

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

YERLİ VE MİLLİ TETANOZ VE DİFTERİ TOKSOİD AŞILARIYLA OLUŞAN İMMÜN CEVAPLARIN, *İN VİTRO VE EX VİVO* KARAKTERİZASYONU

NİHAN ÖRÜKLÜ

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞUBAT 2021


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

YERLİ VE MİLLİ TETANOZ VE DİFTERİ TOKSOİD AŞILARIYLA OLUŞAN İMMÜN CEVAPLARIN, *İN VİTRO* VE *EX VİVO* KARAKTERİZASYONU

Nihan ÖRÜKLÜ

DOKTORA TEZİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞUBAT 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nihan ÖRÜKLÜ
04.02.2021

YERLİ VE MİLLİ TETANOZ VE DİFTERİ TOKSOİD AŞILARIYLA OLUŞAN İMMÜN CEVAPLARIN, *İN VİTRO* VE *EX VİVO* KARAKTERİZASYONU

(Doktora Tezi)

Nihan ÖRÜKLÜ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2021

ÖZET

Bu tez çalışmasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'nda geliştirimiş olan tetanoz ve difteri toksoid aşılarının oluşturduğu immün cevapların *in vitro* ve *ex vivo* yöntemler kullanılarak karakterize edilmesi amaçlandı. Bu aşılar alüminyum hidroksit ve kalsiyum fosfat olmak üzere iki farklı adjuvan içermektedir. Aşılar subkütan (SK) ve intraperitoneal (İP) olarak iki farklı yolla uygulandı. Geliştirilen aşılar ve mevcut olarak kullanılan erişkin tip tetanoz difteri aşısı ile elde edilen immün cevaplar karşılaştırılmalı olarak çalışıldı. Aşılama sonrası fare dalak mononükleer hücreleri akım sitometri ile analiz edilerek, $CD4^+$, $CD8^+$ ve $CD19^+$ hücre miktarları saptanarak karşılaştırıldı. İP yolla uygulanan aşı gruplarındaki farelerin kontrol grubuna göre daha yüksek $CD4^+$ T hücre ve $CD19^+$ B hücre sayısına sahip olduğu bulundu. Hem SK hem de İP yolla uygulanan aşılarda, farelerde oluşan İgG tipindeki anti tetanoz toksoid ve anti difteri toksoid antikorlarının varlığı ve konsantrasyonları ELISA metodu ile gösterildi. Alum adjuvanı içeren aşılarla oluşan antikorların koruyuculuğu ve nötralizan özellikleri, tetanoz toksini "challenge" ve difteri toksini *in vitro* nötralizasyon testleri ile gösterildi. Hem ticari aşıda hem de geliştirilen aşıda tetanoz toksoidi için koruyuculuğun > %99,9 olduğu gösterildi. Anti difteri antikorların nötralizasyon kapasiteleri değerlendirildiğinde ticari aşı ve geliştirilen aşı arasında herhangi bir fark olmadığı bulundu. Aşı antijeni olarak kullanılan toksinlerin total protein miktarları ve Lf değerleri belirlendi. SDS-PAGE Jel elektroforezi ile saflıkları gösterilerek Western Blot ile antijenlerin sağlaması yapıldı. Farelerde tetanoz toksini LD_{50} ve PD_{50} dozları ve difteri toksini VERO-E6 hücrelerinde MSD MTT yöntemi ile saptandı.

Birim Kodu : 1039.2
Anahtar Kelimeler : Tetanoz, difteri, toksoid aşı, yerli, milli, immün reaksiyon, karakterizasyon
Sayfa Adedi : 177
Danışman : Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK

IN VITRO AND *EX VIVO* CHARACTERIZATION OF IMMUNE RESPONSES INDUCED BY TETANUS AND DIPHTHERIA TOXOID VACCINES THAT ARE PRODUCED AS DOMESTIC AND NATIONAL PRODUCTS

(PhD Thesis)

Nihan ÖRÜKLÜ

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

February 2021

ABSTRACT

In this thesis study, it was aimed to characterize the immune responses created by tetanus and diphtheria toxoid vaccines developed in the Gazi University Faculty of Medicine, Department of Immunology by using *in vitro* and *ex vivo* methods. These vaccines contain two different adjuvants; alum and calcium phosphate. Vaccines were administered in two different ways: subcutaneous (SC) and intraperitoneal (IP). The immune responses obtained with the developed and currently used adult type tetanus diphtheria vaccines were studied comparatively. After vaccination, mouse spleen mononuclear cells were analyzed by flow cytometry, and the amount of CD4 +, CD8 + and CD19 + cells were determined. It was found that mice in the IP-administered vaccine groups had higher CD4+ T cell and CD19+ B cell counts than the control group. The presence and concentration of IgG type anti-tetanus toxoid and anti-diphtheria toxoid antibodies were demonstrated by ELISA in vaccine administered mice both by SC and IP route. The protection and neutralizing properties of antibodies formed by vaccines containing alum adjuvant were demonstrated by the tetanus toxin challenge and diphtheria toxin *in vitro* neutralization tests. It was shown that the protection for tetanus toxoid was >99.9 % in both the commercial vaccine and the developed vaccine. When the neutralization capacity of anti diphtheria antibodies was evaluated, it was found that there was no difference between the commercial and the developed vaccine. Total protein amounts and Lf values of toxins used as vaccine antigen were determined. Antigenic purities were shown by SDS-PAGE and confirmed by Western Blotting. LD_{50} and PD_{50} doses for tetanus toxin determined in mice and MCD for diphtheria toxin in VERO-E6 cells were determined by MTT method.

Science Code : 1039.2
Key Words : Tetanus, diphtheria, toxoid vaccine, domestic, national, characterisation, immune reaction
Page Number : 177
Supervisor : Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve tez çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçlanmasında tez danışmanım olarak desteğini ve yardımını esirgemeyen, çalışmanın sonuçlanmasına kadar geçen süre boyunca bilgi ve becerilerini aktararak yol gösterici katkılarda bulunan, değerli hocam Sayın Prof.Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK'a,

Doktora eğitimim boyunca immünolojiye olan ilgimi ve sevgimi artıran kıymetli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bir parçası olmaktan gurur duyduğum Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri sayın hocalarım Prof. Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL, Prof. Dr. Resul KARAKUŞ ve Prof. Dr. VEDAT BULUT ve Prof. Dr. Cemalettin AYBAY'a,

Doktora eğitimime başladığım ilk günden itibaren, birlikte uyumlu çalışmamız ve paylaştıklarımızla hem bir iş arkadaşı hem de kıymetli bir dost olan, tez çalışmalarım boyunca da desteğini esirgemeyen, sevgili arkadaşım Dr. Melek YAMAN'a,

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji AD doktora programı vesilesi ile tanıştığım ve desteklerini her zaman hissettiğim Dr. Sanem GÖKÇEN ve Milad ABBASİ'ye,

Öğrenim hayatımın ilk gününden itibaren maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman ve her koşulda yanımda olarak güç veren başta canım babam Dr. Yunus ÖRÜKLÜ olmak üzere, canım annem Dr. Aysel ÖRÜKLÜ ve canım kardeşlerim Emir Altuğ ÖRÜKLÜ ve Nihan KURNAZ ÖRÜKLÜ'ye,

Sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK'ın Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Proje No: 64/2018-04 ve Kalkınma Bakanlığı Proje No: 2020K12-153120 projeleri kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ xii
RESİMLERİN LİSTESİ xv
SİMGELER VE KISALTMALAR xvi
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. Toksoid Aşılarda İmmün Cevaplar 5
2.1.1. Doğal immün cevaplar 5
2.1.2. Adaptif immün cevaplar 18
2.2. Aşılar ve Çeşitleri 35
2.2.1. Attenüe (zayıflatılmış) canlı aşılar 36
2.2.2. İnaktive (ölü) aşılar 36
2.2.3. Subunit (alt birimli) aşılar 36
2.2.4. Toksoid aşılar 38
2.2.5. Yeni nesil aşılar 38
2.3. Adjuvanlar 40
2.3.1. Alüminyum adjuvanlar 41
2.3.2. Kalsiyum fosfat adjuvanlar 43
2.4. Tetanoz 44
2.4.1. Epidemiyoloji 44

Sayfa

2.4.2. Tetanoz etkeni: *C.tetani* ve toksini 46

2.4.3. Patogenez 47

2.4.4. Korunma 49

2.5. Difteri 50

2.5.1. Epidemiyoloji 51

2.5.2. Difteri etkeni: *C. diphtheriae* 52

2.5.3. Patogenez 54

2.5.4. Korunma ve önleme 56

2.6. Tez Çalışması Kapsamında Yapılan İmmünolojik Karakterizasyonda Kullanılan Metodların Temel Prensipleri 57

2.6.1. Western blot 57

2.6.2. Akım sitometri 58

2.6.3. ELISA (Enzyme linked ımmuno sorbent assay) 59

2.6.4. in vitro Sitotoksisite (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT)) Yöntemi 60

3. MATERYAL VE METOT 63

3.1. Materyal 63

3.1.1. Cihaz ve aletler 63

3.1.2. Plastik ve cam malzemeler 64

3.1.3. Kimyasallar ve kitler 66

3.1.4. Antikorlar 67

3.1.5. Çözeltiler 68

3.1.6. Hücre serisi 71

3.2. Metot 72

3.2.1. %10 FBS içeren DMEM besiyeri hazırlanması 72

3.2.2. Hücre pasajlaması ve saklanması 72

3.2.3. Hücre canlılığı ve sayısının tespit edilmesi 72

Sayfa

3.2.4. Protein miktarlarının belirlenmesi 73

3.2.5. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi 74

3.2.6. Jel boyama 75

3.2.7. Western-Blot 75

3.2.8. Tetanoz toksini LD_{50} ve PD_{50} dozu belirleme yöntemi 75

3.2.9. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile difteri toksini minimum sitopatik doz belirlenmesi 76

3.2.10. *in vitro* Toksin Nötralizasyon Testi ile Difteri Toksoidine Karşı Oluşan İmmün Serumların Titrasyonu 77

3.2.11. Farelerde tetanoz toksini “challenge” deneyi 79

3.2.12. Farelerin *ex vivo* deneyler için immünizasyonu 80

3.2.13. Akım sitometri yöntemi 80

3.2.14. ELISA metodu 82

3.2.15. İstatistiksel analizler 82

4. BULGULAR 83

4.1. Toksoid Aşılarla Oluşan İmmün Yanıtlarının Karakterizasyonu Bulguları 83

4.1.1. Subkütan enjeksiyon yapılan grupların *ex vivo* çalışma bulguları 84

4.1.2. Tetanoz ve difteri toksoidlerinin (Td) intraperitoneal (İP) enjeksiyonu *ex vivo* çalışma bulguları 97

4.1.3. ELISA bulguları 109

4.1.4. Tetanoz toksoidi “challenge” deneyi bulguları 113

4.1.5. Vero Hücre Yöntemi (*Vero Cell Assay*) ile Difteri Toksoidine Karşı oluşan immün serumların titrasyonu 115

4.2. Antijenlerin Karakterizasyon Bulguları 121

4.2.1. Protein miktarı bulguları 121

4.2.2. SDS-PAGE jel elektroforezi bulguları 123

4.2.3. Antijenlerin western blot ile gösterilmesi bulguları 125

Sayfa

4.2.4. Tetanoz toksini LD_{50} ve PD_{50} belirleme bulguları 128

4.2.5. Difteri toksini minimum sitopatik doz belirleme bulguları 128

5. TARTIŞMA..... 131

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 141

KAYNAKLAR 143

EKLER 169

EK-1. Deney Hayvanları Etik Kurul İzni 170

EK-2. Patent Başvurusu Formları 171

ÖZGEÇMİŞ 175

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. 1980-1984 ve 2010-2014 Hastalık (Tetanoz) Vaka Sayılarının Karşılaştırılması 45

Çizelge 2.2. 1980-1984 ve 2010-2014 Hastalık (Difteri) Vaka Sayılarının Karşılaştırılması 52

Çizelge 3.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler 64

Çizelge 3.2. Kullanılan Plastik ve Cam Malzemeler 65

Çizelge 3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler 66

Çizelge 3.4. Kullanılan antikorlar 68

Çizelge 3.5. SDS-PAGE jel hazırlamak için gerekli olan solüsyonlar ve miktarları 74

Çizelge 4.1. Subkütan enjeksiyon yapılan farelerin dalak ağırlıkları, ortalama ve standart sapma değerleri 85

Çizelge 4.2. Subkütan enjeksiyon yapılan gruplardaki farelerin dalak mononükleer sayıları, ortalama ve standart sapma değerleri 87

Çizelge 4.3. İP enjeksiyon yapılan farelerin dalak ağırlıkları, ortalama ve standart sapma değerleri 97

Çizelge 4.4. İP enjeksiyon yapılan farelerin hücre sayıları, ortalama ve standar sapma değerleri 99

Çizelge 4.5. Difteri toksoidine karşı oluşan immün serumların titrasyonu 117

Çizelge 4.6. Antijen Konsantrasyonları 122

Çizelge 4.7. Antijenlerin Lf ve Kf değerleri 123

Çizelge 4.8. Tetanoz Toksini LD_{50} ve PD_{50} Tablosu 128

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Toll Benzeri Reseptör Sinyalizasyonu 7

Şekil 2.2. İnflamazomlar ve inflamazom aktivasyonu 9

Şekil 2.3. $CD4^+$ T hücre farklılaşması 22

Şekil 2.4. T lenfosit aktivasyonu ve farklılaşması..... 23

Şekil 2.5. Germinal Merkezde bulunan hücreler ve meydana gelen olaylar 30

Şekil 2.6. Tetanoz toksini..... 47

Şekil 2.7. T.C Sağlık Bakanlığı Ulusal Çocukluk Dönemi Aşılama Takvimi (2020). 50

Şekil 2.8. Difteri Toksininin protein yapısı..... 54

Şekil 4.1. Subkütan enjeksiyon yapılan grupların ortalama dalak ağırlıkları karşılaştırması 86

Şekil 4.2. Subkütan enjeksiyon yapılan grupların ortalama dalak mononükleer hücre sayıları 87

Şekil 4.3. Subkütan enjeksiyonu yapılan fare dalak mononükleer hücrelerinin PE işaretli izotipik antikor ile boyanma görüntüsü..... 88

Şekil 4.4. Subkütan enjeksiyon yapılan farelerin CD4+ T Hücre yüzdeleri..... 89

Şekil 4.5. Subkütan enjeksiyon yapılan grupların ortalama CD4+ T Hücre yüzdeleri karşılaştırması. 90

Şekil 4.6. Subkütan enjeksiyon yapılan fare dalak mononükleer hücrelerinin FITC işaretli izotipik antikor ile boyanma görüntüsü..... 91

Şekil 4.7. Subkütan enjeksiyon yapılan farelerin CD8+ T Hücre yüzdeleri..... 92

Şekil 4.8. Subkütan enjeksiyon yapılan grupların ortalama CD8+ T Hücre yüzdeleri karşılaştırması. 93

Şekil 4.9. Subkütan enjeksiyon yapılan farelerin CD19+ B Hücre yüzdeleri..... 95

Şekil 4.10. Subkütan enjeksiyon yapılan grupların ortalama CD19+ B Hücre yüzdeleri karşılaştırması 96

Şekil 4.11. İP enjeksiyon yapılan gruplardaki farelerin dalak ağırlık ortalamaları..... 98

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.12. İP enjeksiyon yapılan grupların ortalama dalak mononükleer hücre sayıları karşılaştırması 99

Şekil 4.13. İP enjeksiyon yapılan fare dalak mononükleer hücrelerinin FITC işaretli izotipik antikor ile boyanma görüntüsü..... 100

Şekil 4.14. İP enjeksiyo yapılan farelerin CD4+ T Hücre yüzdeleri..... 101

Şekil 4.15. İP enjeksiyon yapılan grupların ortalama CD4+ T Hücre yüzdeleri karşılaştırması..... 102

Şekil 4.16. İP enjeksiyon yapılan fare dalak mononükleer hücrelerinin PE işaretli izotipik antikor ile boyanma görüntüsü..... 103

Şekil 4.17. İP enjeksiyon apılan farelerin CD8+ T Hücre yüzdeleri..... 104

Şekil 4.18. İP enjeksiyon yapılan grupların ortalama CD8+ T Hücre yüzdeleri karşılaştırması..... 105

Şekil 4.19. İP enjeksiyon yapılan farelerin CD19+ B Hücre yüzdeleri..... 107

Şekil 4.20. İP enjeksiyon yapılan grupların ortalama CD19+ B Hücre yüzdeleri karşılaştırması..... 108

Şekil 4.21. SK enjeksiyon yapılan farelerin serum anti tetanoz toksoid İgG konsantrasyonları..... 110

Şekil 4.22. İP enjeksiyon yapılan farelerin serum anti tetanoz toksoid İgG konsantrasyonları karşılaştırması 111

Şekil 4.23. SK enjeksiyon yapılan farelerin serum anti difteri toksoid İgG konsantrasyonları karşılaştırması 112

Şekil 4.24. İP enjeksiyon yapılan farelerin serum anti difteri toksoid İgG konsantrasyonları karşılaştırması 113

Şekil 4.25. Tetanoz toksoidi hayatta kalma grafiği.. 114

Şekil 4.26. Tetanoz toksini hayatta kalma grafiği..... 115

Şekil 4.27. Td-VAC ve Td+Alum enjeksiyonu yapılan grupların serum titrasyonlarının karşılaştırılması 118

Şekil 4.28. Td-VAC 1/25 ve Td+Alum 1/25 enjeksiyonu yapılan grupların serum titrasyonlarının karşılaştırılması…… 119

Şekil 4.29. Td-VAC 1/50 ve Td+Alum 1/50 enjeksiyonu yapılan grupların serum titrasyonlarının karşılaştırılması 120

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.30. Td-VAC 1/100 ve Td+Alum 1/100 enjeksiyonu yapılan grupların serum titrasyonlarının karşılaştırılması 121

Şekil 4.31. BSA Standart Eğri Grafiği 122

Şekil 4.32. Tetanoz Toksin ve Toksoid SDS-Page Jel Görüntüsü. 124

Şekil 4.33. Difteri toksin ve toksoidi SDS-PAGe jel görüntüsü. 125

Şekil 4.34. Standart Tetanoz Toksoidi ve Tetanoz Toksini Western-Blot Görüntüsü 126

Şekil 4.35. Difteri toksini Western-Blot görüntüsü. 127

Şekil 4.36. Difteri Standart Toksoidi western blot görüntüsü. 128

Şekil 4.37. Difteri Toksini Minimum Sitopatik Doz Grafiği 129

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 2.1. Opistotonuslu bebek görüntüsü 48

Resim 2.2. Boğaz Difterisi ve boğa boynu görünümü 55

Resim 2.3. Deri difterisi 55

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu tez çalışmasında kullanılan simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
dk	Dakika
kDa	Kilo dalton
Kf	Flokülasyon kinetiği
Lf	Flokülasyon sınırı
M	Molar
M.Ö	Milattan önce
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
pM	Pikomolar
rpm	Dakikadaki devir sayısı
V	Volt
yy	Yüzyıl
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
APS	Amonyum persülfat
BSA	Sığır serum albumin
C. tetani	*Clostridium tetani*
dH_2O	Distile su
DMSO	Dimetil sülfoksit

Kısaltmalar	Açıklamalar
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FBS	Fetal sığır serumu
İg	İmmünoglobulin
İL	İnterlökin
OD	Optik dansite
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PVDF	Poliviniliden florür
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Td	Erişkin Tip Tetanoz ve Difteri
TEMED	N,N,N‘,N‘-tetrametil etilendiamin
TT	Tetanoz Toksoid

1. GİRİŞ

Aşılar modern tıbbın elde ettiği en büyük başarılardan biridir. Oluşturdukları immün yanıtlar özellikle enfeksiyon hastalıklardan korunma ve önlemede başarının sebebidir [1]. Difteri ve tetanoz hastalıklarından korunmada ve hastalıkların önlenmesinde toksoid bazlı aşılar uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu aşılar ile oluşan immün yanıtlar değerlendirildiğinde, doğal ve adaptif immün yanıt elemanlarının rol aldığı görülmektedir. Aşılama ile enjeksiyon bölgesine gelen ve doğal immün yanıt hücreleri olan makrofaj, dendritik hücre (*DC: dendritic cell*), nötrofil gibi antijen sunucu hücreler (*APC: antigen presenting cells*) patern tanıma reseptörleri (PRR: *patern recognition receptors)* aracılığı ile aşı antijenlerini tanıyarak sitokin ve kemokin sentezi ile inflamasyonu başlatır [2]. Olgunlaşmamış DC'ler antijenleri yakalayarak lenf düğümlerine ulaştıklarında T hücre yanıtlarını başlatırlar. Bu nedenle DC'ler, aşı antijenlerine karşı bağışık yanıtın başlatılmasında ve şekillendirilmesinde önemlidir. Lenf düğümlerine geçen DC'ler antijeni işleyerek, eksprese ettikleri majör doku uygunluk kompleksi (*MHC: majör histocompatibility complex*) Sınıf I ya da Sınıf II ile $CD8^+$ ya da $CD4^+$ T hücrelerine sunar [3]. Lenf nodunda MHC Sınıf II ile $CD4^+$ T hücresine sunulan antijenler ile T hücreleri alt gruplara farklılaşır. $CD4^+$ T hücreleri, antikor aracılı bağışıklık için gereklidir. Alum adjuvanları ile birlikte bu farklılaşma daha çok yardımcı T hücre 2 (*Th2: T helper 2*) ve foliküler yardımcı T hücre (*Tfh: Follicular helper T cell*) yönünde meydana gelmektedir [4, 5]. Farklılaşan Th2 ve Tfh hücreleri, DC ve B hücreleri ile etkileşime girerek foliküllerde, germinal merkez reaksiyonunu başlatır. B hücreleri germinal merkezlerde aktive olarak antikor salgılayan plazma hücrelerine ve hafıza B hücrelerine dönüşür. Antijen ile tekrar karşılaştıklarında aktive olan hafıza B hücreleri hızla prolifere olarak yüksek miktarda yüksek afiniteli antikor üreten plazma hücrelerine farklılaşırlar [6] . Bununla birlikte B hücreleri de lenf düğümüne gelen çözünür haldeki antijeni yüzey İmmünoglobulinleri (İg) ile tanıyarak aktive olur. Ekstrafoliküler alanlarda B hücreleri farklılaşarak plazma hücresine dönüşür ve düşük afiniteli antikorlar üretilmeye başlar. Hızlı bir cevap olan bu yanıtta oluşan antikorların ve plazma hücrelerinin ömrü kısadır [7].

Tetanoz Gram pozitif, zorunlu anaerop, terminal sporlu, hareketli, kapsülsüz bir basil olan *Clostridium tetani* (*C.tetani*)' nin neden olduğu ölümcül bir hastalıktır. Bakteri

doğada yaygın olarak toprakta, hayvan ve insan dışkılarında, sularda ve genellikle dış etkilere dayanıklı olan spor formunda bulunmaktadır. Bakterinin salgıladığı peptid yapıdaki nörotoksin hastalığın kliniğinden sorumludur [8]. Tetanoz nörotoksini (TeNT) yaklaşık olarak 150kD ağırlığında ve iki adet alt üniteden oluşmaktadır. Yaklaşık 100 kD büyüklüğünde ağır (H) ve 50 kD büyüklüğünde hafif (L) olmak üzere iki adet polipeptid zincirin disülfit bağları ile bağlanması sonucu oluşur [9].

Difteri, *Corynebacterium diphtheriae* bakterisinin neden olduğu bir hastalıktır. *C. diphtheriae* Gram pozitif kapsülsüz, hareketsiz, aerop veya fakültatif anaerop bir basildir [10]. Difteri toksini bir bakteriyofaj tarafından kodlanan *tox* geni ile oluşturulmaktadır. Toksin, yaklaşık 58 kD ağırlığında, A ve B olmak üzere 2 adet alt üniteden oluşan bir polipeptid zincirdir. A alt ünite yaklaşık 21 kD ağırlığındadır ve toksinin amino ucunda bulunan katalizör bir enzim görevindedir. Yaklaşık 37 kD bir peptid olan B alt ünitesi ise hücre membranına tutunup A ünitesinin hücre içine girişine yarıdımcı olur [11]. Çoğalması ile birlikte salgıladığı protein yapıdaki ekzotoksin dolaşıma karışarak semptomlara neden olmaktadır.

Difteri ve tetanoz toksoid aşılarında bulunan toksoidler, toksinlerin besiyerlerinde üretilip izole edilerek, kimyasallar ile muamele sonrası patojenitesini kaybedip, immünojenik özelliklerini koruduğu halidir [12, 13].

Aşıların oluşturduğu immün yanıtı belirlemek için kullanılacak olan yöntemler, immün sistemin uyarılarak aşının geliştirildiği patojene engel olma görevini yerine getirip getiremediğini ölçebilecek şekilde seçilmelidir. Tetanoz ve difteri aşılarında da olduğu gibi pek çok aşıda başlıca hedef patojenin taşıdığı moleküllere karşı antikor oluşturarak korumayı sağlamaktır [14]. Toksoid aşılara karşı gelişen immün yanıtların karakterizasyonu yapılırken kullanılabilecek en önemli parametrelerden biri oluşan antikor varlığını tesbit etmektir. Toksoid ya da toksine spesifik total antikorların ve alt tiplerinin saptanabileceği ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) yöntemi bu amaçla kullanılan başlıca yöntemlerden biridir. Toksoid aşılarda, toksoidlere ve toksinlere karşı oluşan antikorların nötralizan özellikte olması da önemlidir. Bu nedenle temeli antijen antikor reaksiyonlarına dayanan *in vitro* nötralizasyon testleri ile fonksiyonel antikor yanıtları da belirlenebilmektedir.

Aşılama ile oluşan hücresel immün yanıtları belirlemek için hücre yüzeyinde ya da hücre içindeki fenotipik belirteçleri saptamaya yönelik ELISPOT (*Enzyme-linked immune absorbent spot*) ve akım sitometri gibi yöntemler de kullanılmaktadır. Ayrıca, sitotoksik T-lenfosit (CTL) deneyi, öncül CTL frekans deneyi, hücre proliferasyon deneyleri, karboksifloresein diasetat süksinimidil ester deneyleri, multipleks ELISA, PCR gibi yöntemler de immün yanıtların saptanmasında kullanılabilmektedir [15, 16].

Bu tez çalışması kapsamında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'nda daha önce geliştirilen, alüminyum hidroksit ve kalsiyum fosfat adjuvanları içeren Erişkin Tip Difteri-Tetanoz aşıları ile oluşan immün yanıtların *in vivo* ve *ex vivo* karakterizasyonu yapıldı. Antijenlerin saflığını gösterebilmek için SDS-PAGE ve Western Blot yöntemleri kullanıldı. Aşılar ile farklı zaman ve yollarla immünize edilen farelerden elde edilen dalak mononükleer hücrelerinin, yardımcı T hücre belirteci olan CD4 ve sitotoksik T hücre belirteci olan CD8 ve B hücre belirteci olan CD19 moleküllerinin ekspresyon oranları akım sitometri yöntemi ile belirlendi. Ayrıca immünize edilen farelerden elde edilen serumlar kullanılarak, toksoidlere karşı oluşan İgG tipinde antikorlar ELISA metodu ile saptandı. Aşıların koruyucu etkinliğini gösteren tetanoz toksin "*challenge*" ve difteri toksini *in vitro* toksin nötralizasyon testleri ile oluşan bağışık yanıtın koruyucu etkinliği gösterildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Toksoid Aşılarda İmmün Cevaplar

İmmün yanıtlar konağın kendine yabancı olanı tanıması ve kendinden olan ve olmayanı ayırt ederek yanıt vermesidir. Doğal ya da adaptif immün cevabı oluşturan maddeler antijen olarak adlandırılmaktadır. Tetanoz ve difteri toksoid bazlı aşılarda antijenler bakteri toksinlerinden elde edilen toksoidlerdir [17]. Ayrıca bu aşılarla oluşan immün yanıtı güçlendirmek amacıyla çeşitli adjuvanlar kullanılmaktadır [18]. Aşılar ile oluşan immün yanıtlar değerlendirildiğinde immün sistem doğal ve adaptif (kazanılmış) olarak ikiye ayrılmakla birlikte bu iki grubu oluşturan elemanlar birbirleri ile sürekli etkileşim halindedir [19].

2.1.1. Doğal immün cevaplar

Doğal bağışık yanıtı oluşturan elemanlar vücudun yapısal bariyerleri (deri, mukoza, sekresyonlar), fagositik hücreler (monosit, makrofaj, nötrofil), NK hücreler, mast hücreleri, eozinofil ve bazofil gibi inflamatuar mediatör salan hücreler ve sitokinler, akut faz proteinleri ile kompleman gibi çözünür moleküllerdir. Antijen sunucu hücreler (*APC: antigen presenting cells*) olan dendritik hücreler (DC: *Dendritic Cell*) de doğal ve adaptif immün yanıtlar arasında köprü görevi görmektedir. Ayrıca hücrelerin yüzeylerinde bulunan reseptörler de doğal bağışık yanıtta görev almaktadır [20, 21].

<u>Reseptörler</u>

Toksoid aşıların vücuda verilmesi ile birlikte öncelikle immün sistemin doğal (innate) bağışık yanıtı aktive olmaktadır. Enjeksiyon bölgesine gelen doğal bağışık sistemin elemanlarından fagositler ve APC'ler bu moleküllerle ilk etkileşimi kurar. Bu hücrelerin patojen ilişkili moleküler patern adı verilen (PAMP: *pathogen associated molecular patterns*) ve hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMP) adı verilen vücudun yabancı olarak tanıyarak, tehlike olarak algılama işlemi patern tanıma reseptörleri (PRR: *patern recognition receptors)* aracılığı ile olmaktadır. PRR'ler Toll benzeri reseptörler (*TLR: toll like receptors*), NOD-benzeri reseptörler (NLR:

nucleotide-binding oligomerization domain like receptors), C tip lektin reseptörleri (*CLR: C type lectin receptors*) ve retinoik asitle indüklenebilir gen-I benzeri reseptörlerdir (*RLR: RIG-1 like receptors*) [22, 23].

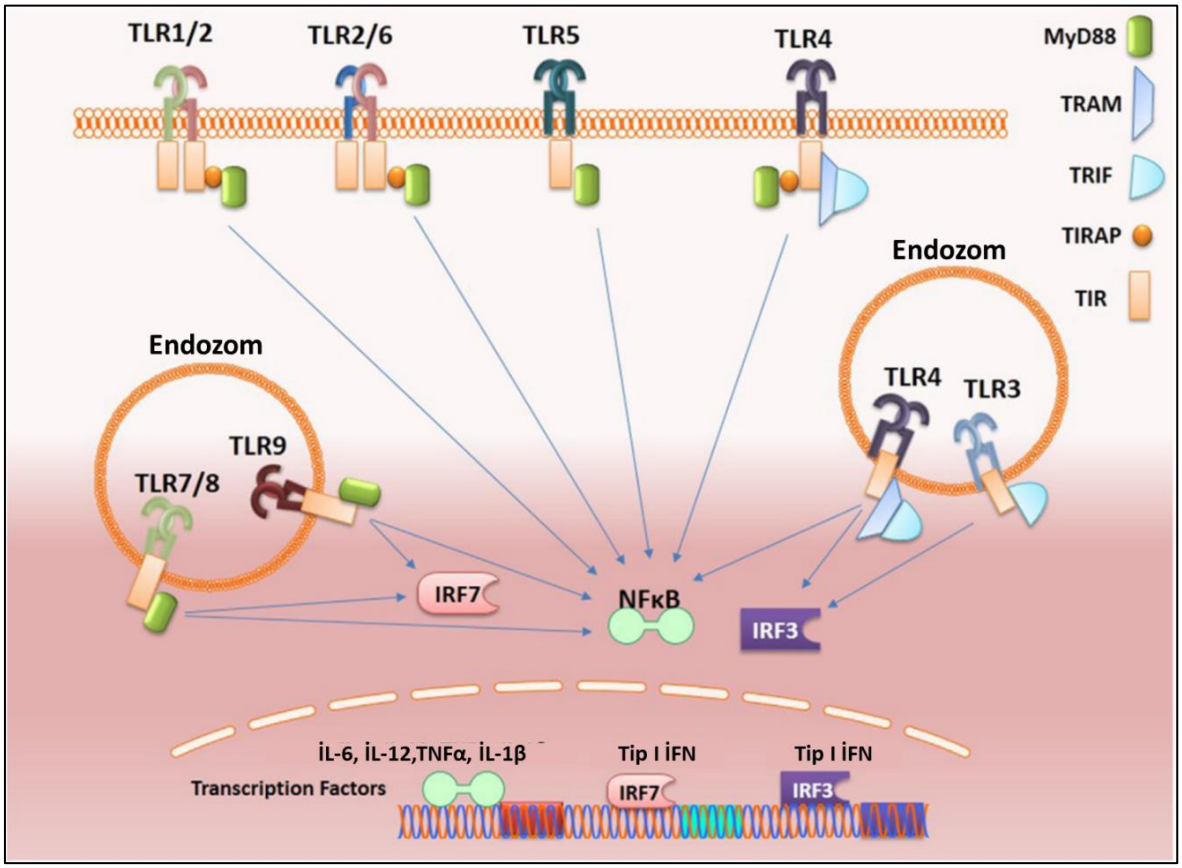
Toll benzeri reseptörler

Transmembran reseptörlerin bir grubu olan TLR'ler patern tanıyan reseptörler olarak önemli görevlerde bulunurlar. Özellikle makrofajlar veya dendritik hücreler gibi APC'ler üzerinde bulunur. TLR ailesi (TLR1-TLR11) patojenlerin korunmuş yapısal komponentleri olan PAMP'ları tanıyarak proinflamatuar doğal immün cevapları uyarırlar. Bu reseptörlerin doğal immün sistem tarafından tanınması sonucu kostimülatör moleküller, sitokinler ve kemokinler uyarılır, antijene özgü lenfositler toplanır, aktive olur ve edinsel immün cevap başlar [24, 25].

