

## MONOKLONAL ANTİKORLAR (MKA) VE BUNLARIN HASTALIKLARDA KULLANILMASI

Prof. Dr. Mustafa ARDA\*

Insan ve hayvanların vücudu, dışardan giren ve özellikle patojenik karakterde olan (bakteri, virus, parazit, vs) etkenlere karşı immunolojik bir yanıt verecek tarzda teçhiz edilmiştir. Partiküler nitelikte olanların yanısıra, eriyebilir özellikteki (protein, polisakkarid ve/veya bunların kompleksleri) substanslara da benzer tarzda bir reaksiyon gösterir. Oluşan bu bağışıklık yanıt başlıca iki tarzda kendini belli etmektedir. Bunlarda,

- 1) Humoral (sıvısal) yanıt,
- 2) Sellüler (hücrese) yanıt.

Uyarımın şiddetine, konakcının bağışıklık durumuna ve immunojenin bazı özelliklerine (yapısı, miktarı, veriliş yolu, vs) göre, bu yanıtlardan biri daha etkin olmakta diğeri ise ikinci planda kalmaktadır. Bazen de her ikisinin de aynı derecede etkin olabildiği veya hiç olamadığı durumlar da (**immunolojik yanıtızsızlık**, **immunolojik paraliz**) ortaya çıkabilmektedir. Bu son durum, özellikle, immunojenin çok az veya çok fazla verildiği hallerde görülmektedir.

Her iki tür immunolojik cevabın temelini, merkezi görev yapan ve immunkompetent bir karaktere sahip olan hücreler teşkil ederler. Lenfoid ve miyeloid serilere ait olan bu hücreler, orijinlerini, embriyogenezis sırasında kemik iliği, fetal karaciğer ve vitellus kesesinde bulunan çok fazla üreme ve diferensiyasyon yeteneğindeki **multipotent köken hücreler**'den alırlar. Bu hücreler arasında yer alan ve lenfoid seriye ait olanlardan bir bölümü, kanat-

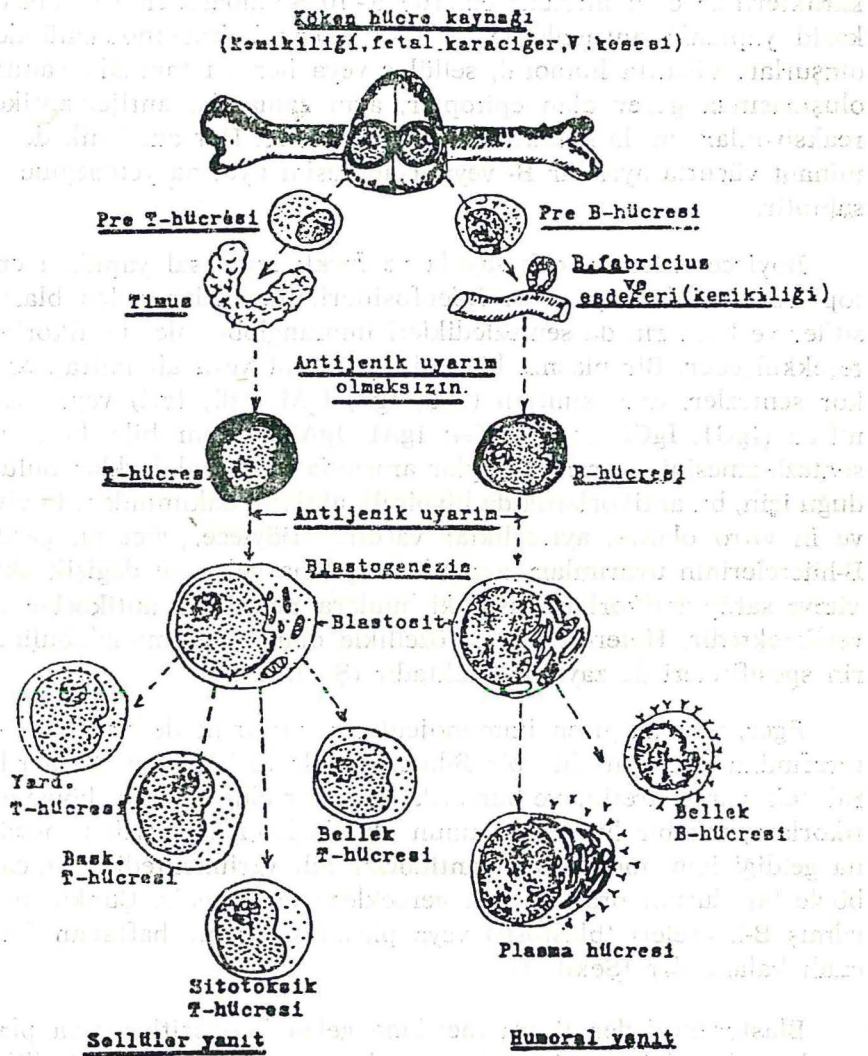
(\*) Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

lılarda **bursa Fabricius**'a giderek burada sentezlenen **bursin**'in etkisi altında, ve memelilerde de kemik iliğinde kalarak, bir reorganizasyona ve diferansiasyona tabi tutulurlar. Yüzeylerinde bazı spesifik moleküller oluşan ve aynı zamanda, immunojenlere yanıt verebilecek bir yetenek kazanan bu hücrelere, **B - hücreleri (B-lenfositleri)** adı verilmektedir. Bunlar, olgunlaştıktan sonra, bu primer (merkezi) lenfoid organlar'dan (b. Fabricius, kemik iliği) ayrılarak kan sirkülasyonuna ve sekonder (periferel) lenfoid organlara (dalak, lenf düğümleri, vs) giderek buralarda kendilerine ait olan bölgelere yerleşirler. B-lenfositleri, antijenik uyarımların derecesine göre aktive olarak fazlaca ürerler ve morfolojilerinde bazı önemli değişiklikler meydana geldiği gibi biyokimyasal olarak ta bir aktivite kazanırlar (**blastogenezis**). Bu aktivasyon sonunda, hücrelerden bazıları antikor sentezleyen **plasma hücreleri (plamasit)** ve diğer bir bölümü de **bellek hücreleri** (homolog immunojenle olan ikinci uyarımı tanıyan hücreler) haline dönüşürler.

Timusa giden ikinci lenfoid hücre serileri ise burada **timik hormonların** (timosin, timopoietin, timostimulin, vs) etkisi altında, B-lenfositlerinde olduğu gibi, benzer tarzda bir reorganizasyona ve diferansiasyona maruz kalarak olgunlaşırlar ve antijenik uyarımlara yanıt verebilecek hale gelirler. B-hücrelerinden daha farklı yüzey antijenik molekülleri de kazanarak timusdan ayrılan hücreler kan sirkülasyonuna ve periferel lenfoid organlara giderek buralarda kendilerine ait bölgelere yerleşirler. Antijenik uyarımlara çoğalarak yanıt veren (blastogenezis) bu tür hücrelere de T-hücreleri (T-lenfositleri, timosit) adı verilir. Vücudun hücresel yönden savunmasında etkin fonksiyonlara sahip olan T-lenfositleri, blastogenezis sonunda, başlıca 4 tür hücrenin oluşmasına yardımcı olurlar (**Yardımcı T-lenf.**, **bellek T-lenf.**, **sitotoksik T-lenf.** ve **supresör T-lenf.**) (Şekil - 1).

Yukarıda açıklanan ve lenfoid seriye ait hücreler yanısıra, vücudun savunmasında önemli katkıları olan miyeloid seriye ait hücreler de bulunmaktadır. Bunlardan **makrofajlar**, **polimorf nukleer lökesitler (PNL)** ve diğer **granulositler**, özellikle, aktive olduktan sonra fagositozis yönünden oldukça etkindirler. **Öldürücü hücreler (KC)** ve **doğal öldürücü hücreler'in (NKC)** de son yıllarda infeksiyöz ajanlara karşı koymada ve tümör immunolojisinde fonksiyonlarının fazla oldukları belirlenmiştir.

Hücrelerin etkin bir şekilde uyarılmaları ve bunlara gerekli yanıtların verilmesi immunojenlerle yakından ilişkilidir. Bu mole-



Şekil-1

küllerin yüzeylerinde, en belirgin yerlerinde lenfoid sistemi ve miyeloid hücreleri uyarma da önemli role sahip ve birbirlerinden az-çok farklı kimyasal yapıda olan bazı bölgeler vardır ki bunlara **antijenik determinant (epitop)** adı verilmektedir. Bunlar, protein

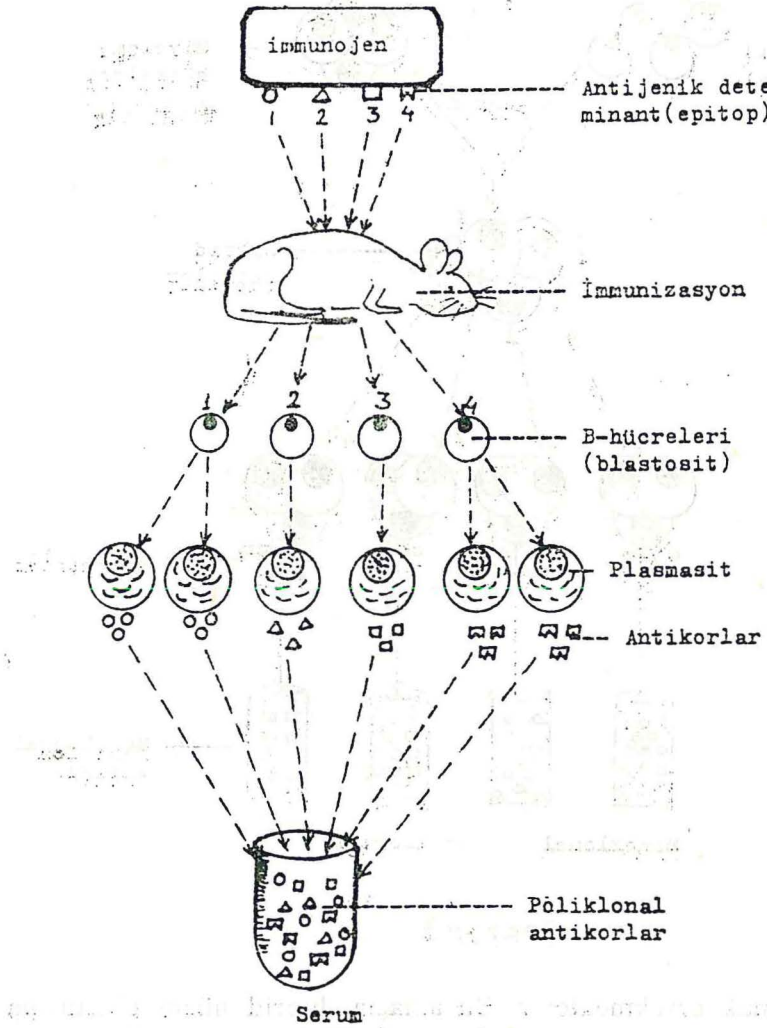
karakterinde olan immunojenlerde 6-10 aminoasitten ve polisakarid yapıdaki antijenlerde de 6-8 karbonhidrat molekülünden oluşurlar. Vücutta humoral, sellüler veya her iki tarzdaki yanıtın oluşmasında görev alan epitoplara, aynı zamanda, antijen-antikor reaksiyonlarının da spesifitesini tayin ederler. Her antijenik determinant vücutta ayrı bir B- veya T-hücresini uyarma yeteneğine de sahiptir.

