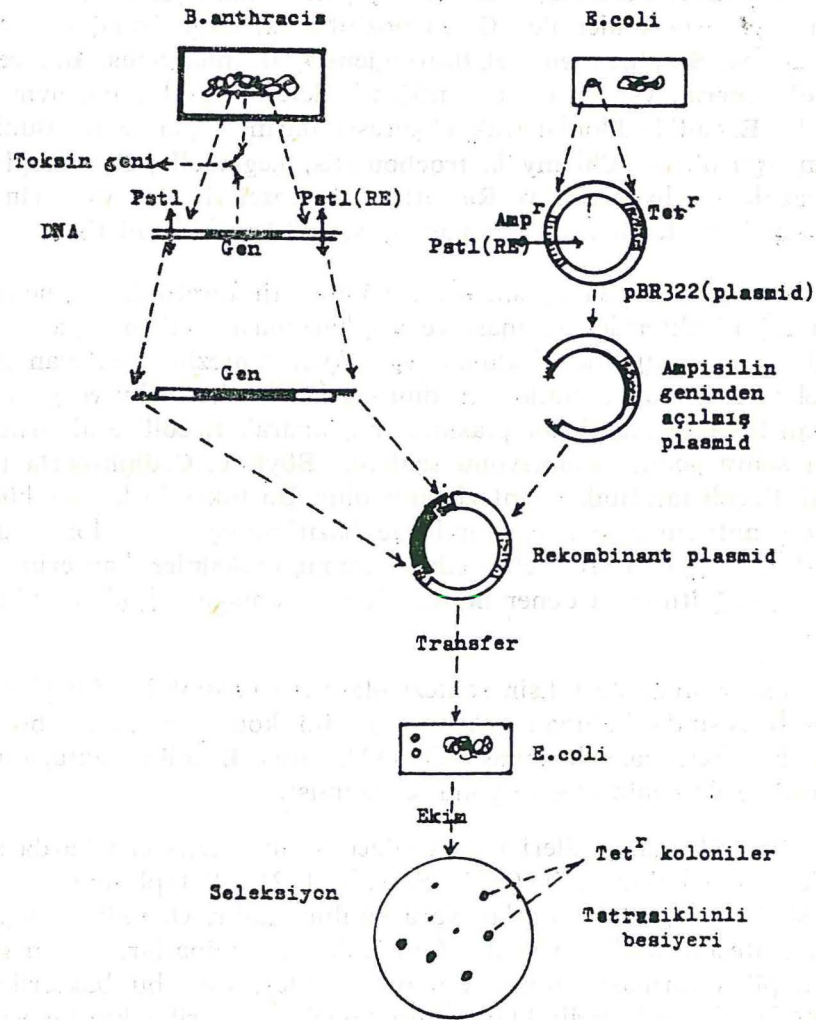
Bu konudaki ilk çalışmaları, yeni doğan hayvanlarda (buzağı, kuzu, domuz) öldürücü diarelere neden olan enterotoksijenik

E. coli'ler de (ETEC) bulunan pilusların proteinlerini kodlayan genlerin klonlanması suretiyle aşuların elde edilmesi oluşturmuştur. Pilus'lar, **E. coli**'lerin barsak epiteline yapışmalarına, üremelerine ve kolonizasyonuna yardımcı olduğundan infeksiyonu kolaylaştırmaktadırlar. Pilus proteini (**Pilin**, 14-16 kd), birbirinden farklı antijenik yapıda çeşitli **E. coli**'lerden (ETEC) izole edilmiştir (Örneğin, K88ab, K88ac, K88ad ve 987P domuzlardan; K99 buzağı, kuzu ve domuzlardan; CFA₁, CFA₂ vs insanlardan). Bazı pilusların proteinlerini kodlayan genler (Tip 1 ve 987P) bakterinin kromozomlarında bulunmasına karşın diğerlerinde (K88, K99, CFA₁ ve CFA₂ gibi) bir plasmidde yerleşmiştir.

Domuzlarda diarelere ve ölümlere neden olan **E. coli**'lerdeki plasmidlerde bulunan K88 pilus geni çıkarılarak bir vektöre ve buradan da toksijenik olmayan başka bir **E. coli**'de klonlanarak ekspresyonu sağlanmıştır. Elde edilen pilin proteini duyarlı hayvanlara verildiğinde **E. coli**'lerin barsak epiteline yapışmasını önlemekte ve aynı zamanda vücuttaki antikor oluşumunu uyarmaktadır. Ayrıca, böyle aşular doğumdan önce gebe domuzlara verildiğinde, kanda oluşan antikorların kolostrumla yavrulara geçtiği de saptanmıştır.

ETEC'lerin termolabil olan **enterotoksin**'lerinin B komponentini (hücrelere bağlanmayı sağlar) kodlayan gen de benzer tarzda plasmidlerden çıkarılmış ve bir bakteride klonlanarak ekspresyonu sağlanmıştır. ETEC infeksiyonlarını kontrol altına almada, K99 pilin proteinine karşı hazırlanan monoklonal antikorlar buzağılara oral verildiğinde diarelerin şiddetinin ve öldürücü etkisinin azaldığı bildirilmiştir. **N. gonorrhoeae**'nin penisiline dirençli suşuna karşı insanları korumada, etkene ait pilus antijeni **E. coli**'de klonlanabilmiştir. Sığırlardaki Brucellosis'in etkeni **Br. abortus** ve Anaplasmosis'in etkeni **A. marginale**'ye ait immunojenik komponentler de **E. coli**'de klonlanmıştır. Ancak, elde edilen gen ürünlerinin protektif etkilerinin ve infeksiyonun insidensini azaltmadaki rollerinin çok dikkatli incelenmesi gerekmektedir. **Bacillus anthracis**'in toksin proteinini kodlayan gen, pBR 322 plasmidi aracılığı ile **E. coli**'de klonlanmıştır. Gen ürününün antijenik değeri üzerindeki çalışmalar devam etmektedir (Şekil - 1). **Streptococcus mutans**'ın (insanlarda diş çürüklüğüne neden olan) esas antijenik komponentleri lambda fajı vektör olarak kullanılarak **E. coli**'de klonlanmıştır. Elde edilen proteinin aşı olarak kullanılması ve değeri üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

B. ANTHRACIS TOKSİN GENİNİN KLONLANMASI AŞAMALARI



Şekil-1

Yukarıda bildirilen mikroorganizmaların dışında, bir çok etkenin antijenik determinantları, virulens faktörleri, toksin genleri, vs önemli genleri, birçok mikroorganizmada klonlanmış ve elde edilen gen ürünü proteinin antijenik değeri incelenmiş ve bazıla-

rından olumlu sonuçlar alınmıştır. Bunlar arasında bazı Gram negatif bakterilerin (**V. cholera**, **K. pneumonia**, **S. typhimurium**, **H. influenzae**, **Ps. aeruginosa**, vs) çeşitli immunojenik substanslarını kodlayan genler ile Gram pozitif mikroorganizmalara (**Str. pyogenes**, **Staph. aureus**, **B. thuringiensis**, **B. sphaericus**, **B. cereus**, **C. diphtheria**, vs) ait çeşitli antijenik determinantlar da, aynı şekilde, **E. coli**'de klonlanarak ekspresyonlarını sağlamıştır. Bunlardan ayrı olarak **Chlamydia trochomatis**, **Legionella**, **Pneumophila**, **Mycoplasma hyorhinae** ve **Rickettsia prowazekii**'ye ait genlerin de **E. coli**'de moleküler klonlanmasının yapıldığı bildirilmiştir.

C. diphtheria'da toksin sentezi beta fajı tarafından yöneltilir. Bu fajın bakteriden çıkması veya çıkarılması, etkeni apatojenik hale getirir. Bu fajda bulunan ve toksin sentezini kodlayan gen, özel restriksiyon enzimleri yardımıyla kesilerek ayrılır ve geni taşıyan DNA segmenti, bir plasmide bağlanarak **E. coli**'ye aktarıldıktan sonra genin ekspresyonu sağlanır. Böylece, **C. diphtheria** toksini, **E. coli** tarafından sentezlenmiş olur. Bu toksinin kanser hücre yüzey antijenlerine karşı farelerde hazırlanmış monoklonal antikorlara bağlanmasıyla elde edilen **immunotoksinler** kanserin teşhis ve sağaltımında denenmiş ve olumlu sonuçlar alındığı açıklanmıştır.

Cl. tetani'de de toksin sentezi plasmide bağımlıdır. Bu plasmidin DNA'sında bulunan toksin sentezini kodlayan genin, benzer tarzda çıkarılması, bir plasmide bağlanarak **E. coli**'ye aktarılması suretiyle de genin ekspresyonu sağlanmıştır.