İnsanlarda 10 (TLR1–TLR10), farelerde ise 12 (TLR1–TLR9, TLR11–TLR13) adet tanımlanmış farklı TLR bulunmaktadır. TLR'ler hücre yüzeyinde veya endozom ve lizozom gibi hücre içi yapılarda bulunabilmektedir. Bu moleküller immun sistem hücrelerinin yanı sıra fibroblast ve epitel hücreleri gibi immün sistem dışındaki hücrelerde de eksprese edilebilir. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 ve TLR10 hücre yüzeyinde lokalize olurken TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 ve TLR13 hücre içinde endozomlarda bulunurlar. TLR 1 triaçil lipopeptid, TLR 2 bakteri diaçil lipopeptid, lipoprotein, peptidoglikan, mantar zimosan ve β glukan yapılarını, virüs zarf glikoproteinlerini tanırken, TLR4 bakteri lipopolisakkaritler (LPS), glikoinositol fosfolipidler ve virüs glikoproteinlerini, TLR5 bakteri flajellini, TLR6 diaçil lipopeptid ve lipoteikoik asiti tanımaktadır. Hücre içi endozomlarda bulunan TLR3 çift zincirli RNA, TLR7 ve TLR8 tek zincirli RNA, TLR9 ise metillenmemiş CpG DNA ve mitokondriyel DNA'yı tanımaktadır [24, 26].

TLR'ler, ligandları tanıyan ekstraselüler bölüm, transmembran kısmı ve sinyal yolaklarının başlangıcı olan intraselüler toll-benzeri/interlökin-1 reseptör (TIR) bölümü olmak üzere 3 bölümden oluşmaktadır. TLR'ler ve IL-1R ailesi üyeleri tarafından başlatılan sinyalin iletilmesi için Miyeloid diferansiyasyon faktör 88 (MyD88), TIR bölgesi içeren adaptör molekül (TIRAP), TIR bölgesi içeren interferon-β indükleyen adaptör (TRIF: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*),

TRIF ilişkili adaptör molekül (TRAM: *TRIF-related adaptor molecule*) ve Steril α ve HEAT/Armadillo motifi içeren protein (SARM: *sterile-α- and armadillo motif-containing protein*) gibi adaptör proteinlere ihtiyaç vardır [27, 28]. Bu adaptör proteinler nükleer faktör kappa B (NF-κB), interferon düzenleyici faktör (IRF: *interferon regulatory factor*) IRF1, IRF3, IRF5, IRF7 ve interferon-γ gibi transkripsiyon faktörlerini aktive etmek için etkileşime girerek inflamatuar yanıtları başlatmaktadır [29-31].



Şekil 2.1. Toll Benzeri Reseptör Sinyalizasyonu [31]

Difteri ve tetanoz aşılarında bulunan alüminyum adjuvanının kaspaz-1 yolağını MyD88 olmaksızın, TLR bağımsız bir şekilde uyardığı Kool ve ark tarafından yapılan in vitro çalışma ile gösterilmiştir. Bununla birlikte, aynı grup MyD88 molekülünün, lenf nodlarında alum aracılı inflamatuar monosit hücre toplanması için gerekli olduğunu *in vivo* göstermiştir. Bu in vitro ve in vivo çalışmalar arasındaki farklılığın daha çok irdelenmesi gerektiği fikri doğmuştur [32]. Alum adjuvanları ile oluşan immün yanıtı güçlendirebilmek amacıyla TLR agonistleri ile birlikte alum adjuvanı ya da yalnızca agonistler ile birlikte toksoidlerin uygulandığı çalışmalar yapılmaktadır.

AS04 adı verilen ve alum adjuvanı ve TLR4 agonisti monofosforil lipid A içeren kombine adjuvan sistemi insan papilloma virüs ve hepatit B aşılarında lisanslı olarak kullanılmaktadır [33].

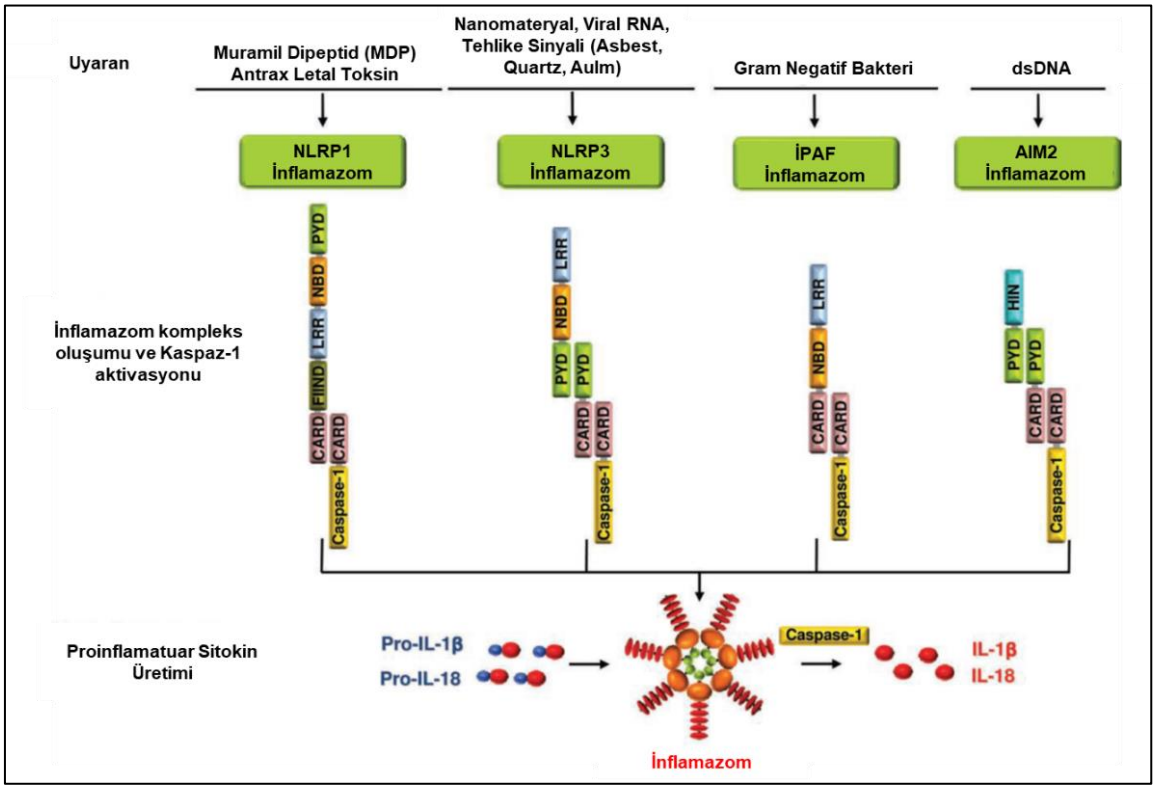
NOD-benzeri reseptörler

NOD-benzeri reseptörler, PAMP ve DAMP'ları tanıyan ve konağın doğal bağışık yanıt regülasyonunda görev alan hücre içi proteinlerdir. NLR'ler, NF-κB ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK: *mitogen activated protein kinase*) sinyal yolaklarını tetikleyen ve enflamatuar kaspazların aktivasyonunu kontrol eden sinyal platformlarını bir araya getiren yapı iskelesi proteinleri olarak işlev görür [34, 35].

Tipik bir NLR proteini farklı yapı ve işleve sahip en az 3 farklı kısımdan oluşur. Bunlardan birincisi ligandı tanıyan lösinden zengin tekrarlayan bölge, NLR'lerin birbirine bağlanmasını ve oligomerler oluşturmasını sağlayan NACHT (neuronal apoptosis inhibitory protein [NAIP], CIITA, HET-E, and TP1) bölgesi ve sinyal kompleksleri oluşturan efektör bölgedir. BIR, Pirin ve CARD (*caspase recruitment domain*) olmak üzere 3 farklı efektör bölge vardır [36]. NLR'ler kullandıkları farklı efektör bölgelere göre 3 alt sınıfa ayrılır. NOD1 ve NOD2 CARD bölgesi taşıyan alt sınıflardır ve pek çok çeşitli hücre sitozolünde bulunmaktadır. Bakteriyel toksinler gibi peptid ligandlarını tanıdığında, CARD efektör alanlarının, RIP2 kinazının birden fazla kopyasını toplayarak NOD sinyalozomu adı verilen bir sinyalleme kompleksi oluşturmasını sağlayan konformasyonel bir değişiklik meydana gelir. Bu komplekslerdeki RIP2 kinazlar, MyD88 aracılığıyla sinyal veren TLR'lere benzer şekilde, inflamatuar gen ekspresyonunu destekleyen NF-KB'yi aktive eder [34].

NLR alt sınıfı olan ve pirin bölgesi içeren NLRP (*NLR family, pyrin-domain-containing proteins*) sitozoldeki PAMP ve DAMP'lara inflamazom adı verilen sinyal kompleksleri oluşturarak yanıt verir. İnflamazomlar, İnterlökin (İL) 1 ve İL-18 gibi inflamatuar sitokinlerin aktif formunu oluşturur. En iyi bilinenler NLRPs—IPAF/NLRC4, NLRP3 ve NLRP1'dir. Ligand ile bağlandığında pek çok NLRP3 bir araya gelerek oligomer oluşturur ve her bir NLRP3 proteini ASC adı verilen adaptör proteine bağlanır. Adaptörler kaspaz-1 inaktif formuna bağlanarak aktifleştirir. Aktif kaspaz-1, İL-1β ve İL-18 sitokinlerini keserek aktifleştirir ve proinflamatuar yanıt

başlar. NLRP inflamazomlar mikrobiyal ürünler ya da çevresel ya da endojen kristaller gibi pek çok sitoplazmik uyarıcı ile uyarılırlar [37, 38].



Şekil 2.2. İnflamazomlar ve inflamazom aktivasyonu [38]

Toksoid aşılarda kullanılan alüminyum adjuvanların da bu kristallerden olduğu ve hem kendisinin hem de hücrelerden ürik asit salınımına neden olmasıyla oluşan ürik asit kristallerinin NLRP3 inflamazom yanıtı oluşturduğu bilinmektedir [38]. Bu kristallerin fagositozu ile lizozomal proses aktive edilir. NLRP3 inflamazom katepsin B gibi enzimleri salgılar. Kaspaz 1 aktivasyonu ile pro İL-1β proteolitik parçalanma ile biyolojik olarak aktif İL-1β'ya çevirilir. Ürik asit ile birlikte hücrenin ölümüne bağlı olarak dsDNA salınımı da gerçekleşmektedir. dsDNA, IRF3 ile monosit aktivasyonu yaparak inflamatuar yanıtı başlatır [39, 40]. Alum ile oluşan kaspaz-1 aktivasyonu ile İL-1β prosesi ve sekresyonunun NLRP3 inflamazom aracılı olduğu hem fare modelinde, hem de insan monosit hücreleri olan THP-1 hücre hattında yapılan çalışmalarda Li ve ark. tarafından ilk kez gösterilmiştir [41, 42]. Daha sonra yapılan benzer *in vitro* çalışmalar ile de bu durum gösterilmiştir [39, 43, 44].

TLR ve NLR uyarımı yoluyla oluşan doğal immün aktivasyon, lenfosit aktivasyonuna yol açan bir dizi önemli olaya yol açar. Örneğin, TLR'ler, DC'lerin lenfositlere antijen sunumuna yol açan olgunlaşmasında önemli bir rol oynar. Antijen ve TLR ligandlarının birarada taşınması, MHC Sınıf II molekülleri ile $CD4^+$ T hücrelerine antijen sunumu yolunu destekler. TLR'ler ayrıca sitotoksik $CD8^+$ T hücrelerini aktive etmek için, antijenin MHC sınıf I molekülleri üzerinde çapraz sunumunu da teşvik edebilir. NLR'ler ayrıca antijen sunumuyla da ilişkilidir; DC'lerin NLR uyarımı ile MHC sınıf II ekspresyonu artar. NOD2'nin DC'lerde MHC sınıf II aracılı CD4+ T hücre yanıtlarını arttırdığı gösterilmiştir [45].

Doğal bağışıklığın çözünür elemanları

Aşıların vücuda uygulanması ile birlikte enjeksiyon bölgesinde bir inflamatuar yanıt oluşmaktadır. Bu durum Polly Metzinger tarafından ortaya atılan “Tehlike Hipotezi” ile örtüşmektedir. Burada oluşan yanıt mikrobiyal yanıttan çok doku hasarı ile oluşan yanıttır. Hasarlı dokulardan gönderilen DNA, ürik asit, adenozin trifosfat (ATP), ısı şok proteini 70 (Hsp70: heat shock protein-70), İL-1α ve İL-33 gibi tehlike sinyalleri ile inflamasyon ve adaptif yanıtları başlatır. Enjeksiyon bölgesinde oluşan ve birkaç hafta ya da yıllarca sürebilen nodül ve granülom oluşumları da bu inflamatuar yanıtın bir göstergesidir. Doğal immün yanıtın kompleman sistemi gibi çözünür elemanları ve doğal immün yanıt hücreleri bu aşamada görev almaktadır.

Kompleman sistemi

Kompleman sistemi, mikropları opsonize etmek, fagositlerin enfeksiyon bölgesine toplanmasını sağlamak ve bazı durumlarda mikropları doğrudan öldürmek için birlikte çalışan birkaç plazma proteininden oluşmaktadır. Kompleman C1 q, r, s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 ve C9, olmak üzere 11 komponentten oluşmaktadır. Bu moleküllerin molekül ağırlıkları ve serumdaki miktarları ile kimyasal yapıları birbirinden farklıdır. Normal şartlarda kanda inaktif ve çözünür halde bulunurken, aktive olduklarında düzenli bir sıra ile birbirleri ile reaksiyona girerek protein-protein kompleksleri ve aktif parçalanma ürünleri meydana getirirler [46].

Kompleman sisteminin 3 yolla aktive olduğu bilinmektedir. Bunlar klasik yol, alternatif yol ve lektin yoludur [47]. Klasik yol genellikle antijen ile antijene özgü İgG ve İgM tipinde antikor kompleksleri ile aktive olmaktadır. C1q antikorun Fc kısmına bağlanarak aktive olmaktadır. Sırayla C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, ve C9 sıra ile görev alır. Bu proteinlerin hemen hemen hepsi proenzim şeklinde bulunurlar. Enzim aktivitesi kazanabilmek için bir önceki enzim tarafından parçalanmaları gerekir. C1r, C1s'yi aktive eder. C1s, serumda serbest haldeki C4' ü parçalar ve C4a ve C4b' nin oluşmasına neden olur. C4b yüzeye bağlanarak C2' yi de kendine bağlar ve C1s için bir substrat oluşturur. C1s, C2'yi parçalayarak C2a ve C2b moleküllerini ayrıştırır. C2b serbest kalır, C2a C4b'ye bağlı kalır. C4b2a kompleksi, C3 konvertaz aktivitesi kazanarak, C3'ü C3a ve C3b'ye parçalar. C3b, C4b2a'ya bağlanarak C4b2a3b kompleksini oluşturur. Oluşan yeni kompleks C5 konvertaz aktivitesi kazanarak, C5'i C5a ve C5b2ye ayırır. C5b, C6, C7, C8, C9'u da kendisine bağlayarak MAK (Membran Atak Kompleksi) oluşturur [48].

Alternatif yol aktivasyonunda antijen antikor bağlanmasına gerek yoktur. C3'den başlayarak C9' da sonlanır. Bu yolakta ayrıca faktör B ve faktör D ve properdin gibi moleküller görev almaktadır [49]. Dolaşımda serbest haldeki C3 molekülü parçalanarak C3b oluşur. Serbest C3b kısa sürede yıkıma uğrar, mikroorganizma molekülü yüzeyine bağlanarak faktör B ve faktör D'yi kendine çeker. Faktör B, Ba ve Bb'ye ayrılır. Bb, C3b' ye bağlanır, C3bBb kompleksi oluşur ve bu kompleks C3 konvertaz aktivitesine sahiptir. C3bBb yeni C3a ve C3b oluşturarak alternatif yolak devam ettirilir. C3b ler yeni faktör B leri bağlar ve sonuçta daha fazla C3b oluşur. Bu siklus bu şekilde devam eder. Yeni oluşan C3b, C3bBb kompleksine bağlanarak C3bBb3b kompleksini oluşturur ve bu kompleks alternatif yoldaki C5 konvertazdır. Bu da C5 i parçalar sonrası klasik yoldaki gibi devam eder [50].

Kompleman sisteminin uyarılmasında rolü olan üçüncü yolak lektin yoludur ve klasik yolla birçok açıdan benzerlik gösterir. Mannoz Bağlayıcı Lektin (MBL), klasik yolaktaki C1q ile benzerdir. Her ikiside, aynı protein ailesinden olan kollektinlerdendir. Aralarındaki temel fark, C1q'da İg bağlanma bölgesi mevcutken, MBL karbonhidrat tanıma bölgesine sahiptir. MBL karbohidrat yapılara bağlandığında lektin yolunun serin proteazları aktive olur. Sonrasında lektin yolu,

klasik kompleman yolu ile ortak şekilde ilerler ve membran atak kompleksinin oluşur [51, 52].

Bredius ve ark. tetanoz toksoidine karşı gelişen İgG1 ve İgG2 tipindeki antikorlar ile kompleman aktivasyonunun klasik yol ile aktive edildiğini göstermiştir [53]. Ramanathan ve ark. kobaylar üzerinde yaptıkları çalışmada alüminyum adjuvanların klasik ve lektin yolu ile compleman aktivasyonu yaparak inflamasyona sebep olduğu gösterilmiştir [54]. Güven ve ark. alüminyum hidroksit adjuvanı ile yaptıkları çalışmada, bu adjuvanın kompleman sistemini her 3 yoldan da aktive ettiğini ve alternatif yolağın daha fazla rolü olduğunu göstermiştir [55].

Toksoid aşılar ile kompleman aktivasyonu adjuvanın bir dezavantajı olarak da görülmektedir. Aşı bölgesinde oluşan lokal reaksiyonlar adjuvan etkisi ile ya da tip III aşırı duyarlılık reaksiyonları (Arthus reaksiyonu) sebebi ile olmaktadır. Tip III aşırı duyarlılık reaksiyonlarında oluşan antijen-antikor kompleksleri damar duvarlarında birikerek organ hasarına neden olabilmektedir. Akut olarak gelişmez. Damarda biriken antijen antikor kompleksleri başta nötrofil olmak üzere lökosit ve komplemanın katıldığı bir inflamasyona neden olur [56]. Aşı ile enjeksiyon bölgesinde gelişen lokalize arthus reaksiyonları dolaşımda yüksek miktarda İgG antikoru varlığında yeniden bağışıklama yapıldığında olmaktadır. Aşılamadan birkaç saat sonra başlayan ve genellikle aşılamadan 12 ila 36 saat sonra zirveye ulaşan ağrı, şişme, sertleşme ve ödem ile karakterizedir. Kendi kendini sınırlarlar ve birkaç gün içinde çözülürler. Tetanoz-difteri toksoid pekiştirme enjeksiyonları için önerildiği gibi, aşıları daha geniş aralıklarla yapmak, sıklığı ve şiddeti azaltabilir [57].

Doğal bağışıklıkta rol alan hücreler

Aşıların vücuda verilmesini takiben oluşan doğal immün yanıtlarda görev alan hücresel elemanlar monositler, makrofajlar, DC'ler, ve nötrofiller gibi fagositoz ve antijen sunumu yapan hücrelerdir.

Mononükleer fagositler

Dolaşımda monosit ve dokuda makrofajları kapsayan mononükleer fagosit sistem hücrelerinin birincil görevi mikropları içlerine alarak yok etmek ve hasarlı dokulardan kurtulmaktır. Hücrelerin enfeksiyon ya da inflamasyon bölgesine geçmesi, yabancı antijenin tanınması ve aktivasyonu, fagositozun başlaması ve antijenin yok edilmesi gibi sıralanan immün yanıtlar oluştururlar. Ayrıca sitokin salgılama ile diğer hücreler ile iletişim kurarak immün yanıtları uyarma ya da regülasyon görevi görürler [46, 58]. Bu özellikleri hem doğal bağışık yanıtta hem de oluşacak adaptif immün yanıt için çok önemlidir. İnsanlarda ve farelerde klasik monosit olarak adlandırılan ve en çok sayıda bulunanlar bol miktarda inflamatuar mediatör üretir ve hızla enfeksiyon ya da doku hasarı olan bölgeye gelirler. İnsanlarda bu monositler, CD14'ün yüksek hücre yüzeyi ekspresyonu ve CD16 ekspresyonunun olmaması ($CD14^{++}$ $CD16^{-}$) ile tanımlanabilir ve farelerde eşdeğer alt set $Ly6^{high}$ olarak tanımlanabilir. Kan monositlerinin az bir kısmını oluşturan klasik olmayan monositler, insanlarda $CD14^{+}$ $CD16^{++}$ ve farelerde $Ly6^{clow'}$ dur. Bu hücreler, endotel yüzeyi boyunca sürtünerek ilerler ve yaralanmadan sonra doku onarımına katkıda bulunur. Ayrıca bir ara monosit alt kümesi de $CD14^{++}$ $CD16^{+}$ olarak tanımlanmıştır [46, 59].

Makrofajların doğal ve edinsel immün cevapta ve doku hemostazında çok önemli rolleri vardır. İmmün sistemde; fagositoz, apoptotik ve nekrotik hücrelerin ortamdan temizlenmesi, antimikrobiyal savunma gibi fonksiyonlar üstlenirler. Bunun yanında Sınıf II MHC ekspresyonu ve sitokin salgılayarak $CD4^{+}$ ve $CD8^{+}$ T hücrelerin aktivasyonunda ve ayrıca $CD4^{+}$ T lenfositlerin alt gruplarına farklılaşmalarında önemli rol oynarlar. Aynı zamanda APC olarak görev alarak T hücre aktivasyonu yaparlar. Klasik aktive makrofaj (M1) ve alternatif aktive makrofajları olmak üzere (M2) iki gruba ayrılırlar. M1 makrofajları yüksek düzeyde İL-12 ve düşük düzey İL-10 salınımıyla karakterizdir. Ayrıca patojenlerin yok edilebilmesi için indüklenebilir nitrikoksit sentetaz (iNOS) üretimi, İL-1β, İL-6, İL-12, İL-23, TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinleri salgılayarak immün sistem hücrelerinin inflamasyon bölgesine toplanmalarını sağlayacak kemokin ve kemoatraktan molekülleri salgılar. M2 makrofajları ise yüksek düzeyde İL-10 ve İL-1 reseptör antagonisti ve düşük düzeyde İL-12 üretimi ile karakterizedir. Arjinaz-1 önemli M2 makrofaj belirtecidir ve iNOS enziminin substratı olan L-arjinin miktarını düşürür [60, 61].

Nötrofiller

Nötrofiller memelilerde kanda en çok bulunan lökosit alt tipidir. Nötrofiller, bazofil ve eozinofillerle birlikte çekirdeklerinin 3-5 segmentli görüntüsü ile polimorf nükleer lökositler (PMNL) olarak adlandırılır. PMNL'nin yaklaşık olarak %55-60'ı nötrofillerden oluşturmaktadır [62]. Nötrofillerin sitoplazması, iki tip granül içerir. Çoğunluğu oluşturan ve spesifik granüller olarak adlandırılan granüller, lizozim, kollajenaz ve elastaz gibi enzimlerle doldurulur. Bu granüller, nötrofil granüllerini, bazofiller ve eozinofiller granülositlerinden ayıran, bazik veya asidik boyalarla güçlü bir şekilde boyanmaz ve bu şekilde diğer PMNL'lerden ayırt edilir. Azurofilik granüller olarak adlandırılan nötrofil granüllerinin geri kalanı, enzimler ve defensinler ve katelisidinler dahil olmak üzere diğer mikrobisidal maddeler içeren lizozomlardır [63]. Üretimi kemik iliğinde granülosit-koloni uyarıcı faktör (G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor) ile olmaktadır. Nötrofillerin degranülasyon ve fagositoz ile öldürme mekanizmalarının yanında NETozis adı verilen bir mekanizma da kullandığı 2004 yılında gösterilmiştir. NETozis sırasında nötrofiller, antimikrobiyal proteinler ile birlikte kromatinlerden oluşan nötrofil ekstraselüler ağlarını (NET: neutrophil extracellular traps) salgılayarak bakteri ya da diğer patojenleri yakalar ve yayılmasını engeller [62, 64].

Mast hücresi, bazofil ve eozinofiller

Mast hücresi, bozfil ve eozinofiller doğal ve adaptif bağışıklıkta rol alan diğer önemli hücrelerdir. Ortak özellikleri hepsinin taşıdıkları granüllerinde inflamatuar ve antimikrobiyal moleküller bulundurmalarıdır. Kemik iliği kökenli hücrelerdir. Mast hücrelerinin farklılaşması için c-Kit molekülü gereklidir. Sitoplazmaları membrana bağlı histamin içeren granüller içerir. Yüzeylerinde yüksek afiniteli İgE reseptörü bulundurmaktadır [65].

Bazofiller de kemik iliğinden köken alır fakat bu köken mast hücrelerinden farklıdır. Kemik iliğinde gelişerek dolaşıma katılır. Mast hücreleri ile yapısal ve fonksiyonel benzerlik taşırlar. Normalde dokuda bulunmaz, inflamasyon sırasında dokuya gelir. Mast hücreleri ile benzer şekilde granüller ve İgE reseptörü taşırlar. Eozinofiller de sitoplazmalarında parazitlere ve kendi dokularına zarar veren granüller taşır.

Farklılaşması için GM-CSF, İL-3 ve İL-5 gibi sitokinlere ihtiyaç duyar. Bazı eozinofiller, gastrointestinal, respiratuar ve genitoüriner sistem mukozaları gibi dokularda bulunabilir. İnflamasyon sırasında kandan geçerek sayıları dokularda artar [66, 67].

Dendritik hücreler

Dendritik hücreler (DC) profesyonel antijen sunucu hücrelerdir. Tipik morfolojileri ve CD11c ve MHC II moleküllerin ekspresyonu ile karakterize edilir. DC'ler, immün sistemin önemli bir parçası olup, antijenin alınması, taşınması ve işlenip sunulması gibi görevler üstlenir. Doğal ve adaptif immün yanıtlar arasında bir köprü görevi görmektedir. Primer T hücre bağımlı immün yanıtın oluşumunda en etkili hücrelerdir [68].

İmmatür DC'ler kemik iliğinde yapılarak tüm vücuda dağılır. Yabancı antijenlere karşı immün sistemin inflamatuar yanıtını indüklerken, öz antijenlere karşı ise tolerans mekanizmalarını indükleyerek işlev göstermektedir. İmmatür DC'lerin Sınıf II MHC ve kostimulatör ekspresyonu oldukça düşüktür [69]. Bununla birlikte *TLR*, C-tip lektin reseptörleri (CLR), NLRs, çöpçü reseptörler gibi patern tanıma reseptörleri yüksek düzeyde eksprese eder. Kemokin reseptörü ve FcR (Fc reseptör) ekspresyonları da artar. Uyaranlara ve çevreden gelen immün yanıtlara cevap verebilme adına birçok sitokin reseptörünün de yüksek düzeyde ekspresyonu görülür. Eksprese ettikleri tüm bu reseptörler adaptif immün sistem elemanı olan T hücreleri aktive etmek için yeterli değildir. Bunun için mutlaka matür (olgun) forma geçmeleri gerekir [70]. İmmatür DC'ler MIP-1α, MIP-1β, MIP-3α, MIP-5, MCP-3 ve RANTES gibi kemokinler tarafından uyarılırlar. Matürasyon sırasında DC'ler CCR7 reseptörleri sayesinde periferik dokudan sekonder lenfoid yapılara doğru harekete başlar ve orada T hücreleri uyaran matür DC'lere dönüşür [71, 72].

Matürasyon sürecinde MHC molekülleri endositik kompartmandan hücre yüzeyine doğru çıkar; antijenlerin hücre içine alımında seçici bir azalma başlar. Antijenleri yakalayarak drene oldukları lenf düğümlerine ulaştıklarında T hücre yanıtlarını başlatırlar. Bu nedenle DC'ler, aşı antijenlerine karşı bağışık yanıtın başlatılmasında ve şekillendirilmesinde önemli bir rol oynarlar. Protein yapıdaki aşı antijenleri, lokal

inflamasyonla aktive olan immatür DC'ler tarafından alınır ve antijenler küçük parçalara ayrılmaya (antijen işlenmesi) başlar. İşlenen antijenler hücre yüzeyinde Majör doku uygunluk kompleksi (*MHC: majör histocompatibility complex*) molekülleri ya da diğer adıyla insan lökosit antijenleri (*HLA: human leukocyte antigens*) ile T hücrelerine sunulur. Bu moleküller antijeni sunup T hücrelerini aktive eden ve T hücre aracılı immün yanıtın yönünü belirleyen hücre yüzey moleküleridir [73].

Hücre sitozolünde bulunan antijenler MHC Sınıf I molekülleri ile CD8+ T hücrelere antijen sunumu yaparken, fagositozla alınan antijenler CD4+ T hücrelere MHC Sınıf II aracılığı ile sunulmaktadır. Matür DC'ler yüksek düzeyde İL-1, İL-6, İL-10, İL-12, İL-23, TNF-α sitokinleri ve CCL17, CCL12, CCL19 ve CCL22 gibi kemokinleri salgılar. Ayrıca; CD80, CD86, CD40, CD54 gibi kostimulatör reseptör ekspresyonlarında artış meydana gelir. DC'lerin sitoplazmik iskeletinin reorganizasyonu ile migrasyon yeteneği artarak, T hücrelerine antijen sunumunu başlatma amacıyla bölgesel lenf düğümlerine göç ederler [74].

Toksoid aşılarda kullanılan alum adjuvanlarının partiküler yapısı sayesinde fagosit hücreler tarafından fagositoz ile hücre içine alındığı bilinmektedir. Alum adjuvanının hücre membranına bağlanarak lipid yığınların (sandalların) oluşumunu uyardığı da düşünülmektedir. Böylece immünoreseptör tirozin bazlı aktivasyon motifleri (ITAM) bir araya gelerek Syk-PI3Kd yolağını aktive eder. Bu yolak sitozolik fosfolipaz A2 (cPLA2)'yi p38 MAP kinaz aracılığı ile aktive eder. Sonuçta da membran lipidlerinden güçlü bir proinflamatuar olan araşidonik asit salınmı gerçekleşir. Araşidonik asit prostoglandin A2'ye dönüştürülerek salınır ve DC aktivasyonuna neden olur [75].

Daha önce de bahsedildiği gibi fagositoz ile alınan adjuvan ve toksoid aşı antijeni lizozomal destabilizasyona yol açarak NLPR3 inflamazom aktivasyonu yapmaktadır [44]. Ayrıca oluşan ürik asit, parçalanan hücrelerden salının DNA [76] ve ATP [77] gibi endojen kaynaklı tehlike sinyalleri de kaspaz-1 toplanma bölgesi içeren ASC proteini (apoptosis-associated speck-like protein) ve NLPR3 ile birlikte inflamazom kompleksini oluştarak İL-1β salınımı ile sonuçlanır. Oluşan tehlike sinyali ortama nötrofil, eozinofil, monosit, makrofaj ve DC gibi hücrelerin toplanmasını zamana

bağlı olarak gerçekleştirir. Kool ve ark. yaptıkları çalışmada OVA ile alum adjuvanını farelereintraperitoneal olarak uyguladıklarında 24 saat sonra peritona nötrofil ($Ly6G^+$, $F4/80^-$, $CD11b^+$ hücreler), eozinofil ($F4/80^{dim}$, $Ly6G^+$, $CD11b^+$ hücreler), ve inflamatuar mononükleer hücrelerin ($CD11b^+$, $F4/80^+$, $Ly6C^+$ hüxreler) toplandığını saptamıştır. Bu yanıtın NLPR3 olmayan farelerde azaldığı fakat halen mevcut olduğu görülmüştür. İL-1 ve İL-6 sitokin salınımı yüksek miktarda bulunmuştur. NLPR3-/- farelerde İL-1 seviyelerinin tamamen düştüğü, İL-6'nın ise azaldığı fakat yine de var olduğu saptanmıştır [32].

Lu ve Hogenesch alum adjuvanını intramuskuler olarak uyguladıklarında $Gr\text{-}1^+$ nötrofil, $Mac\text{-}2^+$ makrofajların, Ly-6C/G monositlerin ve eozinofil gibi inflamatuar hücrelerin enjeksiyon bölgesine 2-6 saat içerisinde toplandığını göstermiştir. Hücrelerin pek çoğu CD11b+ myeloid kökenli olduğu bulunmuştur. Enjeksiyondan 2 gün sonra nötrofil sayısı azalıp, makrofaj sayısı artarken, 7. Günden sonra MHC sınıf II+ hücre sayısı belirgin şekilde artış gösterdiği ve bu hücrelerin DC olduğu bulunmuştur. Nötrofil uyarıcı CXCL1 ve CXCL2 komekinlerin ilk 2 gün arttığı, makrofaj trafiğini düzenleyen kemokinler CCL2 ve CCL4 konsantrasyonunun da arttığı gösterilmiştir [78].

McKee ve ark. 2009 yılında yaptıkları çalışmada farelere alum adjuvanı enjeksiyonundan birkaç saat sonra eozinofil, monosit, nötrofil ve NK hücreleri ile karakterize bir tip 2 T hücre yanıtı olduğunu göstermiştir. İL-1β ve İL-5 gibi sitokinlerin de dahil olduğu pek çok sitokin ve kemokinin ilk 4 saat içinde üretildiğini saptamışlardır. İL-1β salınımının daha çok makrofaj ve mast hücre kaynaklı, İL-5'in ise sadece mast hücrelerden kaynaklandığını ve tüm bu hücrelerin alum adjuvanını tanıyabildiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda çalışmalarında mast hücre kaynaklı İL-5 ve histamin salınımı ile eozinofil akümülasyonu saptamışlardır [79].