Böylece, vücutta, çok sayıda ve farklı kimyasal yapıdaki epitoplara uyarılan ayrı ayrı B-lenfositleri, bunlardan gelen blastosit'ler ve bunların da sentezledikleri immunglobulinler (antikorlar) teşekkül eder. Bir plasma hücresi, aynı sınıf veya altı sınıftan antikor sentezler. Aynı sınıftan (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) veya altı sınıftan (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4; IgA1, IgA2) olsalar bile, bunların sentezlenmesini uyaran epitoplara arasında kimyasal farklar bulunduğu için, bu antikorlarda da biyolojik aktivite bakımından, in vivo ve in vitro olarak, ayrıcalıklar vardır. Böylece, vücutta, çeşitli B-hücrelerinin uyarımları sonunda meydana gelen ve değişik aktiviteye sahip antikorlar oluşur ki bunlara **poliklonal antikorlar** adı verilmektedir. Heterojenik bir özellikle olan bu immunglobulinlerin spesifiteleri de zayıf kalmaktadır (Şekil - 2).

Eğer, vücuda giren immunojenlerin antijenik determinantları tarafından uyarılmış her bir B-hücresi (blastosit), vücuttan ayrılarak tek olarak üretilir ve bunlardan antikor elde edilirse, böyle antikorlara, tek bir hücre ve bunun oluşturduğu klonlardan meydana geldiği için, **monoklonal antikorlar** adı verilmektedir. Ancak, böyle bir durum pratikte pek gerçekleşmemektedir. Çünkü, uyarılmış B-hücreleri (blastosit) veya plasmaitler bir haftadan fazla canlı kalamazlar (Şekil - 3).

Blastogenezisden sonra meydana gelen blastositler veya plasma hücreleri (plasmait) çok spesyalize olmuşlardır ve özellikle plasmait'ler çoğalma yeteneklerini kaybetmişlerdir. Bu hücreler, in vivo veya in vitro koşullarda ancak bir hafta süreye kadar canlı kalabilmektedirler. Ayrıca, her blastosit veya plasma hücresi antikor sentezlemediği gibi, çok az veya orta derecede veya birkaç gün antikor sentezleyebilirler de. Uyarımın şiddeti, antijenin karakteri ve hücrenin fazları, antikor sentezinde bir kontrol mekanizması oluşturmaktadır. Bunlar antikor sentezini kısıtlayıcı bir özellik gösterirler.

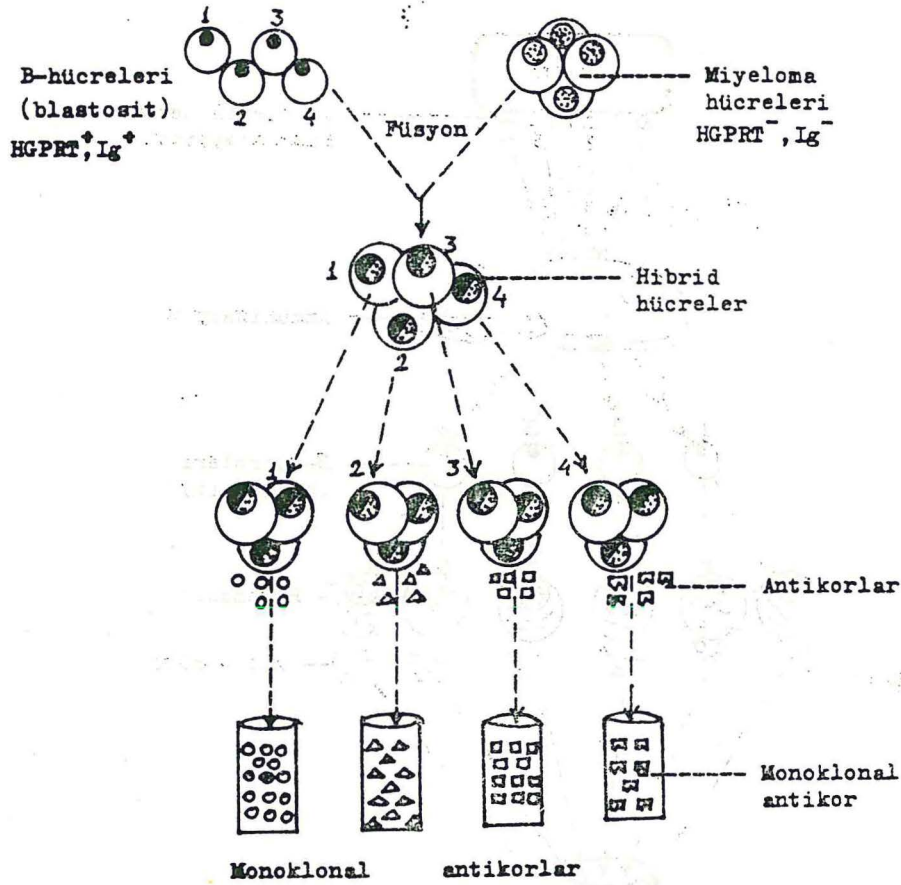
## POLİKLONAL ANTİKORLAR



Şekil-2

Devamlı, yüksek titre, etkinlikte ve çok miktarda immunglobulin elde edebilmek için, antikor sentezleyen hücrelerin hem canlı kalma sürelerini uzatmak ve hem de bölünmelerini (çoğalmaları-

## MONOKLONAL ANTİKORLAR



Şekil-3

nı sağlamak gerekmektedir. Bu amaçla, hibrid hücre oluşturma fikri doğmuştur. Cotten ve Milstein (1973) immunglobulin sentezleyen miyeloma ve dalak hücrelerini birleştirerek oluşturdukları **hibridoma**'lar (hibrid hücre kolonileri) her iki parental hücreye ait immunglobulin sentezlediklerini saptamışlardır. Köhler ve Milstein (1975), koyun alyuvarları verilerek immunize edilmiş fare dalak hücreleri (blastositler) ile antikor sentezlemeyen fare miyeloma hücrelerini birleştirerek meydana getirdikleri hibridomaların sa-

dece alyuvarlara karşı antikor sentezlediklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmalar sonunda, yüksek titre ve spesifitede, homojen ve tek bir B-hücrelerinden kaynaklanan klonlardan oluşan antikorlar elde edilmiş ve ölümsüz (in vivo ve in vitro devamlı üreyebilen) hücreler (hibrid hücreler) meydana getirilmiştir.

Yeterli miktarda, yüksek titrede ve etkin monoklonal antikorlar üretebilmek için bazı aşamalar bulunmaktadır. Bu basamakların her biri ayrı bir teknolojiye sahiptir ve tam olarak yerine getirilmesi de zorunludur. Bu hususlar da kısaca aşağıda bildirilmiştir:

- 1) Etkin bir immunizasyon,
- 2) Miyeloma hücrelerinin hazırlanması
- 3) Bağışık lenfositlerin elde edilmesi,
- 4) Hibridizasyon (hücre füsyonu)
- 5) Hibridoma elde edilmesi
- 6) İmmunglobulin sentezinin kontrolü
- 7) Hibridomaların klonlanması
- 8) Hibridomların fazla üretimi
- 9) Monoklonal antikorların saflaştırılması ve etkinlik kontrolü.

### **Etkin Bir İmmunizasyon**

Deneme hayvanlarında etkin bir immunizasyonun oluşturulması, başarılı bir hibridoma elde etmenin ilk koşulunu teşkil eder. Bunu sağlamak için, başlıca 3 noktanın üzerinde durulması gereklidir. Bunlar da :

- 1) **İmmunizasyon hayvanı** : Hibridoma ve dolayısıyla da monoklonal antikor üretmede fareler ve ratlardan fazlaca yararlanılmaktadır. Bunun başlıca nedenleri arasında, küçük olmaları, idarelerinin, bakım ve beslemelerinin kolay ve ucuz olmaları, iyi immunize edilmeleri, yeterince hücre kaynağına sahip olmaları, masraflarının az olması, kolay bulunabilmeleri, üretilmelerinin kolay olması, vs önemli hususlar bulunmaktadır. Farelerden Balb/c genetik soyuna ait olanlar antijenik uyarımlara iyi yanıt vermeleri ve miyeloma hücrelerinin de fare orijinli olmaları gibi nedenlerle birleşmeleri kolay ve devamlı olmaktadır. Hayvanların genç olması antijene karşı yanıtın etkinliği üzerinde olumlu katkıda bulunur. Tavşan × fare ve fare × insan hibridomalarından, çok çabuk kromozom kaybı olduğu için, tavşanlar immunizasyonda pek tercih

edilememektedirler. İnsan  $\times$  insan hibridomaları da elde edilmiştir.

2) **İmmünizasyon antijeni**: Monoklonal antikor üretiminde, farelerin immünizasyonunda, immunojenin her ne kadar saf olmasına gerek yoksa da, çok sayıda ve karışık hibridomalar elde etmek için, saflaştırılmış antijenler tercih edilmekte ve bunlardan daha homojen immün globulinler sağlanmaktadır.

Eriyebilir karakterde olan immunojenler (proteinler, polisakkaridler, veya bunların kompleksleri) çeşitli dozlarda (1 - 100 mcg) eşit miktarda Freund'un tam adjuvantı ile karıştırılarak periton içi şırıngalar yapılır. Sonra, 2 - 3 hafta aralıkla, antijenin fizyolojik su içindeki suspansiyonundan damar içi verilerek immünizasyon sağlanır. Son şırıngadan 2 - 3 gün sonra dalakları çıkarılarak lenfoid hücreler hibridizasyonda kullanılır.

Farelere yapılacak ilk şırıngalarda immunojenlerin **Freund'un tam adjuvantı** ile birlikte verilmesi, ilk uyarımların çok iyi yapılması için uygun olduğu gibi, yarı yarıya antijen kullanımında tasarruf sağladığından tavsiye edilmektedir. İkinci şırıngalarda da, bu defa, **Freund'un kısmî adjuvantı** ve üçüncü şırınganın da adjuvantsız ve damar içine verilmesi uygun görülmektedir. Eğer antijen çok azsa (nanogram), bu antijen nitrosellüloza adsorbe edilerek farelerin periton boşluğuna konabilir. Zayıf immunojenik moleküller de yüksek antijenik özelliğe sahip taşıyıcılarla (proteinlerle) konjuge edilerek kullanılabilirler.