Genetik materyalleri veya genleri aktarmada, son yıllarda avirulent bazı bakterilerin (**BCG**, **S. typhi Ty21a**, **S. typhimurium aro A SL3261**, vs) DNA'larından yararlanılmaktadır. Önemli proteinlerin sentezini kodlayan genler (antijenik determinatlar, toksin genleri, pilus formasyonunu kodlayan genler, vs) bu bakterilerin DNA'larıyla birleştirildikten sonra konakçıya verilmekte ve genin ekspresyonu sağlanmaktadır. Hayvanların vücudunda hem bakteriye ve hem de taşıdıkları gene karşı koruyucu antikorların meydana geldiği bildirilmektedir. Örn. **S. typhimurium**'a bağlanan pilus proteinini (K88) kodlayan gen'le oluşturulan rekombinant, farelere oral verildiğinde **E. coli** infeksiyonlarına karşı koruduğu bildirilmiştir. **S. typhi Ty21a** DNA'sına bağlanan **Sh. sonnei** geni ile elde edilen rekombinant, insanlar, shigellosis ve tifoya karşı koru-

duğu bildirilmiştir. Aynı amaçla, BCG (**Myco. bovis**) DNA'sına bağlanan bazı genlerle de bağışıklık çalışmaları sürdürülmektedir.

Klonlanmış virulens genleri, DNA probe hazırlamada ve hibridizasyon yöntemlerinde kullanabildikleri gibi, bu genlerin site spesifik mutagenesis yöntemleri ile daha az toksik ve daha fazla immunojenik hale getirebileceği bildirilmektedir. Ayrıca, klonlanmış virulens genlerinin, spesifik ökaryotik hücreyi tanıyan proteini kodlayan genle füzyonu sonu elde edilen hibrid proteini çok etkili toksin veren sistem oluşturabileceği ve kanserin tedavisinde kullanılabileceği açıklanmaktadır.

Rekombinant Virus Aşıları

Virusların kapsidlerinde bulunan yüzey proteini ve diğer komponentleri immunojenik bir karaktere sahiptir ve vücuda girdiğinde de immün sistemi uyararak immunolojik bir yanıtın (humoral ve hücreli) meydana gelmesinde etkin bir rolü vardır. Yüzey proteini, sentezini (kapsid proteini) kodlayan genler virusların genomlarında (DNA veya RNA) lokalize olmuşlardır. Ancak, şunu da hatırlamak gerekir ki virüslere ait olan ve antijenik bir özelliği olan **soluble maddelerin** sentezleri de viral genler tarafından yönetilir. Vücutta oluşan antijenik uyarım, sadece vücuda girenlerce değil, aynı zamanda, vücutta replike olanlar tarafından da desteklenir. Bu uyarımın derecesi çeşitli faktörlere göre değişebilir.

Viral aşı hazırlamada birçok noktalara dikkat edilmesi gerekmektedir. Bunlar arasında, virusun genetik materyal yapısı (DNA veya RNA), büyüklüğü, tek veya çift iplikçikli oluşu, mRNA oluşturma etkinliği, immunojenik genin genom üzerindeki lokusu, transkriptte olan mRNA'nın monosistronik veya polisistronik durumları, vs özellikler dikkate alınmalıdır.

Viral genomdan spesifik genin elde edilmesinde başlıca 3 strateji uygulanmaktadır :

- 1) Eğer gen, DNA üzerinde ise, spesifik ve uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak viral DNA, segmentlere ayrılır. İstenilen geni içeren bu segmentler ya bir vektör plazmid veya bakteriyofaj'la bağlanarak, **E. coli'de** klonlanabilir veya bir viral vektör (Vaksinya, SV40, retrovirus, vs) ile birleştikten sonra devamlı hücrelere (cell line) veya hay-

vanlara aktarılarak hem gen ürününün ekspresyonu ve hem de gen ürünü konakçının immun sistemini uyararak koruyucu antikörlerin sentezi uyarılır. Bazı virüslere karşı aşı elde etmede *S. cerevisiae*'den de yararlanılmaktadır.

- 2) Eğer spesifik gen, RNA üzerinde ise, önce reverse transkriptase enzimi ile RNA'ya, bunun komplementeri olan bir DNA (cDNA) sentezlenir ve sonra da buna polimerase I yardımı ile ikinci DNA iplikçığı sentezlenerek çift iplikçikli DNA haline getirilir. Sonraki işlemler, madde - 1'deki gibi uygulanır.
- 3) Bazı durumlarda, konak hücrede sentezlenen (transkripsiyon) ve spesifik geni içeren mRNA'dan yararlanılır. Saf olarak elde edilen mRNA, yukarıda bahsedildiği gibi çift iplikçikli DNA'ya çevrilerek kullanılır.

Plasmid veya viral bir vektöre bağlandıktan sonra hücrelerde klonlanan genin hem miktarında artma olur (replikasyon) ve hem de gen ürününün sentezi sağlanır. Bu gen ürünü protein hücrelerden özel yöntemlerle çıkarılır, saflaştırılır ve gerekli kontrolleri yapılır. Eğer viral rekombinant vektör hayvanlara verilmişse antijenik karakterde olan gen ürünü immun sistemi uyarabilir ve koruyucu antikörlerin sentezine yol açabilir.

Üzerinde fazlaca durulan ve aşılarda yapılması gerekli görülen viral infeksiyonlar ve etkenler arasında şap hastalığı, kuduz, hepatitis B, parvovirüsler, sığır papilloma, herpes, IBR, yalancı kuduz, Rift vadisi humması, vesiküler stomatitis, TGE (domuzların), kedi ve sığırların leukemia'sı, vs ile bazı kanatlı hastalıkları (IB, ILT, IBD, LL, Marek, Newcastle, vs) sayılabilir.

Yukarıda bildirilen yöntemlerden yararlanılarak üretilen aşılarından aşağıda sadece 3 tanesi hakkında özel bilgi verilmektedir. Bunlar da :

- 1) **Hepatitis B Aşısı** : Hepodna virus grubuna ait ve DNA karakterinde çift iplikçikli dairesel bir genoma sahip bulunan Hepatitis B virusunun DNA'sı yaklaşık 3200 nükleotid uzunluktadır. Virus kronik taşıyıcıların serumundan elde edildikten, saflaştırıldıktan sonra virusun DNA'sı ekstre edilir ve immunojenik olan yüzey proteinini kodlayan gen (S-geni), restriksiyon enzimleriyle kesilerek çıkarılır ve bir plasmide (pBR 322) bağlandıktan sonra *E. coli*'

ye aktarılır. Burada gen taşıyan plasmidin fazlaca üremesi sağlanarak gen miktarı artırılır. Sonra, *E. coli*'den gen taşıyan plasmid DNA'sı çıkarılır. Bu plasmid'den de S-geni ayrılarak, kendisinde TDH-3 promotörü bulunan pRIT 12363 *S. cerevisiae* plasmidine aktarılır (ekspresyon plasmidi). Bu plasmid de maya protoplastına transfer edilerek, bu maya hücrelerinin çok fazla üremesi ve genin de ekspresyonu sağlanır. Sonra, maya içinden gen ürünü çıkarılır, saflaştırılır ve gerekli kontrolleri yapılır (immunojenik kontrolleri de dahil) (Şekil - 2).

2) **Şap Aşısı**: Picorna grubuna ait olan şap virusu RNA karakterinde bir genoma sahiptir ve 8000 nukleotid uzunluktadır. Virusun RNA'sına, önce, reverse transkriptase (RT) enzimi ile tek iplikçikli komplementer DNA (cDNA) sentezlenir ve buna da polimerase I enzimi ile ikinci bir DNA sentezlenerek, böylece RNA, çift iplikçikli DNA'ya çevrilir. Bu DNA'dan uygun restriksiyon enzimleri (PstI, PvuII) kullanarak yüzey proteini kodlayan gen (VPI) kesilerek çıkarılır ve pBR 322 plasmidine aktarılır. Sonra da plasmid transformasyonla *E. coli*'ye nakledilerek genin ekspresyonu sağlanır. *E. coli*'den gen ürünü çıkarılarak saflaştırılır ve hayvanlarda antijenik kontrolü yapılarak değerlendirilir (Şekil - 3).