Yapılan başka bir çalışmada intramuskuler olarak yapılan alum enjeksiyonu ile enjeksiyon bölgesindeki hücrelerin fenotipleri belirlenmiştir. Hücreler nötrofil ($Ly6G^{yüksek}$), eozinofil ($Ly6G^{int}$, $F4/80^{int}$, $SSC^{yüksek}$), inflamatuar monosit ($CD11b^{yüksek}$, CD11c−, $Ly6C^{yüksek}$), mDCs (CD11bhigh, $CD11c^+$, $MHCII^+$), $CD11^{blow}$ DC ($CD11b^{int/low}$, $CD11c^+$, $MHC\text{-}II^+$), $CD11b^-$ DC ($CD11b^-$, $CD11c^+$, $MHC\text{-}II^+$), makrofaj ($CD11b^+$, $F4/80^{yüksek}$), T hücre ($CD11b^-$, $CD11c^-$, $CD3^+$) ve B hücre

($CD11b^{-}$, $CD11c^{-}$, $MHC\text{-}II^{+}$) olarak bulunmuştur [80]. Yapılan bu çalışmalarla DC'lerin enjeksiyon bölgesine 1. Ve 7. Gün arasında toplandığı gösterilmiştir. Ulanova ve ark. insan PMNL'lerin İL-4 bağımlı MHC sınıf II, CD86, CD83, İL-1α, İL-1β, tümör nekroz faktörü (TNF), İL-4 ve İL-6 ekspresyon artışı ile DC morfolojisine döndüğünü göstermişlerdir. Bu DC'ler İL-1β, TNF-α ve İL-6 gibi sinyaller ile drene oldukları lenf düğümlerine göç etmektedir [81].

Alum ile enjeksiyon bölgesinde meydana gelen inflamasyonda başlıca rol alan hücrelerden biri olan $Ly6G^{+}CD11b^{+}$ nötrofillerin olduğu ve enjeksiyon bölgesinde 2 saat içinde görüldüğü ve aynı zamanda bu nötrofillerin NET oluşturduğu gösterilmiştir. Bu yanıtın antijen spesifik T hücrelerin ekspansiyonu ve sınıf dönüşümü gerçekleşerek artan bir antikor üretimi ile B hücre yanıtını güçlendirdiği gösterilmiştir [82].

2.1.2. Adaptif immün cevaplar

Adaptif immün yanıtlar antijene özgü T hücreler ve B hücrelerin başlıca görev aldığı hücresel ve hümoral immün yanıtlardan oluşmaktadır. Lenfositler, antikorlar ve sitokinler bu yanıtlarda görev almaktadır. Toksoid aşılar ile gelişen adaptif immün yanıtlara bakıldığında antijen sunucu hücreler, özellikle DC'ler ile T hücre ve B hücreler arasındaki etkileşimler göze çarpmaktadır [2].

T hücreler

T hücreleri kemik iliğinde üretilmelerinin ardından timusta olgunlaşırlar. Kemikiliğinden göç ederek timus korteksine ulaşan öncül hücreler medullaya doğru hareket ederken, timik stroma hücrelerinin yönlendirdiği bir dizi farklılaşmaya uğrarlar. Bu olgunlaşmaya timik epitel hücreleri ile birlikte makrofajlar ve DC'ler aracılık etmektedir. Farklılaşma sırasında T hücreleri bir takım yüzey antijenlerini kazanır ve kaybederler. Sonuçta kendi MHC molekülüne düşük afinite gösteren, yüzeyinde T hücre reseptörü (TCR: T cell Receptor) taşıyarak olgunlaşan hücrelerin timusu terk etmesine izin verilir. Olgun T hücreleri, dolaşıma katılarak sekonder lenfoid organlara geçer. Dolaşımdaki lenfositlerin %60-80'i T hücrelerinden oluşurken, bunların bir kısmı CD4+ iken bir kısmı da CD8+ T hücreleridir [83, 84].

DC’ler de olugunlaşmalarının ardından, antijenik peptidleri naif $CD4^+$ T hücrelerine (MHC sınıf II molekülleri ile) veya $CD8^+$ sitotoksik T hücrelerine (CTL'ler; MHC sınıf I molekülleri ile) sundukları ikincil lenfoid dokulara göç ederler. Bu T hücre aktivasyonu süreci, öncelikle T hücre reseptörü TCR'den (sinyal 1) ve APC üzerindeki CD80, CD86, CD40, CD54 ve T hücre üzerindeki CD28, CD154, CD2 ve CD11a gibi ko-stimülatör ve adezyon moleküllerinden (sinyal 2) gelen sinyaller tarafından düzenlenir. CD80 ve/veya CD86-CD28 etkileşimleri, T hücre aktivasyonu ve hayatta kalması için önemli sinyaller sağlar. CD40-CD40L (CD154) etkileşimleri, B hücre farklılaşması ve izotip değişimi gibi T hücre bağımlı efektör fonksiyonların geliştirilmesi için de çok önemlidir [85-87].

Aktive APC’ler tarafından salgılanan immünomodülatör sitokinler (sinyal 3) ile CD4+ T hücrelerinin Th1, Th2, Th17 veya $CD4^+$ $CD25^+$ regülatör T hücrelerine (Treg) doğru polarizasyonunu sağlayan ek bir sinyal gerekmektedir. Th1 hücrelerinin farklılaşmasında İL-12 ve ve Th2 farklılaşmasında İL-4 molekülleri önemli bir role sahiptir. İL-1β ve İL-6 ise aktive hafıza insan T hücrelerinden İL-17 ve İL-21 üretimini artırır. İL-21 dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF-β: *transforming growth factor-β*) varlığında naif $CD4^+$ T hücrelerinin Th17 hücrelerine farklılaşmasını teşvik ederken, İL-23 farklılaşmış Th17 hücrelerinin çoğalmasını ve stabilizasyonunu sağlamaktadır [88, 89].

Treg’ler, 'doğal' Tregler olarak adlandırılan timik kökenli hücreler veya naif T hücrelerden farklılaşmış 'indüklenmiş' veya 'adaptif' Tregler olarak adlandırılır [90]. Bağışıklık yanıtta, aktive T hücreleri çoğalır, efektör fonksiyonlar kazanır ve bazıları hafıza hücreleri haline gelir. Ayrıca, patojenleri öldürmek için makrofajları aktive ederler, enfekte hücreleri öldüren sitotoksik T hücrelerin (*CTL: cytotoxic T cell*) gelişimini teşvik ederler ve B hücrelerine antikor üretmeleri için yardım sağlarlar [91].

Th1 hücreler İnterferon gamma (IFN-γ), İL-2, TNF-β gibi sitokinler salgılayarak makrofaj, doğal öldürücü (NK: Natural Killer) ve CD8+ T hücreleri aktive ederek hücre içi patojenlerle savaşta ve inflamasyonda görev alır. Th1 farklılaşmasındaki en önemli sitokinler İFN-γ ve İL-12’dir. Özellikle DC’ler İL-12 salgılayarak NK hücre aktivasyonu yaparak İFN-γ salgılanmasını sağlar. Pek çok transkripsiyon faktörü farklılaşmada rol almakla beraber, anahtar transkripsiyon faktörlerü T-box

transkripsiyon faktörüdür (T-bet). T-bet, İFN-γ üretimini destekleyerek Th2 ve Th17 yönünde farklılaşmayı engeller. T-bet ekspresyonu İL-12 kendi reseptörünü de artıracak sinyali oluşturarak İFN-γ üretimini arttırarak Th1 cevabını arttırır. T-bet ekspresyonunun, İL-12 bağımlı sinyal uyarıcı ve transkripsiyon faktörü 4 (STAT4)'ten ziyade daha çok STAT1 ilişkili olduğu bulunmuştur. STAT-1 ise İFN-γ ile aktive olmaktadır. T-bet farklılaşan hücrelerden İFN-γ üretimini uyarır böylece T-bet ekspresyonu amplifiye edilerek İL-12Rβ2 ekspresyonu artar. Böylece Th1 farklılaşmış hücreler seçilir. T-bet İL-4 genini inhibe ederek ve Th2 ana regülatör transkripsiyon faktörü GATA3 fonksiyonunu engelleyerek Th2 farklılaşmasını inhibe eder. T-bet aynı zamanda Th17 transkripsiyon faktörü olan RORγt'yi kodlayan Rorc promotor ile etkileşerek Th17 inhibisyonu yapmaktadır [92, 93].

Th2 hücrelerinin temel fonksiyonu, parazitik enfeksiyonlara karşı, İgE ve eozinofil/mast hücresi aracılı immün yanıtı güçlendirmektir. Th2 hücre farklılaşması için İL-4 ve İL-2 önemli sitokinlerdir. Th2 yönünde faklılaşma için majör transkripsiyon faktörü İL-4 ile uyarılan STAT6'dır. STAT6 da ana regülatör olan GATA3 proteini ekspresyonunu artırır. GATA3 İL-4, İL-5 ve İL-13'ü kodlayan genleri kapsayan lokusa bağlanarak ve aktifleştirerek Th2 sitokin üretimini düzenler. GATA3 fonksiyonu bozulduğunda Th2 farklılaşması gerçekleşmez. Ayrıca STAT4'ü aşağı yönde regüle ederek Th1 farklılaşmasını engeller. Yapılan çalışmalar GATA3'ün tek başına tüm sitokin genlerini regüle etmediğini, STAT6 ile birlikte görev yaptığını göstermiştir. Ayrıca Th2 farklılaşmasının İL-2, İL-6 ve İL-21 gibi pek çok sitokinin üretimini sağlayan başka transkripsiyon faktörünü de içerdiği de bilinmektedir [93, 94]. Th2 hücreler pek çok farklı hücre grupları ile etkileşim halindedir. B hücresi yüzeyindeki CD40 ile yüzeylerinde bulunan CD40L etkileşimi ile İL-4 ve İL-5 salgılayarak B hücrelerinden insanda İgG4 ve farede İgG2 tipinde, İL-13 salgılayarak da İgE tipi antikor üretimi için izotip dönüşümü gerçekleşir. Oluşan İgE tipindeki antikorlar mast hücre degranülasyonuna neden olmaktadır. Salgıladıkları İL-4 ve İL-10 ile makrofaj, İL-5 ile eozinofil aktivasyonu yapar [95]. Özellikle alüminyum adjuvanı kullanılan toksoid bazlı aşılarda Th2 yönünde yanıt olduğu bilinmektedir [4, 5].

Veldohen ve Dardalhon 2008 yılında TGF-β and İL-4 varlığında uyarılan ve Foxp3-İL-9^{+} ve İL-10^{+} T hücreleri buldular. Bu hücreler yüksek miktarda İL-9 ve İL-10 üreten

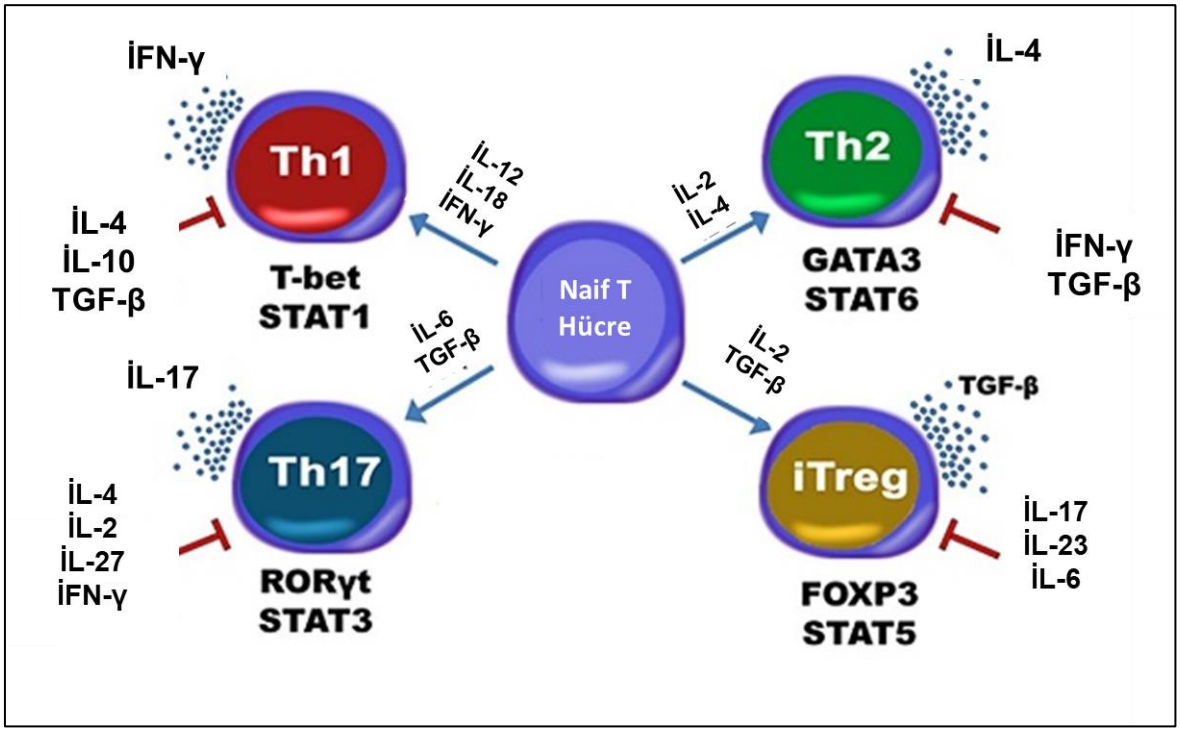
yeni bir CD4+ T hücre alt grubu olarak Th9 hücreler şeklinde ifade edilmiştir [96]. Th2 hücreler ile benzer şekilde İRF4 ve STAT6 gibi transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duyarlar. İL-9 üretimi ise TGF-β ile uyarılan transkripsiyon faktörü PU.1'e bağlıdır [97]. Pek çok alerjik reaksiyon ve otoimmün hastalık ile ilişkilendirilmekle birlikte antitümör aktiviteleri de gösterilmiştir [98].

Naif CD4+ T hücrelerin Th17 hücrelerine farklılaşmasında İL-1, İL-6 ve TGF-β sitokinleri rol almaktadır. Ayrıca TGF-β varlığında İL-21 sitokininin bulunması da Th17 hücre farklılaşmasında rol oynar. Th17 hücreleri kendileri de İL-21 salgılayarak otokrin etki göstermektedir. Fare naif CD4+ T hücreleri APC hücreleri ile kültüre edildiklerinde İL-23 uyarımı ve İFN-γ ve/veya İL-4 varlığı ile Th17 hücrelerine dönüştüğü gösterilmiştir. Ayrıca İL-10'un Th17 üzerinde negatif regülatör etkisi olduğu bilinmektedir [99].

Foliküler yardımcı T hücreler (Tfh: *Follicular helper T cells*) özelleşmiş bir CD4+ T hücre alt grubudur. Hümoral immün yanıtları desteklemek ve regüle etmek için B hücreler ile birlikte çalışmaktadır. Lenf düğümleri ve dalakta fonksiyon göstererek B hücrelerin afinite matürasyonu, sınıf değişim rekombinasyonu ve yaşamlarını devam ettirmelerini sağlar. Diğer efektör CD4+ T hücrelerden farklı olarak farklılaşmaları için hem DC'ler hem de B hücreler ile etkileşime ihtiyaç duyarlar. Yüksek düzeyde programlı ölüm 1 (*PD-1: Programmed cell death-1*), uyarılabilir T hücre kostimülatör (*ICOS: inducible T cell costimulator*) ve CXCR5 kemokin reseptörü taşır. CXCR5 ekspresyonu sekonder lenfoid organlarda Tfh hücrelerin lokalizasyonunu sağlayarak B hücreden zengin alanlara çeker. Tfh hücrelerin gelişimi BCL6 transkripsiyon faktörüne bağlıdır. İL-6 ve İL-21 sitokinleri ve ICOS farklılaşmada rol alan moleküllerdir. Lenfoid dokularda germinal merkez oluşumu için önemli hücrelerdir. Germinal merkezlerin oluşması ve idamesi ile regülasyonunda, B hücrelerin burada plazma ve hafıza B hücrelerine dönüşmesinde görev alırlar [100, 101].

Tfh hücrelerin aşılara karşı oluşan immün yanıtlarda önemli bir görev aldığı bilinmektedir. Özellikle salgısal immün yanıtların görev aldığı toksoid aşılarında etkili bir antikor yanıtın oluşması için germinal merkezlerde B hücreler ile kurdukları etkileşim çok önemlidir. Tfh hücreler germinal merkez reaksiyonlarında çok önemli

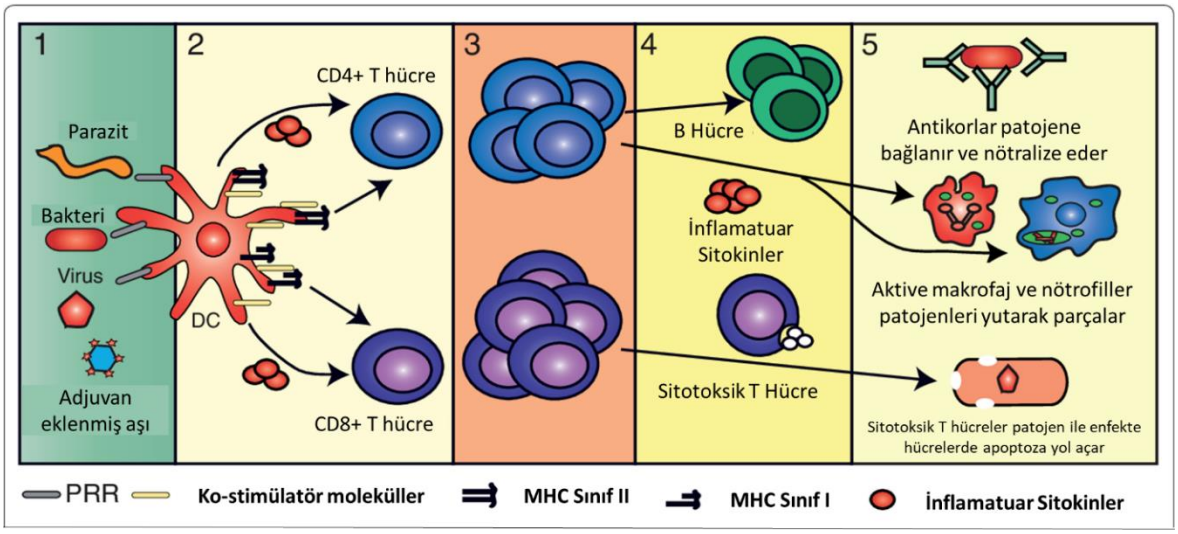
rol oynamaktadır. Süperantijenlerin, T hücre yokluğunda germinal merkez oluşumunu başlatabildiği deneysel olarak gösterilmiştir. Bununla birlikte bu oluşumların 5 gün içerisinde yıkılması sebebiyle germinal merkezlerde antikor üreten plazma hücre oluşumunun T hücrelerini mutlak olarak gerektirdiği gösterilmiştir [102].



Şekil 2.3. $CD4^+$ T hücre farklılaşması [103].

Sitotoksik T hücreler (CTL), $CD8^+$ αβ T hücre reseptörü taşıyan T hücreleridir. İntraselüler bakteri ya da virus ile enfekte hücrelerin ya da malign dönüşüme uğrayan tümör hücrelerinin yok edilmesinde görev alır. APC üzerindeki MHC Sınıf I molekülleri antijeni CD8+ T hücrelere sunarak aktivasyonlarını sağlar. Ayrıca APC sitoplazmasında enfekte hücreye ait antijenler işlenerek dendritik hücreye ait sınıf I-MHC molekülleri ile CTL lefositlere sunulur. Bu olaya çapraz sunum (*cross presentation*) denir. Aktive CTL ile hedef hücre arasında immünolojik sinaps benzeri yapı oluşur ve CTL'ler perforin, granzim ve granülozin gibi granül içeriklerini bu sinapsa boşaltır [104]. CD8+ T hücre farklılaşması için önemli transkripsiyon faktörleri T-bet ve ömesodermindir. T-bet ve ömesodermin yüksek düzeyde perforin, granzim ve İFN-γ sitokini salgılamada görev alır. CTL'ler, İFN-γ yanında TNF−α ve

İL-2 gibi sitokinleri salgılar. İL-2 CD8+ hücrelerin CTL'lere farklılaşması ve proliferasyonunda önemli bir sitokindir [104, 105].



Şekil 2.4. T lenfosit aktivasyonu ve farklılaşması. DC'ler enfeksiyöz patojen ya da aşı kaynaklı antijeni alır (1.aşama). DC'ler patojenin PRR'lere bağlanan özelleşmiş bölgesi ile bağlanarak aktive olur, kostimülatör molekül ekspresyonu ve sitokin salınımı uyarılır. Alüminyum tuzları gibi adjuvanlar inflamatuar yolakları uyarır. DC'ler antijeni peptidlere ayırarak CD4+ ve CD8+ T hücrelere sunar (2. aşama). T hücreler kostimülatör sinyaller ve inflamatuar sitokinlerden de sinyal alarak aktive olur. Aktivasyon sonrası hücre proliferasyonu (3.aşama) ve efektör hüceye farklılaşma (4.aşama) gerçekleşir. CD4+ T hücreler doğal bağışık yanıt hücrelerini (makrofaj ve nötrofil gibi) aktive eder. Aktive CD4+ T hücreler hücre yüzeyinde ve çözünür halde bulunan mediyatörler ile B hücrelere yüksek afiniteli ve sınıf değişimine uğramış antikor salgılaması için yardım eder. Efektör CD8+ T hücreler sitotoksik granülleri ile enfekte hücreyi yok eder ya da inflamatuar sitokin salınımı için başka hücreleri aktive eder (5. Aşama) [106].

Tetanoz ve difteri aşılarında kullanılan alüminyum içeren adjuvanların kuvvetli Th2 yönünde T hücre uyarımı yaptığı ve Th1 uyarımı yapmadığı ya da çok düşük seviyede yaptığı bilinmektedir. Sokolovska ve ark. alüminyum içeren adjuvanların dendritik hücreler ve $CD4^+$ T hücreler üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada DC üzerindeki CD86 molekülünde artış olduğunu, DC'lerden İL-1β ve İL-18 salınımı gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bu DC hücrelerinin OVA ve LPS ile inkübasyonunda naif CD4+ T hücrelerin Th1 yönünde farklılaşırken, OVA ve LPS'nin alüminyum adjuvanları ile inkübe edildiklerinde CD4+ T hücrelerin İL-4, İL-5 ve İFN-γ

salgıladığını tespit etmişlerdir. İL-1β ve İL-18 sitokinlerini bloke ettiklerinde ise İL-4 ve İL-5 sitokinlerinin belirgin şekilde düşüş gösterdiğini saptamışlardır [107].

Brewer ve ark. İL-4 geni eksik olan (İL-$4^{-/-}$) farelerde yaptıkları çalışmada alum adjuvanı ile birlikte OVA enjeksiyonu yapılan farelerde, hem Th1 hem de Th2 yönünde CD4+ T hücre yanıtı olduğunu saptamışlardır. Ayrıca İL-4 ve İL-13'ün alüminyum adjuvanında Th2 yanıtını uyarmada gerekli sitokinler olmadığını fakat bu sitokinlerin Th1 yanıtını güçlü bir şekilde baskıladığını göstermişlerdir. Çalışamada alum adjuvanın Th2 yanıtı regülasyonunu Th1 baskılaması üzerinden yaptığını göstermişlerdir [108, 109]. Bununla birlikte 2010 yılında yapılan başka bir çalışmada Serre ve ark. in vitro İL-4'ün hem CD4+ hem de CD8+ T hücrelerinin, Th2 tipi sitokinlerin salgılanmasına aracılık ettiğini in vitro olarak göstermiş, fakat *in vivo* olarak yalnızca CD4+ T hücrelerin İL-4 salgıladığını gösterebilmiştir [110]. Serre ve ark. yaptıkları başka bir çalışmada ovalbümin eksprese eden canlı attenüe Salmonella (SalmOVA) ile alum ile presipite edilen ovalbümin (alum-OVA) karşılaştırması yaparak, SalmOVA'nın pek çok farklı molekül ile birlikte (İL-1α, İL-1, İL-6, İL-12α, İL-15, İL-27 (İL-30), İL-18, İFN-, CCL2, CCL3, CCL4, CCL7, CCL9, CXCL1, CXCL2,CXCL4, CXCL9, ve CXCL11) Th1 ile ilişkili T-bet ve İFN-γ uyarımına neden olurken, alum-OVA'nın sadece İL-13, GM-CSF ile birlikte GATA-3 ve İL-4 gibi Th2 ile ilişkili moleküllerin salgılanması ile ilgili uyarımlar yaptığını saptamıştır [111].

McKee ve ark. alum adjuvanı enjeksiyonundan birkaç saat sonra eozinofil, monosit, nötrofil ve NK hücreleri ile karakterize bir tip 2 T hücre yanıtı ve antikor üretimi olduğunu gösterdikleri çalışmada, alum adjuvanı ile CD8+ T hücre aktivasyonu sağlandığını da göstermiştir. Makrofaj ve/veya mast hücreden yoksun farelerde antijene özgü ve alum ile uyarılmış CD4 ve CD8 hücre sayısında ve yüzdesinde herhangi bir fark olmadığını saptamışlardır. Aynı zamanda mast hücresi yokluğunun da total İgG ve İgG1 yanıtlarında da bir farka neden olmadığı gösterilmiştir [79].

Daha önce de belirtildiği gibi alum adjuvanları APC'lerden prostaglandin E2 salınımına neden olmaktadır. Prostaglandin E2, DC, makrofaj ve Th1 hücrelerindeki intraselüler siklik adenozin monofosfat (*cAMP: cyclic adenosine monophosphate*) seviyelerini arttırmaktadır. Böylece, İL-12 ve İFN-γ gibi Th1 sitokinleri azaltarak Th1

yanıtını baskılamaktadır [112]. Aynı zamanda prostaglandin E2, DC'lerden İL-23 üretimini artırarak Th17 polarizasynonunu ve İL-17 üretimini de güçlendirmektedir [113]. Salgılanan prostaglandin E2'nin, İL-4 ile birlikte İgE üretimini artırdığı dolayısıyla Th2 yönünde regülasyon yaptığı gösterilmiştir [114].

Ding ve ark. difteri toksoidinin farklı adjuvanlar kullanarak Balb/c farelerde transkütanoz immünizasyon ile etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarında farklı Th tipi yanıtlar saptamıştır. Alum, lipopolisakkarit (LPS), Quil A, CpG oligonükleotid ve kolera toksinlerinin adjuvan olarak kullanıldığı çalışmada alum adjuvanı ile subkütan enjeksiyon yapılarak serum İgG, İgG1 ve İgG2 karşılaştırması yapılmıştır. İgG1/İgG2 oranı Th1/Th2 dengesini veren bir ölçü olarak kabul edilerek değerlendirme yapılmıştır. Yalnızca difteri toksoidi uygulandığında oluşan İgG1/İgG2 oranı transkütanoz ve ve sabuktan uygulamada farklılık göstermemiştir. Adjuvanlar ile yapılan uygulama değerlendirildiğinde ise İgG1/İgG2 oranı yalnızca toksoid, Quil A, kolera toksini CpG sırasıyla azalmıştır. Bu sonuçlar ile araştırmacılar Th2'den Th1'e doğru gelişen bir immün yanıt olduğu sonucuna varmıştır. Bu çalışma ile enjeksiyon yapılan molekülün veriliş yolu ve kullanılan adjuvanın immün sistemi farklı şekilde uyardığı bir kez daha gösterilmiştir [115].

Aşılar ile oluşan hücresel immün yanıtların saptanmasında ELISPOT, akım sitometri, proliferasyon ve sitotoksisite testleri, tetramer yöntemi, PCR, ELISA, multipleks ELISA gibi yöntemler kullanılmaktadır [15, 16]. Bu yöntemler difteri ve tetanoz toksoid aşıları ile oluşan hücresel immün yanıtları saptamak için de kullanılabilir. Örneğin, Mayer ve ark. 1 ila 10 yıl içerisinde tetanoz toksoid aşısı ile aşılanmış bireylerden aldıkları kan örneklerinde izole ettikleri periferik kan mononükleer hücrelerde, tetanoz toksoidine spesifik olan total T lenfosit sayısını ve spesifik İFN-γ salgılayan CD4+ T hücreleri ELISPOT yöntemi ile saptamışlardır [116]. Rowe ve ark. difteri tetanoz aselüler boğmaca aşısı ile oluşan antijene özgü yanıtların Th2 yönünde olduğunu göstermek için İL-4, İL-5, İL-6, İL-9, İL-10, İL-13 ve İFN-γ sitokinleri RT-PCR ve ELISA yöntemleri kullanılarak gösterilmiştir [117]. Ma ve ark. tetanoz toksoidinin retinoik asit ve TLR-3'e bağlanarak sinyalizasyon yolaklarını aktive eden ve sentetik çift iplikli RNA molekülü olan PIC ile yaptıkları çalışmada farelerde oluşan hücresel immün yanıtları saptamıştır. Tetanoz toksoidi ile oluşturulan immünizasyon sonrası fare dalaklarında lenfosit proliferasyonu

radyoaktif 3H timidin yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca akım sitometri yöntemi ile dalak mononükleer hücreleri T hücreleri için PE-anti-CD4 (H129.19) ve FITC-anti-CD8 (53-6.7) antikorları ile B hücreleri PE-anti-B220ve(RA3.6B2) ve FITC-anti-CD19 (1D3), NK / NKT hücreleri FITC-anti-CD3 (17A2), PE-anti-NK1.1 (PK136) ve APC'ler PE-anti-CD11b (M1/70) ve FITC-anti-CD80 (16-10A1) ya da FITC-anti-CD86 (GL1) antikorları ile boyanarak saptanmıştır [118].

B hücreler

B hücreleri salgısal (hümoral) immün yanıttan sorumlu antikor üreten hücrelerdir. Gelişim ve olgunlaşmaları kemik iliğinde gerçekleşir. Kemik iliğinde lenfoid progenitör hücreler pro-B hücre ve pre-B hücre, immatür B hücre ve matür B hücre aşamalarını tamamlarlar. Henüz antijen ile karşılaşmamış olan B hücreleri antijen ile karşılaşmak üzere lenfoid organlara geçer. Foliküler DC'en salgılanan CXCL13 kemokini ile B hücrelerin foliküle doğru hareket etmesini sağlar. Foliküllerde bulunan antijen ile karşılaşmamış hücre matür naif B hücresi adını almaktadır [119].

İg yapıdaki antikorlar 2 adet ağır zincir (*H: heavy*) ve 2 adet hafif (*L: light*) zincir olmak üzere 4 polipeptid zincirden oluşmaktadır. Bu zincirler disülfit bağları ve non-kovalen bağlar ile bağlanmaktadır. Ağır ve hafif zincirler, değişken (*V: variable*) ve sabit (*C: constant*) bölgelerden oluşur [120]. Antikorların sabit bölgesi immün sistem bileşenleri ile ilişki kuran kısımdır ve CH1, CH2, CH3, CH4 ve CL kısımlarından oluşur. Antikorların özgüllüğünü belirleyen antijeni bağlayan bölge ise değişken (*variable*) bölgeler olarak adlandırılır ve molekülün amino terminal kısmında bulunur. Antijenin bağlandığı yer olan ve çok değişken (*hypervariable*) olarak bililen kısım CDR1, CDR2 ve CDR3 burada bulunmaktadır. Bu gölgenin oluşumuna hem ağır zincir hem de hafif zincir katılmaktadır. İgG, İgA, İgM, İgD ve İgE olmak üzere 5 farklı tipte İg molekülü bulunmakta ve bu molekülerde ağır zincir olarak sırasıyla γ, α, μ, δ, ε, ağır zincirleri bulunmaktadır [121].

Naif B hücreler antijeni hücre yüzeylerindeki immünoglobulinler (İg) aracılığı ile tanımaktadır. B hücre reseptörü (BCR: B cell receptor) adı verilen bu yapılar İgM ve İgD yapısındadır [122]. Reseptör gelişimi ve çeşitliliği değişken bölgedeki V (variable), D (diverse), J (joining) DNA gen segmentlerinin somatik rekombinasyonu

ile gerçekleşmektedir. Rastgele bir çift V, D, J gen segmenti seçip, her segmente bitişik çift iplikli kırılmalar eklemek, araya giren DNA'yı silmek (veya bazı durumlarda eklemek) ve segmentleri birbirine bağlamak olarak işleyen rekombinasyon süreci, V(D)J rekombinasyonu olarak tanımlanır. Sonuçta omurgalı bağışıklık sistemlerinde İg çeşitliliğine neden olur [123, 124]. RAG-1 ve RAG-2 (RAG: *recombination activating gene*) enzimleri bu genlerdeki RSS (*recombination signal sequence*) spesifik bölgelerinden tanıyarak keser ve saç tokası şeklinde ilmekler oluşturur. Bu kesimler ve açılan ilmekler DNA'ya bağlı protein kinaz (PK) aktivasyonu yapar. DNA-PK otofosforilasyonu ile ARTEMİS nükleaz enzimini aktive edilerek kırıklar rezekte edilir. Aynı zamanda ARTEMİS tarafından terminal deoksinükleotidil transferazlar etkinleştirilerek iki uca nükleotidler yerleştirilir. Bu şekilde çeşitlilik sağlanmış olur [125, 126].

Naif B hücrelerinin antijeni tanıma ve sinyal iletimi ile aktivasyonu B hücre reseptör kompleksi ile olmaktadır. BCR kompleksi antijen ile ilişki kuran hücre membranına bağlı bir İg ile sinyal iletimi ile ilişkili heterodimer CD79a (Igα) ve CD79b (Igβ)'den oluşmaktadır. Bu aktivasyon T hücre bağımlı ya da T hücre bağımsız olarak gerçekleşir [119, 127].