Partiküler karakterde olan antijenler (bakteri, virus, parazit, hücre, tümör hücreleri, alyuvarlar, virusla infekte hücreler vs), Freund'un adjuvanlarına gereksinim duyulmadan hayvanlara şırınga edilebilirler. Bu amaçla intraperitoneal injeksiyonlar daha etkin bir uyarım sağlamaktadırlar.

3) **İmmünizasyon prosedürü**: Farelerin (veya ratların) immünizasyonunda kesinleşmiş veya standartlaşmış protokoller olmamakla beraber bazı temel yöntemler de bildirilmiştir. Ancak, teknikleri kullanan laboratuvarlar, kendi tecrübelerine, kullanacakları antijenlerin karakterlerine ve deneme hayvanlarına göre bazı değişmeler yapmakta ve en iyi uyarım yapabilen protokolü uygulamaya koymaktadırlar.

İmmünizasyon için genellikle, 5 - 10 arası farenin (**Balb-c**) kullanılması tavsiye edilmektedir. Çünkü, bazı hayvanlar immünizasyon süresi içinde çeşitli nedenlerle, (şok, vs) ölmekte ve bazıları



da antijenlere istenilen düzeyde bir immunolojik yanıt vermemektedir. Hibridoma meydana getirme şansını artırmak için, fare sayısının fazla tutulması iyi bir tedbir olarak kabul edilmektedir. İmmünizasyon yöntemleri için bazı metodlar bildirilmiştir. Bunlar arasında, ilk iki şırınganın Freund'un tam ve kısmi adjuvantla deri altına, diğerlerinin adjuvantsız olarak damar içine verilmesi bir çok araştırmacı grubu tarafından benimsenmektedir. Bazıları süreyi iki ay (her hafta bir enjeksiyon olmak üzere) olarak tavsiye etmekte ve yeterli olduğunu belirtmektedirler. Hayvanların dalakları son şırıngadan 2, 3, 4, 5 ve 6 gün sonra çıkarılarak kullanılması, hibridoma elde etme ve monoklonal antikör sentezleme şansını artırması bakımından yararlı bulunmaktadır. Hayvanların dalakları çıkarılmadan önce, kanları alınarak serumları çıkarılır ve bunlar pozitif serum olarak kullanılır.

Bazı araştırmacılar da subkutan veya ayak tabanlarına şırıngalar yapıldıktan sonra hem dalaklarının ve hem de regional lenf düğümlerinin çıkarılmasını tavsiye etmektedirler. İmmünizasyona alınan hayvanların hepsinin aynı gün içinde değil de, iki hayvanın immünizasyon bitiminden 2 gün sonra, diğer ikisinin 3 gün, geri kalanların da bu tarzda kullanılması etkin bir hibridoma yakalama şansı için yararlı görülmektedir.

Antikör sentezleyen hücrelerin sayısını artırmak için, immün dalak hücreleri, ileri derecede (letal dozda) irradiye edilmiş farelere şırınga edilebilir. Bu tarz uygulamada 50 kat daha fazla hibridoma elde edilebildiği belirtilmiştir.

### **Fare Miyeloma Hücreleri**

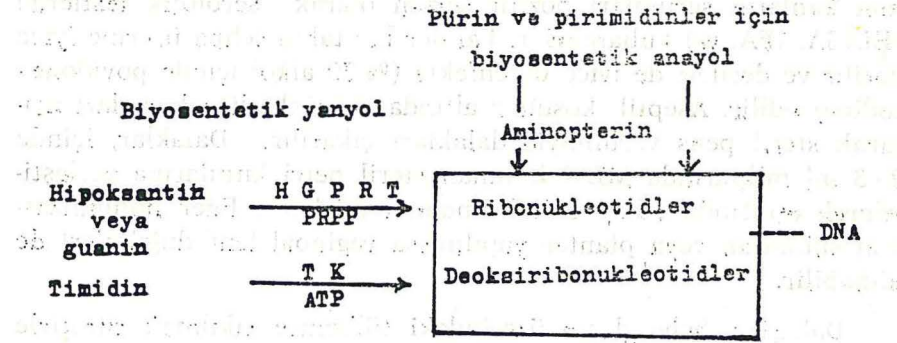
Farelerin bir plazma hücresi kanseri olan miyeloma'larından elde edilen hücrelerin hibrid hücre oluşturmada rolleri oldukça fazla bulunmaktadır. İmmünizasyonda Balb/c genetik soyu fareler kullanıldığı için yine bu farelere ait miyeloma hücrelerinin kullanılması birleşme şansını yükseltmektedir. Ayrıca, monoklonal antikör ürtme süresi de çok uzun olmaktadır. Fare × rat (tavşan, vs) hibrid hücrelerinin ömürleri ve antikör sentezleme süreleri kısa olmaktadır. Fare × insan, vs diğer miyeloma hücrelerinin hibridomalarında (heterohibridoma) kromozom kaybı da fazla olmaktadır. Bu nedenle, fare × fare hibridomaları tercih edilmektedir.

Hibridoma teknolojisinde, önceleri, kullanılan fare miyeloma hücreleri hafif ve ağır zincir sentezlerine sahiptiler. Bu durumu bazı teknik problemlere yol açmaktaydı ve elde edilen antikörlerin da spesifitesini azaltmaktaydı. Ancak, son yıllarda hiç bir antikör sentezlemeyen miyeloma devamlı hücre hatları elde edildi ve bunlar başarı ile kullanılmaya başlandı. Böyle hücreler arasında, en fazla kullanılan P3 olarak kodlanan hücre hatları bulunmaktadır (P3 × 63Ag8.653). Bunun yanısıra, SP2/0-Ag14, ratlara ait YB2/3.0Ag20 (Lou × AD) F1 gibi miyeloma hücreleri de bulunmaktadır. Bu hücrelerin başlıca 4 önemli özelliği vardır :

- 1) Antikör sentezlememektedirler,
- 2) İn vitro olarak sonsuz üreme yeteneğine sahiptirler (ölümsüz)
- 3) Yüksek oranda birleşme özelliği taşırlar,
- 4) Kendilerinde HGPRT defekti vardır (hipoksantin guanin fosforibosil transferase enzimi bulunmamaktadır. HGPRT-).

Bu son durum hibrid hücre oluşumunda önemli role sahiptir. Hücreler, genelde, pürin ve pirimin sentezleri aracılığı ile DNA yaparlar. Bu iki maddeden birinin olmaması, DNA sentezinin bloke edilmesine ve dolayısıyla hücrelerin ölümüne neden olur. Hücreler bu sentezleri temel sentetik yoldan sağlarlar (**ana sentetik yol**). Eğer ortama aminopterin (folik asit analogu) katılırsa, bu madde, prokürsörlerden pürin ve pirimidin sentezlerini bloke eder. Bu durum karşısında, hücre pürin ve pirimidin sentezi için **yan sentetik yollara** başvurur. Bu yoldan yararlanabilmesi için başlıca iki enzime gereksinim vardır. Bunlardan biri pürin sentezi için HGPRT ve pirimidin sentezi için de TK (timidin kinase) enzimleridir. Miyeloma hücrelerinde HGPRT enzimi olmadığı için pürin sentezi gerçekleştirilemez, ve hücrede, pirimidin sentezi yapılsa bile (pürinler olmadığından) DNA yapılamadığı için hücre bölünemez ve ölür. Bu nedenle, hücreler pürin sentezi için gerekli olan enzimi (HGPRT+), ancak normal bir hücre olan ve birleşmede önemli fonksiyonu olan blastositlerden sağlarlar ve böylece de üremelerine devam ederler (Şekil - 4).

Miyeloma hücreleri in vitro olarak üretilir ve aktif üreme fazında iken hafifçe çalkalanarak veya pipetle hafifçe çekip-bırak-



**Sekil-4**

mak suretiyle yapıştıkları camdan ayrılırlar. Hafifce santrifüje edildikten sonra, sayılır ve  $1 \times 10^8$ /ml dalak hücresi için  $1 \times 10^7$ /ml miyeloma hücresi hesap edilir (veya 3 kısım dalak hücresi 1 kısım miyeloma hücresi; 3:1) ve kullanıma hazır duruma getirilir.

Miyeloma hücreleri, 75 cm<sup>2</sup> yüzeyli doku kültürü şişelerinde üretilir. Çok hızlı üreme durumlarında 3-4 günde bir pasajları yapılır (veya şişelere hücre sayısı daha az olacak tarzda ekilir). Miyeloma hücreleri % 5 CO<sub>2</sub>li etüvlerde, 37°C'de MEM besi yerinde (% 5-10 fetal sıgır serumu + 15 mikrogram/ml 8-azaguanin) üretilir.

Miyeloma hücreleri (veya hibridomalar) sıvı nitrojen içinde uzun süre muhafaza edilebilir ve gerektiğinde çözülerek kullanılabilirler. Bu amaçla içinde % 10 dimetilsulfoksid (DMS) bulunan MEM (% 20 fetal sıgır serumlu) ile  $3 \times 10^6$  hücre/ml olacak tarzda sulandırılarak ampullere konulur. Ampuller önce +4°C'de 1-1.5 saat, sonra -70°C'de bir gece (20-24 saat) ve sonra da sıvı nitrojene konurlar ve burada muhafaza edilirler. Hücreleri çözdürmek için, ampuller, 37°C'lik suya değdirilmek suretiyle hafif bir çözdürme sağlanır ve hemen 10 ml taze besi yeri içinde sulandırılırlar. Santrifüje edilir ve tekrar aynı besi yerinde homojen bir süspansiyonu yapılarak şişelere aktarılırlar.

#### **Bağışık Lenfositlerin Elde Edilmesi**

İyi bir immunizasyon protokolüne tabi tutulmuş farelerden 2-3 tanesi kalplerionden kan alınmak suretiyle öldürülür. Alı-

nan kanların serumları pozitif serum olarak serolojik testlerde (ELISA, IFA, vs) kullanılırlar. Fareler bir tahta sehpa üzerine iyice gerilir ve derileri de iyice dezenfekte (% 70 alkol içinde povidone-iodine) edilir. Aseptik koşullar altında ve dikkatlice karınları açılarak steril pens yardımıyla dalakları çıkarılır. Dalaklar, içinde 2-3 ml miktarında MEM bulunan steril petri kutularına yerleştirilerek etrafındaki bağ dokularından temizlenir. Eğer immunizasyon subkutan veya planter yapılmışsa reginoal lenf düğümleri de alınabilir.