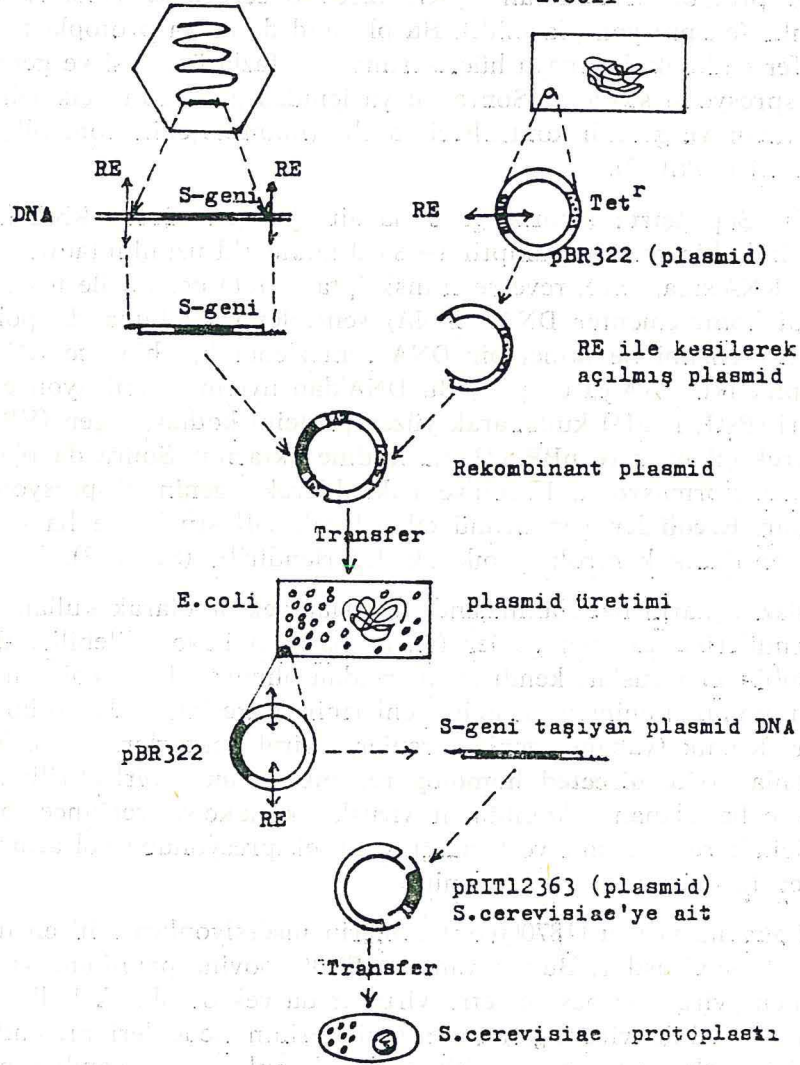
Bazı aşılarda hazırlanmasında viruslar vektör olarak kullanılır ve kendilerine yabancı genler (virus, parazit) ilâve edilebilir. Bu rekombinant viruslar, kendi gruplarından olmayan başka bir virusa ait immundominant protein genlerinin ilâvesiyle elde edilmişlerdir. Konuk (yabancı genler) genler, viral vektörlere rekombinasyonla (**site directed homolog recombination**) birleştirilirler. Böylece hazırlanan rekombinant viruslar konakçıya verince, bunun içinde replike olur ve taşıdığı genin ekspresyonuna yol açarak bu gen ürünü protein sentezlenir.

Vaksinias virusu (187000 bp) genlerin insersiyonları için en uygun vektör virusdur. Bunun yanısıra SV40, bovine papilloma virusu, adeno virus, herpes ve retro viruslar da vektör olarak kullanılmıştır. Vaksinias virusunun fazla seçilmesinin nedenleri arasında, onkojenik olmaması, çok çeşitli genleri kabul etmesi, kendi replikasyonuna mani olmadan büyük bir DNA segmentine (25 kb) tolerans göstermesi, gen ürünlerinin glikozasyonuna yol açması, konakçı spektrumunun çok geniş olması, vs sayılabilir. Deneysel olarak vaksinias virusuna bir çok virus genleri ilâve edilmiştir. Bunlar arasında Hepatitis B, Herpes simplex, Influenza, Transmissible

HEPATİTİS- B AŞISİNİN ÜRETİM AŞAMALARI

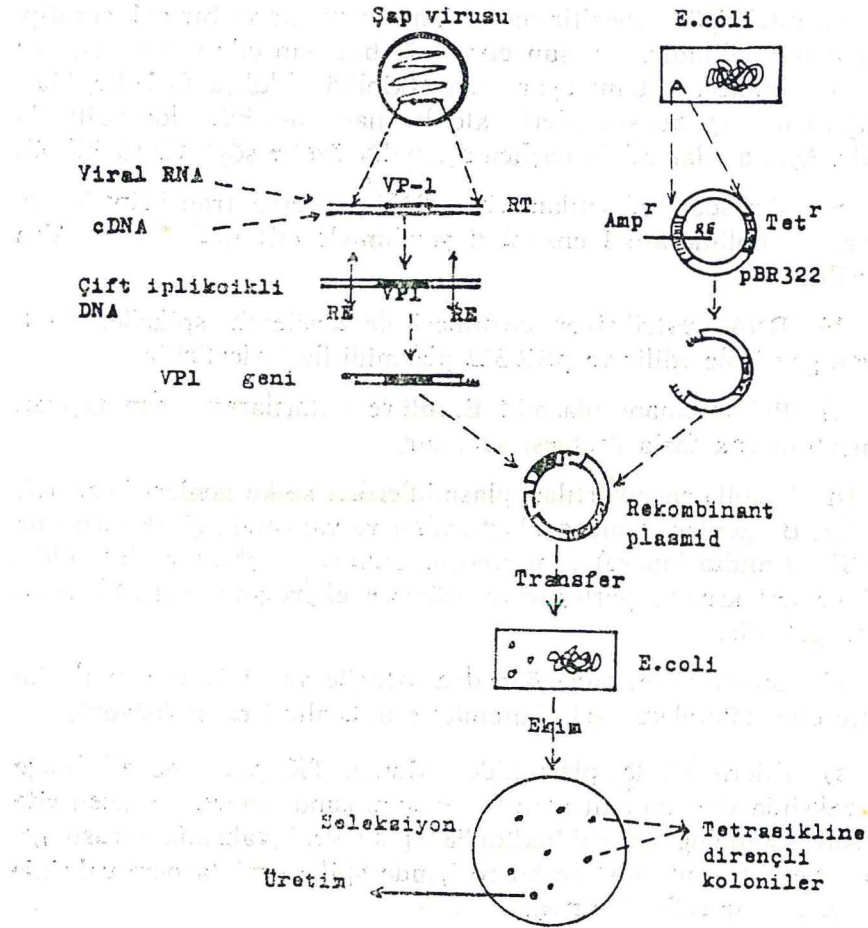
Hepatitis B virusu

E.coli



Şekil-2

ŞAP AŞISI ÜRETİM AŞAMALARI



Şekil-3

gastroenterit (domuzların), vesicular stomatitis, kuduz, Friend murine virus leukemia ve malarya genleri sayılabilir. Aşılamalarda, vücutta üremesi nedeniyle az miktarda rekombinant virusa ihtiyaç duyulur.

3) **Infectious bronchitis virus aşısı**: Coronaviridae grubuna ait olan Infec. bronchitis virusu 80×120 nm boyutlarında ve RNA karakterinde bir genomu sahiptir ($5.5 - 5.7 \times 10^6$ dalton). Kanatlılarda infeksiyöz bronşitis hastalığını oluşturur ve bir çok serotipleri bulunmaktadır. Virusun etrafında bulunan çıkıntılar (spike) vücutta immun sistemi uyarmada etkinliği oldukça fazladır. Hastalığa karşı aşı bu spike'lerin klonlanması suretiyle elde edilmektedir. Aşı hazırlamadaki başlıca aşamalar özetle şöyledir (Şekil-4).

a) Virusdan çıkartılan viral RNA, reverse transkriptase ve sonra da polimerase I enzimleri yardımıyla çift iplikçikli DNA'ya çevrilir.

b) DNA, restriksiyon enzimleri ile kesilerek, spike'leri kodlayan gen izole edilir ve pBR 322 plazmid ile birleştirilir.

c) Rekombinant plazmid **E. coli**'ye aktarılarak, gen taşıyan plazmidin çok fazla üremesi sağlanır.

d) **E. coli**'den çıkartılan plazmidlerden spike genleri kesilerek ayrılır. Bu genler, yeniden oluşturulan ve yapısında çiçek virusuna ait **TK (timidin kinase)** ve **promotor** bulunan başka bir plazmidde, TK genleri arasına yerleştirilir. Böylece **ekpresyon plazmid** meydana getirilir.

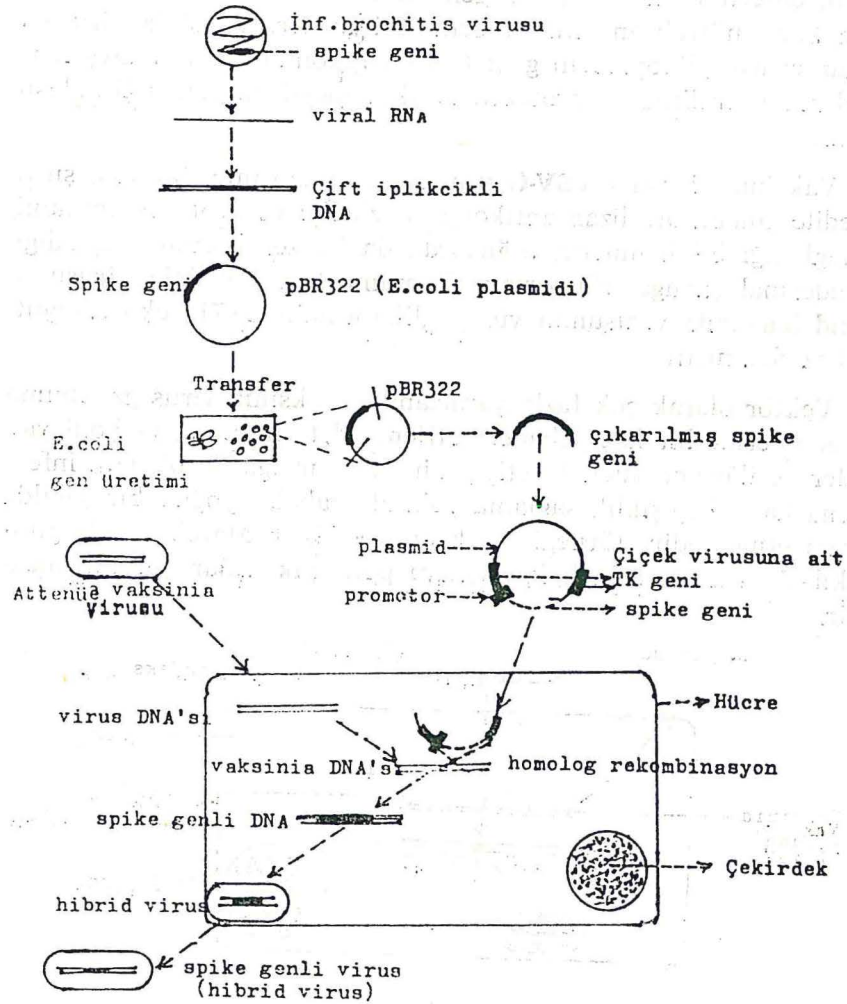
e) Bu plazmid, daha önceden attenüe vaksinia virusu ile infekte olan hücrelere özel yöntemlerle aktarılır (**transfeksiyon**).