T hücre bağımsız aktivasyon BCR'nin lipid, polisakkarit ve glikolipid gibi mutlivalan antijenleri tanıması ile gerçekleşmektedir. Bu durumda herhangi bir T hücre yardımı olmaksızın B hücrelerinin aktive olarak klonal çoğalması gerçekleşir [128]. Igα ve Igβ moleküllernin kuyruk kısmında bulunan ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) molekülleri aracılığı ile sinyal iletimi gerçekleşmektedir. Fos, Jun, NF-κB gibi transkripsiyon faktörlerinin uyarılması ile B hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması sağlanmaktadır. B hücre aktivasyonu için BCR kompleksi ve antijen ile oluşan bu sinyal yeterli değildir. B hücre yüzeyindeki kompleman reseptörü CD21 (*CR2: Complement Receptor type 2*) kompleman sistemi ile ilişkili olan ikinci sinyali sağlamaktadır. Kompleman-antijen kompleksine bağlanan CD2 molekülü ve antijen ile bağlanmış olan BCR kompleksi CR2-CD19-CD81 kompleksini oluşturarak sinyal amplifikasyonu sağlanır. Aktive olan B hücrelerinde MHC Sınıf II molekül ekspresyonu artırılır, B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86) kostimülatör molekül ekspresyonu sağlanır. B hücreleri TLR'ler aracılığı ile de aktive olmaktadır. B hücreleri lipid, nükleik asit, polisakkarit gibi antijenleri tanıyan TLR-2, TLR-3, TLR-

4, TLR-5, TLR-7 ve TLR-9 eksprese ederler. Bu reseptörleri aracılığı ile B hücreler antijenleri tanıyarak aktive olmaktadır [129, 130].

T hücre bağımlı B hücre aktivasyonunda ise protein yapıdaki antijenin antijene özgü CD4+ T hücreler aracılığı ile antijene özgü B hücrenin aktivasyonu sağlanmaktadır. Sekonder lenfoid organlarda T hücreler T hücre zonlarında bulunurken, B hücreleri de B hücre foliküllerinde bulunmaktadır. B hücreleri yüksek oranda özelleşmiş stromal hücreler ve foliküler DC'ler ile birlikte foliküllerde bulunmaktadır [131]. Foliküler DC'ler (FDC) klasik DC'ler gibi antijen işlemesi yapmaz. FDC'ler kompleman ve Fc reseptörü taşıyan ve folikül içerisine immün kompleks halinde antijenin akümüle olmasını sağlayan hücrelerdir. FDC'ler tarafından antijen sunumu B hücrelerin aktivasyonu ve farklılaşması için çok önemlidir [132].

Antijene özgü ve DC tarafından aktive olan T hücresi ile B hücreleri lenf nodu foliküllerinde bir araya gelmektedir. Aktive Th hücreler CCR7 ekspresyonunu azaltarak T hücre zonlarından foliküle doğru, aktive B hücreler de CCR7 ekspresyonlarını artırarak folikülden T hücre zonlarına doğru göç ederler [133]. Protein yapıdaki antijenler B hücrelerinde güçlü bir BCR çapraz bağlanması ve BCR sinyali sağlayamazlar. Protein antijenler endozomal veziküller içinde B hücresi içine alınır, peptid şeklinde işlenerek B hücre yüzeyinde sınıf II MHC molekülleri ile Th hücrelere sunulur. B hücreleri burada APC olarak görev alır. B hücre yüzeyinde bulunan kostimülatör moleküller olan CD80 ve CD86 Th hücre yüzeyindeki CD28' bağlanır. Bağlanma ile uyarıyı alan Th hücresi yüzeyinde CD40L ekspresyonu artarak İL-2, İL-4, İL-5 ve İL-6 gibi sitokinlerin salınımı başlar. B hücre yüzeyindeki CD40 ile CD40L bağlanır. Bu şekilde B hücrelerinde farklılaşma, proliferasyon, izotip değişimi, afinite matürasyonu ve hafıza B hücre oluşumu gibi B hücre aktivasyon mekanizmaları gerçekleşmektedir [52]. Klonal olarak çoğalan B hücreleri antikor salgılayan plazma hücresine dönüşür. Öncelikle İgM tipinde olan antikorlar izotip dönüşümü ile İgG, İgA ya da İgE tipinde antikorlar haline gelmektedir. BCR'de meydana gelen somatik hipermutasyonlar ile afinite matürasyonu prosesi gerçekleşerek bu antikorlardan antijene yüksek afinite ile bağlanabilenler seçilir [134]. Aktive olan B hücrelerinin bir kısmı yüksek afiniteli antikor salgılayan plazma hücresine dönüşürken, bir kısmı da hafıza B hücrelerine dönüşmektedir. Bu hücreler de antijen ile tekrar karşılaştıklarında hızlı bir salgısal immün yanıt oluşturabilen

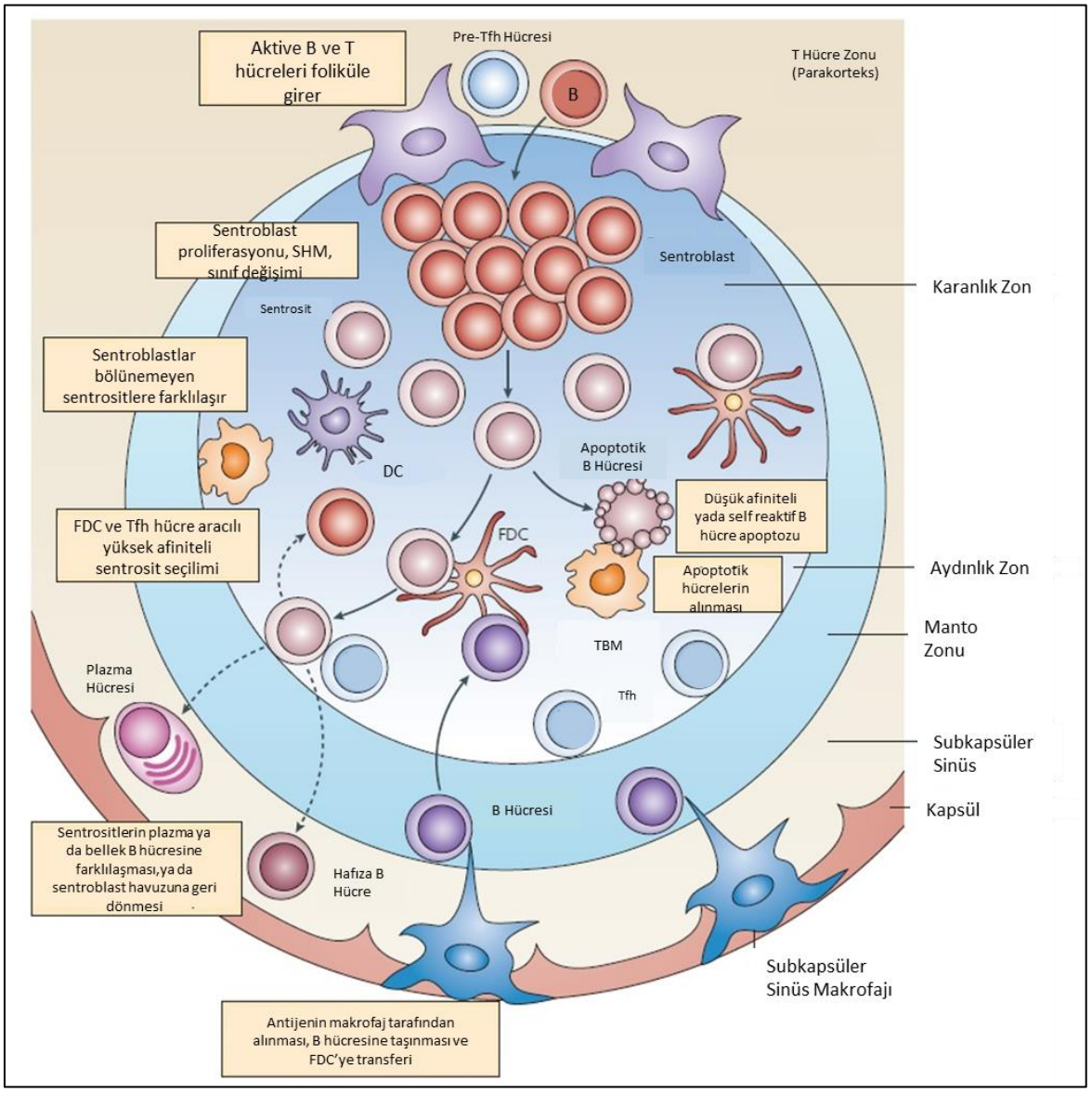
hücrelerdir. T hücre bağımlı B hücre aktivasyonu germinal merkez reaksiyonları ve ekstrafoliküler alanlarda meydana gelen reaksiyonlar sonucu oluşmaktadır [84].

Germinal merkez reaksiyonları

Germinal merkezler ilk olarak Walther Flemming tarafından mitoz bölünmedeki lenfosit kümeleri olarak tanımlanmıştır. B hücre foliküllerinde enfeksiyon ya da immünizasyon ile oluşan mikroçevreler olarak tanımlanmaktadır [135]. Oluşumları için T hücrelere ihtiyaç vardır. Lenfoid dokularda B hücrelerinin prolifere olduğu, reseptörlerin sınıf değişimine uğradığı ve antijenlere afinitelerinin arttığı yerlerdir. B hücreleri bu alanlarda uzun süreli antikor salgılayan plazma ve bellek hücrelerine dönüşürler. Bu nedenle germinal merkezler yüksek afiniteli antikor üreten B hücrelerin seçilimi ve gelişimi için çok önemlidir [136]. Ayrıca bu mikroyapıların regülasyonları otoreaktif hücre oluşumu açısından da çok önemlidir. CD4+ T hücre alt grubu olan ve FoxP3^{+} regülatör T hücrelerden köken alan regülatör T foliküler hücreler (Tfr: *Regulatory T follicular cells*) germinal merkez yanıtlarını baskılar. Tfh hücreler ile birlikte germinal merkez regülasyonu yaparlar. Tfh hücreler germinal merkezlerin pozitif yönden büyüklük ve verimini regüle ederken, Tfr hücreler negatif regülatör olarak görev alır. Tfh sayı ve fonksiyonunu artırıcı ve Tfr hücrelerini baskılayıcı stratejiler geliştirilerek üretilen aşılar ile germinal merkez reaksiyonlarını artırarak aşılama ile daha güçlü yanıtlar oluşması sağlanabilir [137, 138].

Germinal merkezler iki ayrı kompartmandan oluşmaktadır. Karanlık zon (DZ: *dark zone*) olarak tanımlanan kısım CXCL12 üreten retiküler hücrelerden oluşur. Bu kısım B hücre proliferasyonu ve somatik hipermutasyonun meydana geldiği bölgedir. Sentroblastlar CXCR5 ekspresyonu ile CXCL13 gradientini takip ederek aydınlık zona (LZ: *light zone*) sentrosit olarak girer [139]. Burada sentrositler foliküler DC'ler tarafından sunulan antijeni yakalar. Foliküler T hücrelerden aldıkları sinyaller ile karanlık alana tekrar geçerek germinal merkezi antikor sentezleyen plazma hücresi ya da hafıza hücresi olarak terk etmek üzere somatik hipermutasyon ve proliferasyon aşamalarını geçirirler. Sentrositler; kıvrımlı çekirdekleri olan küçük ya da büyük B lenfositlere verilen ad iken, sentroblast oval veya yuvarlak, çekirdeği kıvrımsız ve çekirdeğin dışında birkaç adet çekirdekçik içeren büyük B lenfositlerdir

[140, 141]. Germinal merkez yapısı ve yer alan hücreler Şekil 2.5.'te gösterilmiştir [142].



Şekil 2.5. Germinal Merkezde bulunan hücreler ve meydana gelen olaylar [142].

B hücrelerinin protein antijene bağlanma yeteneği sekonder lenfoid organlarda ve lenf foliküllerinin kendine özgü mikroçevresinde, T hücre bağımlı olarak meydana gelmektedir. Protein antijene özgü aktive Tfh hücrelerinden gereken sinyali alan B hücreleri germinal merkezlerde aktive olarak antikor salgılayan plazma hücrelerine ve hafıza B hücrelerine dönüşür. Germinal merkezlerin indüksiyonu, antijene özgü B hücrenin CXCR5 ekspresyonunu artırması ve CXCL13 eksprese eden foliküler DC'ler (FDC) tarafından çekildikleri B hücre foliküllerine doğru göç ettikleri için

başlatılır. FDC'ler, B hücre yanıtlarında önemli rol almaktadır. FDC'ler, antijene özgü B hücre ve Tfh hücrelerini çekerler ve uzun süreler boyunca antijeni tutarlar. FDC'lerden ve Tfh hücrelerinden, özellikle İL-21 yoluyla aktivasyon ve hayatta kalma sinyalleri alan B hücreleri, klonal proliferasyona uğrar [139, 143]. Bu proliferasyon, İgM'den İgG, İgA veya İgE'ye doğru İg sınıfı değiştirme rekombinasyonu ve B hücrelerinin kendi spesifik antijenleri için afinitesinin olgunlaşması olaylarını başlatır. Somatik rekombinasyon ve afinite maturasyonu ile daha yüksek antijen bağlama kapasitesine sahip yüksek miktarda antikor üretimi ile sonuçlanır [6] . Germinal merkez reaksiyonunun gelişimi için birkaç hafta gereklidir. Protein aşı antijenlerine karşı hipermutasyona uğramış İgG antikorları 10-14 gün sonra kanda görülmeye başlar. Reaksiyonlar yaklaşık 3-6 hafta içinde sonlandırır. Bu süre boyunca çok sayıda antijene özgü plazma hücresi üretilir. DC, B hücresi, Tfh hücresi ve FDC etkileşimlerinin kalitesi germinal merkez reaksiyonlarının gücünü belirlemektedir. Bu durum B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasının yoğunluğunu kontrol eder ve 4- 6 hafta içinde İgG tipi aşı antikorunun tepe noktasına ulaşmasını sağlar [144].

Protein antijenler ile başarılı bir aşılama farklılaşmış, olgunlaşmış ve antijen ile aktive olmuş B hücrelerinin, sınıf değişimine uğramış uzun süre yaşayabilen hafıza B hücresine dönüşümüne dayanır. Bu aşamada germinal merkez reaksiyonları çok önemlidir. Alum adjuvanları ile güçlü bir Th2 yanıtının oluştuğu bilinmektedir. Alum adjuvanı ile birlikte verilen antijenin CD4+T hücre ile kontaktı B hücre foliküllerine migrasyonuna ve merkezi hafıza CD4+ T hücre gelişimine neden olmaktadır. Bu CD4+ T hücreleri klonal ekspansiyon ile çoğalarak drene olunan lenf düğümünden uzaktaki antijen bulunmayan lenf düğümlerine göç eder. Uzakta bulunan lenf düğümlerindeki merkezi hafıza CD4+ T hücreleri B hücre foliküllerine giderek İL-4 salgılar. Böylece Th2 yönünde ve antikor aracılı bir immün yanıt oluşturulur [145, 146].

Ekstrafoliküler reaksiyonlar

Kemik iliğinde üretilen naif B hücreleri, B hücre reseptörünün (*BCR: B cell receptor*) bağlanabileceği bir protein antijen ile karşılaşıncaya kadar lenf düğümlerinde bulunmaktadır. Antijen ile bağlanması B hücre aktivasyonunu başlatarak CCR7

kemokin reseptör artışına neden olur. CCR7 kemokin reseptörü antijen spesifik B hücrelerinin lenf nodlarının T hücre zonuna doğru gitmesini sağlamaktadır. Bu bölgede B hücreleri DC'ler ve T hücreleri ile etkileşime girer ve B hücreleri de aktive edilmiş olur. Bu T hücresi yardımı, B hücre farklılaşmasını, ekstrafoliküler reaksiyon olarak adlandırılan, düşük afiniteli antikorları üreten plazma hücrelerine dönüştürür. B hücre farklılaşması sırasında aktivasyon ile indüklenen deaminaz (*AID: activation induced deaminase*) enzimi ile İgM tipinden İgG, IgA ve İgE gibi antikorlara izotip dönüşümü gerçekleşir. Hem Th1 hem de Th2 tipindeki CD4+ T hücreleri yüzyelerinde bulunan CD40L molekülü ile B hücre üzerindeki CD40 ile bağlanarak bu değişime yardım eder [147, 148]. Ekstrafoliküler reaksiyonlar oldukça hızlıdır. İgM ve düşük düzey İgG tipinde antikorlar, primer aşılamadan birkaç gün sonra kanda tesbit edilebilir. Bu reaksiyonlar sırasında hipermutasyon ya da seçim olmadığı için oluşan antikorlar düşük afiniteli ve oluşsn hücreler kısa ömürlüdür. Çoğu hücre birkaç gün içerisinde apoptoza uğramaktadır. Bu nedenle aşı etkinliğindeki rolleri sınırlıdır [7].

Daha önce de belirtildiği gibi alum adjuvanları DC'ler tarafından üretilen İL-1β ve İL-18 ile gerçekleşen Th2 yanıtlarına neden olmaktadır. Elde edilen Th2 tipindeki yanıtların ile antijene özgü antikor üretimine neden olduğu bilinmektedir [40, 107]. Ayrıca alum adjuvanının İL-4, İL-1, İL-6, İL-10, İL-13, GATA-3 ce CXCR5 gibi moleküller aracılığı ile antikor yanıtlarını arttırdığı gösterilmiştir [40]. Jordan ve ark. yaptıkları in vivo çalışmada alum adjuvanı ve NP-BSA antijeni ile enjeksiyon sonrası dalakta Gr1+ hücre akümülasyonu olduğunu ve bu hücrelerin İL-4 salgıladıklarını saptamıştır. Bu hücrelerin dalakta B hücre akümülasyonu ve antikor salgılaması için gerekli hücreler olduğu saptanan İgM tipi antikorlar ile gösterilmiştir [149]. Cain ve ark. 3 farklı alum adjuvanı ile yaptıkları çalışmada artan antikor yanıtlarının, enjeksiyon sonrası oluşan inflamasyon aracılığı ile gerçekleştiğini göstermiştir. Farelere uygulanan intraperitoneal enjeksiyon sonrası ELISA yöntemi ile İgM ve İgG tipinde antijene özgü antikorları ve yüksek afiniteli İgG tipinde antikorların varlığı gösterilmiştir [150]. Grasse ve ark. difteri ve tetanoz multivalan aşılar ile oluşan hümoral immünizasyonda, difteriye karşı oluşan uzun dönem immün yanıtın yaşlılarda daha zayıf olduğunu ortaya koyarak aşı ile birlikte Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktörü (GM-CSF) farelere uygulayarak yaptıkları çalışmada, tek başına aşı ile oluşan antikor yanıtlarından daha yüksek bir antikor yanıtı ve daha

spesifik bir CD4+ T hücre yanıtı saptamıştır. Ayrıca GM-CSF uygulaması ile daha yüksek oranda MHC sınıf II molekülü eksprese eden ve daha çok miktarda dalak CD11b+ hücresi saptamıştır. Ayrıca GM-CSF uygulaması ile enjeksiyon bölgesine daha çok CD11b+ DC toplandığı görülmüştür [151].

Tetanoz toksoidi ve difteri toksoidi ile yapılan immünizasyonlar sonrası antikorların varlığı ve izotiplerinin belirlenmesi hem hayvan deneylerinde hem de insanlarda yapılan çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. İnsanlarda, anti tetanoz ve anti difteri toksoid antikorların varlığının gösterilmesi hem bireylerin enfeksiyon riskini belirleme açısından hem de aşılama programlarının etkinliğinin gösterilmesi açısından kullanılmaktadır. İgM tipi antikorlar akut enfeksiyonu gösterirken, oluşan İgG tipi antikorlar hastalığın geçirildiğini ya da aşı ile immünizasyon sağlandığını göstermektedir. Ayrıca insan ve hayvanlarla preklinik ve klinik çalışmalarda yapılan antikor çalışmalarında da aşıların ve adjuvanların etkinlikleri saptanabilmektedir.

Toksoid aşılar ile oluşan antikorların nötralizan özellikte olması gerekmektedir. Bu amaçla, oluşan antikorların nötralizan etkisi *in vitro* ya da *in vivo* yöntemler ile belirlenebilir. Pasif hemaglutinasyon, ELISA, toksin bağlanma inhibisyonu (TOBI: toxin-binding inhibition) testi gibi antikorların nötralizasyon etkinliklerini saptamada kullanılan birkaç serolojik yöntem bulunmaktadır. *in vivo* olarak çoğunlukla aşı ile immünizasyon sonrası deney hayvanına ilgili toksinin verilerek sağkalımların belirlenmesi olarak test edilen “challenge” deneyleri kullanılmaktadır. *in vitro* toksin nötralizasyon belirlemede ise hayvanlar immünize edilerek elde edilen serumlarının *in vitro* ortamlarda toksinleri nötralize etme kapasitesi ölçülmektedir. Bu amaçla VERO hücreleri gibi difteri toksinine duyarlı olduğu bilinen hücre hatları kullanılarak sitotoksisite deneyleri yapılmaktadır [152-154].

Gupta ve ark. yaptıkları çalışmada tetanoz toksoidi ile immünize fare ve kobaylarda ELISA metodu ile anti tetanoz toksoid İgG antikorlarını belirlemiştir. 5Lf tetanoz toksoidini tek başına ve alum adjuvanı ile birlikte farklı zamanlarda uygulayarak oluşan İgG tipi antikorların miktarları saptanmıştır. Ayrıca farelerde oluşan antikorların nötralizan özellikte olup olmadığı, fareler immünize edilerek alınan serumların tetanoz toksini ile 1 saat inkübasyonu sonrası tekrar farelere uygulanarak sağ kalımın belirlenmesi ile saptanmıştır. Tetanoz toksoidinin farelere

30 gün ara ile 2 defa uygulanmasından 2 hafta sonra alınan serum örnekleri ile tek doz uygulanmasından 8 hafta sonra alınan serum örnekleri karşılaştırıldığında, benzer İgG ve nötralizasyon titreleri elde etmişlerdir [155]. Farzad ve ark. farelerde yaptıkları çalışmada biri tetanoz aşısı diğeri pürifiye tetanoz toksoidi olan iki farklı toksoid ile immünize ettikleri farelerde, çeşitli zamanlarda fare serumları elde ederek farklı izotiplerdeki antikor yanıtlarını değerlendirmiştir. Çalışmalarında İgG1, İgG2a, İgG2b, İgG3, İgM ve İgA tipindeki antikorlar ELISA metodu ile saptanmıştır [156].

Sonobe ve ark. kobaylar ile yaptıkları çalışmada, difteri ve tetanoz toksoidleri ile immünizasyon sonrası modifiye ederek geliştirdikleri TOBI yöntemi ve *in vivo* toksin nötralizasyon testi ile karşılaştırmalı olarak oluşan antikorları ve nötralizasyon özelliklerini saptamışlardır. Her iki yöntem ile oluşan antikorların seviyeleri benzer bulunarak kullanıma uygun olduğu sonucu elde edilmiştir [157]. Benzer bir çalışmada Kreefternberg ve ark. difteri tetanoz boğmaca, difteri tetanoz polio ve difteri tetanoz polio olmak üzere 3 farklı aşı ile difteri toksoidine karşı oluşan antikor yanıtlarını değerlendirdikleri çalışmada *in vivo* ve *in vitro* olarak titrasyon karşılaştırması yapmışlardır. VERO hücreleri kullanarak yapılan in vitro çalışmada ve immünizasyon sonrası toksin uygulayarak yaptıkları in vivo çalışmada birbirine benzer sonuçlar elde ederek, letal doz ile etkinlik belirleme çalışmalarının yerini *in vitro* çalışmaların alabileceği ortaya koyulmuştur [158].

Reder ve ark. tetanoz, difteri ve boğmaca toksoinlerine karşı oluşan İgG tipi antikorları saptamada ELISA ve manyetik boncuk bazlı multipleks ELISA yöntemlerini karşılaştırmıştır. Piyasada mevcut olarak bulunan ELISA kitleri ile *in-house* olarak geliştirdikleri ELISA yöntemini multipleks ELISA ile karşılaştırarak, yöntemler arasında benzer sonuçlar elde etmişler ve multipleks ELISA ile oluşan antikor yanıtlarının saptanabilirliğini göstermişlerdir [159]. Brezilya'da 2004 yılına kadar çocukluk çağı aşılamasından sonra 15 yaş sonrası herhangi bir pekiştirici doz uygulamasının resmi olarak yapılmaması ve bu nedenle difteri toksinine karşı oluşan antikorların koruyuculuğunun test edildiği çalışmada, antikorların nötralizan özelliği VERO hücre nötralizasyon testi ile belirlenmiştir. Tüm bireylerin %30.7'sinin antikor titreleri <0.01 IU/ml, %42.'inin 0.01-0.09 IU/ml arasında ve %27.1'inin koruyucu olarak kabul edilen ≥ 0.1 IU/ml değerinin üzerinde olduğu saptanmıştır [160].

2.2. Aşılar ve Çeşitleri

Aşıların tarihçesi Çin'de 1100'lü yıllarda başlayarak Afrika ve Türkiye'de de yapılan çiçek hastalığını önlemeye yönelik uygulamalara dayanmaktadır. Bu uygulamalarda çiçek hastalığı veziküllerinden elde edilen sıvılar kişilere uygulanmıştır. Uygulamalar zaman zaman ağır komplikasyonlara neden olsa da modern aşılamanın temellerini oluşturmuştur [161]. Daha sonraları Edward Jenner'ın 1796 yılında başarılı bir şekilde inek çiçeği materyalini kullanmasıyla başlayan yenilikleri, uygulamayı hızla yaygınlaştırmıştır. Bu yöntem sonraki 200 yıl içerisinde geliştirilerek sonunda çiçek hastalığının eradikasyonu ile sonuçlanan bir süreci başlattı. Louis Pasteur'un 1885 yılında geliştirdiği kuduz aşısı ise insanda görülen hastalıklar üzerinde etkili olan ikinci aşı olmuştur [162]. Bakteriyoloji alanında meydana gelen yenilikler ile de 1930'larda difteri, tetanoz, şarbon, kolera, veba, tifo, tüberküloz ve daha fazlasına karşı antitoksinler ve aşılar geliştirildi. Aşı geliştirme çalışmaları için en aktif zamanlardan biri 20. yüzyılın ortalarıdır. Bu yıllarda araştırmacılar, kızamık, kabakulak ve kızamıkçık gibi yaygın çocukluk hastalıklarını hedef alarak bu hastalıklara yönelik aşılarla hastalık yükünü büyük ölçüde azaltmıştır [163].

Günümüzde rekombinant DNA teknikleri, yeni taşıyıcı sistemler gibi yenilikçi yöntemler aşı çalışmalarına yön vermektedir. Aşı hedefleri genişlemiş, enfeksiyon etkenleri dışında da bağımlılık, alerji, kanser gibi pek çok alanda aşı geliştirme çalışmaları yapılmaktadır.

Dünya'da enfeksiyon hastalıkları için kullanılan aşı tipleri viral aşılar (attenüe canlı viral aşılar, inaktive-ölü aşılar, subunit aşılar) ve bakteriyel aşılar (tam hücreli aşılar, toksoid aşılar, subunit aşılar, polisakkarid aşılar) ve kombine aşılardır. Bu aşıların farklı formlarının bir arada kullanıldığı aşılar da bulunmaktadır. Aşılar İntramusküler (İM), intravenöz (İV), dermal, intradermal, deri altı (subkütan), intranazal ya da oral yollarla uygulanabilmektedir. Aşıların veriliş yolu, etkinlik çalışmaları yapılarak belirlenmektedir [164].

2.2.1. Attenüe (zayıflatılmış) canlı aşılar

Attenüe canlı viral aşılar, virusun 50 ya da daha fazla sayıda pasajlanarak anormal koşullar altında uzun süreler çoğaltılması ile oluşturulmaktadır. Günümüzde halen pek çok aşıda kullanılmakta olan suşlar 1960'lı ve 1970'li yıllarda oluşturulmuştur. Bu suşlarda virülans zayıflatıldığı için hastalık tablosu oluşmadan bağışık yanıt oluşturulur. Zayıflatılmış aşı enjeksiyon yapılan kişide çoğalarak doğal enfeksiyona benzer şekilde antijenik uyarım yapmaktadır. Bu nedenle sadece birkaç doz uygulandığında bile ömür boyu kalıcı immünolojik hafıza oluşturur. Bunun yanında kullanımları bazı koşullarda limitlidir. Az miktarda da olsa canlı virüs içerdikleri için organ nakli yapılan, bağışıklık sistemi zayıflatılmış ya da uzun süreli sağlık sorunları yaşayan kronik hastalığa sahip kişiler ve gebelerde uygulaması kısıtlıdır. Ayrıca soğukta saklanma koşullarına gereksinim duyulduğu için bu koşulları sağlayamayan ülkelere transferi de bozulmalara neden olabilmektedir. Kızamık, kabakulak, kızamıkçık (KKK kombine aşı), Rotavirüs, çiçek, suçiçeği, sarıhumma gibi aşılar attenüe canlı aşılara örneklerdir [165, 166].

2.2.2. İnaktive (ölü) aşılar

İnaktive aşılar virusların hücre kültürlerinde üretilip, saflaştırılarak bir takım işlemler ile hastalığa neden olmayacak hale getirilmesi ile oluşturulmaktadır. Virüs saflaştırma sonrası ısı ya da formaldehit benzeri kimyasallar kullanılarak inaktive edilir. İnaktivasyon aşamasında dikkat edilmesi gereken iki önemli nokta vardır. Birincisi inaktivasyon işlemi sırasında antijenlerin zarar görmemesidir. Antijen zarar gördüğü takdirde bağışık yanıt oluşturulamaz ve aşı etkisiz hale gelir. İkincisi ise inaktivasyon ile tüm patojenlerin etkisiz hale geldiğinin gösterilmesi gerekmektedir. Genellikle canlı aşılar kadar güçlü bir immün yanıt oluşturamazlar. Bu nedenle bağışıklığın sürdürülebilmesi için birden fazla doz ile pekiştirme yapılmasına gerekmektedir. Hepatit A, influenza, kuduz aşıları inaktive aşılardandır [167, 168].

2.2.3. Subunit (alt birimli) aşılar

Canlı aşılarda oluşabilecek patojenite dönüşümünün önüne geçilebilmesi için geliştirilmiş aşılardır. Bu aşılar virüs ya da bakterilerin yalnızca belirli antijenlerinin

kullanılması ile oluşturulmaktadır. Bu aşılar yüksek ölçüde saflaştırılmış antijen içermektedir. Bu antijenlere karşı spesifik güçlü bir immün yanıt oluşmaktadır. Trivalan ya da tetravalan olarak geliştirilmiş influenza aşıları bu tür aşılara örnektir [165].

Rekombinant DNA aşıları

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak ile geliştirilmiş aşılar alt birimli aşılardır. Bu aşılar bakteri, maya ya da hücre kültüründe klonlanmış bir plazmid aracılığı ile protein antijenin üretilmesi temeline dayanmaktadır. Üretilip saflaştırılan antijen bir adjuvan ile birlikte kullanılmaktadır. Bu şekilde hazırlanıp kullanımda olan ilk aşı Hepatit B aşısıdır. Hepatit B yüzey antijeni (HbsAg) üretilip saflaştırılarak aşı olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem ile HIV, EBVi kolera gibi hastalıklar için aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir [169, 170].

Bakteri alt birim aşıları

Bakteriler için de geliştirilmiş olan tam hücre aşıların etkilerini azaltmak için bakteri alt ünite aşıları da geliştirilmiştir. Bu aşılara en iyi örnek aselüler boğmaca aşısıdır. Bu aşı *Bordatella pertussis* adı verilen bakterinin filamentöz hemaglutinin, fimbria gibi yüzey antijenleri ile pertussis toksoidi kullanılarak hazırlanmaktadır. Bakterinin belirli antijenleri kullanılması sebebiyle hastalık yapma potansiyeli yoktur [171].

Polisakkarit konjuge aşılar

Polisakkarit aşılar T hücre bağımsız uyarım yaptıkları için güçlü ve uzun süreli bir bağışık yanıt oluşturamazlar. Polisakkaritler doğrudan B hücre ile etkileşime girerek patojenlerin fagositoz ile alınması ile sonuçlanan özgül antikor yanıtını uyarmaktadır. Zayıf bir immün uyarım yaptıkları için konjuge polisakkarit aşılar olarak kullanımı yaygındır. Tetanoz toksoidi gibi bir protein ile konjuge edilerek kullanılmaktadır. Böylece T hücre bağımlı bir uyarım yapılarak daha uzun süreli immün hafıza oluşturulur. Pnömokok aşıları konjuge polisakkarit aşılara örnektir [172, 173].

2.2.4. Toksoid aşılar

Toksoid aşılar da alt ünite aşılardandır. Bu aşılar bakteri toksinlerinin formaldehit ile zararsız hale getirilmesi ile hazırlanmaktadır. Bu şekilde toksinin antijenik özelliği korunurken zararlı etkisi yok edilmektedir. Toksoid aşılaması yapılarak sağlanan bağışıklık ile oluşan antikorlar bakteri toksinine karşı koruma sağlamaktadır. Bakteriler uygun ortamda çoğaltılarak toksin üretilir. Üretilen toksin formalin ile inaktivasyon öncesinde ya da inaktive edilerek toksoid formunda saflaştırılarak kullanılır [174]. Toksoid aşılar, büyük miktarlar veya çoklu dozlar kullanılmadıkça yüksek oranda immünojenik olma eğiliminde değilir. Daha büyük dozların kullanımındaki bir sorun, antijene toleransın indüklenebilmesidir. Bu nedenle çoklu dozlar ve pekiştirme dozları halinde uygulanmaktadır. Adaptif bağışık yanıtın uzun süreli ve yeterince etkili olmasını sağlamak için, aşıya bir yardımcı madde (adjuvan) dahil edilir. Toksoid aşılar, bağışıklık oluşturmak istenilen hastalığa neden olmadıkları için güvenlidirler ve virülansa geri dönme olasılığı yok denecek kadar azdır. Aşı antijenleri aktif olarak çoğalmadığı için aşılanmamış kişilere yayılma gibi bir risk bulunmamaktadır. Ayrıca bu aşılar sıcaklık, nem ve ışık değişikliklerine daha az duyarlı olduklarından çoğunlukla stabil ve uzun raf ömrüne sahiptirler. bu avantajların yanında daha önce de belirtilen adjuvan ve birkaç doz uygulama gereksinimi ve aşı bölgesinde oluşabilecek lokal reaksiyonlar dezavantajlarıdır. Bu reaksiyonlar adjuvan kaynaklı ya da tip 3 hipersensitivite reaksiyonlarına bağlı olabilir. Genellikle aşılamadan birkaç saat sonra enjeksiyon bölgesinde kızarıklık ve sertleşme olarak başlar ve genellikle 48-72 saat içinde düzelir. Reaksiyon, toksoid ile ona karşı oluşan antikorların meydana getirdiği immün kompleksin kompleman aktivasyonuna neden olarak lokal inflamatuar bir reaksiyondur. Tetanoz ve difteri toksoid aşıları bu aşılara verilebilecek en iyi örneklerdir. Bu toksoidler yıllardır primer immünizasyonda ve erişkin aşılamada alum adjuvanları ile birlikte sıklıkla kullanılmakta ve başarılı sonuçlar alınmaktadır [14, 175].