Dalaklar, beherglasın üzerindeki tülbentte sıkılmak suretiyle hücrelerin beherglasın içindeki MEM solusyonuna geçmesi sağlanır. Böylece dalakların büyük bir bölümü tülbentten MEM solusyonuna aktarılmış olur. Bu işlem, aynı zamanda, dalaklar 8-10 parçaya bölünmek ve tekrar tülbent üzerinde sıkılmak suretiyle de gerçekleştirilebilir. Suspansiyon bir santrifüj tüpüne alınarak 5-10 dakika bekletildikten sonra üst kısım ayrı bir santrifüj tüpünde 300-500 gravitede 5-10 dakika süre ile santrifüje edilir. Üst kısım (hücre artıkları, alyuvarlar ve diğer hücreler) atılır. Dipteki hücre kümesine (uyarılmış B- ve T-hücreleri, makrofajlar PNL, monositler, alyuvarlar, vs hücreler) MEM ilave edilerek sulandırılır ( $1 \times 10^8$  hücre/ml).

#### **Hibridizasyon (hücre füsyonu)**

Yukarıda belirtildiği tarzda hazırlanan bağışık dalak hücreleri ile miyeloma hücreleri 3:1 oranında (bazı laboratuvarlar 5:1 oranında kullanmaktadır) bir tüpte karıştırıldıktan sonra 1000 devirle 10 dakika santrifüje edilir ve üst taraf atılır. Dipteki hücre kümesine 1 ml miktarında **polietilenglikol** (% 40-50'lik, PEG) katıldıktan sonra 37°C'de 2 dakika birleşmeye (hibridizasyona) bırakılır. Bazı durumlarda, PEG'in meydana getirebileceği zararlı etkiyi gidermek için, bununla birlikte ortama % J DMS (dimetilsulfoksit solusyonu) katılabilir. Bu sürenin sonunda hücre suspansiyonuna **HAT (hipoksantin aminoptein timidin)** solusyonu ilâve edilerek 1 ml de  $10^6$ /hücre olacak tarzda ayarlanır. HAT solusyonunun miktarı 50-100 ml arasında değişebilir. Bu aşamada istenirse fare periton boşluğundan sağlanan makrofajlar hücre aktivitesini arttırmak, artıkları temizlemek, mikropları (varsa) fagosite ederek ortadan kaldırmak, amacı ile HAT solusyonuna katılabilir. Hücre suspansiyonu, 96 gözlü steril mikrolatelerin her bir gözüne 0.2 ml

miktarında dağıtılır ve bir kapakla kapatıldıktan sonra 37°C'de % 10 CO<sub>2</sub>'li inkubatörde bir hafta kadar bırakılır.

### Hibridoma Elde Edilmesi

Bu sürenin sonunda, mikropatein gözleri, mikroskop altında teker teker incelenerek hücre üremesi ve aynı zamanda kontaminasyonlar yönünden kontrol edilir. Hücre üremeleri, genellikle, besi yerinin renginin açılması ile dıştan bakarak gözle de farkedilebilir. Ancak, kontaminasyonlarda da benzer durum meydana geldiğinden mikroskop altında incelenmesinde yarar vardır.

Hibrid hücre üremeleri (hibridomalar) mikroskop altında yuvarlak, refraktil hücre kümeleri tarzında görülürler. Hibridoma genişledikçe ortaları koyulaşmaya ve kenarlardaki hücreler de daha belirgin bir hal almaya başlar. Üreme olan gözler bir kalemle alttan işaretlenir.

Besi yerinin pH'sı değişen ve üreme gösteren hücreler, her iki veya üç günde bir olmak üzere, eski besi yerinin yarısı alınarak taze, normal besi yeri ile değiştirilir.

Kontamine olan veya mantar üremeleri görülen gözler için derhal önlem alınarak etrafa bulaşmalara mani olunur. Bu amaçla hücrelerinin başka bir plateye pasajı da yapılabilir.

### Immunglobulin Sentezinin Kontrolü

Hibridomalarda antikor üretmesi genellikle bir hafta veya 10 günden sonra görülmeye başlar. Burada dikkat edilmesi gereken bir nokta da, birleşemeyen, fakat antikor sentezine başlamış olan bazı blastositler veya plasma hücreleri, bu bir haftalık süre içinde antikor sentezine devam edebilirler. Bunları gerçek hibridomalardan ayırmak gerekir. Aslında, birleşemeyen blastositler ve diğer hücreler, bir haftadan fazla canlı kalamadıkları gibi üreme yeteneklerini de kaybederler.

Hibridoma oluşan gözlerdeki üst sıvıdan bir miktar alınarak duyarlı serolojik yöntemlerle (ELISA, RIA, IFA, vs) immunglobulin sentezinin olup olmadığı incelenir. Çünkü, her hibridoma antikor sentezlemeyeceği gibi, aynı derecede de immunglobulin oluşturamayabilirler. İyi bir hibridoma kolonisinin üst sıvısında 1 ml de yaklaşık 0.1 - 10 mikrogram antikor sentezine rastlanabilir. An-

tikor sentezlemeyen veya yeterli yoğunlukta sentezlemeyen hibridomalar bir hafta sonra tekrar kontrol edilirler.

En fazla ve etkin antikör sentezleyen hibridoma gözleri saptanarak işaretlenir ve bunlardan pasajlar yapılır.

### Hibridomaların Klonlanması

Meydana gelen hibridomalar, zamanla antikör sentezini azaltabildiği gibi kaybedebilirler de. Hatta, bazıları ikinci çekirdeği de atabilirler. Ayrıca kontaminasyonlar da her zaman mümkün olabilir. Bu nedenlerle, iyi antikör sentezledikleri belirlenen hibridomalar zaman geçirilmeden suspansiyon hazırlanarak, başka bir mikropatein gözlerinin herbirine **birer hücre** isabet edecek tarza ekilirler. Bu durum mikroskop altında da incelenerek kontrol edilir. Ekilen hücreler üzerine normal besi yeri konarak aynı koşullar altında inkubasyona bırakılırlar.

Bir hafta içinde veya gerektiği hallerde, hücrelerin üremeleri ve antikör sentez durumları yukarıda açıklanan tarzda kontrol edilir. Eğer ihtiyaç varsa antikörün sınıf ve alt sınıfı da saptanır.

### Hibridomaların Fazla Üretimi

Hibridomaların antikör sentezlerini artırmak ve fazla antikör elde etmek için başlıca iki yöntem bulunmaktadır (**in vitro** ve **in vivo**).

**In vitro** hibridoma üretmek ve antikör sentezi elde etmek için çeşitli büyüklükte (küçük, orta, büyük) kültür şişelerinden yararlanılmaktadır. Aktif üreyen ve antikör sentezleyen hücre kültürünün üst sıvısında 1 ml'de yaklaşık 0.1 - 20 mikrogram kadar monoklonal antikör bulunabilir. Son yıllarda, MKA'ların fazla üretimi için bazı teknikler geliştirilmiştir. Bunlar arasında, yüzeyleri geniş ve rolling sisteme göre çalışan veya magnetik karıştırıcı içeren 1-2 litrelik özel sistemler bulunduğu gibi, fermentör ve bioreaktörler de kullanılmıştır. Bunların yanısıra, **Calcium alginate** (veya delikli fiberler, mikrokerrier'ler, mikroporöz matriksler, jel entrapment yöntemleri, vs ile **immobilize** edilen hücre sistemlerinde serumsuz ortamlarda üretilen hibridoma hücrelerinden daha iyi sonuçlar alındığı açıklanmıştır. Bu son teknikle insan alfa-interferon ve interleukin-2 (IL-2)'ler başarı ile elde edilmişlerdir.

İn vivo hibridoma üretmede, aynı genetik karakterde (singe-neik) farelerin (Balb/c) derileri altına veya karın içine aktif üremekte olan kültürlerden veya tümör hücrelerinden hazırlanan hücre suspansiyonlarından şırınga edilir. Bu amaçla farelere  $1 \times 10^6$  hücre/ml yoğunluktan 0.2 ml ve ratlara da 0.4 ml kadar vermek yeterli kabul edilmektedir.

Tümör oluşumunu hızlandırmak için, hayvanlarda immun-supresyonun sağlanmasını ve bu amaçla farelerin düşük düzeyde **X-ışınları ile irradiasyonu** (500 rads) ve/veya 24 saat öncesinden **cyclophosphamide** (0.5 mg/20 gr vücut ağırlığı) verilmesi tavsiye edilmektedir.

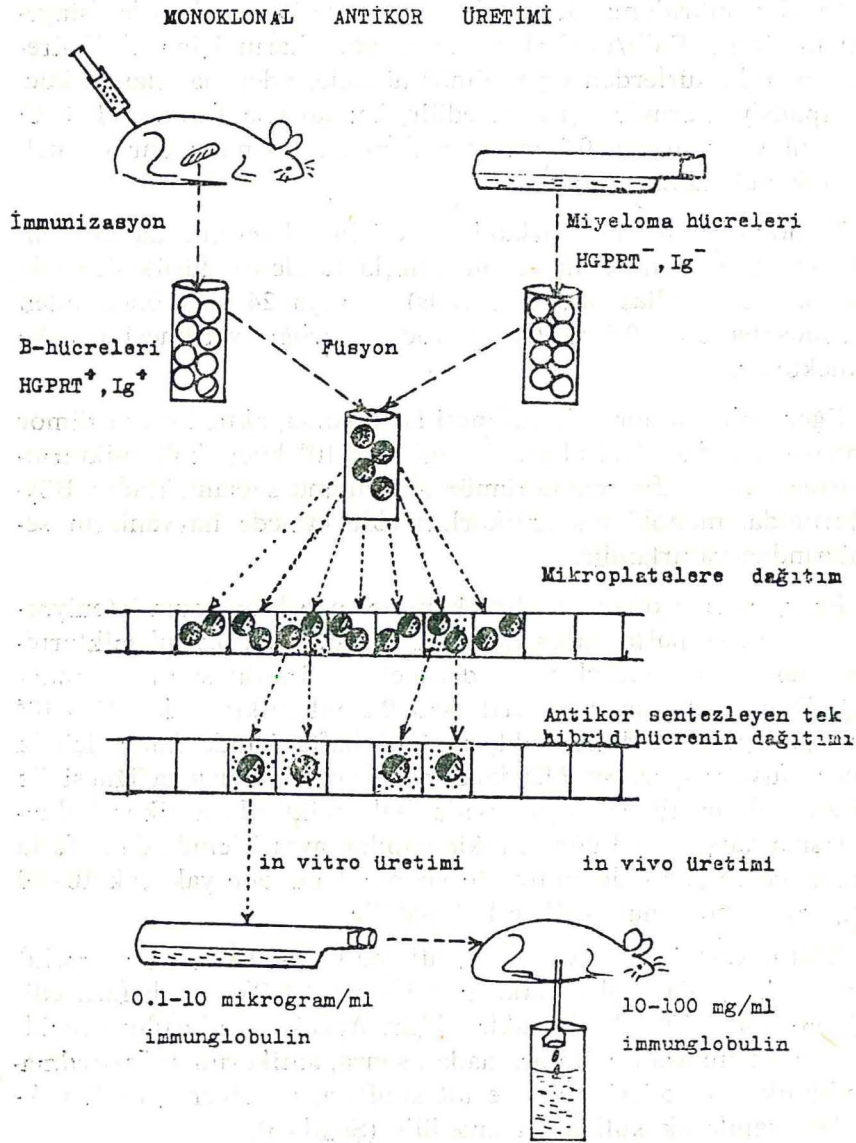
Eğer, solid tümör elde edilmesi isteniyorsa, aktif üreyen tümör suspansiyonundan deri altına 0.2 ml ( $1 \times 10^6$  hücre/ml) miktarında şırınga, 2-5 hafta içinde tümör oluşumunu sağlamaktadır. Böyle durumda, monoklonal antikorları elde etmede hayvanların serumlarından yararlanılır.