f) Hücre içinde, plazmidde bulunan TK genlerine ait bölge ile vaksinia virusuna ait aynı bölgeler arasında meydana gelen **site spesifik homolog recombination**'la spike geni vaksinia virusu genomuna aktarılır. Böylece hücre içinde spike geni taşıyan vaksinia virusu oluşur (**hibrid virus**).

g) Böyle virus, hayvanlara verildiğinde spike geninin ekspresyonu sağlandığı gibi kendisine karşı da bir koruma meydana gelir.

Vaksinia virusu genomuna ilâve edilen **HBsAg** geni hücrelere verilince bu antijenin 22nm partikül halinde sekresyonunu sağladığı açıklanmıştır. Eğer tavşanlar böyle bir rekombinant vaksinia virusu ile infekte edilirse HBsAg'ye karşı antikorlar meydana getirirler. Vaksinia virusu + **HSV-gD** geni ile rekombine edildikten sonra tavşanlara verildiğinde, authentic HSV-gD ile reaksiyon ver-

INFECTIONOUS BRONCHITIS VİRUS AŞISI HAZIRLAMA AŞAMALARI

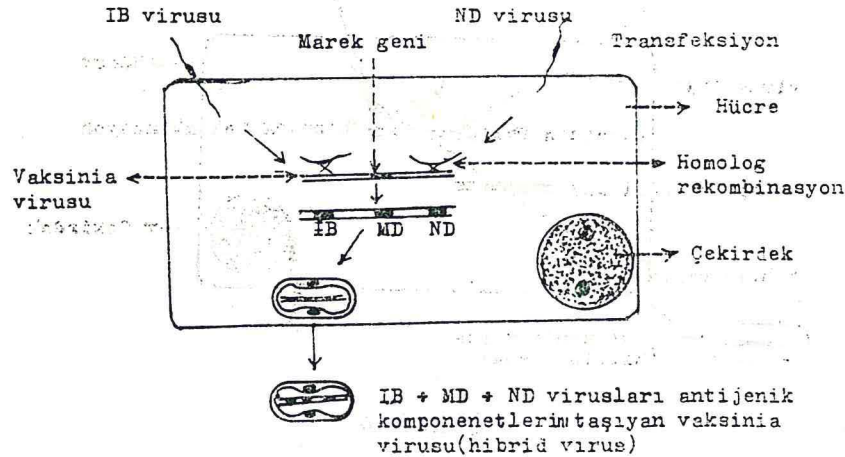


Şekil-4

diği ve HSV'yi nötralize ettiği bildirilmiştir. Bu tarzda aşılanan farelerde de, HSV'ye karşı korunma elde edilmiştir. Vaksinia virusu + **influenza** virusunun hemaglutinin geni rekombinantı, tavşan ve hamsterlerde HI antikoru ve nötralizan antikolar meydana getirdiği açıklanmıştır. Vaksinia virusunun + **TGE** (transmissible gastro enteritis) virusu gp 195 geni ile rekombinasyonu, TGE virüsüne karşı nötralizan antikor sentezini uyarır. Vaksinia virusu + **kuduz virusu** glikoprotein geni (V-RG) rekombinantının tavşan ve farelerde nötralizan ve protektif antikor meydana getirdiği anlaşılmıştır.

Vaksinia virusu + **VSV-G** geni rekombinantının, farelere şırınga edildiğinde nötralizan antikor sentezlediği ve protektif immunité sağladığı bildirilmiştir. Sığırlarda da benzer koruma sağladığı, intradermal şırıngalarla, ortaya konulmuştur. Vaksinia virusu + **friend leukemia** virusunun yüzey glikoprotein gp 71 rekombinantı da hazırlanmıştır.

Vektör olarak çok fazla yararlanılan vaksinia virus genomuna bir gen yerine bir kaç yabancı antijenik determinanti, vs kodlayan genler de ilâve edilmek suretiyle bir defa şırınga ile bir çok infeksiyona karşı bağışıklık sağlama yolunda çabalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (örneğin, vaksinia + IB + Marek + ND gibi) (Şekil - 5). Bu tür hazırlanan aşılar **politopik** aşılar adı verilmektedir.



Şekil-5

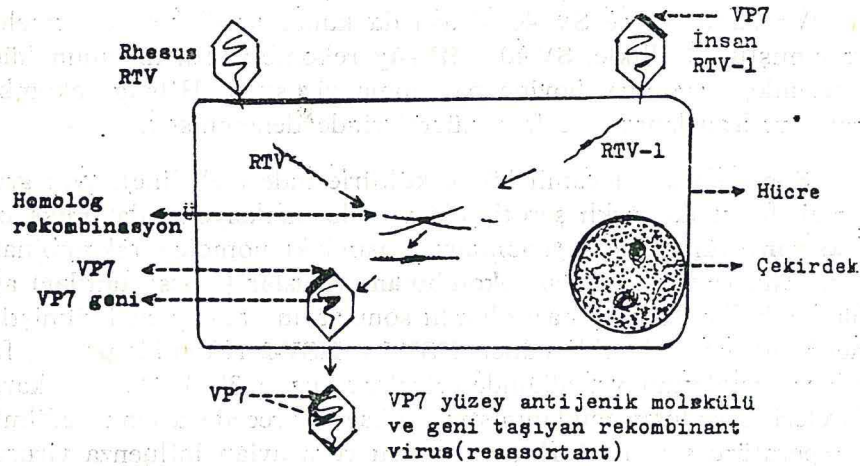
Vaksinia yerine SV 40 virüsü da kullanılarak bazı denemeler yapılmıştır. Özellikle, SV 40 + HBsAg rekombinantı, maymun hücrelerinde, ve ayrıca, bovine papilloma virüsü + HBsAg rekombinantları hazırlanmış ve fare hücrelerinde denenmiştir.

Son yıllarda, devamlı hücre kültürlerinde (cell line), aynı gruba ait fakat iki farklı serotipteki virüsle infeksiyonunda (**miks infeksiyon**), iki virüsün genomları arasındaki homolog rekombinasyon sonu meydana gelen **rekombinant virüsler (reassortantlar)** aşı olarak kullanılmış ve bazı olumlu sonuçların alındığı belirtilmiştir. Açıklandığı tarzda elde edilen **HSV-1 × HSV-2** rekombinantları, farelere intrakutan verildiğinde, virulent suşun 3000 LD₅₀'sine karşı fareleri koruduğu açıklanmıştır. Yüksek derecede attenüe edilmiş temperatüre sensitif **Influenza virüsü** veya avian influenza virüsü, virulent influenza virüsü ile hücre içinde birleştirilerek elde edilen rekombinantın daha az infeksiyona neden olduğu ve daha az virus saçtığı bildirilmiştir. Benzer çalışma atların influenza virüsü ile de yapılmıştır. **Rota virüslerinde**, hücrelerin miks infeksiyonu sonu meydana gelen rekombinantlar elde edilmiş ve aşı olarak değerleri incelenmiştir. İnsan rota virüsü (RTV) genomunda bulunan VP7 geni (kapsidde yüzey antijenik molekülleri kodlayan gen), bovine veya rhesus rota virüsleri ile rekombinasyonu sonu elde edilen reassortantların insanlarda rota virüsünün üremesini sınırladığı bildirilmiştir. Bu rekombinant'ta, rhesus ve insan rota virüsleri genomları yanısıra, VP7 proteinini kodlayan gen de bulunmaktadır. Henüz deneme safhasında olan bu tür aşı elde etme yöntemlerinin daha fazla inceleme ve kontrole ihtiyacı olduğu belirtilmektedir.

Bu tür rekombinantlarda önemli olan nokta, yeni kazanılan genler ile birlikte, bu genin kodladığı antijenik determinantların kapsidde de bulunması ve vücuda girdiğinde immun sistemi uyarmasıdır (Şekil - 6).

Rekombinant Paraziter Aşılar

Paraziter hastalıklara karşı rekombinant DNA teknolojisi ile aşı hazırlama çabaları bakteri ve virus aşıları ile birlikte yürütülmektedir. Özellikle, avian koksidiozis, malarya, anaplasmosis, ve East cost fever hastalık etkenleri için böyle çalışmalar hayli ilerlemiş bulunmaktadır.