2.2.5. Yeni nesil aşılar

Gelişen biyoteknoloji alanındaki yenilikler ve kullanılan teknikler ile temeli yıllar öncesine dayanan günümüzde de gelişimi devam eden bazı aşı tipleri vardır. Bunlar rekombinant vektör aşılar, sentetik peptid aşılar ve nükleik asit aşılarıdır.

Rekombinant vektör aşılar

Bu aşılarda, canlı replike olan virus vektör olarak kullanılmaktadır. Vektör bağışık yanıt oluşturmak istediğimiz antijen genlerini taşımak üzere genetik mühendisliği teknolojileriyle oluşturulmuştur. Kullanılan virus zayıflatılmış hastalık yapmayan bir virus olarak seçilir. Adenovirus, lentivirus ya da retroviruslar bu anlamda kullanılan viruslaradır. Virus replikasyonu ile aşı yanıtı geliştirilmek istenen antijen üretilerek immün yanıt oluşturulur [176].

Sentetik peptid aşılar

Sentetik peptid aşılar, bağışıklama sağlamak istenen enfeksiyon etkeninin immünolojik protein komponentlerinin in vitro ortamda sentezlenir. Elde edilen peptidler aşı olarak kullanılır. Çeşitli virüs, bakteri ve parazitlere karşı geliştirilmiş sentetik peptid aşılar bulunmaktadır. Bu aşılarda peptidler kullanıldığı için enfeksiyon etkeninin üreme ve hastalık yapma potansiyeli yoktur. Bu nedenle güvenlidir. Üretimde en önemli aşama epitop dizaynıdır. Bu nedenle öncelikle uygun bir epitop dizaynı yapılmalıdır. Bu epitoplar bağışıklanma istenen patojene karşı güçlü, uzun süreli ve hümoral ve/veya hücresel immün yanıt oluşturmalıdır [177].

Nükleik asit aşıları

Nükleik asit aşılarında, antijenik proteini kodlayan nükleik asit materyali bir ekspresyon plasmidine bağlandıktan sonra doğrudan verilmekte, genin ekspresyonu enjekte edilen hücrelerde gerçekleşmekte, sentezlenen gen ürünü protein de immun sistemi uyararak koruyucu bir bağışıklık oluşturmaktadır. Nükleik asit aşıları, insan ve hayvanlarda hastalık oluşturan virüs, bakteri ve parazitler için denenmiştir. Bu aşılar rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmektedir. Nükleik asit aşıları tek bir antijenik genle monovalent olarak hazırlanabileceği gibi, birden fazla antijenik gen ilave edilerek, aynı anda bir kaç etkene karşı bağışıklık elde edilebilir. Bu aşılar az miktarda inokülasyon gerektirmesi, uzun süreli antijen ekspresyonu sağlayarak güçlü bir immün yanıt oluştuması ve saflık derecesinin yüksekliği gibi avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, nadir de olsa antijenin aşırı uyarımı ve

ekspresyonu otoimmüniteye, ya da nükleik asit materyalinin tümör oluşumuna neden olma olasılığı gibi dezavantajları da bulunmaktadır [178, 179].

2.3. Adjuvanlar

Adjuvan, kendisi immünojen olmayan fakat beraberinde verildiği antijenin immünojenitesini artıran moleküllerdir. Latince yardım etmek anlamına gelen “adjuvare” kelimesinden köken almıştır. Ramon tarafından belirli bir antijen ile kombinasyon halinde uygulandığında, antijenin tek başına oluşturacağı immün yanıttan daha güçlü bir yanıt oluşturan maddeler olarak tanımlanmıştır [5, 180]. Aşılarda temel hedef güçlü, koruyucu ve uzun süreli bir immün yanıt oluşturmaktır. Mikroorganizmanın attenüe edildiği (hastalık yapıcı özellikleri azaltılmış fakat çoğalma kapasiteleri devam eden), zayıflatılmış formunun kullanıldığı canlı aşılarda, doğal olarak enfeksiyon ile gelişene yakın bir immünite gerçekleşmektedir. Bu nedenle canlı aşılarda adjuvana gerek duyulmamaktadır [181]. Tam hücreli aşı gibi bir mikroorganizmanın tamamının öldürülerek kullanıldığı ya da belli bir kısmını içeren alt birim aşılara ölü aşı denmektedir. Canlı aşılara göre daha az immünojenik olan ölü aşıların istenilen derecede immünizasyon oluşturabilmesi için birkaç defa ve adjuvan ile birlikte uygulanması gerekmektedir. Son yıllarda aşıların yan etkilerini azaltmak amacıyla geliştirilen yeni teknolojilerle aşılarda kullanılan antijenler çok daha saf halde, hatta rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmektedir. Bu aşıların immünojenik etkisi düşük olduğu için ve güçlü, etkili ve kalıcı bir immün yanıt oluşturabilmesi için güçlü adjuvanlara ihtiyaç duyulmaktadır [182].

Adjuvanların genel olarak kullanım amaçları şunlardır:

- Zayıf uyarım yapan antijenlerin immünojenitesini artırmak,
- Daha hızlı ve daha uzun süreli immün yanıt oluşturmak,
- Hümoral immün yanıtları uyarmak ve izotip değişimini modüle etmek,
- Hücresel immün yanıtı uyarmak,
- Mukozal immün sistemi indüklemek (antijenlerin mukozadan alınarak immün yanıt oluşmasını sağlamak),
- Aşının yenidoğanlar ve immünyetmezliği olan kişilerde etkinliğini artırmak,

- Yeterli immün yanıt elde edebilmek için gereken antijen dozunu ya da aşılama sayısını azaltmak ve aşı maliyetlerini düşürmek [183].

Aşı geliştirme çalışmalarının çeşitli aşamalarında değerlendirilen ve halihazırda aşılarda kullanımı mevcut olan pek çok adjuvan bulunmaktadır. Geliştirilecek olan bir aşı için seçilecek olan adjuvan seçiminde pek çok faktör göz önünde bulundurulmalıdır. Güvenlik olmazsa olmaz ilk kuraldır. Güvenilir olmasının yanında, vücut tarafından iyi tolere edilebilir olmalı ve üretim aşamasında ölçeklendirmeye uygun olmalıdır. Ayrıca pH, osmolarite, endotoksin seviyeleri gibi farmasötik kriterler açısından kabul edilebilir değerlerde, antijen ile uyumlu, hücresel veya hümoral ne tür bir korunma isteniyorsa istenilen immünitenin oluşmasını sağlamalı, immün hafıza oluşturmalı, otoimmüniteyi uyarmamalı, mutajenik, karsinojenik ya da teratojenik etkisi olmamalı, biyolojik olarak parçalanabilir olmalı, makul bir raf ömrüne sahip ve ekonomik olarak uygun olmalıdır [184]. Tüm bu parametrelerin oluşturulması zor ve zaman alıcı süreçlerdir. Bu nedenle şu an piyasada mevcut aşılarda belirli sayıda kullanılan adjuvanlar bulunmaktadır. Adjuvanlara bağlı olarak ağrı, inflamasyon, şişlik, enjeksiyon yerinde nekroz, granülomlar, apse ve lenfadenopatiler gibi lokal ve bulantı, ateş, artrit, üveit, alerji, anafilaksi, ve otoimmün hastalıklar gibi sistemik yan etkiler görülebilir [185].

Adjuvanlar alüminyum hidroksit, alüminyum fosfat, kalsiyum fosfat, magnezyum hidroksit, çinko sülfat, demir ve zirkonyum tuzları gibi mineral tuzlar, mikroorganizma bazlı muramil dipeptid (MDP) analogları ve bakteriyel ekzo ve endotoksinler, saponinler, Freud adjuvanı, MF59 ve AS03 gibi emülsiyonlar, sitokinler (IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN-gama) , polisakkaritler, nükleik asitler, lipozom ve virüs benzeri partiküllerden elde edilebilir [186, 187].

2.3.1. Alüminyum adjuvanlar

Aliminyum fosfat ve aliminyum hidroksit gibi 1920'li yıllardan bu yana aşılarda kullanılan mineral tuzların güvenirliliği ve etkinliği oldukça yüksektir. Glenny ve arkadaşları tarafından difteri toksoidinin alum tuzları ile adsorbe olarak kullanımı 1926 yılında gösterilmiştir [188]. O günlerden bu yana alüminyum adjuvanları, her yıl milyonlarca insana yapılan, lisanslı pek çok çeşitli milyarlarca doz aşıda

kullanılmaktadır [189]. Bu başarı aliminyum adjuvanlarının pek çok antijen ile başarılı bir şekilde etkileşime girebilmesi, güvenli olması, minimal bir reaktojenik aktiviteye sahip olması ve ucuz olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca firmalar tarafından kullanıma uygun çeşitli formları ile kullanımda kolaylık sunulmaktadır [190].

İlk alüminyum içeren adjuvanlar, alüminyum potasyum sülfatlı bir solüsyonun adjuvan solüsyonuna eklenmesi ve adjuvan ve alüminyum tuzunun çöktürülmesi ile oluşturuldu. Aşıların antijenlerin alum ile birlikte çöktürülmesi ile hazırlanması yerini daha önceden hazırlanmış alüminyum jellere adsorbe edilmesine bırakmıştır [191]. Alum kelimesi alüminyum potasyum sülfat çözeltisinin adı olsa da günümüzde tüm alüminyum adjuvanlar için kullanılmaktadır.

Piyasada mevcut olarak kullanılan lisanslı aşılarda alüminyum hidroksit ve alüminyum fosfat olmak üzere iki adet alüminyum adjuvanı bulunmaktadır. Bu adjuvanlar aşı şirketi içerisinde üretilir ya da başka şirketlerden satın alınır. Farklı adjuvanlar farklı fizikokimyasal ya da biyolojik özellikleri açısından farklılık gösterebilir [192].

Alüminyum hidroksit genellikle alüminyum klorür ($AlCl_3$) ya da alüminyum potasyum sülfatın ($AlK(SO4)_2$) sodyum hidroksit (NaOH) ile karıştırılması ile elde edilir. Alüminyum fosfat, $AlCl_3$ or $AlK(SO_4)_2$ gibi bir alüminyum tuzu çözeltisi ile fosfat çözeltisinin karıştırılması ve sodyum hidroksit ile çöktürülmesi ile oluşturulur. Alüminyum hidroksit kristalize olmuş bir iğneye benzerken, alüminyum fosfat ise amorf gevşek agregatlar olarak görülmektedir. Alüminyum hidroksit için Allhydrogel ve alüminyum fosfat için Adju-phos adında hazırlanan kullanıma hazır preparatlar bulunmaktadır [191]. Antijenlerin alüminyum ile etkileşimi, elektrostatik, fosfat ligand değişimi, hidrojen bağları ve van der Waals etkileşimleri ile gerçekleşmektedir [193].

Alüminyum adjuvanları ile yapılan ilk çalışmalarda T hücre proliferasyonlarını artan İnterlökin 1 (İL-1) sitokini aracılığı ile yaptığı gösterilmiştir. Alum adjuvanlar NLRP-3 inflamazomları aktive ederek ya da membran lipidlerine bağlanarak dendtritik hücre aktivasyonu yapmaktadır. Bu şekilde İL-1β aktivasyonu sağlamaktadır [39]. Günümüzde alüminyum adjuvanların yardımcı T hücre 2 (Th2) eğilimli bir antikor

uyarımı yaptığı bilinmektedir. İnterlökin 4 (İL-4) geni defektif olan farelerde yapılan bir çalışmada, farelere ovalbumin ile alum adjuvanı verildiğinde (OVA+$Al(OH)_3$), ovalbumin ile Freund tam adjuvanı (OVA+FCA) verildiğindekine benzer şekilde İgG2a tipinde antikor yanıtı görülmüştür. Bu tip antikorlar genellikle Th1 yanıtı sonrası oluşmaktadır. OVA+$Al(OH)_3$ verilen grupta Th2 tipi yanıtta görülen IL-5 sitokini salgılandığı da saptanmıştır. OVA+FCA verilen grupta ise İL-5 salınımına rastlanmamıştır. İnterlökin 18 (İL-18) sitokininin alum adjuvan mekanizmalarındaki ve Th2 tipinde immün yanıttaki rolü de gösterilmiştir. İL-18 defektif farelerde OVA+$Al(OH)_3$ ile immünizasyon sonrası, vahşi tip farelere göre lenf nodu hücrelerinde azalmış IL-4 üretimi görülmüştür. Dışarıdan IL-18 eklediklerinde ise Th2 yanıtının arttığını görmüşlerdir [194].

Alum adjuvanları hümoral immün yanıt oluşturarak antijenlere karşı koruma sağlamaktadır. Bu nedenle korunmada hümoral immün yanıtın gerekli olduğu hastalıklarda etkilidir. Hücresel immün yanıtın gerekli olduğu hastalıklarda ise başarısızdır. Ayrıca oral ve intranazal uygulamalar için de uygun değildir. Mukozal immün yanıtın başlıca elemanlarından biri olan IgA sentezini uyaramazlar. Alüminyum adjuvanları, Th2 immün yanıtı indükleme ve buna bağlı artan eozinofil ve immünoglobulin (İg) E üretimi ile alerji ve anafilaksi riskini artırır [185, 195].

Alüminyum adjuvanları depo etkileri ile enjeksiyon bölgesinden antijenin difüzyonunu yavaşlatarak inflamatuar hücre kemotaksisi için zaman kazandırır. Böylece antijene karşı verilen immün yanıtın şiddeti artırılmış olur. Antijen sunucu hücreler tarafından endositoz ile hücre içine alınmasını artırır, fagotsitozu kolaylaştırır. Dendritik hücreleri doğrudan ve dolaylı olarak aktive ederler [40]. Alüminyum adjuvanlarının difteri ve tetanoz toksoid aşılarda adsorbe olarak kullanımı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından önerilmektedir [196].

2.3.2. Kalsiyum fosfat adjuvanlar

Kalsiyum fosfat adjuvanı ilk olarak Pasteur Enstitüsü tarafından geliştirilmiştir. Fransa'da difteri, tetanoz, boğmaca ve poliomyelit aşılarında kullanılmıştır [197]. 1980'lerin sonunda yerine aluminyum adjuvanları kullanılmaya başlanmıştır. Halen DSÖ tarafından beşeri aşılarda kullanımı onaylı bir adjuvandır [196]. İki şekilde

hazırlanarak kullanılabilmektedir. Birincisi, disodyum hidrojen fosfat ve kalsiyum klorür ile birlikte antijenin çöktürülmesi ile adsorbe edilmesidir. İkincisi ise hazırlanan jel forma direkt olarak adsorbe edilmesidir [197]. Vücudun yapısında bulunduğu için güvenli bir moleküldür. Alüminyum adjuvanlara göre çok daha iyi absorbe olmakta ve çok daha iyi tolere edilmektedir. Alum adjuvanlara göre lokal doku irritasyonu daha azdır. Enjeksiyona bağlı gelişen doku reaksiyonunun 4 hafta içinde kaybolduğu gösterilmiştir. Bu süre alum adjuvanları için 8 haftayı bulabilmektedir. Bu nedenlerle aşılarda alüminyum adjuvanların yerini almaya her an için aday bir maddedir [198].

Kalsiyum fosfatın herhangi bir antijen ile birlikte kullanımı önerilmekle birlikte alüminyum adjuvanlarının mevcut başarısı nedeniyle tam olarak adjuvan mekanizması araştırılmamıştır. Bununla birlikte, Pasteur Enstitüsü 1984'den beri kalsiyum fosfat adjuvanını alerjen desentizasyonu için alerjenleri adsorbe ederek kullanmaktadır. Son yıllarda yeniden kullanıma girmesi konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Klasik süspansiyon ya da jel formundan farklı olarak kalsiyum fosfat nanopartikülleri üretilmiş ve etkinlikleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır [199, 200]. Alum adjuvanların Th2 yönünde immün sistem uyarımı yapmasının aksine kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin dengeli bir Th2/Th1 uyarımı yapma potansiyelinde olduğu düşünülmektedir [201].

2.4. Tetanoz

Tetanoz, anaerobik bir basil olan *Clostridium tetani* bakterisi tarafından üretilen güçlü nörotoksinin neden olduğu, çoğunlukla öldürücü olmakla birlikte aşı ile önlenebilir bir hastalıktır. Tetanoz latince gerilme anlamına gelmektedir [202, 203]. Bildirimi zorunlu bir hastalıktır ve yaygın (jeneralize), neonatal (yenidoğan), lokal ve sefalik olmak üzere temel olarak 4 tip halinde gözlenir [204].

2.4.1. Epidemiyoloji

Tetanozun, aşılama ile insidansı ve mortalite oranları düşüş göstermektedir. Aşı ile kontrol altında tutulabilen bir hastalık olmasına karşın özellikle sosyoekonomik düzeyi düşük, gelişmekte olan bölgelerde halen birçok ölüme neden olmaktadır.

Gelişmiş ülkelerde ise nadiren görülmektedir [203, 205]. Bulaş genellikle yaralanmalar ile bakteri sporların bu yaralardan vücuda girmesi ile gerçekleşir. Trafik kazaları, çivi ya da tahta batması, teneke kesikleri, açık kırıklı yaralar, kirli aletler ile göbek kordonunun kesilmesi, sünnet ve cerrahi işlemler, hayvan ısırması genel olarak bulaşa neden olan olaylardır. Son yıllarda uyuşturucu kullanımı sırasında bakteri sporlarının enjekte edilmesi ile de tetanoz vakaları görülmektedir [206].

Tetanoz vakalarının gerçek sayısını tahmin etmek, sürveyans sistemlerinin tam olarak çalışmadığı sosyoekonomik düzeyi düşük ülkelerde görülmesi sebebiyle zordur. Dünyadaki tetanoz insidansının yaklaşık 100,000'de 18 olduğu düşünülmektedir. Dünya genelinde, mortalite oranı %30 - %50 arasında seyreden, 1 milyondan fazla olgunun meydana geldiği düşünülmektedir [203, 207]. Ölümlerin en az yarısı yeni doğanlarda meydana gelmektedir. Dünyada 2015 yılında yaklaşık 20.000'i yenidoğan olmak üzere 56.000 ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir [208]. Türkiye'de vaka sayıları uygulanan aşılama programları ile birlikte azalmıştır. Ülkemizde 2017 yılında toplam 25 tetanoz vakası görülmüş olup vakaların 2'si ölümle sonuçlanmıştır. Bu vakaların tamamının aşısız olduğu bilinmektedir. Hastalığın ülkemizde aşılama öncesi ve sonrası vaka sayılarının karşılaştırılması çizelge 2.1'de sunulmuştur [209].

Çizelge 2.1. 1980-1984 ve 2010-2014 Hastalık (Tetanoz) Vaka Sayılarının Karşılaştırılması [209]

Hastalık	Aşılama Öncesi Vaka Sayısı*	1980-1984 Vaka Sayısı*	2010-2014 Vaka Sayısı*	Azalma Yüzdesi
Tetanoz	Bildirimi yapılmamıştır. (1963-1967)	110	11	90

*5 yıllık ortalama alınmıştır.

En doğru epidemiyolojik veriler neonatal tetanoz insidansı hakkındadır. Neonatal tetanoz, doğumdan sonraki 28 gün içinde gelişen tetanozdur. Maternal tetanoz ile çok yakın ilişkilidir. Maternal tetanoz ise; doğum, düşük ya da kürtaj ile sonuçlanan

hamilelik sırasında ya da sona ermesinden 6 hafta içinde gerçekleşen tetanoz olarak tanımlanmaktadır. Çoğunlukla gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir [210]. Annenin tetanoz aşısı ile yetersiz bir şekilde bağışıklanması, steril olmayan koşullarda gerçekleşen doğumlar ve kordonun steril olmayan koşullarda kesilmesi ve hijyen kurallarına dikkat edilmemesi gibi nedenler başlıca sebepleridir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) neonatal tetanoz eliminasyonunu her 1000 canlı doğumda 1'den az tetanoz vakası görülmesi olarak tanımlamaktadır [211]. DSÖ ülkemizde maternal ve neonatal tetanozun elimine edildiğini 24 Nisan 2009 tarihinde duyurulmuştur [209].

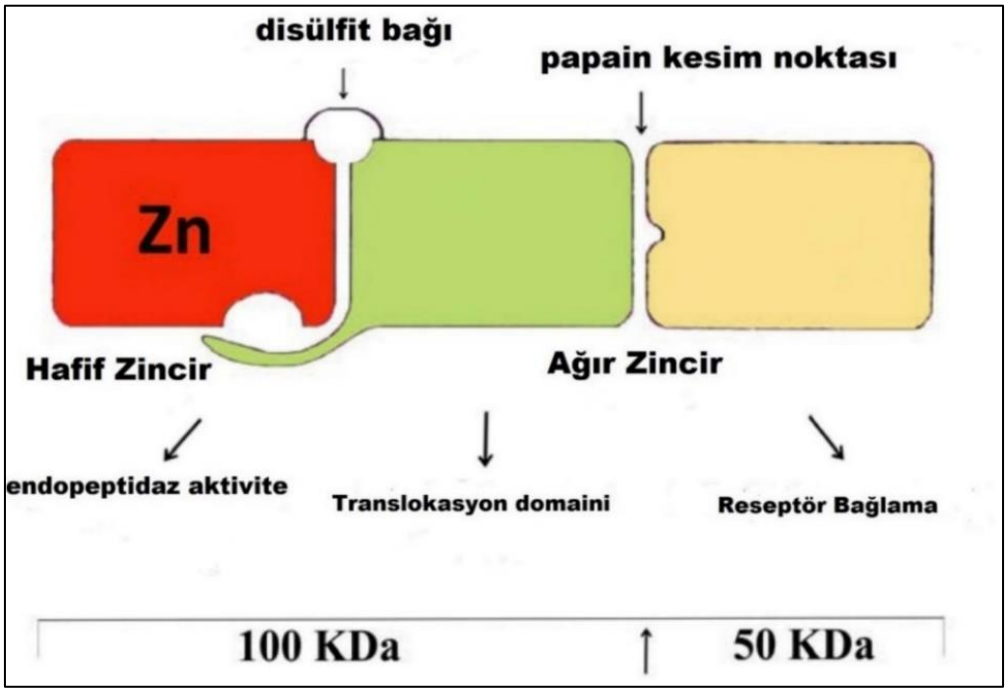
2.4.2. Tetanoz etkeni: *C.tetani* ve toksini

Tetanoz hastalığının etkeni olan *C. tetani*, zorunlu anaerobik, gram pozitif, terminal sporlu, kapsülsüz, hareketli basildir. Dokularda ve eski bakteri kültüründe gram negatif şeklinde de görülebilmektedir. Bakterinin sporlu formu davul tokmağı ya da tenis topu şekline benzetilir. Doğada pek çok yerde, toprakta, insan ve hayvan dışkılarında normal flora elemanı olarak bulunur [212]. Bakterinin aerobik ortamdaki dirençli spor formu, anaerobik ortamda vejetatif basil forma döner. Basil formu dezenfektanlara duyarlı iken, sporlar çok dirençlidir. Sporların eliminasyonu, otoklav ya da gaz sterilizasyonu gibi yöntemlerle sağlanmaktadır. Uygun besiyeri ortamında 37°C'de anaerobik ortamda çoğalır. Besiyerinde R tipi koloniler oluşturur. Kanlı agarda kolonilerin etrafında toksinin neden olduğu hafif bir hemoliz görülürken, gaz ve kötü koku oluşumu tipiktir [204, 213, 214].

C. tetani, somatik (O) ve kirpik (H) antijenlerine göre 10 tipe ayrılır. Bakteri sporları anaerobik ortamda vejetatif forma geçtiğinde çoğalarak tetanospazmin ve tetanolizin adında iki adet toksin üretir. Tetanolizinin patolojik aktivitesi olmamakla birlikte, bir hemolizindir [215]. Tetanoz hastalığına neden olan toksin tetanospazmindir ve tetanoz nörotoksini (TeNT) olarak adlandırılmaktadır [216].

TeNT, 1315 aminoasitten oluşan yaklaşık 150 kD ağırlığında bir proteindir [217]. Yaklaşık 100 kD büyüklüğünde ağır (H) ve 50 kD büyüklüğünde hafif (L) olmak üzere iki adet polipeptid zincirin disülfit bağları ile bağlanması sonucu oluşur [8, 218]. Ağır zincir sinir hücrelerine bağlanma ve proteinin taşınmasından sorumludur.

Hafif zincir ise nörotransmitterlerin salınımını bloke eder. Toksin geni ilk olarak toksijenik E88 suşunda 2003 yılında büyük bir plazmidde tanımlanmıştır. Bu plazmidi taşımayan suşlar non-toksijeniktir [219]. Genom yaklaşık olarak 2.8Mb'lik bir kromozom ve toksini kodlayan 74kb'lik bir plazmid içerir. Bu plazmidin diğer toksijenik *C.tetani* suşları da sekanslandığında yüksek oranda korunaklı olduğu görülmüştür. Ayrıca, bu genin hemen yukarısında, toksin düzenleyici gen (tetR) olan ve toksin geninin transkripsiyonunu pozitif olarak düzenleyen alternatif bir sİgMa faktörünü kodlar. Bu düzenleyici gen botulinum toksin düzenleyici gen ile homologdur. Bununla birlikte TeNT sentezini düzenleyen regülasyon ağı tam olarak bilinmemektedir. Bu düzenleyici mekanizmaların aydınlatılması, etkileyen çevresel faktörlerin belirlenmesi toksin ve dolayısı ile toksoid üretiminin iyileştirilmesi açısından önemlidir [220].



Şekil 2.6. Tetanoz toksini [221].

2.4.3. Patogenez

Tetanoz genellikle *C.tetani* sporlarının yaralardan bulaşması sonucu meydana gelmektedir. Anaerobik koşullarda sporlar vejetatif bakteri formuna dönerek TeNT üretmeye başlar ve bakteriyel otolizis ile ortama salgılanır. Tetanozun inkübasyon periyodu, sporların giriş yaptığı yaralanan bölgenin santral sinir sisteminden

uzaklığına bağlı olarak değişmekle birlikte ortalama olarak 15 gündür. Vücut sıvılarına geçen toksin ana hedefi olan sinir ucu terminallerindeki presinaptik membranlara tutunur. TeNT ‘in C-terminal ucu periferik sinir uçlarında çok miktarda bulunan oligosakkaritlere bağlanma özelliğindedir. Bu durum toksinin ne şekilde presinaptik membranlara tutunduğunu açıklasa da toksinin merkezi sinir sistemine ne şekilde taşındığı konusunu açıklamada yetersiz kalmaktadır. Bir membran molekülü olduğu düşünülen fakat tam olarak bilinmeyen toksinin taşınması işlemine aracılık eden ikinci bir reseptör olduğu düşünülmektedir. Toksin endositoz ile bir vezikül içinde ilerleyerek retrograd yolla sinir hücre gövdesinden, medulla spinalise ve oradan da beyin sapına ulaşır. Sinir büyüme faktörü, kolera toksini ya da lektinler gibi retrograd yolla ilerleyen diğer proteinlerden farklı olarak TeNT somada akümüle olmaz, periferal motor nöronların dendritlerinden inhibitör nöronlara geçer. Bu hücreler inhibitör sinir ileticilerinden olan glisin ve γ-aminobütirik asit (GABA) nörotransmitterleri kullanır. Transmitterlerin salınımının TeNT tarafından bloke edilmesiyle disinhibisyon oluşarak kas tonusu artar, spastik paralizler meydana gelir. Asetilkolin ve nörepinefrin salınımı azalır. Hastalığın ilerlemesi ile asetilkolin salınımı kaybolur ve kas spazmlarına tonik kasılmalar da eklenir. Hastalarda opistotonus adı verilen boyun ve sırt kaslarının kasılması ile oluşan pozisyon meydana gelir. Toksin sempatik sinirleri de etkileyerek, damarlarda daralma, terleme, taşikardi ve ritm bozukluklarına neden olabilir [207, 222, 223].



Resim 2.1. Opistotonuslu bebek görüntüsü [224]

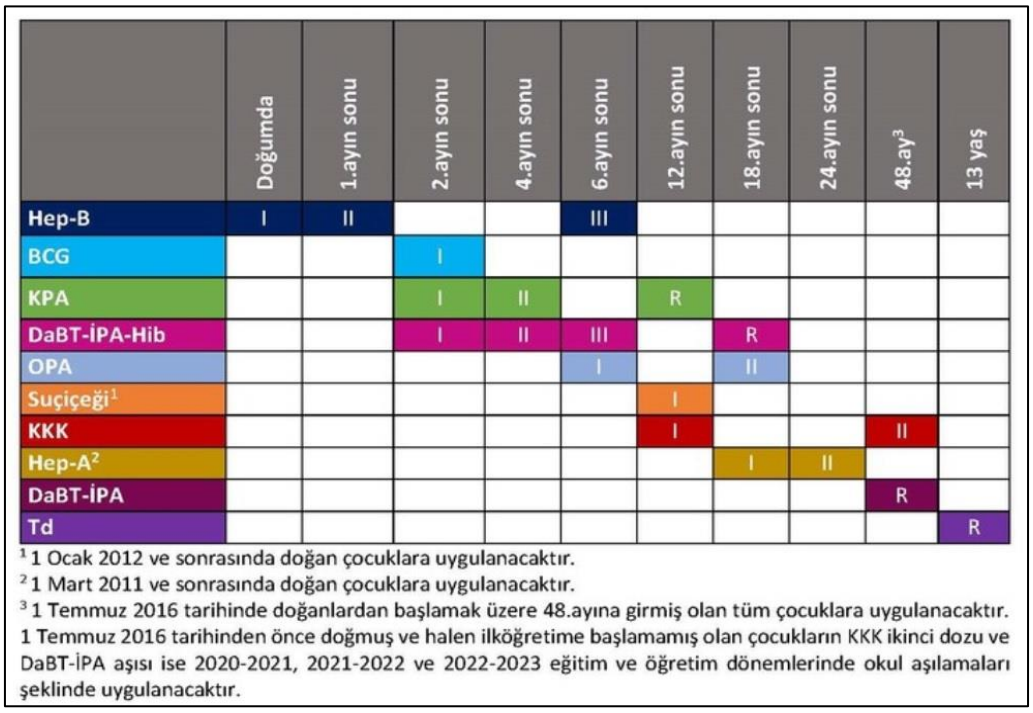
2.4.4. Korunma

Tetanoz vakalarının pek çoğu bağışıklanmamış ya da yetersiz bağışıklanmış kişilerde görülmektedir. Etkin bir aşının toplumda yaygın bir şekilde kullanılması ile hastalığın morbidite ve mortalitesi önemli ölçüde düşmektedir. Tetanoz aşılarında, *C.tetani* toksininin formaldehit kullanılarak zararsız hale getirilerek inaktive edilmesi ile elde edilen toksoidler kullanılmaktadır. Tetanoz toksoidi, toksinin patojenitesini kaybetmiş fakat immünojenik özelliğini halen taşıyan şeklidir [225]. Tetanoz aşılarını üretmek için öncelikle bakteriler uygun ortamda çoğaltılır, toksinleri besiyerinden uzaklaştırılarak saflaştırılır. Formalin ile inaktivasyon toksin saflaştırmadan önce ya da saflaştırma sonrası yapılabilir [153, 226, 227].

Aşılama ile kontrol altına alınabilmesine karşın mortalitesi yüksek olan dünyada her yıl yaklaşık 1 milyon vakaya neden olan tetanozun önlenebilmesi için gebelere ve yenidoğanlarda 2. aydan itibaren aşılama yapılmaktadır [228, 229]. Ülkemizde yenidoğan tetanoz aşısı uygulaması T.C Sağlık Bakanlığı Ulusal Çocukluk Dönemi Aşılama Takvimi'ne (Tablo 2.1) göre doğum sonrası 2. ay, 4. ay ve 6. ayda birer doz ve 18. ayda pekiştirme dozu beşli karma aşı (difteri, aselüler boğmaca, tetanoz, inaktif polio, hemophilus influenza tip b aşısı) olarak uygulanmaktadır. Daha sonra 48. ayda dörtlü karma aşı (difteri, aselüler boğmaca, tetanoz, inaktif polio) olarak pekiştirme dozu yapılmaktadır. İlköğretim 13. yaşta yine bir pekiştirme dozu erişkin tipi difteri-tetanoz aşısı (Td) olarak uygulanmaktadır [230].

Doğum sırasında riskin yüksek olması nedeniyle gebeler de doğumdan önce aşılanmaktadır [228]. Tüm dünyada yürütülen aşılama programları ile gebelik sırasında verilen aşının neonatal tetanozdan ölümleri azalttığı pek çok çalışmada gösterilmiştir [231-233]. Ülkemizde 1994 yılında başlayan Maternal Neonatal Tetanoz Eliminasyon Programı kapsamında yapılan aşılama ile son vaka 2014 yılında görülmüştür. Dünya sağlık örgütü tarafından 24 Nisan 2009 yılında ise maternal ve neonatal tetanozun ülkemizde elimine edildiği duyurulmuştur [209]. Sağlık bakanlığı tarafından yürütülen Genişletilmiş Bağışıklama Programı (GBP)'nın içinde rutin olarak uygulanan aşılardan biri de tetanoz toksoidi (TT)'dir. Bir gebe ya da doğurganlık yaşında bir kadın ile karşılaşıldığında eğer hiç aşılanmamış ya da aşılanma durumu bilinmiyor ise primer immünizasyon gebeliğin 4. ayından

başlayarak en az 4 hafta ara ile 2 doz olmak üzere toplam 3 doz yapılmalıdır [234]. Ülkemizde titizlikle yürütülen bu programlar sayesinde maternal ve neonatal tetanoz görülmemekle birlikte, erişkin ve özellikle ileri yaşlarda tetanoz vakalarına rastlanabilmektedir. Yaşlılar için tetanoza karşı düzenlenmiş bir aşı programı yoktur. Fakat tetanoz ve difteri için aşı üzerinden 5-10 yıl geçmişse pekiştirme dozu yapılması önerilmektedir [235].