Eğer, in vivo olarak ascites karakterinde hibridoma isteniyorsa, farelere 3-4 hafta öncesinden, karın içi olarak 0.5 ml miktarında **pristane** (tetramethyl penta decane) verilir. Bu sürenin sonuna, Balb/c farelerine intraperitoneal 0.2 ml miktarında ( $1 \times 10^6$  hücre/ml) şırınga edilir. Yaklaşık 2-4 hafta içinde karın içinde ascites oluşmaya başlar. Meydana gelen sıvı, bir şırınga iğnesi ile çekilerek alınır. İlk çekilişte sıvıda fazla miktarda antikor bulunmamasına karşın, 2-3 gün aralıkla yapılan aynı işlemde daha fazla antikor içeren sıvı elde edilir. Bu sıvının 1 ml'inde yaklaşık 10-80 miligram monoklonal antikor bulunabilir.

Kültür veya karın sıvısı santrifüje edilir ve üst sıvı (antikorlu) 0.1 ml miktarında tüplere taksim edilir ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilebildiği gibi  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de de saklanabilir. Ancak, dondurulup-çözülmesi etkinliğini azaltır. Bu aşamadan sonra, antikorun saflaştırılması, etkinlik kontrolleri, sınıf ve alt sınıfları, ve diğer gerekli yoklamaları yapılarak kullanıma arz edilir (Şekil-5).

#### **Antikorun Saflaştırılması**

Özellikle, in vivo olarak elde edilen MKA'lar fare kanından gelen bazı proteinler ve antikorlarla kontamine olabilmektedir. Bu nedenle, in vitro üretilenler kadar, in vivo elde edilenlerinin de çeşitli yöntemlerle saflaştırılması gerekmektedir. Bu amaçlarla bazı



metodlardan (affinite kromatografi, iyon değişimi, vs) saflaştırılması gerekir.

Periton sıvısında, farelere ait antikorların da geçeceğini düşünerek, immunizasyondan önce, hayvanların kanının antikor yö-



nünden iyice kontrol edilmesinde yarar bulunmaktadır. Bu yönden SPF (veya Germfree) farelerden yararlanılabilir.

Antikorlar saflaştırıldıktan sonra aktiviteleri yeniden kontrol edilebilir.

Monoklonal antikorlar içinde % 0.1 oranında sodium azide bulunan borat buffer da +4°C'de de saklanabilirler

Monoklonal antikorların, konvansiyonel serumlara (poliklonal antikorlar) karşı bazı avantajları bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi, yüksek spesifiteye sahip olmalarıdır. Bu nedenle, birbirlerinden çok küçük kimyasal yapı farkı ile ayrılan iki antijenik determinantı ayırt edebilecek etkinliktedir. Bu iki determinant aynı antijenik molekül üzerinde olsa bile bu ayırım etkindir. Ayrıca, monoklonal antikorlar kolay, ucuz ve devamlı olarak elde edilebilirler. Affinite ve spesifiteleri de oldukça yüksektir. Monoklonal antikorlara (MKA) radioaktif amino asitler (<sup>35</sup>S methionine, <sup>75</sup>Se-lenomethionine) ilave edilerek işaretlenebilir. Bunların yanısıra, enzim ve fluorenas boyalar da bağlanarak, ELISA ve FA testlerinde de güvenle kullanılabilirler.

MKA'ların yukarıda açıklanan avantajları yanısıra, bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Örneğin komploment fikzasyon ve presipitasyon testlerinde bir monoklonal antikor yerine birkaç MKA'nın kullanılması tavsiye edilmektedir. Monoklonal antikorların çok spesifik olmaları nedeniyle, ayrı cinste bulunan mikroorganizmalar da benzer antijenik determinantlar varsa onlarla da **kros reaksiyon** verebilirler. Bunların yanısıra, MKA'ların dondurulması ve çözülmesi sırasında titre kayıpları, poliklonal antikorlara oranla, daha fazla olmakta ve buna bağlı aktivitesinde düşmeler görülmektedir. İnsanların **tiroid'in stimulan hormonu**'na (TSH) karşı oluşan MKA'lar, insan **luteinizan hormonu** (LH) ile, TSH'den daha kuvvetli reaksiyon verdiği bildirilmiştir.

Monoklonal antikor teknolojisi ile üretilen antikorların etkinlikleri bazen zayıf olmaktadır. Hibridoma tek bir tip sınıf ve alt sınıfıta antikor sentezlediği için, bu tür immünglobulinler bazı serolojik reaksiyonlar için yeterli olamamaktadır. Şöyle ki, Ig G'ler komplementi fikse edemez ve bu nedenle de komplemente bağımlı immunolojik reaksiyonlarda (CFT ve sitotoksitate) kullanılamazlar. IgG3'ler de oldukça insoluble bir özellik taşıdıklarından mu-

hafaza ve sevklerde güçlükler gösterir. Buna karşın IgG2'ler insan tümör hücrelerinin makrofajlar tarafından tahribinde (sitotoksik etkinlik) daha etkili görülmektedirler.

Yukardakilerin yanısıra, bazı genetik karakterleri de MKA'ların hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılımlarını kısıtlamaktadır. Örneğin, IgG'lerin Fc bölgeleri, birçok normal hücrelerin yüzeyindeki Fc gama reseptörleriyle bağlanabilir. Böylece, radioaktif veya kemoterapötik maddelerle bağlanmış olan MKA'ların tümör veya hedef hücrelerine karışık olan selektif yönelmelerine ve spesifik bir özellik göstermelerine mani olur.

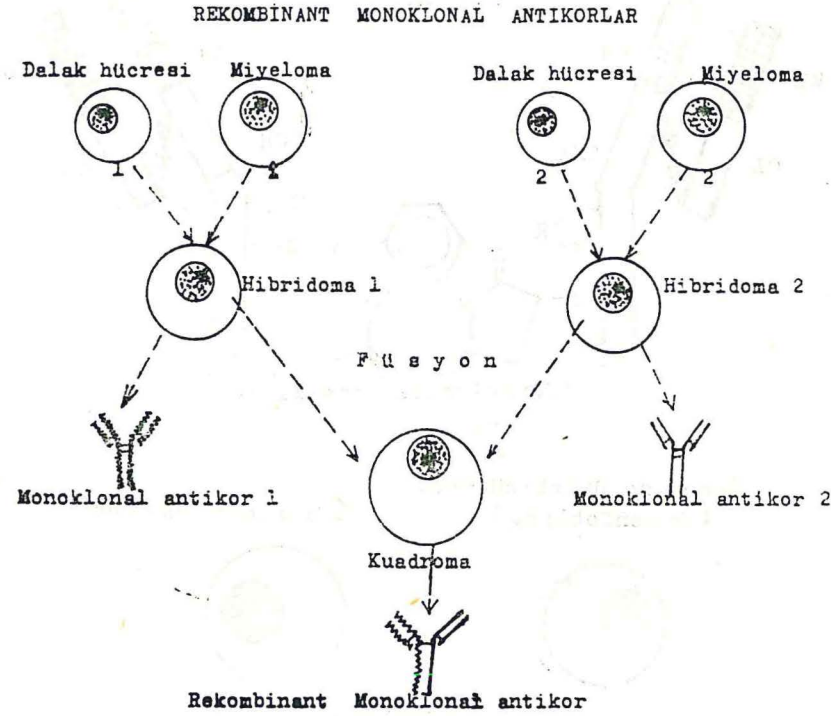
MKA'ların üç boyutlu özelliği de (**Lettice formasyonu**) zayıf olduğundan veya ortadan kalktığından presipitasyon reaksiyonu için de uygun değildir.

Aglutinasyon reaksiyonlarında da bazı aktivite ve avidite azlığına rastlanıldığı bildirilmiştir.

Yukarıda açıklanan nedenlerin ışığı altında, MKA'larla yapılan immunolojik reaksiyonlarda alınan negatif sonuçlar antijenik moleküllerin (veya immunojenlerin) yokluğunu pek göstermemektedir.

Son yıllarda, Monoklonal antikorların bazı serolojik reaksiyonlarda (CF, AGID, vs) etkinliğini artırmak amacıyla yeni bir yöntem geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu da, **Rekombinant Monoklonal Antikor tekniği**'dir. Bu metodda, iki ayrı antijenik determinanta karşı antikor sentezleyen iki hibridomayı bileştirerek (**Kuadroma**) her iki tür MKA'a ait karakter taşıyan yeni **hibrid MKA** elde etme amaçlanmaktadır. Bu tekniğin aşamaları aşağıdaki Şekil - 6'da gösterilmiştir.

Bahsedildiği tarzda antikor sentezleyen iki ayrı hibridomanın füsyonu sonunda elde edilen rekombinant monoklonal antikor oluşturma yöntemi yanısıra, benzer diğer bazı tekniklerde bildirilmiştir. Bunlardan biri, iki ayrı monoklonal antikor enzimatik yolla ayrıştırıldıktan sonra elde edilen Fab bölgelerinin (antijenle birleşen bölge) bifonksiyonel kros linkerler ile birleştirilmesi ve böylece **bispesifik (kimerik) monoklonal antikor** oluşturulması (Şekil - 7) ve diğeri de antikor sentezleyen bir hibridoma ile immunize edilmiş bir dalak hücresinin (B-lenfoblast) füsyonu (**trioma**), MKA elde edilmesi teknikleridir (Şekil - 8).