Şekil-6

Plasmodium knowlesii'in sporozoit ve merozoit formlarının yüzey proteinini kodlayan gen *E. coli*'de klonlanarak ekspresyonu sağlanmıştır.

Paraziter infeksiyonlara karşı da viral vektörler kullanılmıştır.

Vaksinias virusu + **Plasmodium knowlesii** sporozoit yüzey protein geni rekombinantı, hücrelerde 53 ve 45 kd protein sentezledikleri ve bunların monoklonal antikorla reaksiyon verdikleri gözlenmiştir. Böylece, rekombinant virusla infekte edilen tavşanlarda oluşan antikorların sporozoitlere bağlandığı bildirilmiştir. Merozoit yüzey antijenlerinin malarya'ya karşı korunmada daha etkin olduğu açıklanmıştır.

İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan diğer protozoon ve helmintlerin de benzer tarzda, antijenik determinantlarına karşı aşı hazırlama çabaları bulunmaktadır.

SENTETİK PEPTİD AŞILARI

İnfeksiyöz etkenlerin (veya antijenlerin) immunojenik komponentlerini oluşturan proteinlerin *in vitro* kimyasal sentezleri sonu elde edilen polipeptidlerin aşı olarak kullanılması son yıllarda fazla denenen aşılarda bulunmaktadır. Aşı elde etme yanısıra, hastalıkların teşhisinde, immun terapide ve aşı dizaynında da sentetik peptidler önemli rol oynamaktadırlar.

Kimyasal yoldan sentezlenen peptid aşıları yeni değildir. Yıllar önce (25 yıl), **Tütün Mozaik Virusunun (TMV)** C1 terminusuna tekabül eden heksapeptidlerin, tavşanlara verildiğinde antikör oluşturduğu ve TMV'yi presipite ve nötralize ettiği belirlenmiştir. MS-2 bakteriyofajı'nın P2 kapsid protein bölgesine tekabül eden peptidler de sentezlenmiş ve tavşanlarda nötralizan antikörler oluşturduğu açıklanmıştır.

Yumurta akı **lizoziminin** antijenik determinantlarına karşı da hazırlanan sentetik peptidlerin natif lizozimle reaksiyon veren antikörler oluşturduğu saptanmıştır.

Son yıllarda bakterilerin ve virusların antijenik olan immun-dominant epitoplarına benzer etkiye sahip sentetik peptidler elde edilmiştir. Bunlar arasında SV40, Maloney leukemia virusu, Hepatit B, influenza, Herpes virus, şap virusu ve poliomyelitis virusları bulunmaktadır.

Sentetik Bakteriyel Peptid Aşılar

Bakteriyel infeksiyonları önlemek için bazı sentetik peptid aşıları hazırlanmıştır. Bunlar arasında difteri ve kolera hastalıkları gelmektedir.

Difteri toksini A-zincirinin 186-201 aminoasitleri arasına ait olan 14 aminoasitlik sentetik peptidin (heksadeka peptid), uygun bir adjuvant ve taşıyıcı ile birlikte (sentetik muramil dipeptid, adjuvant, ve sentetik multichain poli DL-alanin, taşıyıcı) verildiğinde kobaylarda protektif antitoksik immunité sağladığı açıklanmıştır. Kolera etkeni **V. cholera**) lipopolisakkaritlerine ve kolera toksinlerine karşı peptid aşılar hazırlanmış ve denenmiştir. **V. cholera'** nın B alt ünitesine (103 aminoasit) ait 11 ve 18 aminoasitlik birçok peptidler hazırlanmıştır ve tetanoz toksoidi ile birleştirilerek veya multichain poli DL-alanin birleştirilerek kullanılmış ve tavşanlarda denenmiştir. **E. coli** (ETEC) lerin'de, ısıya dayanıklı ve dayanıksız toksinlerinin epitoplarına karşı gelen sentetik polipeptidler hazırlanmış ve deneme hayvanlarında kullanıldıklarında infeksiyonun şiddetini çok azalttığı açıklanmıştır. Ayrıca, **Str. pyogenes** (M proteini) ve **N. gonorrhoea** (pilin) proteinleri sentetik olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır.

Son yıllarda, sentetik polipeptid genlerin bir plasmidle birleştirilerek bakteride klonlanma çalışmaları ümit verici düzeyde sür-

dürülmektedir. Eğer iyi sonuçlar alınırsa, invitro olarak sentezlenen genler, bakterilere ait bir plasmidle konjuge edildikten sonra, E. coli (veya başka bir bakteride) klonlanması ve genin ekspresyonunu sağlanabilecektir.

Sentetik Viral Peptid Aşılar

Viral orijinli sentetik aşılar SV40 virusunun büyük T antijenine ait N ve C terminuslarına tekabül eden sentetik hepta- ve endekapeptidler hazırlanmış ve bunların tavşanlarda oluşturduğu antikörlerin, orijinal SV40'nin T-antijeni ile reaksiyon verdikleri görülmüştür. **Maloney leukemia** virus RNA'sının 3 ucundaki nukleotid sıralarına tekabül eden sentetik pentadekapeptid yapılmış ve tavşanlarda antikor oluştuğu belirlenmiştir. **Hepatitis B virusun** 138 - 149 nukleotid sıralarına tekabül eden sentetik peptidler hazırlanmış ve bunların oluşturdukları antikörlerin virusla reaksiyon verdikleri açıklanmıştır. Ayrıca 117 - 123 ve 124 - 137 nukleotidlerin karşıtı olan aminoasitler de sentezlenerek farelere verilmiş ve antikor oluşturdukları belirtilmiştir. HBV'nun pre-S bölgesine ait nukleotidlere tekabül eden aminoasitler (55 aminoasit) de yüksek oranda grup spesifik antikörler oluşturduğu (Liposomlarla birlikte verildiğinde) ve ancak bunların protektif etkilerinin değerlendirilmesinin henüz daha fazla çalışmaya ihtiyaç göstereceği açıklanmıştır. Pre-S'nin önemli bir bölümüne ait olan sentetik peptidin (p120 - 145) hayvanlara daha fazla immunojenik olduğu açıklanmıştır. Bu peptidin N-terminusu T-hücrelerini ve C-terminal sekaslarının da B-hücrelerini tanıdığı saptanmıştır. Peptidin oluşturduğu antikörlerin natif pre-SHBsAg ile kros reaksiyon verdiği belirlenmiştir. **Influenza virusunun** hemaglutinin sentezini kodlayan gen bölgesine tekabül eden peptidler hazırlanmıştır. İnfluenza virusu Tip A H₃N₂ virusunun 91 - 108 nukleotidlerine ait peptid hazırlanmış ve bu tetanoz toksoidi ve Freund'un adjuvantı ile birleştirilerek fareye verilmiş ve farelerde hem nötralizan ve hem de hemaglutinasyon - inhibisyon antikörlerinin oluşturduğu ve farelerde kısmi bir koruma sağladığı açıklanmıştır. Ayrıca, HA molekülünün HA1 bölgesinin % 75'ine tekabül eden 20 sentetik peptidin 18'inin antikor oluşturduğu da belirtilmiştir. **Herpes simplex** tip 1 (HSV-1) glikoprotein D'in 8 - 23 bölgesine tekabül eden aminoasitlerinin, (HSV-1 ve 2'yi nötralize eden anti gpD monoklonal antikörlerle reaksiyon verdiği açıklanmıştır. Sentetik 16 mer'lik

peptidin hayvanlarda oluşturduğu antikorların natif glikoprotein D ile reaksiyon verdiği ve ayrıca HSV-1 ve 2'yi nötralize ettiği de vurgulanmıştır. **Şap virusu** tip I1'in yüzey proteini (VP1) 141 - 160 bölgelerine tekabül eden 20 aminoasitlik peptidin, taşıyıcı bir proteinle verildiğinde sığır ve kobaylarda nötralizan antikor sentezini uyardığı ve kobayları koruduğu bildirilmiştir. Ayrıca, tip A'nın yüzey proteinine ait 55 - 179 aminoasit bölgeleri arasına ait sentetik peptidin oluşturduğu antikorların domuz ve sığırlarda koruyucu etkileri olduğu açıklanmıştır. Ayrıca, VP1'in 201 - 213 bölgelerine ait sentez yapılmıştır. **Polio virusunun** VP1 kapsid proteine ait hidrofilik domaine tekabül eden birçok küçük peptidler sentez edilmiş ve bunların poliovirus nötralizan antikorlarla reaksiyon verdiği de belirtilmiştir (bunlar bovine serum albumin ve komplet Freund adjuvantı ile birlikte verilmiştir).

Sentetik Paraziter Peptid Aşılar

Parazitik hastalıklara karşı aşı hazırlamada sentetik peptidler denenmiştir. **Plasmodium falciparum** sporozoitlerinde bulunan immundominantlara karşı hazırlanan sentetik dodekapeptid'in malarya aşısına katılarak verilmesinin antikor sentezine yararlı olacağı bildirilmiştir.

Malarya parazitinin sporozoitleri esas circumsporozoit protein (CS)'leri, immun dominant tekrarlanan epitoplara sahiptir. Bu epitoplara karşı oluşan antikorlar da infeksiyonu durdurur.