	Doğumda	1.ayın sonu	2.ayın sonu	4.ayın sonu	6.ayın sonu	12.ayın sonu	18.ayın sonu	24.ayın sonu	48.ay[3]	13 yaş
Hep-B	I	II			III					
BCG			I							
KPA			I	II		R				
DaBT-İPA-Hib			I	II	III		R			
OPA					I		II			
Suçiçeği[1]						I				
KKK						I			II	
Hep-A[2]							I	II		
DaBT-İPA									R	
Td										R

[1] 1 Ocak 2012 ve sonrasında doğan çocuklara uygulanacaktır.
[2] 1 Mart 2011 ve sonrasında doğan çocuklara uygulanacaktır.
[3] 1 Temmuz 2016 tarihinde doğanlardan başlamak üzere 48.ayına girmiş olan tüm çocuklara uygulanacaktır. 1 Temmuz 2016 tarihinden önce doğmuş ve halen ilköğretime başlamamış olan çocukların KKK ikinci dozu ve DaBT-İPA aşısı ise 2020-2021, 2021-2022 ve 2022-2023 eğitim ve öğretim dönemlerinde okul aşılamaları şeklinde uygulanacaktır.

Şekil 2.7. T.C Sağlık Bakanlığı Ulusal Çocukluk Dönemi Aşılama Takvimi (2020). Hep-B: Hepatit B Aşısı, BCG: Bacillus-Calmete Guarine Aşısı, KPA: Konjuge Pnömokok Aşısı, DaBT-İPA-Hib: Difteri, Aselüler Boğmaca, Tetanoz, İnaktif Polio, Hemofilus influenza tip b aşısı (beşli karma aşı), OPA: Oral Polio Aşısı, Suçiçeği: Suçiçeği Aşısı, KKK: Kızamık, Kızamıkçık, Kabakulak Aşısı, Hep-A: Hepatit A Aşısı, DaBT-İPA: Difteri, Aselüler Boğmaca, Tetanoz, İnaktif Polio (Dörtlü karma aşı), Td: Erişkin Tipi Difteri-Tetanoz Aşısı, R: Rapel (Pekiştirme) [230].

2.5. Difteri

Difteri, toksijenik *Corynebacterium diphtheriae* bakterisi tarafından oluşan akut enfeksiyöz bir hastalıktır. Halk arasında kuşpalazı olarak bilinir [236]. Bakteri, bademcikler, yutak, gırtlak, burun, deri, konjuktiva ve genital bölgede yerleşim gösterebilir. Enfeksiyon sırasında bir membran oluştuğu için hastalığa Yunan dilinde deri anlamına gelen difteri (diphtherite) adı Bretonneau tarafından 1826 yılında

verilmiştir. Lokal psödomembranlar ve ekzotoksinlerin neden olduğu sistemik belirtilere neden olmaktadır [237].

2.5.1. Epidemiyoloji

Difteri ilk kez M.Ö 5. yüzyılda Hipokrat tarafından tanımlanmıştır. 16. ve 17. yüzyıllarda başta Avrupa olmak üzere dünyanın pek çok ülkesinde epidemilere neden olmuştur [238]. Günümüzde ise uygulanan aşılar ile difteri hastalığının dünyadaki insidansı yıllar içerisinde düşüş göstermiş olsa da hala bazı ülkelerde endemiktir [239]. Difteri, özellikle 12 yaş altı çocukları etkileyen bir çocukluk çağı hastalığı olarak kabul edilse de erişkinler de özellikle komorbit koşulları olan kişiler enfeksiyon riski altındadır. Hastalığın bilinen tek rezervuarı insanlardır. Hastalık damlacık şeklinde hava yolu ile ve solunum ve burun sekresyonları aracılığı ile yayılmaktadır. Ayrıca enfekte deri lezyonlarına temas edilmesi ile de bulaşmaktadır. Çocuklar ilk 1 yıl anne sütü ile korunmakta hastalık çoğunlukla 2-5 yaşındaki aşılanmamış çocuklarda görülmektedir. Çocukluk çağı aşılamasının artmasıyla birlikte hastalık erişkin yaş gruplarında daha sıklıkla görülmeye başlamıştır [240]. Hastalığın boğaz difterisi adı verilen ve solunum yollarında görülen hali daha çok soğuk mevsimlerde görülmektedir. Tropikal ülkelerde hala endemik olan kutanöz difteri, *C.diphtheriae*'nin toksijenik izolatlarına bağlı enfeksiyonun en yaygın solunum dışı klinik bulgusudur. Hastalık, vücudun herhangi bir yerinde ortaya çıkabilen ve genellikle kronik olan sığ deri ülserleriyle karakterizedir. Aşılanmış kişiler arasında sistemik toksik belirtiler nadirdir. Deri lezyonları toksini yavaşça emer ve doğal bağışıklama sağlayan yüksek seviyelerde antikorları indükleyebilir. Bu lezyonlar önemli bir enfeksiyon rezervuarıdır ve temaslarda solunum yolu ve deri enfeksiyonlarına ve salgınlara neden olabilir. Bazı salgınlarda, ikincil bulaşma, solunum yolu enfeksiyonu olanlara göre deri enfeksiyonu olan hastaların temaslarında daha yüksek olmuştur. Kutanöz difteri daha fazla çevresel kontaminasyona neden olabilir [241, 242].

Ülkemizde 1960'lı yıllardan itibaren uygulanan aşılama programları sayesinde difteri insidansında çok hızlı bir düşüş görülmüştür. Yıllık en düşük vaka sayısı 1980'de 86 olarak kaydedilmiştir. Avrupa'da 1982-1985 ve 1990-1995 yıllarında görülen epidemilerden ülkemiz de etkilenerek önceki yıllara oranla artan vaka sayıları

görülmüştür. Ülkemizde 2004 yılından bu yana sadece 2011 yılında bir adet vaka ve ölüm olmuştur. Ülkemizde görülen difteri vaka sayıları karşılaştırması Çizelge 2.2'de gösterilmiştir [209].

Çizelge 2.2. 1980-1984 ve 2010-2014 Hastalık (Difteri) Vaka Sayılarının Karşılaştırılması [209]

Hastalık	Aşılama Öncesi Vaka Sayısı*	1980-1984 Vaka Sayısı*	2010-2014 Vaka Sayısı*	Azalma Yüzdesi
Difteri	1236 (1932-1936)	173	0,2	100

*5 yıllık ortalama alınmıştır.

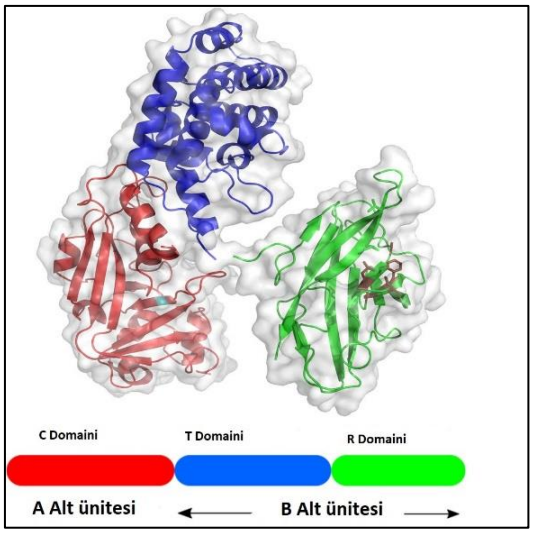
Aşılamanın yüksek oranda yapıldığı bağışıklama programlarının doğru bir şekilde uygulandığı ülkelerde yeni difteri vakalarının görülmesi toplumda bazı toksijenik suşların olduğunun belirtisi olarak görülmektedir. Bu durumda asemptomatik taşıyıcılardan, aşılanmamış, aşıları tam olmayan ya da pekiştirme dozlarını almamış duyarlı kişilere geçiş önem kazanmaktadır. Ayrıca psödomembran oluşumu ile karakterize tablonun görülmediği olgularda duyarlı kişilere bulaştan sorumludur. Bu şekilde 4 haftaya kadar bulaşıcılık devam etmektedir [243]. Toksijenik olmayan suşlar bakteriyofaj ile tox genini alarak toksijenik forma dönüşebilir. Aşılama asemptomatik taşıyıcılığı önlememektedir [244].

2.5.2. Difteri etkeni: *C. diphtheriae*

Difteri hastalığı etkeni olan *C. diphtheriae* 1-6 µm uzunluğunda, gram pozitif, fakültatif anaerobik, kapsülsüz, sporsuz, hareketsiz, metakromatik granül oluşumu görülen, pleomorfik ve bir ucu daha şişkin bir davul tokmağı görünümünde bir basildir [242]. Toksin üretebilen türleri insanlarda ve hayvanlarda hastalığa neden olmaktadır. Mikroskop altında oldukça polimorfik, birbirine dik ya da paralel olarak durabilen X, V, L, Y ve çin harflerine benzetilen şekilde görünür. Metilen mavisi ile boyandığında koyu renkte görülen Babest-Ernst cisimcikleri olarak adlandırılan metakromatik granüllere sahiptirler. İlk olarak 1883 yılında Klebs tarafından tanımlanmış ve 1884 yılında da Loeffler tarafından kültürü yapıldığından Klebs-Löffler basili olarak da tanımlanmaktadır [245, 246]. En iyi Loeffler besiyerinde üremektedir. Potasyum tellüritli besiyerinde çoğaltıldığında siyah koloni oluşturması

tipik bir özelliğidir. Tellüritli besiyerinde oluşan koloni morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri ile gravis, mitis, intermedius ve belfanti olmak üzere 4 biyotipi bulunmaktadır [247]. Fakültatif anaerop olmasına karşın en iyi oksijenli ortamda çoğalır. En iyi çoğaldığı optimum sıcaklık 35-37°C'dir. Hücre yüzeyinde bulunan diğer bakterilerde bulunan K antijenine benzer antijen serolojik olarak ayrımda kullanılmaktadır [248, 249].

Difteri toksini, *tox* geni ile kodlanır. *tox* geni taşıyan bir bakteriyofajın gen transferi yolu ile bakteri kromozomuna entegre olmasıyla taşınmaktadır [250]. Difteri toksini protein yapıda A-B modeli bir ekzotoksindir. Sistemik enfeksiyondan sorumlu olan bu toksindir. Toksin, 535 aminoasitten ve A ve B olmak üzere 2 adet alt üniteden oluşan yaklaşık 58-62 kDa ağırlığında bir proteindir. Katalitik (C), transmembran (T) ve reseptöre bağlanan (R) bölgelerden oluşmaktadır. C kısmı A alt ünitede bulunurken, T ve R kısımları B alt ünitede bulunmaktadır [251]. Protein öncelikle yaklaşık 62kDa ağırlığında bir polipeptid olarak sentezlenir. Hücre dışına yaklaşık 58 kDa ağırlığında bir molekül olarak salınır. Proteolitik enzimler ile A ve B alt ünitelerine ayrılır. Bu alt üniteler disülfit bağları ile birbirine bağlı halde bulunur. A alt ünite yaklaşık 22 kDa ağırlığındadır ve toksinin amino ucunda bulunur. Katalizör bir enzim görevi görmektedir. B alt ünitesi ise hücre membranına tutunup A ünitesinin hücre içine girişine yarıdımcı olan, toksinin karboksi ucunda bulunan yaklaşık 40 KDa bir peptiddir. Hücre yüzeyine bağlandıktan sonra konak hücre tarafından vezikül içinde hücre içine alınır. Vezikül içerisinde globüler bir yapıda bulunur. A alt ünite, ökaryotik hücrelerde protein sentezinde görev alan EGF-2 proteinini inhibe ederek protein sentezini durdurur. Daha sonra hücre ölümü gerçekleşerek psödomembran oluşumuna ve diğer sistemik bulguların oluşmasına neden olmaktadır. *İn vitro* ortamda toksin yapımı demir konsantrasyonu ile ilişkilidir. Demir konsantrasyonunun artması ile toksin yapımı azalmaktadır [238, 252, 253].



Şekil 2.8. Difteri Toksininin protein yapısı [251]

2.5.3. Patogenez

Difteri hastalığına neden olan *C.diphtheriae* farenks mukozasına ve tonsillere yerleşir ve mukozanın epitel hücrelerinde çoğalmaya başlar. Çoğalması ile birlikte salgıladığı protein yapıdaki ekzotoksin dolaşıma karışarak semptomlara neden olmaktadır [254]. Toksin reseptörü olan EGF (elongation growth factor) benzeri HB-EGF'ye bağlanarak hücreye giriş yapar [255]. HB-EGF başta kalp ve sinir sistemi dokuları olmak üzere pek çok memeli dokusunda bulunmaktadır. Toksin dokularda birleşim yaparak nekroz ve paralizilere neden olur. Ortaya çıkan kardiyak ve nörolojik toksisite ölümlere neden olabilmektedir [256].

Toksin hücre içine girdikten sonra A alt ünite ribozoma geçerek, zincir uzamasında önemli bir fonksiyona sahip olan EF2 (*elongation factor 2*) ile bağlanarak polipeptid zincirinin uzamasını önler ve hücrede protein sentezini engeller. En önemli etkilerini kalp dokusu (miyokardit), sinir dokusu (demiyelinizasyon) ve böbrek (tübüler nekroz) hücreleri üzerine göstermektedir. İnkübasyon genellikle 2-5 günde olmaktadır. Solunum yolu enfeksiyonunun ilk birkaç gününde toksinin hızlı lokal nekrotik etkisine karşılık immün sistemde lökosit yanıtı gelişmektedir. Oluşan gri veya beyaz renkli yalancı membran (psödomembran) ölü hücreler, fibrin, lökositler, eritrositler ve bakteri içermektedir. Bakteriler psödomembran içerisinde çok iyi üremektedir. Bir tonsil üzerinde ufak bir leke kadar olabileceği gibi, her iki tonsili, yumuşak damağı ve farengeal duvarın tamamını kaplayan büyüklükte de olabilmektedir. İçeriğindeki

yoğun fibrin ile altındaki dokulara sıkıca yapışmıştır. Membran kaldırıldığında kanamaya neden olur. Toksin etki alanını genişleterek tonsillerden farenksin arka alanına kadar ilerler. Toksin bu sırada lenf dolaşımına da katılabilmektedir. Tonsillerde meydana gelen psödomembranlar ve altındaki ödem ile boyun bölgesinde bulunan lenf düğümlerinin şişmesi çocuklarda nefes alma zorluğuna neden olur. Oluşan görüntüye boğa boynu görüntüsü adı verilmektedir (Resim 2.2) [257]. Deri difterisinde bacak, kollar, ayaklar ve ellerde iltihaplı yaralar ve etrafı kırmızı renkte büyük ülserler şeklinde olmaktadır (Resim 2.3). Deri difterisinde toksinin emilimi oldukça düşük olduğu için sistemik etkiler genellikle hafif seyirlidir ya da hiç görülmez [245].



Resim 2.2. Boğaz Difterisi ve boğa boynu görünümü [257]



Resim 2.3. Deri difterisi [245]

2.5.4. Korunma ve önleme

Difteriden korunmada ilk basamak hastalığın etkeni olan *C. diphtheriae*'nın yayılımını önlemek ve olabildiğince çok kişi ile toplumda bağışıklanmayı artırmaktır. Difterinin hastada tesbit edilmesinin ardından, kültür sonucunun negatif olacağı zamana kadar sağlıklı kişilerden mutlaka ayrı tutulması gerekmektedir. Hastanın bulunduğu ortam ve temasta bulunduğu eşyalar dezenfekte edilmelidir. Difteri ile bağışıklanma hastalığın geçirilmesi ya da toksoid aşılar ile gerçekleşmektedir [258]. Difteri aşı ile önlenebilir hastalıklardan biridir. Hastalığın yayılmasını önlemek için tetanoz toksoidi ile benzer şekilde, difteri toksoidi de aşılamada güvenilir ve etkindir. Çocukluk çağında yapılan aşılama ile yetişkin oluncaya kadar immünizasyon sağlanmaktadır. Yetişkinlerde oluşan antikorlar zamanla azalabileceğinden belirli zamanlarda hatırlatma (pekiştirme) dozlarının yapılması gerekmektedir [259]. Bakterinin uygun ortam ve koşullarda üretilmesi ile besiyerine toksin salgılanmaktadır. Salgılanan toksin besiyerinden izole edilmeden önce ya da edildikten sonra formaldehit ile toksoid formuna dönüştürülür. Difteri toksoidi formaldehit ile kimyasal olarak zararsız hale gelen toksinin immünojenik ve antijenik özelliklerini taşıyan şeklidir [260]. Toksoide karşı oluşan hümoral immün yanıt İgG tipinde antikorlar oluşmasına neden olmaktadır. Bu antikorlara antitoksin adı verilir. Antikorlar hastalık, asemptomatik taşıyıcılık ya da aşılama ile oluşmaktadır [261, 262].

Dünya Sağlık Örgütü difteri ile primer bağışıklamanın difteri içeren aşı ile 3 dozluk seriler şeklinde yapılmasını önermektedir. Birinci seri bebekler 6 haftalıkken başlamalı ve sonraki dozlar arasında en az 4 hafta olacak şekilde yapılmalıdır. Üçüncü takviye dozu tercihen 2 yaş aralığında (12-23 ay), daha sonra 4-7 yaş ve 9-15 yaşlarında uygulanmalıdır. İdeal olarak pekiştirme dozları arasında 4 yıl bulunmalıdır [263].

Ülkemizde de aşılama tetanoz aşısı ile benzer şekilde Dünya Sağlık Örgütü önerileri doğrultusunda, T.C Sağlık Bakanlığı Ulusal Çocukluk Dönemi Aşılama Takvimi'ne (Tablo 2.1) göre doğum sonrası 2. ay, 4. ay ve 6. ayda birer doz ve 18. ayda pekiştirme dozu beşli karma aşı (difteri, aselüler boğmaca, tetanoz, inaktif polio, hemophilus influenza tip b aşısı) olarak uygulanmaktadır. Bir pekiştirme dozu 48.

ayda dörtlü karma aşı (difteri, aselüler boğmaca, tetanoz, inaktif polio) olarak yapılmaktadır. İlköğretim 13. yaşta yine bir pekiştirme dozu erişkin tipi difteri-tetanoz aşısı (Td) olarak uygulanmaktadır [230]. Aşılanmamış kişilerde hastalık ciddi anlamda mortaliteye sebep olmaktadır. Mortalite aşılanmamış kişilerde %20 olarak görülmekte iken bağışıklanmış bireylerde %1,3'tür. Tam aşılama yapılamasa da kısmi olarak yapılan aşılamanın mortaliteyi yaklaşık olarak %50 oranında azalttığı bilinmektedir. Hastalığın asemptomatik olarak taşınması endemik olarak devam etmesine neden olmaktadır. Endemik bölgelerde sağlıklı bireylerin %3-5'inde taşıyıcılık görülmektedir. Aşılama ile toplumdaki taşıyıcılık oranı da azalsa bile aşılama asemptomatik taşıyıcılığı engellememektedir [264]. Ayrıca hasta ile temas edenler belirlenmeli, son temas tarihinden sonra yedi gün boyunca boğazda membran oluşumu takip edilmelidir. Temaslıların tümü bağışıklanma durumları açısından değerlendirilmelidir. Üç dozdan daha az toksoid aşı ile aşılanmış ya da bağışık durumu bilinmeyen temaslılara hemen bir doz aşı yapılmalı ve önerilen aşılama şemasına uygun bir şekilde bağışıklanmalıdır [265] .

2.6. Tez Çalışması Kapsamında Yapılan İmmünolojik Karakterizasyonda Kullanılan Metodların Temel Prensipleri

Aşı adayı antijenlerin karakterizasyonu uzun ve kompleks bir prosedürdür. Bu antijenler protein yapıda oldukları için biyokimyasal ve immünolojik özelliklerinin ortaya koyulabilmesi için karakterizasyonu yapılabilir. Geliştirilen bir aşının karakterizasyonu için yapılması gereken işlemler Dünya Sağlık Örgütü tarafından üretim ve kalite kontrol aşamalarında açıkça ortaya koyulmuştur [152].

2.6.1. Western blot

Hücresel ve moleküler bilimlerde sıklıkla kullanılan western blot bir immünoblotlama yöntemidir. Bu yöntem ile araştırmacılar kompleks bir protein karışımı içerisinden spesifik proteinleri ayırt edebilmekte ve tanımlayabilmektedir. Ayrıca ELISA ya da kütle spektrometri gibi yöntemlerle elde edilen sonuçların doğrulaması için kullanılmaktadır [266]. Yöntem DNA ve RNA tesbiti yapan Southern blot ve northern blot yöntemlerinden evrimleşmiştir. Bu yöntemde proteinler elektroforez ile ağırlıklarına göre ayrılır. Daha sonra jelde bulunan proteinler PVDF ya da nitroselüloz gibi malzemelerden yapılmış katı fazda bir membrana aktarılır. İlk olarak

Towbin ve ark. Tarafından 1979 yılında İsviçre'de ve Stark ve ark. tarafından Amerika Birleşik Devletleri'nde geliştirilmiştir. Poliakrilamid-üre jelde elektroforezi yapılan proteinler nitroselüloz bir membrana aktarılmıştır. Daha sonra Brunette, yöntemi geliştirerek proteinleri sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayırmış ve bilinen adı olan immünblotlama ya da protein blotlama adını vermiştir [267, 268].

Yöntem örnek hazırlama, jel elektroforezi, transfer, bloklama ve işaretleme, tesbit etme ve analiz aşamalarından oluşmaktadır. Örnekler bir hücre ya da dokudan ekstrakte edilebileceği gibi saf bir protein de olabilir. Hazırlanan örnekler denatüre edilerek SDS-PAGE jele yüklenerek ayrıştırılır. Daha sonra jelden membrana yine elektrik akımı kullanılarak transfer gerçekleştirilir. Transfer işlemi ıslak ya da yarı kuru olarak yapılabilir. Primer antikorun membrana non-spesifik bağlanmasını engellemek için membran bloklama solüsyonu ile bloklanır. Burada çeşitli konsantrasyonlarda süt proteinleri ya da sığır serum albümini kullanılabilir. Daha sonra primer antikor ile işaretleme +4°C'de bir gece ya da birkaç saat oda sıcaklığında yapılır. Primer antikor ile inkübasyon sonrası membran Tween-20 içeren bir yıkama solüsyonu ile yıkanır. İkincil antikor ile saptama işlemi radyoaktif, kolorimetrik ya da floresans ile yapılabilir. Yüksek hassasiyeti sebebiyle ECL kemilüminesans (*Enhanced chemiluminescence* (ECL)) solüsyonlar sıklıkla tercih edilmektedir. HRP ile işaretli sekonder antikor kemilüminesans substratı parçalayarak parlama olmuşmasına neden olur. Parlaklık protein miktarı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Oluşan ışıma kamera ya da film baskısı olarak görülür [269, 270].

2.6.2. Akım sitometri

Akım sitometri yöntemi ile sıvı içerisinde akan hücrelerin pek çok özellikleri hızlı bir şekilde saptanabilmektedir. Çalışma prensipleri çok eski tarihlere dayanmakla birlikte argon lazerlerin kullanıma girmesi ve gelişen teknoloji ve bilgisayar sistemleri ile günümüze kadar gelişim göstermiştir. Akım sitometride, hücrelerin yüzeylerindeki ya da hücre içindeki antijenlere özgül floresan ile işaretli antikorların kullanılması ile saptama yapılmaktadır. Floresan yoğunluğuna bağlı olarak hücreler büyüklük ve granülaritesine göre tek hücre bazında kantitatif ölçüm yapmaktadır. Hücreler lazer

ışını ile karşılaştığında yaydığı floresan sinyalleri değerlendirilerek hücrenin hangi antijeni taşıyıp taşımadığı belirlenir. Akım sitometri cihazı akış sistemi, optik ve elektronik sistem olmak üzere 3 temel kısımdan oluşmaktadır. Floresan antikor ile işaretlenmiş olan hücreler akış kanalından geçerek lazer ile karşılaşır. Lazer ile aktifleşen florokrom dedektör ve filtreler yardımı ile dalga boylarına ayrılır. Farklı dalga boylarındaki bu sinyaller bir yazılım ile hücre büyüklüğü ve granülaritesi saptanmış olur [271, 272].

2.6.3. ELISA (Enzyme linked ımmuno sorbent assay)

Özgül bir reaksiyon olan antijen ve antikor reaksiyonlarını göstermek amacıyla kullanılan ELISA yöntemi antijen ya da antikor saptamada klinik ve araştırma laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Alkalen fosfataz, β-galaktosidaz ya da horseradish peroksidaz (HRP) gibi enzim ile işaretli olan antikorlar ile reaksiyona giren substrat renk değiştirir. Oluşan renk değişimi spektrofotometrik olarak tesbit edilir. Sonuçlar kalitatif ya da kantitatif olarak elde edilebilir. Oldukça hassas bir yöntem olarak pikogram seviyelerinde sonuç verebilmektedir. Çok çeşitli vücut sıvılarından (serum, beyin omurilik sıvısı, plevra sıvısı, bronkoalveolar lavaj) ve hücre lizatı, hücre kültürü süpernatantı ya da doku homojenizasyonu ile dokulardan çalışma olanağı sağlamaktadır. Bu amaçla İndirekt ELISA, Sandviç ELISA ve Kompetetif ELISA gibi çeşitli ELISA yöntemleri geliştirilmiştir [273, 274].

<u>İndirekt ELISA</u>

İndirekt ELISA yöntemi ile mikroplaka yüzeyine kaplanmış olan antijenlere karşı gelişen antikorlar saptanabilmektedir. İşaretsiz olan primer antikorlar örneğin hasta serum örneği kuyucuklara eklenerek inkübe edilir. İnkübasyon sonrası primer antikora spesifik enzim ile işaretli sekonder antikor koyulur. İnkübasyon sonrası yıkamalar yapılarak non-spesifik bağlanmalar uzaklaştırılır. Daha sonra enzimin substratı eklenerek oluşan renk değişimi reaksiyonun durdurulmasını takiben spektrofotometrik olarak ölçülür. İndirekt ELISA tanı amaçlı en sık kullanılan ELISA yöntemidir [275].

Yarışmalı (Kompetetif) ELISA

Yarışmalı ELISA'da antijen ve antikorların miktarları belirlenebilmektedir. Mikroplaka kuyucukların tabanına antijen ya da antikor bağlanır. Kuyucuklara işaretsiz antijen ya da antikor (ligand) ve enzim ile işaretli antijen / antikor (ligand) eklenerek inkübe edilir. İnkübasyon süresince katı fazdaki antijen ya da antikora bağlanmak için işaretsiz ligand ile işaretli olan ligand yarışa girer. Substrat eklenerek reaksiyon başlatılır. Reaksiyon ile oluşan renk değişimi işaretsiz ligand miktarı ile ters orantılıdır. Örnek içerisinde ne kadar çok miktarda işaretsiz ligand varsa daha düşük optik dansite değeri elde edilmektedir [276].

Sandviç ELISA

Sandviç ELISA yönteminde mikroplaka kuyucukları yakalayıcı antijene özgül antikorlar ile kaplanır. Antijen içeren örnek kuyucuklara eklenerek antijen-antikor kompleksinin oluşması için inkübe edilir. Bağlanmamış antijenler yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Enzim ile işaretli antijene özgül yakalayıcı ikincil antikorlar eklenir. Bu antikorlar, antijen üzerindeki mikroplaka tabanında bulunan yakalayıcı antikorlardan farklı bir epitopa bağlanma özelliğindedir. Yıkamanın ardından substrat eklenerek yakalayıcı antikora bağlı bulunan enzim ile reaksiyona girmesi sağlanır. Oluşan renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçülür [274].

2.6.4. in vitro Sitotoksisite (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT)) Yöntemi

Sitotoksisite, maddenin hücreler üzerinde doz ve süreye bağlı olarak zarar vermesidir. Hücreler sitotoksik maddeler ile karşılaştığında apoptoz, nekroz ya da otofaji yolu ile ölebilir ya da proliferasyon özelliklerini kaybedebilir. Hücre bazlı sitotoksisite testleri uygulamada sağladığı kolaylık ve *in vivo* testler ile elde edilen veriler ile benzerliği nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak kullanılır hale gelmiştir. Sitotoksisite belirleme yöntemleri ne olursa olsun sonuçta canlı ve ölü hücre miktarı belirlenmektedir. Genel olarak kolorimetrik, kemilüminesans ve enzimatik yöntemlerdir. Kolorimetrik yöntemlerde MTT sıklıkla kullanılmaktadır. MTT yanı sıra 2,3-Bis(2-metoksi4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT), 3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum (WST1) gibi formazan tuzları da sitotoksisite testlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenir ve formazan adı verilen yapılara dönüşerek renk değişimine neden olur. Bu reaksiyon mitokondride gerçekleştiği için yalnızca canlı hücrelerde renk değişimi görülmektedir. Ölü hücrelerde ise tetrazolyum bileşikleri indirgeme özelliği kaybolur ve renk değişimi meydana gelmez. MTT pozitif yüklü olup ökaryot hücre membranından kolayca geçer. Hücre içine geçtikten sonra kolayca indirgenebilir. MTT sarı renkli bir bileşiktir. İndirgenmesi sonucu oluşan formazan mor renkte ve suda çözünür halde değildir. Suda çözünür olmadığı için kristal halde çökmektedir. Bu nedenle dimetil sülfoksit, sodyum dodesil sülfat gibi çözücü maddeler kullanılması gerekir. Hücreler hücre kültüründe üretilip, sitotoksik madde ile muamele edilmelerinin ardından MTT ayracı eklenir. MTT ayracı ile hücreler (tetrazolyum tuzu) 1-4 saat inkübe edilir. Son aşamada çözücü madde eklenerek spektrofotometrik yöntemle renk değişimi ölçülür. Sonuçta oluşan sinyal yoğunluğu hücre, MTT konsantrasyonu, canlı hücre sayısı, hücrelerin metabolik aktivite kapasitesi ve besiyeri içeriği ile ilişkilidir. Elde edilen optik dansite değerleri ile canlı ve ölü hücre miktarı belirlenmektedir [277, 278].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Cihaz ve aletler

Tez çalışması sırasında Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarları'nda kullanılan cihazların marka ve modelleri Çizelge 3.1'de belirtildi. Sıralama alfabetik olarak yapıldı.

Çizelge 3.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler

Cihaz / Alet Adı	Marka
Distile su cihazı	Millipore Milli-Q
Hassas Terazi	Mettler Toledo
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Schott SLR Hot Plate
-20℃ Derin dorundurucu	Uğur
-86° C Derin Dondurucu	Sanyo MDF-U72V
+4° C Kit Dolabı	Revco
Otoklav	Sanyo MLS 3781-L
Karbondioksitli etüv	Sanyo MCO-20AIC
pH Metre	Mettler Toledo SevenMulti
Buz makinası	Scotsman AF100
Yer Tipi Ultrasantrifüj	ThermoScientific LYNX6000
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter Alegria
Kuru Isı Bloğu	HLC
ELISA Yıkayıcı	Tecan Sunrise
ELISA Okuyucu	Biotek Synergy HT
Güç Kaynağı	Bio-RAD
Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sistemi	Bio-RAD
Western Blot Islak Transfer Sistemi	Bio-RAD
Akım Sitometri Cihazı	Beckman Coulter FC500
Azot Tankı	Jencons 35-HC

3.1.2. Plastik ve cam malzemeler

Tez çalışması kapsamında kullanılan plastik ve cam malzemeler markaları ile birlikte Çizelge 3.2'de alfabetik sıra ile belirtildi.

Çizelge 3.2. Kullanılan Plastik ve Cam Malzemeler

Malzeme Adı	Marka
Cam mezür (1 lt)	Marienfeld
Cam mezür (500 ml)	Marienfeld
Cam mezür (100 ml)	Marienfeld
Cam mezür (25 ml)	Marienfeld
Beher (250 ml)	Marienfeld
V tabanlı 10 ml cam tüp	Marienfeld
Erlenmayer Şişe	Marienfeld
Pastör Pipeti	Grainer
Steril Serolojik Pipet (25 ml)	Grainer
Steril Serolojik Pipet (10 ml)	Grainer
Steril Serolojik Pipet (5 ml)	Grainer
Steril Filtreli Pipet ucu (1000µl)	Grainer
Steril Filtreli Pipet ucu (200µl)	Grainer
Steril Filtreli Pipet ucu (20µl)	Grainer
Steril Filtreli Pipet ucu (10µl)	Grainer
Non-steril pipet ucu (1000µl)	Grainer
Non-steril pipet ucu (200µl)	Grainer
Non-steril pipet ucu (10µl)	Grainer
Steril Konik Tabanlı Santrifüj Tüpü (50 ml)	Grainer
Steril Konik Tabanlı Santrifüj Tüpü (15 ml)	Grainer
Hücre Kültürü Şişesi (25 cm^2)	Grainer
Hücre Kültürü Şişesi (75 cm^2)	Grainer
Düz tabanlı 96 kuyucuklu hücre kültürü plağı	Grainer
V tabanlı 96 kuyucuklu hücre kültürü plağı	Grainer
Düz tabanlı 96 kuyucuklu plak	Grainer
1,5 ml santrifüj tüpü	Grainer
İnsülin enjektörü	Beybi

3.1.3. Kimyasallar ve kitler

Çalışma kapsamında yapılan deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler ve kullanılan kitler alfabetik sıra ile Çizelge 3.3'de belirtildi.