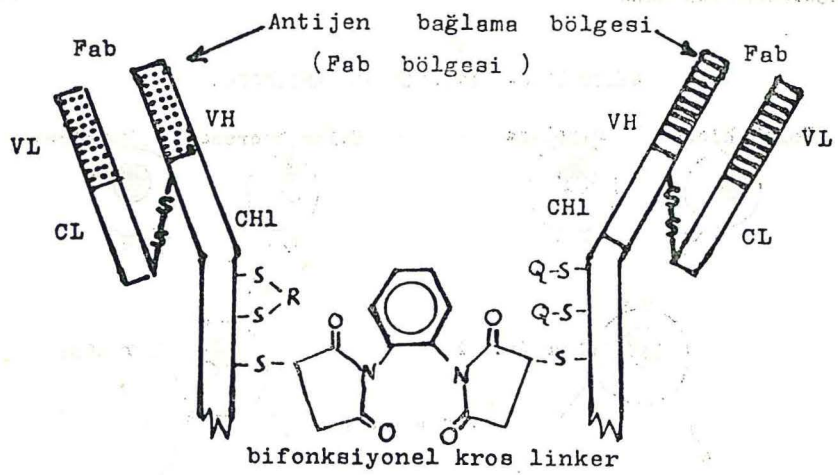


Şekil-6

Her iki yöntemle de oluşturulan rodent-rodent veya rodent-human kimerik monoklonal antikorun bir ağır ve bir hafif zinciri, diğer yarısından farklı orijinden kaynaklanmaktadır.

Son yıllarda antikor moleküllerinin bakterilerde ekspresyonu ile fazla miktarda antikor sentezi elde etme yöntemleri üzerinde durulmaktadır.

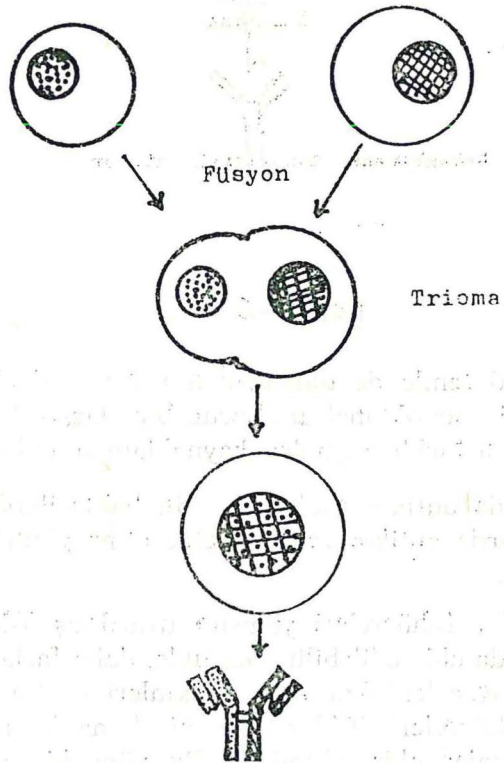
Hibridomlar B-hücreleri yanısıra uyarılmış T-lenfositlerinden de benzer tarzda elde edilebilir. Özellikle, daha fazla interferon, interleükin ve diğer lenfokin veya sitokinleri üretmek için bunları sentezleyen T-hücreleri (T-blast) ile miyeloma hücreleri birleştirilerek hibridomalar elde edilmiştir. Bu yöndeki çalışmalar halen devam etmektedir.



Şekil-7

İmmunize dalak hücresi  
( B-lenfoblast )

Hibridoma hücresi



Şekil-8

## MONOKLONAL ANTİKORLARIN HASTALIKLARDA KULLANILMASI

Her ne kadar monoklonal antikorların elde edilmesinin her aşamasında ayrı ayrı güçlükler ve sentezlenen antikorların aktivitesinde bazı sorunlar (kros reaksiyonlar, yabancı proteinlerle kontaminasyon, dondurma hallerinde titre düşmesi, vs) olmasına karşın, bilim adamları MKA'ların geleceğine insan ve hayvan sağlığı açısından ümitlenmektedirler. Şunu da belirtmek gerekir ki, güçlüklerin çoğu, gelişen teknolojik olanaklar nedeni ile çok azaltılmıştır ve bugün MKA'lar bir çok laboratuvarlarca kolayca üretilmekte ve diğer araştırmacılara kullanılmak amacı ile gönderilmektedir.

Monoklonal antikorların hastalıklarda başlıca kullanım amaçları şöyle özetlenebilir :

- 1) Epidemiyolojik çalışmalarda (seroepidemioloji'de)
- 2) İnfeksiyonların teşhisinde (serodiagnozis'te)
- 3) İnfeksiyonlardan korunmada (pasif bağışıklık, seroprolaksi'de)
- 4) Hastalıkların sağaltımında (seroterapi'de)
- 5) Aşıların hazırlanmasında

### Epidemiyolojik Çalışmalarda (Seroepidemioloji)

İnfeksiyonların insidens ve prevalansının tayininde, erken teşhis, sağaltım, infeksiyonların kontrol altına alınmasında veya eradikasyonunda yararlanılan prensiplerin konulmasında olduğu kadar, subklinikal infeksiyonların (latent, gizli infeksiyonlar), kronik infeksiyonların, portör, rezervuar, reaktör, vs hayvanların ortaya konmasında epidemiyolojik ve özellikle seroepidemiolojik araştırmaların rolü çok fazla bulunmaktadır. Bu amaçla, alınan kan, serum, ekskret, sekret, sıvı ve organlarda antikor ve antijenlerin aranması veya ortaya konmasında MKA'lar çok daha fazla etkinlik göstermektedirler. Son yıllarda çeşitli kimyasal maddelerin (hormonlar, vs) aranmasında da işaretli MKA'lar, poliklonal'lara oranla daha spesifik fonksiyon yapmaktadır.

Monoklonal antikorların enzimlerle (peroksidase, vs), radioizotoplar ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ) ve fluoresan boyalarla (Fluorescein isothiocyanate, vs) bağlanarak duyarlı immunolojik testlerde (ELISA, RIA, FA) direk veya indirek olarak kullanılmaktadırlar. MKA'ların bu tarz-

da kullanılması ile, laboratuvarlarda rutin olarak yararlanılan yöntemlerle ortaya konamayan antikor, antijen ve diğer maddeler, daha çabuk ve güvenilir bir şekilde teşhis edilebilmekte veya ortaya konabilmektedir. Bu substanslar çok düşük düzeylerde (nanogram) olsalar bile. Böylece gizli kalmış infeksiyonlar, reaktörler, rezervuarlar, vs daha fazla oranda ortaya konabilmekte, hastalık odakları teşhis edilebilmekte ve bunlara karşı kısa bir süre içinde etkin koruyucu önlemler alınabilmektedir.

Bir çok bakteriyel (Brucellosis, Campylobacteriosis, Listeriosis, Tuberculosis, Paratuberculosis, Leptospirosis, Salmonellosis, Pasteurellosis, Chlamydiosis, Mycoplasmosis, vs) viral (Newcastle, IB, IBD, Marek, Kuduz, Şap, vs) ve paraziter hastalıkların teşhisinde monoklonal antikorların rolü çok fazla artmış bulunmaktadır.

### **Hastalıkların Teşhisinde (Serodiagnosis)**

İnfeksiyonlar ve bunlara bağlı olarak meydana gelen hastalıklarda etkenin veya antikorların erken saptanmasında, tip ve serotiplerinin belirlenmesinde MKA'lar büyük yararlar sağlamaktadırlar. Hastalık etkenlerinin identifikasyonlarının çok çabuk ve güvenilir olarak yapılması sağaltıma ve prognoza çok olumlu katkıda bulunacağı gibi, hastalığın etrafa yayılmadan söndürülmesinde ve gerekli koruyucu önlemlerin alınmasına da büyük yararları olacaktır.

MKA'lar aynı zamanda, hastalık odaklarının, kanser hücrelerinin, tümör markerlerinin ve metastaslarının teşhisinde, toksemik infeksiyonlarda toksinin tip ve alt tiplerinin tayininde, ayrıca süt, idrar, doku sıvıları, vs sıvılardaki bazı kimyasal maddelerin (hormon, enzim, ilaç, eriyebilir protein, metabolit, vs) tesbitinde de çok fazla kullanılmaktadırlar.

### **Hastalıkların Sağaltımında (Seroterapi)**

Hayvanlardaki çeşitli hastalıkların sağaltımında, monoklonal antikorların kullanılması, henüz insan hekimliğinde olduğu kadar bir alana sahip değilse de, zamanla, özellikle, evde beslenen kedi ve köpeklerin, ayrıca çok kıymetli damızlıkların tedavilerinde kullanılabilmesi doğaldır. Ancak, bu amaçla kullanılacak monoklonal antikorların çok fazla üretilmesi, ucuz olması ve kolaylıkla temin edilmesi gibi problemlerin ortadan kaldırılması gereklidir. Bunla-

ra rağmen, diğer sağaltım metodlarının yanısıra veya onlarla birlikte veya yardımcı olarak yararlanılması öncelikle düşünölmelidir. Tedavi amacıyla çeşitli hastalıklara (tetanoz, botulizim, kuduz, ve diğer bakteriyel ve viral infeksiyonlara karşı hazırlanan MKA'lar oldukça fazla yararlar sağlayacağı bir gerçektir.

Buzağılarda neonatal sepsisemi ve enteritlere neden olan **E. coli**'lerin piluslarına karşı hazırlanan MKA'lar oral verildiklerinde, ETEC (entero toksijenik **E. coli**)'lere karşı koruduğu bildirilmiştir.

Kanserin sağaltımında, kanserli hücrelerin yüzey antijenlerine karşı hazırlanan MKA'lar ya tek olarak veya çeşitli toksinlerle (**C. diphtheria** toksini veya ricin) konjuge edilerek (**immuntoksin**), kullanılmış ve yararlı olabileceği açıklanmıştır.

### **Hastalıklardan Korunmada (Seroproflaksi)**

Veteriner hekimlikte «**koruyucu hekimlik**» önemli ve esastır. Sağaltımdan daha etkili ve ucuzdur. İnfeksiyonların çıkmaması ve yayılmaması için her türlü genel ve özel önlemler almak gerekmektedir. Koruyucu amaçla, çeşitli infeksiyonlara karşı hazırlanmış monoklonal antikorlar veteriner hekimlikte henüz yaygınlık kazanmış değildir. Ancak, bazı spesifik bakteriyel ve viral hastalıklara karşı evde beslenen kedi ve köpeklerde veya çok kıymetli damızlıklarda **pasif bağışıklık** sağlamak amacıyla kullanılabilirler.

### **Aşıların Hazırlanmalarında**

Çeşitli infeksiyonlara karşı korumada son yıllarda **anti-idiotip antikor**'dan yararlanma durumu ortaya çıkmış bulunmaktadır. Bu amaçla çeşitli bakteriyel, viral ve paraziter etkenlere karşı hazırlanmış monoklonal antikorlara karşı yine singeneik hayvanlarda hazırlanmış anti-idiotip monoklonal antikorlar, antijenle aynı internal imaja sahip olması, veya, antijenle birleşebilmesi nedeniyle, aşı olarak yararlanılmaktadır. Böyle aşılar da henüz deneme safhasında olup ticarete çıkarılmış değildir.