ANTI-İDİOTİP ANTİKOR AŞILARI

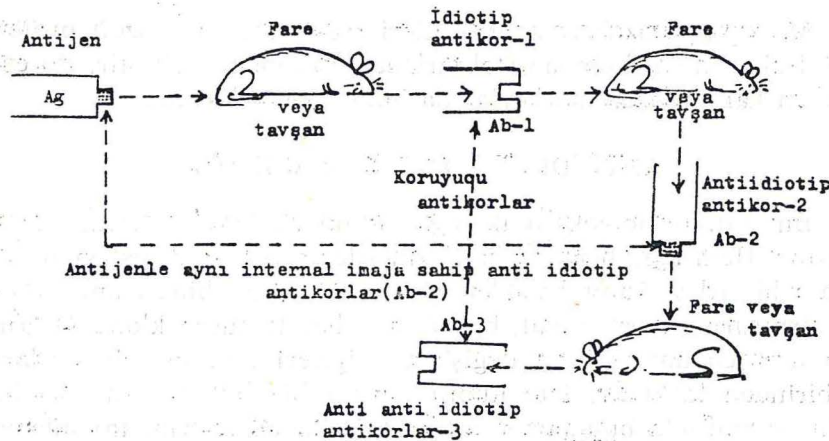
Bir antikor molekülü iki ağır ve iki de hafif zincirden oluşmuştur. Hem ağır hem de hafif zincirler sabit ve değişken bölgelere sahiptirler. Sabit bölgeler aynı sınıfa giren bütün antikorlarda birbirine benzer. Fakat, bir bireyin her B hücre klonu tarafından üretilen antikorların değişken bölgeleri (amino asit sıraları) birbirinden farklıdır. İşte idiotip terimi bir bireyin yalnızca bir antikor sınıfında bulunan o antikora özgül bölgelerini tanımlamada kullanılır.

Bilindiği gibi, bir antikor ile antijenin bağlanması anahtar-kilit ilişkisine benzer. Antijeni bir kilit olarak kabul edersek bunu ancak ona en uygun olan anahtar yani antikor açabilecektir. Bu da antikorun değişken bölgesindeki aminoasit sıraları ile yani antiko-

run idiotipi ile ilgilidir. İdiotiplere karşı oluşan antikorlar ile ilgili ilk teori JERNE tarafından ortaya atılmıştır. Buna göre, immunizasyondan sonra, kuramsal olarak, bir x antijenine karşı oluşan antikor (Ab1), x antijeni üzerindeki epitopa benzer bölgeler taşır ve bu bir anti-anti x antikoru (Ab2) için antijen olarak görev yapar. İşte, antijenin epitopuna karşı uygun paratop bölgesi taşıyan bu antikorlara **idiotip antikorlar** (Ab1) ve bunlara karşı oluşan antikorlara da **anti-idiotip antikorlar** (Ab2) adı verilir. Paratop, bir antikorda bulunan ve antijenle birleşen Fab bölgesini oluşturur. Paratopa karşı oluşan antikorlar orijin antijenin epitopunun bir internal imajı halindedir. Anti-idiotip antikorlar hibridoma teknolojisi yardımıyla üretilmektedirler.

Anti-idiotiplerle yapılan son çalışmalarda bunların Ab2A ve Ab2B diye iki çeşit oldukları saptanmıştır. Ab2A'nın, yapılan çalışmalarda, idiotipe spesifik olmadığı, buna karşın, Ab2B'nin vitro koşullarda Ab1 ile birleşmek için antijenle yarıştığı gözlenmiştir. Ayrıca Ab2B'nin in vivo koşullarda Ab3 yapımını uyardığı görülmüştür (Şekil - 7).

ANTI İDIOTİP ANTİKORLAR



Şekil-7

Anti-idiotiplerin immun yanıt üzerine etkisi uyarıcı veya basıklayıcı olabilir.

Orijinal antijenin internal imajını taşıyan Ab2'ye karşı vücutta oluşan Ab3, orijinal antijene bağlanabilme yeteneğindedir.

Bu görüşlerden hareket ederek anti-idiotiplerden aşı olarak yararlanma yoluna gidilmiştir. Bu amaçla çeşitli deney hayvanlarından adjuvantlı veya adjuvantsız olarak hazırlanan monoklonal anti-idiotip antikör aşıları denenmiştir.

Bakteriyel Anti-idiotip Antikör Aşılar

Anti-idiotip aşılar, patojenik bakteri hücre duvarlarının polisakkarit antijenlerine karşı henüz yanıt oluşturamayan yeni doğanlarda oldukça önemlidir. Bu bakterilere (**H. influenza**, **N. meningitidis**, **Str. pneumoniae**, **D. pneumoniae**, **E. coli**, **L. monocytogenes**, vs) karşı hazırlanan klasik aşılar yenidoğanlarda etkisiz kalmaktadır. Bir anti-idiotip, hücre duvarı materyalinin bir kopyasıdır ve protein yapısındadır. Böyle anti-idiotip antikörler protein karakterindeki antijenlere yanıt verme yeteneğinde olan yenidoğanlarda başarı ile aşı olarak kullanılabilir. Deney hayvanlarında (özellikle, fare ve tavşan) yapılan çalışmalar aşının etkin olabileceğini göstermiştir.

Viral Anti-idiotip Antikör Aşılar

İnfekte insan plasmasından elde edilen Hepatitis B virusuna karşı oluşturulmuş idiotip antikörler tavşanlara verilmiş ve bunlardan elde edilen anti-idiotip antikörler (Ab2) farelere verildiğinde orijinal antijene bağlanıp nötralize etme yeteneğinde olan anti-idiotip antikörler (Ab3) elde edilmiştir. Hepatitis B virusuna karşı meydana gelmiş idiotip antikörler, tavşanlara verildiğinde ve elde edilen anti-idiotip antikörleri (Ab2), Hepatitis B aşısı olarak iki şempanzeye verildiğinde hayvanlarda koruyucu etki yarattığı gözlenmiştir.

Hepatitis B'den başka, **TMV** (tütün mozaik virusu), **VEE** (Venezuelan equine encephalitis), **Polio** (tip II), **Kuduz**, **Herpes simplex**, **Reo** (tip 3) ve **Sendai** viruslarına karşı çeşitli deney hayvanlarında (fare ve tavşanlar) anti-idiotip antikörler elde edilmiştir.

Paraziter Anti-idiotip Antikör Aşılar

Schistosoma mansoni, **Trypanosoma rhodesiense**, **Trypanosoma crusei** ve **Eimeria**'lara karşı farelerde anti-idiotipler elde edilmiştir.

Şayet, anti-idiotip antikor aşuları insanlar için üretilmeye başlanırsa diğer aşı üretim tekniklerine göre birtakım avantajlar sağlayabilir. Şu anda kullanılan aşular infeksiyöz ajanların öldürülmüş, attenué veya pürifiye antijenleri son zamanlarda Rekombinant DNA teknolojisi ile elde ediliyorsa da Hepatitis B antijeni gibi birçok antijenin saflaştırılması oldukça zordur. Ayrıca, birçok bakteri ve protozoanın antijenik kısımları karbonhidrattan oluşmuştur ve bu kısımlar Rekombinant DNA yöntemi ile veya sentetik olarak sentezlenemezler. Bunun yanı sıra, attenué edilmiş patojenlerin aşı olarak kullanılması sırasında etkenin tekrar virulens kazanma tehlikesi de vardır. Eğer anti-idiotip aşular monoklonal antikor tekniği ile kolayca elde edilebilirse hastalık etkeni olmadıklarından korumayı kolayca sağlayabilirler. Anti-idiotip antikorların cazip bir yanı da spesifiteleridir. Bir anti-idiotip, yalnızca internal imajı taşıdığı antijene karşı antikor yanıtı oluşumunu sağlar. Buna karşın, attenué edilmiş bir infeksiyöz etken koruyucu immunitiyi indükleyen bir tanesinden başka birçok antijenik determinant taşıyabilir. Bunların bazıları, vücut dokuları üzerindeki determinantlara benzer ve otoimmün bir yanıt oluşturabilir.

Çeşitli faktörler insan aşısı olarak anti-idiotip antikorların kullanımını kısıtlamaktadır. Anti-idiotiplerin tavşan gibi bir deney hayvanından hazırlanıp verilmesi bazı insanlarda ateş ve allerjik reaksiyonlara neden olabilir. Birçok anti-idiotip antikor bir antijenin meydana getirdiği yanıtı eşit bir immün yanıt oluşturabilir fakat, Jerne'nin bildirdiği gibi, immün sistem üzerine baskılayıcı bir etkide de bulunabilir.

Son yıllarda, anti-idiotiplerin kanserin sağaltımında aşı olarak kullanılabileceğine ilişkin çalışmalar yapılmaktadır.

MUTANT AŞILAR

Mikroorganizmalarda (bakteri, virus, vs) genetik düzeyde meydana gelen doğal veya suni mutasyonlar sonu oluşan mutantlar aşı olarak eskiden beri kullanılmaktadırlar. Bu mutasyonlar, etkenin virulensinin, azalmasına, hastalık yapma yeteneğinin azalmasına veya kaybolmasına yol açmasına karşın, etkenin antijenik kabiliyetinde pek fazla bir değişiklik olmadığından, vücuda verildiğinde koruyucu özelliğini devam ettirirler.