Çizelge 3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Kimyasalın adı	Marka	Katalog Numarası
2-Mercaptoethanol	GİBCO	21985-023
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ayracı	SİGMA	M2128
3-3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate	SİGMA	T0440
4X Laemmli Sample Buffer	BİO-RAD	161-0747
Asetik Asit Glasiyel	MERCK	K389661156
Blotting Grade Blocker	BİO-RAD	170-6404
Commasie Brillant Blue	BİO-RAD	6104-59-2
Dimethyl Sülfoksit	SİGMA	D2650
Disodyum sülfat	MERCK	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GİBCO	41965062
Dulbecco's PBS	GİBCO	14190
Etanol	MERCK	64-17-5
Fare Anti-Difteri Toksoid İgG ELISA Kiti	Mybiosource	MBS728203
Fare anti-Tetanoz Toksoid İgG ELISA Kiti	Mybiosource	MBS9907879
Fetal Sığır Serumu (FBS)	GİBCO	
Folin & Ciocalteu's Fenol Ayıracı	SİGMA	F9252
Glisin	APPLİCHEM	A3707
Hidroklorik Asit (%37)	MERCK	100317
L-Glutanmin	GİBCO	25030

Çizelge 3.3. (Devam) Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

MEM-Neaa	GİBCO	11140
Metanol	MERCK	67-56-1
Monosodyum sülfat	SİGMA	
N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin (TEMED)	Bio-RAD	161-0801
Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit	Thermo Fischer Scientific	WP20005
Penisilin-Streptomisin	GİBCO	15140
Precision Plus Prestained Protein Standards	BİO-RAD	161-0377
Precision Plus Protein Western C Protein Standarts	BİO-RAD	161-0367
Sodyum Dodesil Sülfat	SİGMA	L4390
Sodyum Hidroksit	SİGMA	S8045
Sodyum Piruvat	GİBCO	11360
Tripan Mavisi	GİBCO	0508
Tripsin-EDTA (%0.05)	GİBCO	25200056
Trizma Base	SİGMA	T1503
Tween-20	SİGMA	P1379

3.1.4. Antikorlar

Tez çalışması sırasında kullanılan antikorlar Çizelge 3.4'te alfabetik sıra ile gösterildi.

Çizelge 3.4. Kullanılan antikorlar

Antikor / Standart Adı	Katolog Numarası	Markası
AffiniPure F(ab')$_2$ Fragment Goat Anti-Mouse İgG (H+L)	709-005-149	Jackson ImmunoResearch
Anti-Fare CD19 (PE) Monoklonal Antikoru	12-0193-82	Invitrogen
Anti-Fare CD4 (FITC) Monoklonal Antikoru	11-0041-82	Invitrogen
Anti-Fare CD8a (PE) Monoklonal Antikoru	12-0081-82	Invitrogen

3.1.5. Çözeltiler

Çalışma kapsamında kullanılan yöntemlerde hazırlanan çözeltiler ve hazırlanış biçimleri aşağıda anlatıldığı gibidir.

Tris-glisin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) jel elektroforezi çözeltileri

Akrilamid-bisakrilamid solüsyonu

14,4 gr akrilamid ve 0,4 gr bisakrilamid tartılarak 50 ml distile su ile çözüldü. 0,45 µm şırınga ucu filtre ile filtre edildi. Degas işleminin ardından buzdolabında karanlıkta muhafaza edildi.

Tris-HCl (pH: 6.8) çözeltisi

1,5M Tris-HCl tampon çözeltisi hazırlamak için, 9.08 gr tris tartılarak distile suda çözüldü. Hidroklorik asit ile pH 6.8'e ayarlandı. Distile su ile hacim 50 ml olacak şekilde tamamlandı.

Tris-HCl (pH: 8.8) çözeltisi

0.5M Tris-HCl tampon çözeltisi hazırlamak için, 3gr tris tartılarak distile su içerisinde çözüldü. Hidroklorik asit ile pH 8.8'e ayarlandı. Son hacim 50ml'ye ayarlandı.

%10 SDS

10 gr SDS,100ml distile su içerisinde çözüldü.

Amonyum persülfat solüsyonu

Amonyum persülfat %10 konsantrasyonda olacak şekilde distile su içerisinde çözülerek hazırlandı ve taze olarak kullanıldı.

Tris-glisin jel yürütme tampon solüsyonu

25mM tris, 190mM glisin ve %0.1 SDS 10X olacak şekilde 500 ml hazırlandı. Çalışma sırasında 1X konsantrasyonda 500 ml kullanıldı.

Jel boyama çözeltileri

Boyama ve fiksasyon çözeltisi: %50 (v/v) metanol, %10 (v/v) glasiyel asetik asit içeren distile su içerisinde çözülen 1gr Coomassie Brillant Blue R-250 boyası ile hazırlandı.

Yıkama çözeltisi: %12.5 (v/v) metanol ve %17.5 (v/v) glasiyel asetik asit içeren distile su ile hazırlandı.

Western Blot çözeltileri

Transfer solüsyonu

25mM tris, 190mM glisin, %0.1 SDS ve %20 metanol 500 ml hazırlandı, +4°C'de saklanarak soğuk olarak kullanıldı.

Bloklama solüsyonu

PBS içerisinde %3 konsantrasyonda olacak şekilde süt tozu tartılarak 100 ml olacak şekilde hazırlandı.

Yıkama solüsyonu

PBS içerisinde % 0.1 (v/v) Tween-20 olacak şekilde hazırlandı.

3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi çözeltileri

MTT çözeltisi

MTT ayracı 5mg/ml olacak şekilde PBS içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti 0.2 µm membran filtreden geçirilerek süzüldü. Steril, ışık geçirmeyen bir tüpte muhafaza edilerek kullanıldı.

Çözme çözeltisi

SDS %10 konsantrasyonda olacak şekilde tartılarak, distile su ile hazırlanmış 0.01M HCl içinde çözüldü.

Protein tayin yöntemi (lowry protein assay) çözeltileri

Solüsyon A

%2 $NaCO_3$, % 0,02 potasyum sodyum tartarat, 0.1 M NaOH, %1 Sodyum Dodesil Sülfat

Belirtilen oranlarda kimyasallar tartılarak 50 ml distile su içerisinde çözüldü.

Solüsyon B

% 0.5 $CuSO_4$ tartılarak distile suda çözüldü.

Solüsyon C

25 ml Solüsyon A ile 1 ml Solüsyon B karıştırılarak Solüsyon C oluşturuldu.

Solüsyon D

1N Folin & Ciocalteu's Fenol Ayıracı

Akım sitometri çözeltileri

Eritrosit lizis tampon çözeltisi

155 mM NH_4Cl,12 mM $NaHCO_3$ ve 0.1 mM EDTA distile su içerisinde çözüldü. Taze olarak kullanıldı.

Hücre boyama tampon çözeltisi

%0.5 olacak şekilde FBS, PBS içine eklenerek karıştırıldı.

Bloklama Çözeltisi

Boyama tampon çözeltisi içinde %10 oranında olacak şekilde fare serumu eklenerek hazırlandı.

3.1.6. Hücre serisi

Difteri toksininin minimum stopatik doz belirleme ve difteri toksini vero hücre yöntemi testleri için kullanılan sitotoksisite deneyleri sırasında Vero-E6 (ATCC, CRL-1586) hücre serisi kullanıldı. Hücreler Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri içerisinde, 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem içeren etüvde çoğaltıldı.

3.2. Metot

3.2.1. %10 FBS içeren DMEM besiyeri hazırlanması

Yüksek glikoz içeren 500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri içine 50 ml fetal sığır serumu (FBS), 2mM L-glutamin, 1mM Sodyum piruvat, 100U/ml penisilin-streptomisin ve 0,05 mM β-merkaptoetanol eklenerek hazırlandı.

3.2.2. Hücre pasajlaması ve saklanması

Vero-E6 hücrelerinin pasajlanması sırasında hücre kültürü şişelerindeki besiyeri boşaltıldıktan sonra, PBS ile 3 kez yıkandı. Hücre kültürü şişesi tabanına yapışık halde bulunan hücrelerin üzerine 3ml %0.05 Tripsin-EDTA eklenerek, 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem içeren etüvde 5 dakika inkübe edildi. Tripsin-EDTA ile inkübasyon sonucu hücre kültürü şişesi tabandan kaldırılan hücreler, fosfat tamponu (PBS) yardımı ile konik tabanlı santrifüj tüpüne toplandı. Toplanan hücreler 1200 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak tripsin-EDTA uzaklaştırıdı. Pellet 1 ml DMEM besiyeri ile sulandırılarak hücre canlılığı ve sayısı tesbit edildi. Uygun sayıdaki hücre, aktarılacağı hücre kültürü şişesine alındı. Kullanılmayan hücreler ise % 5 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren FBS içerisinde dondurularak sıvı azotta saklandı.

3.2.3. Hücre canlılığı ve sayısının tespit edilmesi

Vero-E6 hücrelerinin canlılığını ve sayısını tespit etmek amacıyla tripan mavisi dışlama metodu kullanıldı. Besiyeri içerisinde homojen bir süspansiyon halinde bulunan hücrelerden ve %0.04 konsantrasyondaki tripan mavisi 1:20 oranında alınarak karıştırıldı. Bu karışımdan 10µl Nauber lamına koyularak ışık mikroskobu altında incelendi. Mavi renkte boyayı alan hücreler ölü, renksiz görünen hücreler canlı olarak kabul edilerek sayıldı. Canlı ve ölü hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi.

Hücre Sayısı = Ortalama hücre sayısı X Dilüsyon faktörü X 10^4

3.2.4. Protein miktarlarının belirlenmesi

Saflaştırılmış tetanoz ve difteri toksinlerinin ve standart toksoidlerin miktarları mg/ml ve Lf cinsinden bulunması için kullanılan yöntemler aşağıda belirtildi.

Lowry protein yöntemi ile total protein miktarı tayini

Total protein miktarını hesaplamak amacıyla Lowry Protein Yöntemi kullanıldı. Bu amaçla hazırlanan solüsyonlar 3.1.5'de belirtildiği şekilde kullanıldı.

Standart olarak sığır serum albümini (BSA) belirli konsantrasyonlarda hazırlandı. Bu konsantrasyonlar 0 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml ve 100 mg/ml olarak belirlendi. Temiz cam tüplerde standart konsantrasyondaki BSA'lar ve miktarını saptamak istediğimiz örnekler son hacim 1 ml olacak şekilde solüsyon A eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası solüsyon D eklenerek 30 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Oluşan renk değişimine karşılık gelen optik dansite (OD) değerlerini saptamak için 96 kuyucuklu plaklara her bir standart ve örnekten 100µl eklendi. OD değerleri mikroplaka okuyucusunda (*Synergy, Biotek, ABD*) 650nm dalga boyunda okuma yapılarak belirlendi. Standart proteinlerin oluşturduğu grafik ile formül çıkarılarak, miktarı bilinmeyen proteinlerin mg/ml cinsinden miktarı hesaplandı.

Flokülasyon testi

Toksin ve toksoidlerin flokülasyon testi için öncelikle 10 adet deney tüpüne, 100 Lf/ml konsantrasyonunda ve gittikçe artan hacimlerde toksoid içeren örnekler hazırlandı. Her tüpe, flokülasyon sınır (Lf) değeri belirli olmayan toksinden 1 ml olacak şekilde ilave edildi ve 50°C'deki su banyosuna alınarak bekletildi. Antitoksin ilavesinden sonra saat kontrol edilerek tüpler gözlemlendi. Flokülasyonun ilk görüldüğü tüpte bulunan miktar; flokülasyon (Lf) ünitesi/ml (Lf/ml) olarak kabul edildi. Tüplerde sırasıyla önce bulanıklık, daha sonra ise tüpün dip tarafında çökme gözlendi. Başlangıçtan ilk flokülasyonun görüldüğü zamana kadar geçen süre de flokülasyon kinetiği Kf (*kinetics of floculation*) olarak kabul edilerek dakika olarak belirlendi.

3.2.5. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi

Jel hazırlanması

Jelde yürütülecek olan toksoid ve toksinlerin molekül ağırlıklarına göre, yürütme jeli olarak difteri toksoid ve toksini için %12, tetanoz toksoid ve toksini için %7 konsantrasyondaki tris-glisin SDS-PAGE jelin kullanılmasına karar verildi. Bu amaçla, kullanılan jellerin hazırlanması için gerekli solüsyonlar ve miktarları Çizelge 3.5.'de belirtildi. Jeller belirtilen miktardaki çözeltilerin karıştırılmasının ardından cam plakalara hızlı bir şekilde döküldü ve polimerleşmesi beklendi.

Çizelge 3.5. SDS-PAGE jel hazırlamak için gerekli olan solüsyonlar ve miktarları

Jel konsantrasyonu (%)	dH_2O (ml)	Akrilamid-bisakrilamid (ml)	1,5M Tris-HCl	0,5M Tris-HCl	%10 SDS (µl)	APS (µl)	TEMED (µl)
4	6,2	1,32	-	2,5	100	25	15
7	4,9	2,5	2,5	-	100	25	15
12	3,3	4,2	2,5	-	100	25	15

Örneklerin hazırlanması

Toksinlerdeki hesaplanan protein miktarına göre hesaplama yapılarak her kuyuya 5 µg protein düşecek şekilde protein eklenmesine karar verildi. Toksinler 4X Laemmli tamponu içerisinde 95 °C' de 5 dakika kaynatılarak indirgenmiş koşullar oluşturuldu.

Örneklerin yüklenmesi ve yürütülmesi

Hazırlanan jelin üzerindeki tarak çıkarıldı ve tarağın oluşturduğu kuyulara eşit miktarda protein düşecek şekilde örnekler yüklendi. Tank yürütme tamponu ile dolduruldu. Güç kaynağına bağlanan elektrotlar ile 100V ve yaklaşık olarak 25 dk örnekler jelde yürütüldü.

3.2.6. Jel boyama

Proteinlerin SDS-PAGE jelde yürütülmesinin ardından görünür hale gelebilmesi için Commasie Brillant Blue boyası ile boyandı. Boyama ve fiksasyon çözeltisi jelin üzeri tamamen kapanacak kadar eklenerek 30 dakika çalkalanarak boyandı. Boyamanın ardından, yıkama çözeltisi ile jeldeki boyanın uzaklaşarak yalnızca yürütülen proteinlerin görünür halde kalacağı görüntü elde edilene kadar yıkama yapıldı.

3.2.7. Western-Blot

Western Blot işlemi öncesi difteri ve tetanoz toksin ve toksoidleri SDS-page jel elektroforezi ile ayrıştırıldı. Proteinlerin jelden PVDF membrana aktarılması için Bio-RAD ıslak transfer sistemi kullanıldı. Bu amaçla kullanılacak olan pedler ve filtre kağıtları transfer tamponu ile ıslatıldı. PVDF membran da önce metanol daha sonra transfer tampon solüsyonu ile ıslatılır. Sırasıyla ped, filtre kağıdı, tris glisin SDS-PAGE jeli, membran ve tekrar filtre kağıdı ve pedler yerleştirildi. Anot ve katotun bulunduğu transfer kabına yerleştirilerek transfer tamponu eklendi. Güç kaynağı 100V ayarlanarak yaklaşık 30 dk transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer sonrası membran bloklama solüsyonuna alındı. Bloklama işleminin ardından primer antikor 1/1000 sulandırımda eklenerek +4°C'de bir gece inkübe edildi. Primer antikor olarak difteri için Difteri Antitoksin, İnsan İgG (1.Uluslararası Standard), tetanoz için de Tetanoz İnsan İmmunoglobulini eklendi. Ertesi gün yıkama işleminin ardından HRP ile işaretli anti-insan İgG ikincil antikoru 1/10000 dilüsyonda eklendi. Yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon sonrası membranlar yıkandı ve görüntüleme işlemine geçildi. Görüntüleme için ECL substrat membranlara eklenerek oluşan parlaklık röntgen filmlere basılarak görüntüleri elde edildi.

3.2.8. Tetanoz toksini LD_{50} ve PD_{50} dozu belirleme yöntemi

Dişi, 17-22 gram ağırlığındaki Balb/c fareler her grupta 6 adet fare olacak şekilde gruplara ayrıldı. Tetanoz toksininin azalan dozlarda konsantrasyonları hazırlanarak subkütan yolla farelere enjeksiyon yapıldı. Dozlar 50, 10, 2,5, 1,2, 0,1, 0,01 ve 0,001 ng/0,5ml olarak belirlendi. Enjeksiyonunun ardından fareler 4 gün boyunca günde 4 kez kontrol edilerek takip edildi. Paraliz bulgusu ve ölüm gerçekleşen fareler

belirlendi. Dört gün içinde farelerin %50'si ölen gruptaki en düşük doz, tetanoz toksininin LD_{50} dozu, %50'inde paraliz bulgusu görülen en düşük doz ise PD_{50} dozu olarak saptandı. Hayvanlar üzerindeki paraliz ve ölüm bulguları aşağıdaki DSÖ belirlediği kriterlere göre belirlendi:

T1: bir ön ayağın hafif sertliği, ancak gözlemlenmesi zor;
T2: hala çalışabilen bir ön ayağın kas gücü kaybı;
T3: bir ön ayağın felci. Hayvan isteksizce hareket eder, skolyoz nedeniyle vücut genellikle hafifçe muz şeklindedir;
T4: ön ayaklar tamamen sert ve ayak parmakları hareket ettirilemez. Ön ayağın kas kasılması çok belirgindir ve genellikle skolyoz görülür;
T5: tetanoz nöbetleri, kasların sürekli tonik spazmı;
D: ölüm [152].

3.2.9. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile difteri toksini minimum sitopatik doz belirlenmesi

Difteri toksinin Vero-E6 hücre hattında MTT yöntemi ile minimum sitopatik dozu belirlendi. Bu amaçla hücre pasajlanması ve saklanması yönteminde anlatıladığı gibi Vero-E6 hücreleri 75 cm^2'lik hücre kültürü şişesinde 37°C'de, 24 saat süreyle % 5 CO2 ve % 95 nem içeren inkübatörde çoğaltıldı. Bundan sonraki işlemler 96 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü plağında yapıldı. Difteri toksini 1 Lf/ml konsantrasyonda olacak şekilde %10 FBS içeren DMEM besiyerinde sulandırıldı ve filtre edildi. Hazırlanan toksin, 96 kuyucuklu hücre kültürü plağındaki 1. sıradaki kolona her kuyucukta 100µl olacak şekilde eklendi. Kolonlardan 2-10. sıradaki kuyucuklara 50µl %10 FBS içeren DMEM besiyeri koyuldu. Toksin içeren 1. sıradaki kuyucuklardan 50µl çekilerek ½ oranında dilüsyon olacak şekilde alınıp 2. sıradaki kuyucuklara koyuldu. Seri dilüsyona 10. sıraya kadar aynı şekilde devam edilerek gittikçe azalan konsantrasyonlarda toksin koyulmuş oldu. Her kuyucuğa 50 µl %10 FBS içeren DMEM besiyerinden eklenerek kuyucuklardaki toplam hacim 100 µl yapıldı. Hücre kontrolü olarak 11. Kolondaki kuyucuklara sadece 100 µl %10 FBS içeren DMEM besiyeri koyuldu. Besiyeri kontrolü amaçlı olarak 12. Kolondaki kuyucuklara 150 µl besiyeri eklendi. Çoğalan Vero-E6 hücreleri tripsin-EDTA ile hücre kültürü şişesi tabanından kaldırılarak tripan mavisi dışlama yöntemi ile sayılıp

$4X10^5$ hücre/ ml olacak şekilde ayarlandı. Sayılan Vero-E6 hücreleri 1-11. kolonlardaki her kuyucuğa 50µl besiyeri içerisinde eklendi. Böylece tüm kuyucuklarda toplam hacim 150 µl oldu. Plaklar 37°C'de, 6 gün süreyle, % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklar ışık mikroskobu altında kontaminasyon açısından değerlendirildi. Her kuyucuğa 10 µl MTT ayracı eklenerek 4 saat, 37 °C'de, % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyeri plak tabanına değmeden çekilerek, çözme çözeltisi eklenerek bir gece 37 °C'de % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren inkübatörde inkübe edildi. Ertesi gün 590-660 nm dalga boyunda okutularak OD değerleri belirlendi. Belirlenen OD değerlerinin ortalamaları alındı, hücre kontrolü %100 kabul edilerek, kontrole göre % canlılık hesaplandı. Hücre kontrolü kuyucuklarından elde edilen ortalama OD değerlerine göre %50 canlılık olan OD değeri MSD olarak belirlendi.

3.2.10. *in vitro* Toksin Nötralizasyon Testi ile Difteri Toksoidine Karşı Oluşan İmmün Serumların Titrasyonu

Difteri aşıları için etkinliği belirlemede letal ve non letal "challenge" testlerine alternatif olarak, Vero hücreleri ile yapılan in vitro nötralizasyon yöntemi ile son nokta (*end-point*) belirleme testi de Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilmektedir [152]. Bu amaçla 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarında immünize farelerden elde edilen serum örnekleri ½ seri dilüsyon ile koyuldu. Ardından, her kuyucuğa difteri toksininin Vero hücreleri üzerindeki daha önce belirlenmiş olan minimum sitopatik dozunun (MSD) 4 katı (4XMSD) eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, kuyucuklara $4X10^5$/ml olacak şekilde Vero hücreleri koyularak 6 gün boyunca 37°C'de %5 CO_2 ve %95 nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolduğunda MTT testi yapılarak değerlendirildi. Değerlendirmede her plak için toksin ve toksoid eklenmeyen hücre kontrol kuyucuklarının OD değerlerinin ortalamaları alınarak ikiye bölündü ve %50 kontrol OD değeri belirlendi. Her test edilen aşı ve referans serum örneği için %50 kontrol OD değerinden büyük olan kuyucuk (nötralizasyonun görüldüğü son kuyucuk) o serum örneğinin son-noktası olarak belirlendi. Her kuyucuk için belirlenen son-nokta skoru ile çarpılarak titre hesaplandı. Kuyucukların skorları 1. Kuyucuk için 1, 2. için 2, 3. Için 4, 4. Için 8 gibi karesi şeklinde artan sayılar olarak alınarak çarpma işlemi yapıldı. Birinci

kuyucuktan önce ise; 0.5, 11. kuyucuktan büyük ise de 2048 ile çarpıldı. Bu hesaplamada hem pozitif kontrol olarak testin hassasiyetini doğrulamak hem de plaklar arasındaki varyasyonu belirlemek için kullanılan serum antitoksini de 1/12,5 olarak sulandırıldığı için hesaplamaya dahil edildi.

Kontrol antitoksin titresi = Kontrol son-nokta skoru X Dilüsyon faktörü

Kontrol antitoksin titresi = 1024 X 12,5

Antitoksinin nötralize edebildiği %50 kontrol OD değerinden büyük olan son kuyucuk 11. kuyucuk olduğu için 1024 skoru alındı.

Kontrol antitoksin titresi ile tüm serumların titreleri aşağıdaki formül ile belirlendi.

Serum titresi = Serum son-nokta skoru X Kontrol antitoksin titresi

Enjeksiyon grupları, her grupta 6 adet dişi Balb/C fare olacak şekilde aşağıdaki gibi belirlendi.

1. Grup: 0,5 ml tek insan dozu referans Td aşısı (Td-VAC)
2. Grup: 7,5 Lf/ml Tetanoz toksoidi ve 2,5 Lf/ml difteri toksoidi ile alum adjuvanı (Td+Alum)
3. Grup: 0,5 ml tek insan dozu referans Td aşısının (Td-VAC) 1/25 dilüsyonu (Td-VAC 1/25)
4. Grup: 7,5 Lf/ml Tetanoz toksoidi ve 2,5 Lf/ml difteri toksoidi ile alum adjuvanının (Td+Alum) 1/25 dilüsyonu (Td+Alum 1/25)
5. Grup: 0,5 ml tek insan dozu referans Td aşısının (Td-VAC) 1/50 dilüsyonu (Td-VAC 1/50)
6. Grup: 7,5 Lf/ml Tetanoz toksoidi ve 2,5 Lf/ml difteri toksoidi ile alum adjuvanının (Td+Alum) 1/50 dilüsyonu (Td+Alum 1/50)

7. Grup: 0,5 ml tek insan dozu referans Td aşısının (Td-VAC) 1/100 dilüsyonu (Td-VAC 1/100)
8. Grup: 7,5 Lf/ml Tetanoz toksoidi ve 2,5 Lf/ml difteri toksoidi ile alum adjuvanının 1/100 dilüsyonu (Td+Alum 1/100)
9. Grup: Serum fizyolojik enjekte edilen kontrol grubu (Kontrol)

3.2.11. Farelerde tetanoz toksini “challenge” deneyi

Tetanoz toksoidinin alum adjuvanı içeren aşı şeklinde uygulandığında koruyucu etkisini saptayabilmek ve piyasada mevcut olarak bulunan ve alum adjuvanı içeren aşı (referans) ile etkinliğini karşılaştırabilmek amacıyla “challenge” deneyleri yapıldı. Bu amaçla, 17-22 gram ağırlığındaki dişi Balb/c farelere alum adjuvanı ile birlikte Td (Td+Alum) ve ticari olarak satılan mevcut aşı (Td-VAC) subkütan yolla verilerek fareler immünize edildi. İmmünizasyon dozlarına göre ve her grupta 6 adet fare olacak şekilde gruplar şu şekilde oluşturuldu:

1. Grup: 0,5 ml tek insan dozu referans Td aşısı (Td-VAC)
2. Grup: 7,5 Lf/ml Tetanoz toksoidi ve 2,5 Lf/ml difteri toksoidi ile alum adjuvanı (Td+Alum)
3. Grup: Serum fizyolojik enjekte edilen kontrol grubu (Kontrol)

İmmünizasyondan 5 hafta sonra farelere tetanoz toksininin minimum öldürücü dozunun 50 katı derialtı yolla verildi. Fareler enjeksiyon sonrası 4 gün boyunca gözlemlendi. Günde dört kez aynı saatlerde yapılan kontrol ile ölü fare sayısı her grup için belirlendi. Ayrıca toksinin etkinliğini doğrulamak için her grupta 4 adet dişi Balb/c fare olacak şekilde gruplar oluşturuldu. Tetanoz toksininin minimum öldürücü dozunun 50 katı hazırlandı. Kontrol 1/16 grubunda toksinin belirlenen mimimum öldürücü dozunun 50 katının 1/16 dilüsyonu, Kontrol 1/50 grubunda 1/50 dilüsyonu ve Kontrol 1/160 grubunda da 1/160 dilüsyonları hazırlandı ve derialtı yolla enjekte edildi. Fareler enjeksiyon sonrası 4 gün boyunca gözlemlenerek ölü ve canlı fare sayısı belirlendi.

3.2.12. Farelerin *ex vivo* deneyler için immünizasyonu

Toksinlerin ve aşıların karakterizasyonunu yapmak amacıyla kullanılan yöntemlerde farelere enjeksiyonlar yapıldı. Bu amaçla her grupta 6 adet 17-22 gram ağırlığında dişi Balb/c fare olacak şekilde fareler rastgele seçilerek gruplara ayrıldı. Birinci gruba kontrol grubu olarak serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu, ikinci gruba karşılaştırma yapılacak olan ticari aşı enjeksiyonu, üçüncü gruba alüminyum adjuvanı ile adsorbe tetanoz difteri toksoidleri (Td+Alum) enjeksiyonu, dördüncü grupta ise kalsiyum fosfat ajduvanı (CAP) ile adsorbe edilen tetanoz difteri toksoidleri (Td+CAP) enjeksiyonu yapıldı.

Farelerin subkutan (derialtı) enjeksiyon ile immünizasyonu

Farenin ense bölgesindeki deri baş ve işaret parmağı ile tutularak gerdirildi. İnsülin enjektörü bu bölgeye 45-60° açı ile batırılarak enjeksiyon yapıldı.

Farelerin intraperitoneal (İP) enjeksiyon ile immünizasyonu

Fare bir elle ense ve kuyruk kısmından tutularak uygun pozisyona getirildi. Bir yardımcı ile fare bacak kısmından sabit hale getirildi. Farenin abdomenindeki sağ ya da sol alt kadranına 45 derecelik bir açıyla deriye girildi. Daha sonra hafifçe ilerletilerek peritona girildiği saptandı ve enjeksiyon yapıldı.

3.2.13. Akım sitometri yöntemi

Akım sitometri yönteminde kullanılacak olan dalak mononükleer hücrelerinin izole edilerek antikorlar ile boyanması ve sonuçların elde edilmesi ile ilgili basamaklar aşağıda anlatıdı.

Farelerden dalak izolasyonu

Farelere servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi uygulandı. Farenin karnı yan tarafa doğru kesilerek dalak izole edildi. Dalak, steril 10 cm’ lik petri kabına alınarak steril

pens ve makas ile üzerinde bulunan yağ dokusu temizlendi. Dalaklar, ağırlıklarının belirlenmesi amacıyla, hassas terazide tartıldı.

Lenfosit hücrelerinin hazırlanması

İzole edilen dalaklar, steril bir enjektör pompasının arka kısmı ile PBS içerisinde ezildi ve 70µm hücre süzgecinden geçirildi. Dalak süspansiyonu %0.5 FBS içeren PBS içerisinde 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Pellet, eritrosit lizis tamponu ile sulandırılarak 3-5 dakika buz içinde bekletildi. Eritrositlerin patlatılmasından sonra lenfositler tekrar santrifüj edilerek yıkandı. Santrifüj sonrası lenfosit hücrelerin sayısı tripan mavisi dışlama yöntemi ile Nauber lamında sayılarak belirlendi.

Hücre boyaması

Sayısı belirlenen hücrelerden her tüpte, 90 µl boyama çözeltisi içinde $1X10^6$ hücre olacak şekilde hücreler ayarlandı. Her bir dalak için tüplere; boyanmayan, izotip boyama, anti fare-CD4, anti fare-CD8a ve anti fare-CD19 boyaması olacak şekilde hücreler koyuldu. Antikor boyamaları öncesinde spesifik olmayan antikor bağlanmalarını engellemek için, Fc reseptörlerine bloklama işlemi yapıldı. Bu amaçla hazırlanan bloklama çözeltisinden 10µl alınarak tüplere eklendi. Bloklama işlemi oda sıcaklığında 10 dakika süre ile gerçekleştirildi. Bloklama sonrası hücreler hafif vortekslenerek antikorlar eklendi. İzotip boyaması için rat anti-İgG antikoru kullanıldı. FITC ile işaretli fare anti-CD4 antikoru 0,25 µg/test, PE ile işaretli anti-CD8a antikoru 0,25 µg/test ve PE ile işaretli fare anti-CD19 antikoru 0,125 µg/test konsantrasyonda kullanıldı. Antikor ile işaretleme işlemi 20 dakika süre ile 4°C'de 5 dakikada bir vorteks yapılarak gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet 300 PBS ile süspanse edilerek, akım sitometri cihazında okutuldu.

Akım sitometri analizi

Tüm numuneler akım sitometri cihazı ile (FC 500, Beckman Coulter, USA) çalışıldı ve sonuçlar Cytomix FC500 CXP yazılımı (Beckman Coulter, USA) ile analiz edildi.

Sonuçlar forward scatter (ileri dağılım) / side scatter (yan dağılım) grafikleri yardımıyla oluşturulan lenfosit kapısındaki hücrelerin CD ile işaretli hücrelere oranları olarak hesaplandı ve yüzde olarak kaydedildi.

3.2.14. ELISA metodu

Fare kalp kanı alınması ve serumların elde edilmesi

Fareler sırt üstü pozisyonda yatırıldı, anestezi altında sternum kesilerek kalp ortaya çıkarıldı. İnsülin enjektörü yardımı ile 0,5-1ml arasında değişen oranlarda farelerden kalp kanları elde edildi. Kanlar oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 2000 rpm 20 dk santrifüj edilerek serumlar elde edildi. Serumlar çalışılacağı zamana kadar -20°C'de dondurularak saklandı.

ELISA testi çalışılması

Serumlar oda sıcaklığına getirilmek üzere -20°C'de saklandıkları yerden çıkarıldı. Serumlar, fare Anti-difteri toksoid İgG ELISA kiti ve fare Anti-Tetanoz toksoid İgG ELISA kitlerinde önerildiği şekilde kitin talimatlarına göre çalışılarak sonuçlar elde edildi. Her grupta 17-22 gram ağırlığında 6 adet dişi Balb/c fare olacak şekilde, üç doz subkütan ve her grupta 17-22 gram ağırlığında 6 adet dişi Balb/c fare olacak şekilde 3 doz intraperitoneal Td enjeksiyonu yapılan ticari aşı, Td+Alum ve Td+CAP gruplarından elde edilen serumlar ile fare Anti-Tetanoz toksoid İgG ELISA kiti ve fare Anti-difteri toksoid İgG ELISA kiti çalışıldı.

3.2.15. İstatistiksel analizler

Tez kapsamında yapılan tüm istatistiksel analizler Graphpad Prism 9 programı kullanılarak yapıldı. Veriler arasında bağımsız gruplar T-testi yapıldı.

4. BULGULAR

Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilerek sunuldu. Çalışma kapsamında kullanılan tetanoz ve difteri toksinleri ve geliştirilen tetanoz ve difteri aşıları Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'ndan elde edilmiştir.