### **MONOKLONAL ANTİKORLARIN DİĞER BAZI KULLANIM ALANLARI**

Monoklonal antikorlar (MKA) çok yüksek spesifiteye ve etkinliğe sahip olması nedeniyle gerek insan ve gerekse veteriner hekim-

likte bir çok kullanım alanı bulmuştur. Yukarıda bahsedilen konular dışında bir çok çalışmalarda ve araştırmalarda da monoklonal antikordardan yararlar sağlanılmaktadır. Bunlar da özetle aşağıda bildirilmiştir.

- 1) Antijenlerin saflaştırılmasında
- 2) Aşı suşlarının seçiminde
- 3) Diyagnostik kitlerin hazırlanmasında
- 4) Araştırma ve teşhis çalışmalarında
- 5) Mastitis çalışmalarında
- 6) Tümörle ilgili çalışmalarda

#### **Antijenlerin Saflaştırılmasında**

Bir immunojenin yüzeyinde birbirinden az-çok farklı karakterde antijenik determinantlar bulunmaktadır. Bunlara karşı da vücutta antikolar meydana gelir. Bu antijenik determinantların herbirine karşı da monoklonal karakterde antikolar oluşturulabilir. Böyle antikolar kullanılarak antijenler saflaştırılabilmektedir. Şöyle ki, monoklonal antikolar cyanogen bromid yardımıyla agarose granüllerine absorbe edildikten sonra, heterojen antijenle muamele edilerek antijen-antikor kompleksi sağlanır. Sonra bundan, yıkama suretiyle antijen çıkarılarak çeşitli serolojik testlerde güvenle kullanılabilir. Bu tarz pürifikasyon yöntemine **affinite kromatografik metod** adı verilmektedir.

#### **Aşı Suşlarının Seçiminde**

Kompleks yapıdaki bir antijen inokulumu içinde, vücutta en iyi uyarımı yapan ve proteksiyon meydana getiren antijenik determinantları seçmede ve bunu ayırmada monoklonal antikordardan yararlanılmaktadır. Bu amaçla yüksek titre ve aktiviteye sahip olan monoklonal antikolar, antijenle absorpsiyona tabi tutularak, buradan antijenik determinant elde edilir ve bu immunizasyon için kullanılır.

Eğer antijenik determinant bir protein molekülü üzerinde bulunuyorsa, bu protein, enzimatik olarak polipeptidlere ayrılır. Sonra bunlar monoklonal antikolarla birleştirilir (affinite kromatografi). Antijen-antikor kompleksinden protein antijen ayrılır. Bunun amino asit sıraları tayin edilir ve bunun benzeri sentetik olarak elde edilir. Bu polipeptid, taşıyıcı bir proteinle birleştirilerek vücu-



da verilir. Bu yolla da, en iyi antijenik uyarım yapan antijen seçilebilir.

### **Diagnostik Kitlerin Hazırlanmasında**

Çeşitli bakteriyel, viral ve paraziter hastalık etkenlerine karşı hazırlanan monoklonal antikorlar (IgG, IgM, vs) veya saf olarak elde edilmiş olan immunglobulinlere veya bunların alt sınıflarına karşı hazırlanan monoklonal antikorlar klinik mikrobiyolojide seroepidemiyolojik, ve serodiyagnostik amaçlarla etkin bir şekilde kullanabilmektedirler. Özellikle, ikinci türden elde edilen monoklonal antikorların bazı maddelerle (enzim, isotop, boya) birleştirilerek elde edilmiş konjugatlar da infeksiyon etkenlerinin veya bunların alt türlerinin erken teşhisinde büyük faydalar sağlamaktadır.

Böyle hazırlanan kitler aynı zamanda kan, idrar ve dokularda çeşitli kimyasal maddelerin aranmasında da yardımcı olmaktadır.

### **Araştırma ve Teşhis Çalışmalarında**

- İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan infeksiyöz etkenlerinin birbirlerinden ayrılmasında,
- İnfeksiyöz etkenlerin (bakteri, virus, mantar, protozoon, parazit, vs) alt gruplarının belirlenmesinde,
- İnfeksiyöz etkenlerde sonradan meydana gelen genetik değişmelerin (mutasyon) saptanmasında ve mutantların teşhisinde,
- Postvaksinal hastalıkların meydana geldiği durumlarda, aşı içerisinde geriye dönüş oranının belirlenmesinde ve böyle aşılarda virulent etkenin varlığının saptanmasında,
- Birbirlerine çok yakın olan antijenik moleküllerin ayrımalarının yapılmasında,
- İnsan ve hayvanlardaki B- ve T-hücrelerinin ve bunların alt gruplarının saptanmasında,
- Çeşitli hücrelerinin yüzey antijenik moleküllerine göre birbirlerinden ayrılmasında ve antijenik haritalarının çıkarılmasında,
- Kompleks antijenik moleküllerden saf, spesifik ve yüksek titrede homojen antikorların elde edilmesinde,

- Aşı üretiminde kullanılabilen uygunlukta immunojenlerin seçilmesinde,
- Kompleks antijenik moleküllerden saf, spesifik ve yüksek titrede homojen antikorların elde edilmesinde,
- Kan hücrelerinin yüzey moleküllerinin belirlenmesinde ve kan gruplarının tayininde,
- Büyük doku uyuşum antijenlerinin (MHA) belirlenmesinde,
- Antijenlerin saflaştırılmasında,
- İmmunglobulinlerin sınıf ve alt sınıflarının tayininde,
- Hormanlara, çeşitli ilaçlara, toksinlere, mikroorganizmalara ve diğer ajanlara karşı yüksek titreli spesifik ve homojen antiserumların elde edilmesinde,
- Vücut doku ve sıvılarında çeşitli kimyasal maddelerin belirlenmesinde,
- Sperma hücrelerinin ayırımında,
- Hücrelerin ontogenezisi sırasında ve sonradan yüzeylerinde meydana gelen antijenik moleküllerin türlerinin tayininde,
- Lenfokin ve diğer sitokinlerin elde edilmesinde,
- İmmunojenlerin yüzeylerinde bulunan çeşitli antijenik determinantların belirlenmesinde, haritalarının ve analizlerinin yapılmasında,
- ve diğer önemli çalışmalarda.

#### **Mastitis Çalışmalarında**

- Süt komponentlerinin sentez mekanizmalarını incelemeye,
- Süt salgılayan hücrelerin yerlerini belirlemeye,
- Sekretör hücrelerin yüzey antijenik moleküllerinin ve yüzey immunglobulinlerinin belirlenmesinde,
- İmmunglobulinlerin transportunun saptanmasında ve izlenmesinde,
- İmmunglobulinlerin serum, süt ve kolostrumdaki düzeylerinin ve sınıflarının tayininde,

- Sütte ve kanda bulunan hücrelerin tip ve alt tiplerinin belirlenmesi ve aralarındaki farkın ortaya konmasında,
- Laktasyonun çeşitli dönemlerinde, çeşitli stres faktörleri altında veya özel koşullarda, sütte ve kanda bulunan hücrelerin yüzey antijenlerinde meydana gelecek değişikliklerin belirlenmesinde,
- İnfeksiyon durumlarında, sütte ve meme dokusunda bulunan hücrelerin yüzey antijenik moleküllerinde oluşabilecek değişikliklerin belirlenmesinde,
- Hayvanlar arasındaki sekretör hücre yüzey moleküllerinin saptanmasında,
- Süt bileşiminin belirlenmesinde.

#### **Tümörle İlgili Çalışmalarda**

- Benzer histolojik görünümde olan tümörlerin yüzey antijenik moleküllerinin belirlenmesinde,
- Tümör tiplerinin ve alt tiplerinin tayininde,
- Primer tümörlerle bunlara ait metastazların saptanmasında,
- Kemik iliği aspiratlarından tümör hücrelerinin eliminasyonunda,
- Kemik iliğinden immunreaktif hücrelerin (T-hücrelerinin) eliminasyonunda,
- Kanda dolaşan veya hücrelere bağlanmış olan tümör antijenlerinin ortaya konmasında,
- İmmuntoksinlerin hazırlanmasında,
- Tümörle ilgili ve sağaltıma ve teşhise yönelik diğer çalışmalarda.

Sonuç olarak, gelişen rekombinant DNA teknolojisi, monoklonal antikor üretimine yeni ufuklar getirmiş ve hibridomalardan sağlanan klasik antikor sentezinin daha ötesine gidilmesine yardımcı olmuştur. Yeni yöntemler yardımı ile, immunglobulin sentezini kodlayan genler (ağır, hafif, variable, konsatant bölge genleri) hücrelerden çıkarılabilmekte ve üzerlerinde, *in vitro* olarak, DNA manipulasyonları (gen manipulasyonları) yapılarak istenilen nitelikleri taşıyan yeni gen kombinasyonları elde edilebilmektedir. Bu tarzda hazırlanan genler, bir ekspresyon vektörüne veya mekik

vektöre (plasmid, vaksinia virusu, SV40, vs) bağlanarak uygun bir konakçıya (bakteri, maya, hibridoma hücresi, vs) aktarılmakta ve genin ekspresyonu sağlanmaktadır.

Yeni teknolojiler, klasik tam bir antikor molekülünün yanısıra, sadece **variable** veya **Fc-porsiyonlarının** sentezlerini gerçekleştiren hibridomaların elde edilmesine olanak sağladığı gibi, gelecekte, antikor sentezleyen bakteri ve maya gibi hücrelerin elde edilmesine de ışık tutacaktır. Nitekim şimdiden, **E. coli**'de bazı antikorların üretildiği bildirilmiştir.

Trioma ve kuadroma'ların sentezlediği hibrid immunglobulinlerin yanısıra, geliştirilen yeni yöntemlerle başka tarzda kimerik moleküller de oluşturulabilmektedir. Örneğin, hafif zincirleri fareye ve ağır zincirleri insana ait antikor molekülü veya, bir hafif ve ağır zinciri bir hücre yüzeyindeki antijenik moleküle ve diğer yanısı (bir ağır ve bir hafif) da başka bir hücre yüzey antijenine karşı hazırlanmış antikorların bir araya getirilmesinden teşekkül etmiş hibrid immunglobulinler, veya diğer değişik kombinasyonlar, vs gibi.

Böylece, geliştirilen rekombinant DNA teknolojisi yardımı ile doğada rastlanmayacak özellikte ve etkinlikte immunglobulin molekülü elde etmek mümkün olabilecektir.