Suni olarak meydana getirilen mutasyonlarda mikroorganizmalar doğal konakçısı, doku kültürü, besi yerleri, vs gibi normal

alıştığı ve çoğaldığı ortamların dışında, koşulları değişik yabancı konakıcılarda ve besi yerlerinde devamlı pasajları yapılmak suretiyle elde edilmişlerdir (attenüasyon).

Bu tarzda attenüye edilen mutantlardan hazırlanan aşılar, bazen geriye dönüş olmakta ve etken virulens kazanarak hayvanlarda infeksiyonlar meydana getirebilmektedir. Bu tür olaylar, mutant aşıların en önemli dezavantajları arasında bulunmaktadır. Ancak son yıllarda bakteri veya virusların genomlarından, sadece patojeniteyi oluşturan genin çıkarılmasına yönelik yapılan gen manipulasyonları sonucu oluşturulan mutantlar daha güvenlidir ve geriye mutasyonlarla virulens kazanma gibi dezavantajlar ortadan kaldırılmakta ve güvenle kullanılabilirler.

Bakteriyel Mutant Aşılar

Bakterilerde suni olarak meydana getirilen mutasyonlar sonucu oluşan mutantlarla aşı hazırlama çabalarının tarihi oldukça eskidir. Pasteur 1880 yıllarında, laboratuvarında uzun zaman kalarak virulensi zayıflamış olan **P. multocida** suşunu tavuklara verdiği hastalık yapmadığını, buna karşı hayvanları virulent suşa karşı korunduğunu saptamıştır.

Yine Pasteur, sporlu bir mikroorganizma olan ve memeli hayvanlarda öldürücü seyreden antraks (şarbon) hastalığı etkeni **B. anthracis**'i 42°C'in üstünde devamlı pasajlarını yaparak, bu etkenin virulensinin azaldığını, buna karşın antijenitesinin bozulmadığını gözlemlemiştir. Kendi adı ile anılan (Pasteur - I ve -II) iki aşı hazırlayarak, önce çok zayıflatılmış olan Pasteur - I ve sonra da daha az zayıflatılmış olan Pasteur - II suşlarıyla koyunları aşıladığında hayvanların virulent suşa karşı korunduğunu tespit etmiştir.

Bugün antraks hastalığına karşı spor oluşturmayan ve virulensi azaltılmış olan Max Sterne 34F **B. anthracis** suşu kullanılmaktadır.

Benzer tarzda pasajlarla elde edilen bir aşı da, **BCG**'dir. Sığır tüberküloz etkeni olan **Mycobacterium bovis**, Calmette ve Queren tarafından, 13 yıl safralı ve patatesli ortamda devamlı pasajları yapılarak, insanlar için virulensi azaltılmış ve aşı haline getirilmiştir (1929).

Tavuk tifosu etkeni **S. gallinarium 9S** suşundan elde edilmiş olan 9R suşu, bugün kanatlıları tifoya karşı korumada aşı olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda genetik düzeyde yapılan manipulasyonlarla, patojeniteyi sağlayan genin yerinden çıkarılarak oluşturulan mutantlar (**deletion mutant**) aşı olarak kullanılmaktadır. Bunların geriye mutasyonla virulens kazanma gibi bir riskleri bulunmamaktadır. Bu konuda salmonella, shigella ve V. cholera üzerinde bazı başarılı çalışmalar yapılmıştır.

S. typhi, gal E suşu (Ty21a, genetik olarak modifiye edilmiş olup galaktose ve epimurase aktivitesine sahip değildir, oral verildiğinde vücutta üreyerek uygun bir süre kalır ve patojenik **S. typhi'** ye karşı koruma sağlar.

V. cholera El Tor suşundan buna ait olan A ve B toksin genleri çıkarıldıktan sonra, B alt ünite geni bir plasmid aracılığı ile tekrar V. cholera'ya aktarılmış ve böylece elde edilen mutant V. cholera suşu, insanlarda (10 gönüllüde) aşı olarak kullanılarak 9'unda koruma sağladığı bildirilmiştir (1 milyon El Tor Inaba suşuna karşı). Buna karşın, aşılanmamış kontrollerde kolera meydana gelmiştir.

S. typhimurium'un deletion mutantlarından olan avirulent aro A SL 3261 suşunun da benzer tarzda koruyucu etkiye sahip olduğu açıklanmıştır.

Sh. sonnei üzerinde de çalışmalar sürdürülmektedir.

Viral Mutant Aşılar

Pasteur, 1879 - 1880 yılları arasında, virus fiks verilerek infekte edilen tavşanlardan aldığı omuriliği NaOH'lı bir desikatörde 3 hafta kadar beklettikten sonra hastalık etkeninin virulensinin zayıfladığını gözlemlemiş olduğu gibi. bu materyalden hazırladığı emulsiyonu da, kuduz köpek tarafından ısırılmış olan bir çocuğa (Joseph Meyer) uygulayarak kurtarmıştır.

Atvebası virusu, farelerin beyinde 105 pasajı yapıldıktan sonra, virulensi atlar için azaltılmış, buna karşın atlarda immunolojik yanıt meydana getiren ve hastalıktan koruyan bir virus haline getirilebilmiştir. Bu virus halen atvebasına karşı aşı olarak kullanılmaktadır.

Sığırlarda çok öldürücü hastalıklara yol açan sığırvebası virusu doku kültürlerinde, tavşanlarda (lapinize), embriyolu yumurtalarda (avianize) ve keçilerde (kaprinize) çok pasajları yapılmak su-

retiyile attenüe edilmiş ve böyle suşlar infeksiyondan korunmada aşı olarak kullanılmışlardır.

Kanatlılarda tehlikeli infeksiyonlara yol açan Newcastle hastalığı virusunun doğal attenüe suşlarından olan Hitchner B1'in virulensinin çok zayıflamış olması nedeniyle civcivlerin aşılama-larında (burun - göz, sprey, suya katılarak) başarı ile kullanılmaktadır.

Suni olarak attenüe edilen Infec. bronchitis viruslarından H52 ve H120 suşlarından aşı olarak yararlanılmaktadır.

Viral genomlardan patojenik genlerin çıkarılması sonu meydana gelen mutantlardan (**deletion mutant**) aşı hazırlama çabaları sürdürülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1 — ADA, G. L. and JONES, P. D. (1987): Vaccines for the future-an update. Immunol. Cell Biol., 65 (1) : 11 - 24.
- 2 — ALOUF, J. E. (1985): Vaccins anti-toxines. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., 136 B : 309 - 321.
- 2 — ARDA, M. (1985): Rekombinant DNA teknolojisi (konferans). Etlik Vet. Kont. Araş. Enst., Ankara.
- 4 — ARDA, M. (1985): İmmuntoksinler (konferans). Etlik Vet. Kont. Araş. Enst., Ankara.
- 5 — ARDA, M. (1985): İmmunoloji (bağışıklık bilimi). A. Ü. Vet. Fak. Yay., No. 404, Ankara.
- 6 — ARNON, R. and SELA, M. (1985): Synthetic vaccines : Present and future Ann. Inst. Pasteur/Immunol., 136 D : 271 - 282.
- 7 — AUDIBERT, N. (1986): Carriers and adjuvants for the development of synthetic vaccines. Ann. Inst. Pasteur/Viral., 137 E : 514 - 518.
- 8 — AYDIN, N. (1978): Adjuvantlar ve veteriner hekimlikte kullanılmaları. Vet. Hek. Dern. Derg., 48 (2) : 13 - 19.
- 9 — BAHRACH, H. L. (1982): Recombinant DNA technology for the preparation of subunit vaccines. JAVMA, 181 (10) : 992 - 999.
- 10 — BAHRACH, H. L. (1985): New approaches to vaccines. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 30 : 1 - 35.
- 11 — BERZÖFSKY, J. A., CEASE, K. B., CORNETTE, J. L., SPOUGE, J. L., MARGALIT, H., BERKOWER, I. J., GOOD, M. F., MILLER, L. H. and DeLISI, C. (1987): Protein antigenic structures recognized by T cells : potential applications to vaccine design. Immunol. Rev., 98 : 9 - 52.

- 12 — BITTLE, J.L., HOUGHTEN, R.A., ALEXANDER, H., SHINNICH, T.M., SUTCLIFFE, J.G., LERNER, R.A., ROWLANDS, D.J. and BROWN, F. (1982): Protection against foot and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*, 298 : 30.
- 13 — BONA, C.A. (1987): Les vaccins du futur. *La recherche*, 18 (188) : 672-682.
- 14 — BOX, P.G. (1984): Poultry vaccines-live or killed. *Poult-Int.*, 23 (5) : 58-64.
- 15 — BROWN, F. (1984): Synthetic viral vaccines. *Ann. Rev. Microbiol*, 3 : 221-235.
- 16 — BROWN, T.D.K. (1985): New poultry vaccines by genetic manipulation. *Span*, 28 (2) : 68-70.
- 17 — BROWN, E. (1986): Prospects for synthetic peptide vaccines against foot-and-mouth disease. *Ann. Inst. Pasteur/Viral.*, 137 E : 504-508.
- 18 — CAPRA, J.D. and BONA, C. (1988): Idiotypes: Practical advances from fundamental concepts. *Immunol. Today*, 9 (4) : 98-100.
- 19 — CARTER, S.K. (1986): Adjuvant chemotherapy of cancer a review of its current status. *Drugs*, 31 : 337-367.
- 20 — CHANG, J.D.T., EIDSON, C.S. and KLEVEN, S.H. (1985): Simultaneous application of live turkey herpesvirus and infectious bursal disease vaccines against Marek's disease and infectious bursal disease. *Poult. Sci.*, 64 : 78-83.
- 21 — CHANG, J.D.T., EIDSON, C.S. and KLEVEN, S.H. (1985): Vaccination against Marek's disease and infectious bursal disease III. growth rate of both turkey herpesvirus and infectious bursal disease virus in coinfecting cell cultures. *Poult. Sci.* 64 : 841-843.
- 22 — CHEDID, L. (1985): Adjuvants of immunity. *Ann. Inst. Pasteur/immunol.*, 136 D : 283-291.
- 23 — CONFER, A.W., TABATABAI, L.B., DEYOE, B.L., OLTJEN, S.L., HALL, S.M., ÖLTJEN, J.W., MORTON, R.J., FULNECHEK, D.L., SMITH, R.E. and SMITH, R.A. (1987): Vaccination of cattle with chemically modified and unmodified salt-extractable proteins from *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol*, 15 : 325-339.
- 24 — CRYZ, S.J., FÜRER, E., SADOFF, J.C., GERMANIER, R., PASTAN, I., WILKINGHAM, M.C. and FITZGERALD, D.P. (1987): Use of *Pseudomonas aeruginosa* toxin A in the construction of conjugate vaccines and immunotoxins. *Rev. Infect. Dis.*, 9 (suppl 5) : 644-649.
- 25 — DIAKUN, K.R., YAZAWA, S., VALENZUELA, L., ABBAS, S.A. and MATTA, K.L. (1987): Synthetic antigens as immunogens: part I the combining site specificities of antibodies formed in rabbits to synthetic disaccharide x-L-Fuc-(1-3)-D-Gal. *Immunological Invest.*, 16 (1) : 1-11.
- 26 — DIAKUN, K.A., YAZAWA, S., VALENZUELA, L., ABBAS, S.A. and MATTA, K.L. (1987): Synthetic antigens as immunogens: part II: antibodies to synthetic T antigen. *Immunological Invest.*, 16 (2) : 151-163.

- 27 — DORNER, F. and McDONEL, J.L. (1985): Bacterial toxin vaccines. *Vaccine*, 3: 94-102.
- 28 — ESSELUND, K. (1980): Inactivated vaccines. *Zootecnica Int.*, 5:18-22.
- 29 — HILLEMANN, M.R. (1986): Vaccines made from recombinant yeast cells. *Vaccine*, 4: 75-76.
- 30 — HILLEMANN, M.R. (1986): Vaccinology in practical perspective. *Develop. Biol. Standard.*, 63: 5-13.
- 31 — HILLEMANN, M.R. (1986): Recombinant yeast hepatitis B vaccine. *Develop. Biol. Standard.*, 63: 57-62.
- 32 — HILLEMANN, M.R. (1986): The science of vaccines in present and future perspective. *Med. J. Aust.*, 144: 360-364.
- 33 — HUGH-JONES, M.E. (1981): A simple vaccination model. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 93 (1-2): 1-8.
- 34 — İSTANBULLUOĞLU, E. ve ÖZTÜRK, F. (1988): Zoonozların kontrolünde biyoteknoloji. Konya Bölgesi V. Hayvancılık ve Beslenme Sempozyumu, Konya.
- 35 — KANRA, G., DİKER, S. ve CEYHAN, M. (1985): Bakteri aşılı. *Katkı 6 (5)*: 341-350.
- 36 — KAUFMANN, S.H.E. (1987): Towards new leprosy and tuberculosis vaccines. *Microbiol. Sci.*, 4 (11): 324-328.
- 37 — KENNEDY, R. C., MELNICK, J. L. and DRESMAN, G. R. (1986): Anti-idiotypes and immunity. *Sci. Amer.*, 255 (1): 40-48.
- 38 — KREAGER, K. (1985): Good results with polyvalent Marek vaccine. *Poultry (Misset Int.)*, 2 (1): 8-11.
- 39 — LAGRANGE, P. H. (1985): L'avenir des vaccinations: Vaccins de l'avenir. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.*, 136 D: 313-334.
- 40 — MACRINA, F. L. (1984): Molecular cloning of bacterial antigens and virulence determinants. *Ann. Rev. Microbiol.*, 38: 1-27.
- 41 — MAURICE, J. (1987): Les premiers pas d'un vaccine universal. *La Recherche*. 18 (192): 1232-1234.
- 42 — MINOR, P. D. and FERGUSON, M. (1986): Prospects for synthetic peptide vaccines against poliovirus. *Ann. Inst. Pasteur/Viral.*, 138 E: 508-512.
- 43 — McBEATH, D. G., WELLES, P. W., EYRE, P. and HANNA, J. (1983): Equine immunology 4: vaccines and antisera. *Equine Vet. J.*, 15 (3): 196-202.
- 44 — MELNICK, J. L. (1986): Beginings of the development of synthetic peptides as viral vaccines. *Ann. Inst. Pasteur/Viral.*, 137 E: 499-503.
- 45 — MOSS, B. and FLEXNER, C. (1987): Vaccinia virus expression vectors. *Ann. Rev. Immunol.*, 5: 305-324.
- 46 — MURDIN, A. D. (1986): Synthetic peptide vaccines against foot and mouth disease. *Vaccine*, 4: 210-211.

- 47 — NEURATH, A. R. and KENT, S. B. H. (1986): Requirements for successful synthetic peptide vaccines. *Ann. Inst. Pasteur/Viral.*, 137 E: 513-514.
- 48 — NEURATH, A. R., JAMESON, B. A. and HUIA, T. (1987): Hepatitis B virus proteins eliciting protective immunity. *Microbiol. Sci.*, 4 (2): 45-51.
- 49 — Norrby, E. (1987): Prospects for new viral vaccines. *Microbiol. Sci.*, 4 (7): 202-205.
- 50 — Peters, A. R. (1987): Vaccines for respiratory disease in cattle. *Vaccines*, 5: 164.
- 51 — ROTHBARD, J. B. (1986): Peptides and the cellular immune response. *Ann. Inst. Pasteur/Viral.*, 137 E: 518-524.
- 52 — SAINSBURY, D. W. B. (1983): Using vaccines to maximum effect. *Poult. Int.*, 22 (6): 56-62.
- 53 — SCHMECK, H. M. (1986): Building a new vaccine: breaking ground with genetic engineering, synthetics. *Int. Herald. Tribune*, p. 7, Thursday May 29.
- 54 — SEUDAMORE, J. M. (1980): Efficient vaccination. *Poult. Int.*, 19 (5): 94.
- 55 — SHINNICK, T. M., SUTCLIFFE, J. G., GREEN, N. and LERNER, R. A. (1983): Synthetic peptide immunogens as vaccines. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37: 425-446.
- 56 — SIEGMANN, O., KALETA, E. F. and LEIMBECK, R. (1974): Resorption und elimination NDV-spezifischer, maternalen Antikörper sowie deren Bedeutung für Vaccinationen von Hühnerküken gegen die Newcastle disease. *Zbl. Vet. Med. B.*, 21: 3-13.
- 57 — STEVENSON, F. K. (1986): Idiotypes and diseases. *Immunol. Today*, 7 (10): 287-288.
- 58 — SWARBRICK, O. (1981): What the producer requires from vaccines. *Poult. Int.*, 20 (1): 42-44.
- 59 — Van REGENMORTEL, M. H. V. (1986): Synthetic peptides as viral vaccines. *Ann. Inst. Pasteur/Viol.*, 137 E: 497-499.
- 60 — VOETEN, A. C., LÜTTICKEN, D., Van DĪJK, P. M., BERGS, G. H. H. and ORTHEL, F. W. (1985): The use in practice of inactivated oil emulsion vaccine against infectious bursal disease in broiler breeders and its influence on the progeny: a comparative field trial. *Vet. Quart.*, 7 (2): 91-100.
- 61 — WARREN, K. S. (1986): New scientific opportunities and old obstacles in vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 9275-9277.
- 62 — WARREN, H. S., VOGEL, F. R. and Chedid, L. A. (1986): Current status of immunological adjuvants. *Ann. Rev. Immunol.*, 4: 369-388.

- 63 — YARDIMCI, H. (1986) : Aşılar. (seminer). A. Ü. Vet. Fak. Ankara.
- 64 — YARDIMCI, H. ve ARDA, M. (1987) : Aşı üretiminde yeni teknikler. KÜKEM Derg., 10 (2) : 1972.
- 65 — ZANETTI, M., SERCARZ, E. and SALK, J. (1987) : The immunology of new generation vaccines. Immunol. Today., 8 (1) : 18-25.
- 66 — ZHOV, E. M., DREESMAN, G. R. and KENNEDY, R. C. (1987) : Anti-idiotypic antibodies : a new generation of vaccines against infectious agents. Microbiol. Sci., 4 (2) : 36-40.