#### KAYNAKLAR

- 1 — ANTCZAK, D.F. (1982): Monoclonal antibodies: Technology and potential use. JAVMA, 181 (10): 1005-1010.
- 2 — ARDA, M. (1984): Monoklonal antikor hazırlama tekniği (kurs notları) Hannover.
- 3 — DAVIS, W.C., McGUIRE, T.C. and PERRYMAN, E.E. (1982): Biomedical and biological application of monoclonal antibody technology in developing countries. National Academy Press, Washington, D.C., 1982.
- 4 — DOMINGO, M. (1982): Herstellung und charakterisierung monoklonaler antikörper gegen bursazellen des huhnes (Inaugural dissertation). Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität zu Giessen.
- 5 — Fox, J.L. (1986): Monoclonal antibodies: A successful diagnosis ASM News, 52 (2): 90-93.
- 6 — GALFRE, G. and MILSTEIN, C. (1981): Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures.  
Eds. V. HOUBA and S.H. CHAN (1982): Properties of the monoclonal antibodies produced by hybridoma technology and their application to the study of diseases p. 1-46. UNDP/WORLD BANK/WHO, Geneva.

- 7 — GALFRE, G. and MILSTEIN, C. (1981) : Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. *Meth. Enzymol.*, 73 : 3-47.
- 8 — GERSHWIN, L.J. (1981) : Hybridomas : The production of monoclonal antibodies. *Cal. Vet.*, 35 (10) : 31-33.
- 9 — HEWITT, J., COATES, A. R. M., MITCHISON and IVANYI, J. (1982) : The use of murine monoclonal antibodies without purification of antigen in the serodiagnosis of tuberculosis. *J. Immunological Methods*, 55 : 205-211.
- 10 — İZGÜR, M. ve DİKER, K.S. (1984) : Monoklonal antikorlar. *A.Ü. Vet. Fak Derg.*, 31 (1) : 98-106.
- 11 — KADOUCHE, J., DARNE, C., KETELS, F., POULETTY, P., CREVAT, D., KALİL, J. et NAJEAN, Y. (1982) : Analyse de différentes isoferritines par des anticorps monoclonaux. *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 295, Serie 443-448.
- 12 — KEARNEY, J.F. (1984) : Hybridomas and monoclonal antibodies. Ed. W. E Paul. *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York.
- 13 — KÖHLER, G. and MILSTEIN, C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predifined spesifity. *Nature*, 256 : 495-497.
- 14 — KRAMMER, P.H., ECHTENACHER, B., GEMSA, D., HAMANN, U., HÜLTNER, L., KALTMAN, B., KESS, U., KUBELKA, C. and MARCUCCI, F. (1983) : Immune-interferon (IFN), Macrophage activating factors (MAFs), and colony stimulating factors (CSFs), secreted by T.cell clones in limiting dilution microcultures, long-term cultures, and by T cell hybridomas. *Immunol. Review*, 76 : 5-28.
- 15 — LaBONNARDIÈRE, C., GROSCLAUDE, J. et VENTURA, M. (1983) : Détection des hybrides séréteurs d'immunoglobulines monoclonales par egglutination de Staph.aureus. *Ann. Immunol.*, 134 C : 281-291.
- 16 — LETOWORTH, G.J. and APPLETON, J.A. (1984) : Methods for production of monoclonal antibodies. U.S. Dep. of Agric., *Agriculture Handbook*, No. 630.
- 17 — LLOYD, R.V. and WILSON, B.S. (1983) : Spesific endocrine tissue marker defined by a monoclonal antibody. *Sciense*, 222 : 628-630.
- 18 — Longenecker, B.M. (1982) : Preparation and properties of monoclonal antibodies against cell surface polymorphic or allelic determinats : their use in blood typing and the study of cell differentiation. *Anim. Blood groups and Bioch. Genetics*, 13 : 225-238.
- 19 — LOVBORG, U. (1982) : Monoclonal antibodies : Production and maintenance. William Heinemann Medical Books, London.
- 20 — McCULLOUGH, K.L. (1986) : Monoclonal antibodies : Implications for virology (brief review). *Arch. Virology*, 87 : 1-36.
- 21 — MENEVŞE, A. ve MENEVŞE, S. (1984) : Gen mühendisliği. *TÜBİTAK, Doğa Bilim Derg.*, Seri C, 8 (3) : 430-442.
- 22 — MILSTEIN, C. (1980) : Monoclonal antibodies. *Sci. Amer.*, 243 : 56-64.
- 23 — MORRISON, S.L., WIMS, L.A. and OI, V.T. (1985) : Transfectomas : A new approach for the production of the monoclonal antibodies.

- Eds. A. PINCHERA, G. DORIA, F. DAMMACCO, A. BARGELLES, Monoclonal Antibodies'84: Biological and clinical application, p. 39-53. Proc. Int. Symp. MCA'84. Editrice Kurtis, Milano.
- 24 — NICKERSON, S.C. SHAPIRO, R.P., GUIDRY, A.J., SRIKUMARAN, S. and GOLDSBY, R.A. (1983): Production of monoclonal antibodies to bovine leukocyte cell-surface components. *J. Dairy Sci.*, 66 (7): 1547-1558.
- 25 — NOWINSKI, R.C., TAM, M.R., COLDSTEIN, L.C., STONG, L., KUO, C.C., COREY, L., STAMM, W.E., HANDSFIELD, H.H., KNAPP, S.S. and HOLMES K.K. (1983): Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans. *Science*, 219: 637-644.
- 26 — PALLOCK, R.R., TEILLAND, J.L. and SCHARFF, M.D. (1984): Monoclonal antibodies: A powerful tool for selecting and analysing mutations in antigens and antibodies. *Ann. Rev. Microbiol.*, 36: 389-417.
- 27 — PALLOCK, R.R., AGUILA, H.L., BARGELLES, A., SPIRA, G. FISCHBERG, E. and SCHARFF, M.D. (1985): Advances in monoclonal antibodies. Eds. A. PINCHERA, G. DORIA, F. DAMMACCO, A. BARGELLES; Monoclonal Antibodies'84: Biological and clinical application, p. 15-38. Proc. Int. Symp. MCA'84. Editrice Kurtis, Milano.
- 28 — PASTORET, P.P. (1982): Anticorps monoclonaux et perspectives d'application en médecine vétérinaire. *Ann. Res. Vet.*, 13: 21-31.
- 29 — PATTON, J.G., ALLEY, M.C. and MAO, S.J.T. (1982): Avaluation of monoclonal antibodies to human plasma low density lipoprotein. A requirement for lipid to maintain antigenic structure. *J. Immunol. Meth.*, 55: 193-203.
- 30 — PAVLOV, H., MOGARTH, M., MCKENZIE, I.F. and CHEERS, C. (1982): In vivo and in vitro effects of monoclonal antibody to Ly antigens on immunity to infection. *Cellular Immunol.*, 71: 127-138.
- 31 — PENG, W.W., BRESSLER, J.P., CASTIGLIONI-TIFFANY, E. and VELLIS, J. (1982): Developments of a monoclonal antibody against a tumor associated antigen. *Science*, 215: 1102-1104.
- 32 — READING, C.L. (1982): Procedure for in vitro immunization and monoclonal antibody production. Eds. B.H. TOM and J.P. ALLISON; Hybridomas and cellular Immortality p. 235-250. Plenum Press, New York.
- 33 — SCHRÖDER, J. (1980): Monoclonal antibodies: A new tool for research and immunodiagnosis. *Medical Biol.*, 58: 140-148.
- 34 — SECHER, D.S. and BURKE, D.C. (1980): A monoclonal antibody for large scale purification of human leukocyte interferon. *Nature*, 285: 446-450.
- 35 — SHIRAI, Y., HASHIMOTO, K., YAMAJI, H. and TOKASHIKI, M. (1987): Continuous production of monoclonal antibody with immobilized hybridoma cells in an expanded bed fermentor. *App. Microbiol Biotechnol.*, 26: 495-499.
- 36 — SINKOVIS, J.G. and REESMAN, G.R. (1983): Monoclonal antibodies of hybridomas. *Rev. Infect. Dis.*, 5 (1): 9-34.

- 37 — SRIKUMARAN, S., GUIDRY, A.J. ve GOLDSBY, R.A. (1982) : Production and characterization of monoclonal antibodies to bovine immunoglobulin G2. *Amer. J. Vet. Res.*, 43 (1) : 21 -25.
- 38 — SÜSS, C. (1983) : Produktion monoklonales antikörper gegen experimentelle gliome durch fusion von mausmyelomzellen (X63-Ag8.653) und maussplenozyten. (Inaugural dissertaion). Institut für Tierpathologie der Universtät München.
- 39 — TEILLAUD, J.L., DESAYMARD, C., GUISTY, A.M., HASELTINE, B., PALLÖCK, R.R., YELTON, D.E., ZACK, D.J. and SCHARFF, M.D. (1983) : Monoclonal antibodies reveal the structural basic of antibody diversity. *Scienze*, 222 : 721 -726.
- 40 — THIRY, E. and PASTORET, P.P. (1981) : Les anticorps monoclonaux. *Ann. Méd. Vét.*, 125 : 485 -493.
- 41 — ÜSTÜN, T.B. ve ALKAN, Ş.Ş. (1982) : Hücre melezlemesi ve monoklonal antikorlar. *TÜBİTAK, Doğa Bilim Derg., Tıp, Seri C*, 6 (2) : 89 -98.
- 42 — VALLERA, R.C., ASH, R.C., ZANJANI, E.D., KERSEY, J.H. LeBIEN, T.W., BEVERLY, P.C.I., NEVILLE, D.M. and YOULE, R.J. (1983) : Anti T-cell reagents for human bone marrow transplantation : Ricin linked to three monoclonal antibodies. *Science*, 222 : 512 -515.
- 43 — WEINSTAIN, J.N., STELLER, M.A., KEENAN, A.M., COVELL, D.G., KEY, E.E., SIEBER, S.M., OLDHAM, R.K., HWANG, K.M. and PARKER, R.J. (1983) : Monoclonal antibodies in the lymphatics : Selective delivery to lymph node metastases a solid tumor. *Science*, 222 : 423 -426.
- 44 — WEISS, R.A. (1982) : Hybridomas produce viruses as well as antibodies. *Immunol. Today*, 3 (11) : 292 -294.
- 45 — YEWDELL, J.W. and GERHARD, W. (1981) : Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies. *Ann. Rev. Microbiol.*, 35 : 185 -206.
- 46 — YELTON, D.E. and SCHARFF, M.D. (1982) : Monoclonal antibodies. *Amer. Scientist*, 68 (5) : 510 -516.
- 47 — YELTON, D.E., MARGULIES, D.H., DIAMOND, B. and SCHARFF, M.D. (1981) : Plasmocytomas and Hybridomas. *Development and applications*. Eds. R.H. KENNETH, T.J. McKEARN, K.B. BECHTOL (1981) : *Monoclonal antibodies Hybridmas : A new dimension in Biological analyses*. p. 3-17. Plenum Press, New York.