4.1. Toksoid Aşılarla Oluşan İmmün Yanıtlarının Karakterizasyonu Bulguları

Erişkin Tip Difteri-Tetanoz aşıları ile oluşan immün yanıtlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Bu amaçla aşılar ile immünize edilen farelerden elde edilen bulgular başlıklar halinde gösterildi. Tetanoz ve difteri toksoidlerinin (Td) aluminyum hidroksit ve kalsiyum fosfat adjuvanlarını kullanarak oluşturulan aşılarda hücresel immün yanıtta oluşturduğu etkileri göstermek, piyasada mevcut ticari aşı (Td-VAC, KEYMEN İLAÇ SAN. ve TİC. LTD. ŞTİ.) ile etkinliğini karşlılaştırmak ve farklı adjuvanlar ile kullanıldığında etkinliğini karşılaştırabilmek amacıyla *ex vivo* deneyler yapıldı. Bu amaçla her grupta 6 adet olacak şekilde, 5 haftalık dişi Balb/c farelere, 30 gün ara ile deri altı yolla üç doz enjeksiyon yapıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak belirlenerek farelere serum fizyolojik (SF), 2. gruptaki farelere ticari aşı, 3. gruba alüminyum hidroksit adjuvanı ile birlikte Td ve 4. gruba kalsiyum fosfat (CAP) adjuvanı ile birlikte Td subkütan enjekte edildi. Enjeksiyonlar 0., 30. ve 60. günlerde yapılarak, birinci enjeksiyondan 90 gün sonra her gruptaki altı adet farenin kalp kanı alındı ve dalakları çıkarıldı. Fare serumları elde edilerek, oluşan spesifik antikor yanıtını belirlemek amacıyla, ELISA yönteminde kullanılmak için -20C'de saklandı. Her bir fareden alınan dalağın ağırlığı mg cinsinden ölçüldü ve her grubun ortalama dalak ağırlıkları belirlendi. Her gruptaki farenin dalak mononükleer sayısı ve grupların ortalama dalak mononükleer hücre sayıları belirlenerek karşılaştırıldı. Her bir farenin dalak mononükleer hücre CD4, CD8 ve CD19 ekspresyonları akım sitometri yöntemi ile belirlenerek gruplar arasında ekspresyon oranları açısından karşılaştırma yapıldı. Karşılaştırılan arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı T test ($p < 0,05$) ile belirlendi.

Enjeksiyon grupları ve enjeksiyon içerikleri şu şekilde belirlendi:

1. Grup: Kontrol (SF) ; 0.5ml serum fizyolojik
2. Grup: Ticari Aşı; 0.5ml Td-VAC aşısı
3. Grup: Td+Alum; SF içinde 7,5 Lf/0,5ml Tetanoz toksoidi ve 2,5 Lf/0,5 ml difteri toksoidi ile aluminyum hidroksit adjuvanı
4. Grup: Td+CAP; SF içinde 7,5 Lf/0,5ml Tetanoz toksoidi ve 2,5 Lf/0,5 ml difteri toksoidi ile kalsiyum fosfat adjuvanı

Enjeksiyonlar iki farklı yolla aynı gruplama işlemi yapılarak subkütan ve intraperitoneal olarak yapıldı.

4.1.1. Subkütan enjeksiyon yapılan grupların *ex vivo* çalışma bulguları

Fareler yukarıda belirtildiği şekilde gruplara ayrılarak subkütan enjeksiyonları yapıldı. Elde edilen sonuçlar başlıklar halinde sunuldu.

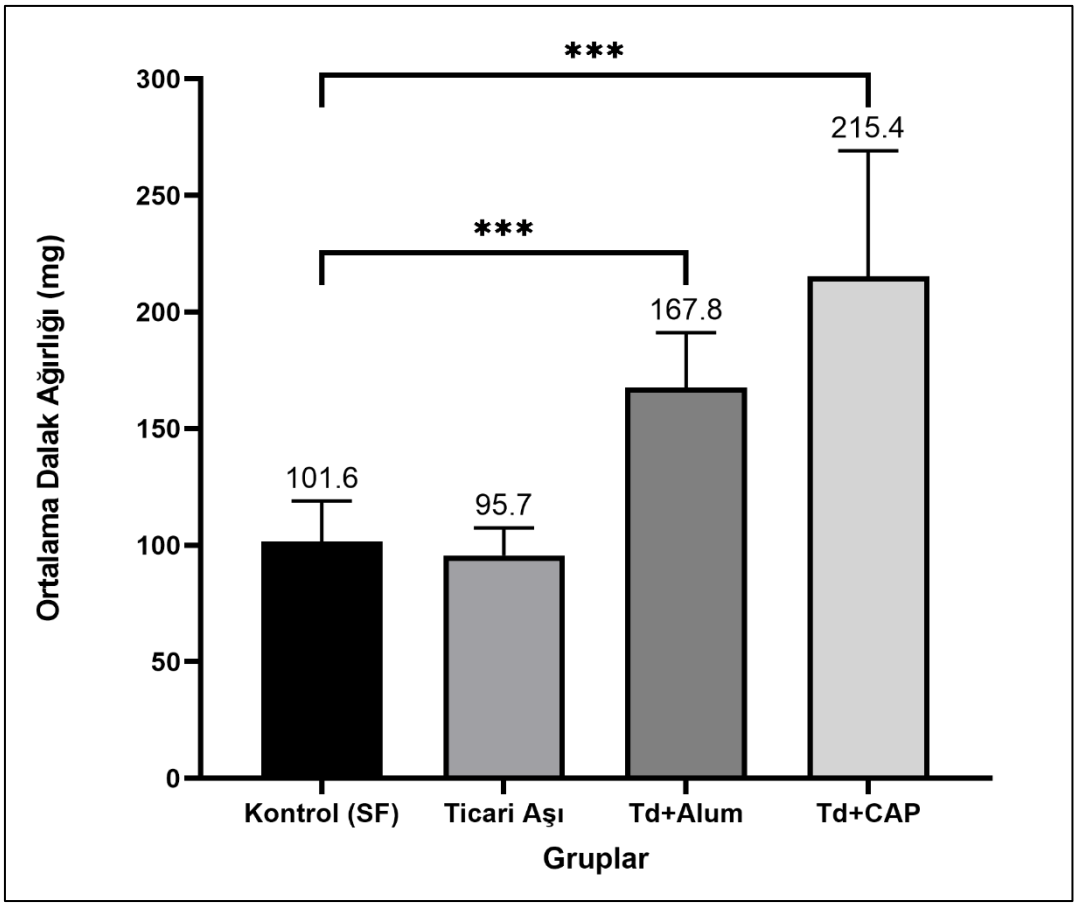
Subkütan enjeksiyon yapılan farelerin dalak ağırlığı ve mononükleer hücre sayıları bulguları

Birinci enjeksiyondan 90 gün sonra, her grupta 6 adet dişi Balb/c fare olmak üzere, 4 gruptaki tüm farelerin dalakları anestezi altında çıkarılarak ağırlıkları mg cinsinden ölçüldü (Çizelge 4.1). Gruplardaki farelerin ortalama dalak ağırlıkları ve standart sapmaları (SS) hesaplanarak gruplar arasında dalak ağırlıkları açısından bir fark olup olmadığı değerlendirildi (Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Subkütan enjeksiyon yapılan farelerin dalak ağırlıkları, ortalama ve standart sapma değerleri

	Dalak Ağırlığı (mg)			
Fare No	**Kontrol (SF)**	**Ticari Aşı**	**Td+ Alum**	**Td + CAP**
1.Fare	99,6	104,2	173,4	275,9
2.Fare	104,3	93,5	177,2	289,1
3.Fare	115,6	93,9	120,3	178,7
4.Fare	76,9	110,8	181,6	184,1
5.Fare	124,4	76	175,4	161,2
6. Fare	88,8	95,7	178,6	203,3
Ortalama±SS	101,6±17,3	95,7±13,2	167,8±23,4	215,4±53,9

Kontrol grubundaki farelerin ortalama dalak ağırlığı 101,6±17,3 mg, ticari aşı enjekte edilen grupta ortalama dalak ağırlığı 95,7±13,2 olarak bulundu. Bu iki grup arasında ortalama dalak ağırlıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Fakat Td+Alum grubunda ortalama dalak ağırlığı 167,8±23,4 mg ve Td+CAP grubunda ortalama dalak ağırlığı 215,4±53,9 mg olarak ölçüldü. Bu iki grupta dalak ağırlıklarında kontrol grubuna göre belirgin bir artış görüldü ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.1.) ($p<0.05$).

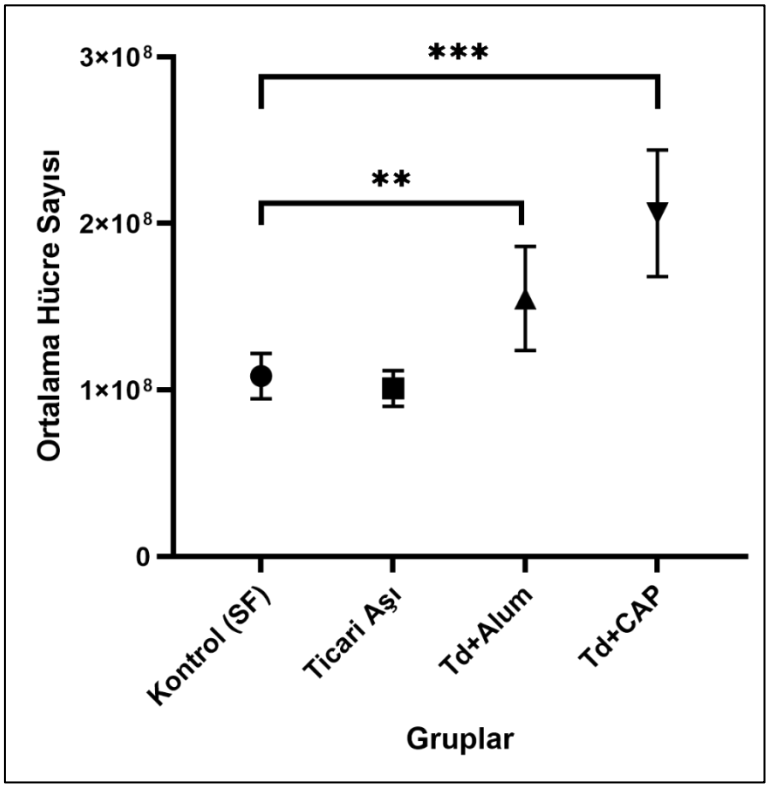


Şekil 4.1. Subkütan enjeksiyon yapılan grupların ortalama dalak ağırlıkları karşılaştırması (***; p<0,05).

Subkütan enjeksiyon yapılan tüm gruplardaki farelerin dalakları çıkarılıp tartıldıktan sonra dalak mononükleer hücre izolasyonu yapılarak, hücreler tripan mavisi dışlama yöntemi ile sayıldı. Böylece gruplardaki her bir farenin dalak mononükleer hücre sayısı belirlendi. Gruplar arasında elde edilen hücre sayısı açısından bir farklılık olup olmadığı karşılaştırıldı (Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. Subkütan enjeksiyon yapılan gruplardaki farelerin dalak mononükleer sayıları, ortalama ve standart sapma değerleri

	Dalak mononükleer Hücre Sayısı (Hücre/3ml)			
Fare No	**Kontrol Grubu**	**Ticari Aşı Grubu**	**Td+Alum**	**Td+CAP**
1. fare	102X10^6	118 X10^6	168,75 X10^6	237,5X10^6
2.fare	117 X10^6	100,5 X10^6	191.250.000	266,25 X10^6
3.fare	108 X10^6	106,5 X10^6	111.250.000	172,5 X10^6
4.fare	92,25 X10^6	95,25 X10^6	155 X10^6	191,25 X10^6
5.fare	130,5 X10^6	87,3 X10^6	125 X10^6	171,25 X10^6
6.fare	100,5 X10^6	101 X10^6	178,75 X10^6	198 X10^6
Ortalama±SS	108,375 X10^6± 12427917,2	100,925 X10^6± 9863389,8	155 X10^6 ± 28522651,8	206,125 X10^6± 34721736,1



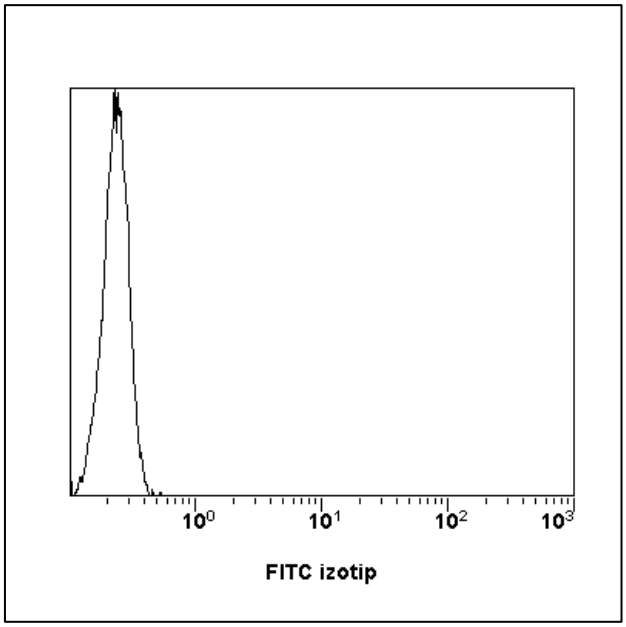
Şekil 4.2. Subkütan enjeksiyon yapılan grupların ortalama dalak mononükleer hücre sayıları

Kontrol grubunda ortalama 108,375 X10^6 hücre/3ml bulunurken, ticari aşı grubunda ortalama 100,925 X10^6 hücre/3ml bulundu. Td+Alum grubunda ortalama 155X10^6 hücre/3ml, Td+CAP grubunda ise ortalama 206,125 X10^6 hücre/3ml bulundu. Dalak

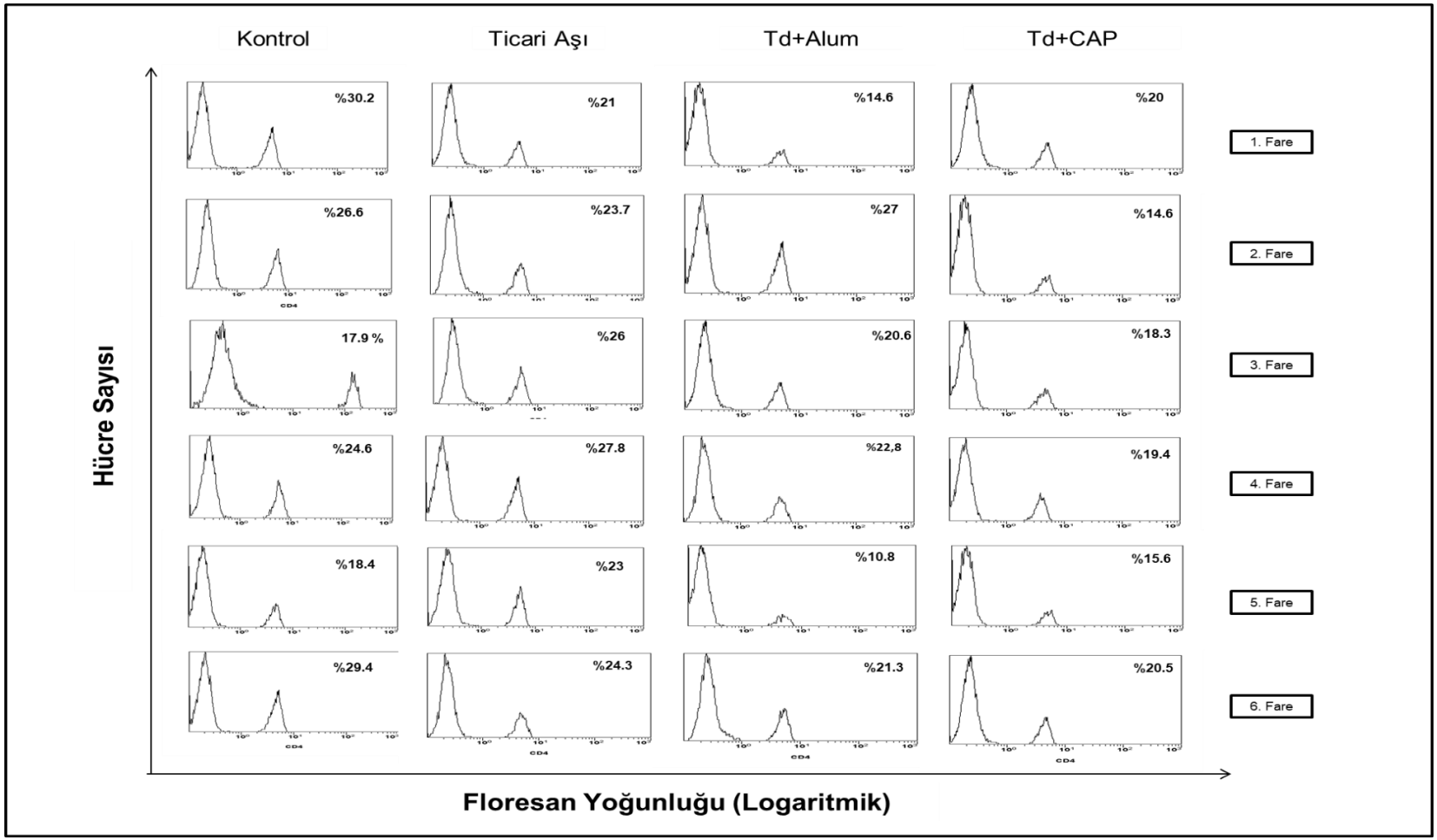
ağırlıkları karşılaştırması ile benzer şekilde ortalama dalak mononükleer sayılarına bakıldığında, Td+Alum ve Td+CAP gruplarında kontrol ve ticari aşı gruplarına göre artış olduğu görüldü. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Elde edilen dalak mononükleer hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile CD4, CD8 ve CD19 ekspresyon oranları belirlendi.

Subkütan enjeksiyon yapılan farelerin dalak $CD4^+$ T hücre bulguları

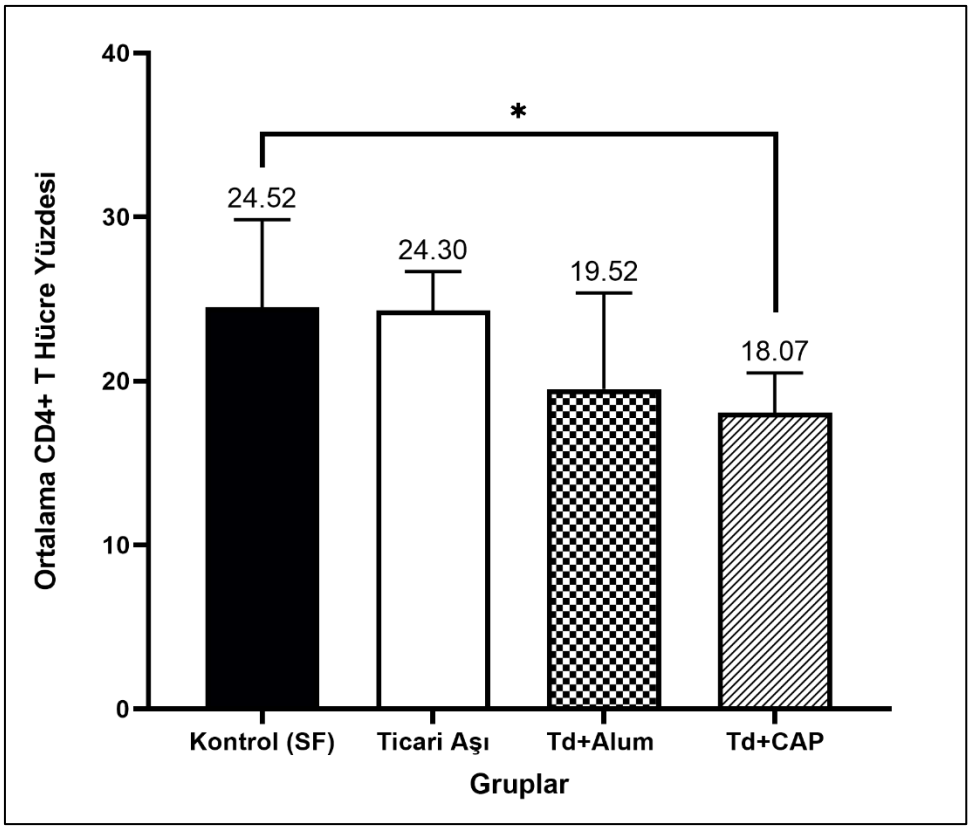
Birer ay ara ile üç doz Td enjeksiyonu yapılan tüm gruplardaki farelerin dalak mononükleerlerinin, yardımcı T hücre belirteci olan CD4 molekülü ekspresyonu belirlendi. Bunun için dalak mononükleer hücreleri FITC ile işaretli anti fare CD4 antikoru ile boyanarak akım sitometride incelendi. Tüm farelere ait CD4+ T Hücre yüzdeleri histogram grafiği şeklinde gösterildi (Şekil 4.4.). FITC ile işaretli izotipik antikor ile kontrol boyaması yapıldı (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Subkütan enjeksiyonu yapılan fare dalak mononükleer hücrelerinin PE işaretli izotipik antikor ile boyanma görüntüsü



Şekil 4.4. Subkütan enjeksiyon yapılan farelerin CD4+ T Hücre yüzdeleri



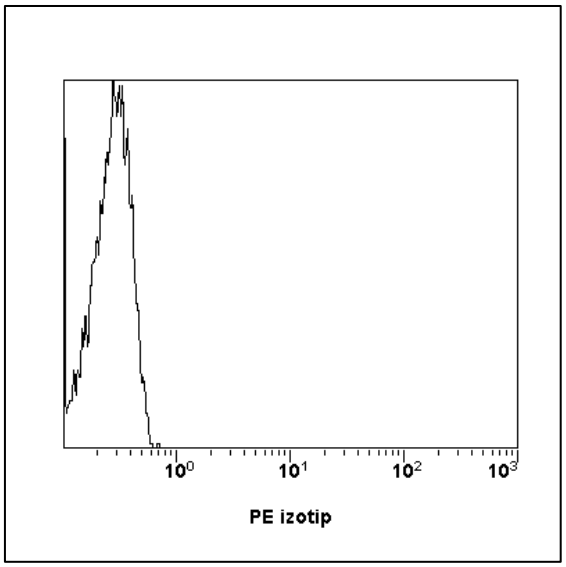
Şekil 4.5. Subkütan enjeksiyon yapılan grupların ortalama CD4+ T Hücre yüzdeleri karşılaştırması (*; p<0,05).

Subkütan yolla, 30 gün ara ile 3 doz enjeksiyon yapılan her grup için yardımcı T hücre belirteci olan CD4 molekülü ekspresyon oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri belirlendi. SF enjeksiyonu yapılan kontrol grubu için ortalama %24,52 olarak bulunurken, ticari aşı için %24,30, Td+Alum grubu için %19,52 olarak saptandı. Ticari aşı ve Td+Alum grubu ile kontrol grubu arasında CD4+ T Hücre yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05). TT+CAP grubunun ortalama CD4+ T Hücre yüzdesi %18,07 bulunmuş ve kontrol grubuna göre görülen azalma istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). Alum adjuvanı içeren ticari aşı ile Td+Alum grupları arasındaki CD4 ekspresyonu arasında ve Td+Alum ile Td+CAP grupları arasındaki CD4 ekspresyonu arasında ise anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05).

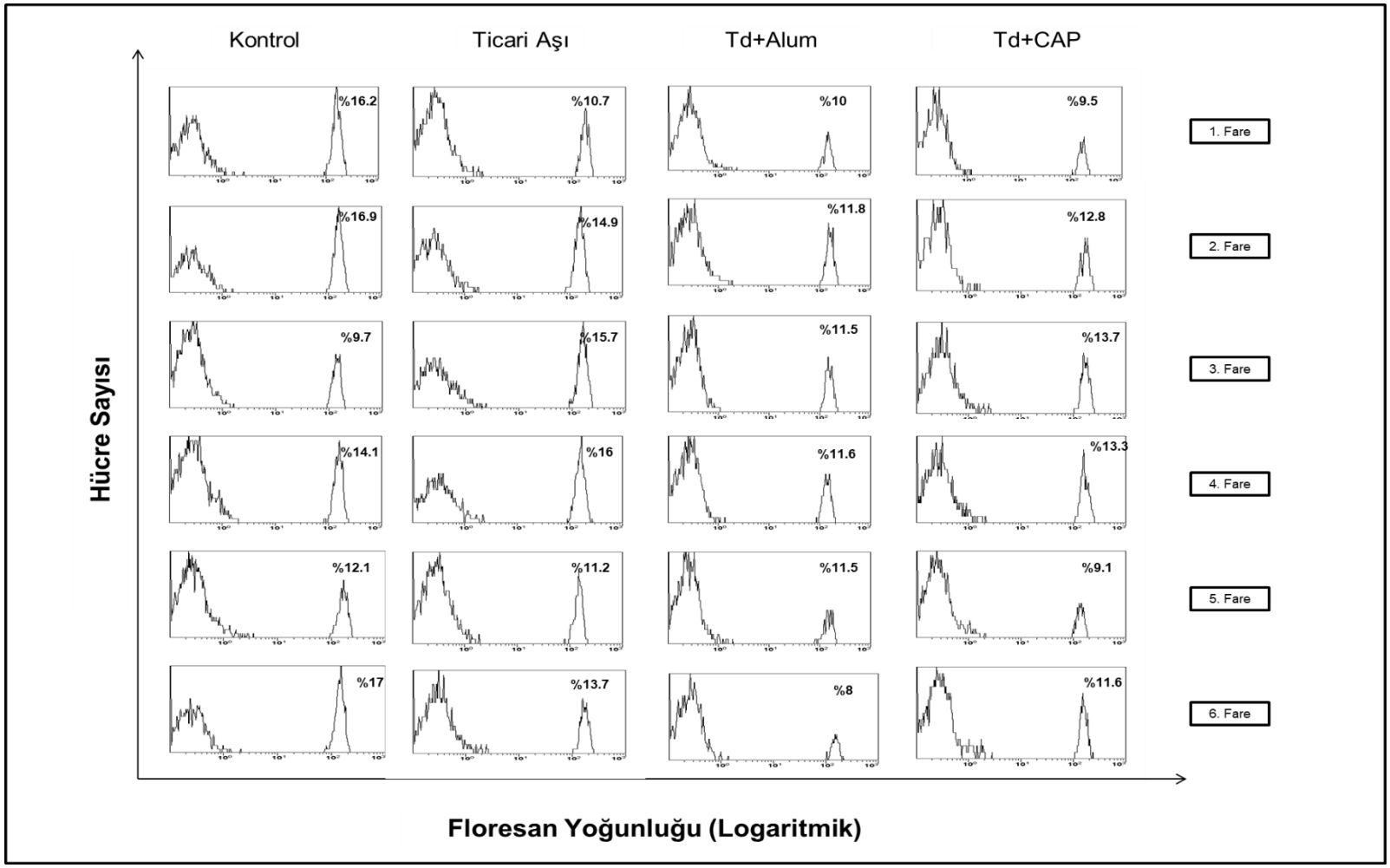
Subkütan enjeksiyon yapılan farelerin dalak $CD8^+$ T hücre bulguları

Enjeksiyon yapılan tüm gruplardaki fare dalak mononükleerlerinin sitotoksik T hücre belirteci olan CD8 molekülü ekspresyonunu belirlendi. Bu amaçla dalak

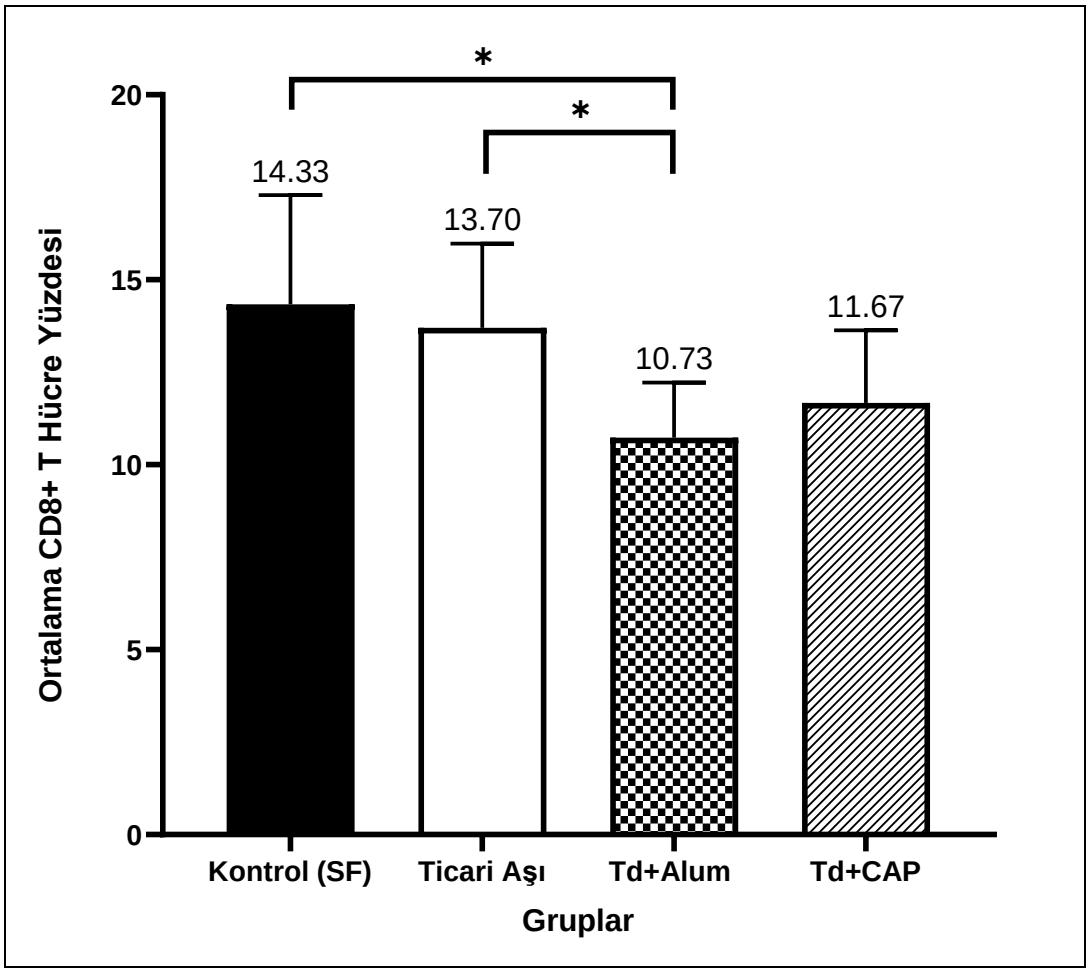
mononükleer hücreleri PE ile işaretli anti fare CD8a antikoru ile işaretlenerek akım sitometride incelendi. Her grupta bulunan tüm farelerin CD8+ T Hücre yüzdelerini gösteren histogram grafikleri gösterildi (Şekil 4.7). PE ile işaretli izotipik antikor ile kontrol boyaması yapıldı (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Subkütan enjeksiyon yapılan fare dalak mononükleer hücrelerinin PE işaretli izotipik antikor ile boyanma görüntüsü



Şekil 4.7. Subkütan enjeksiyon yapılan farelerin CD8+ T Hücre yüzdeleri

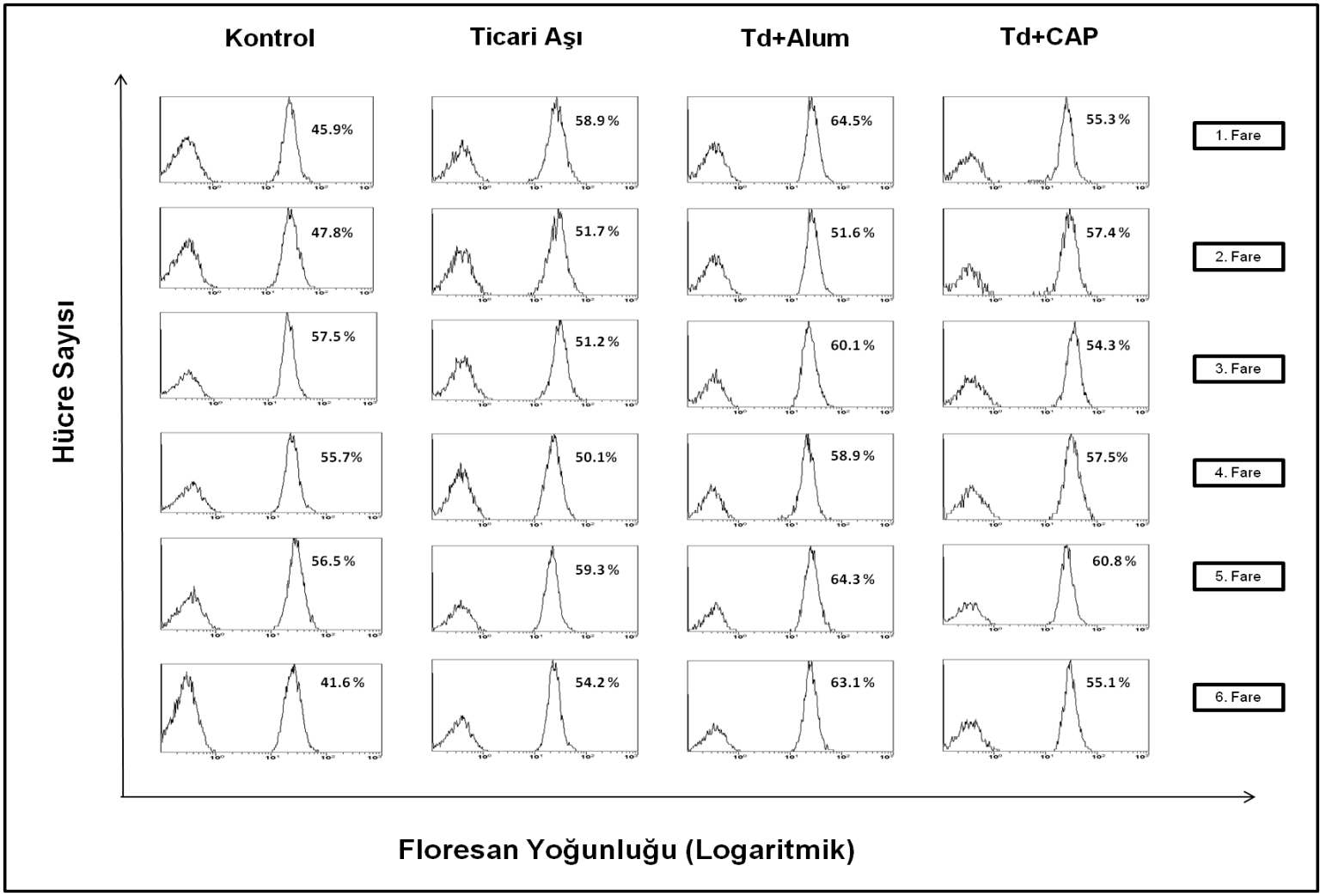


Şekil 4.8. Subkütan enjeksiyon yapılan grupların ortalama CD8+ T hücre yüzdeleri karşılaştırması (*; p<0,05).

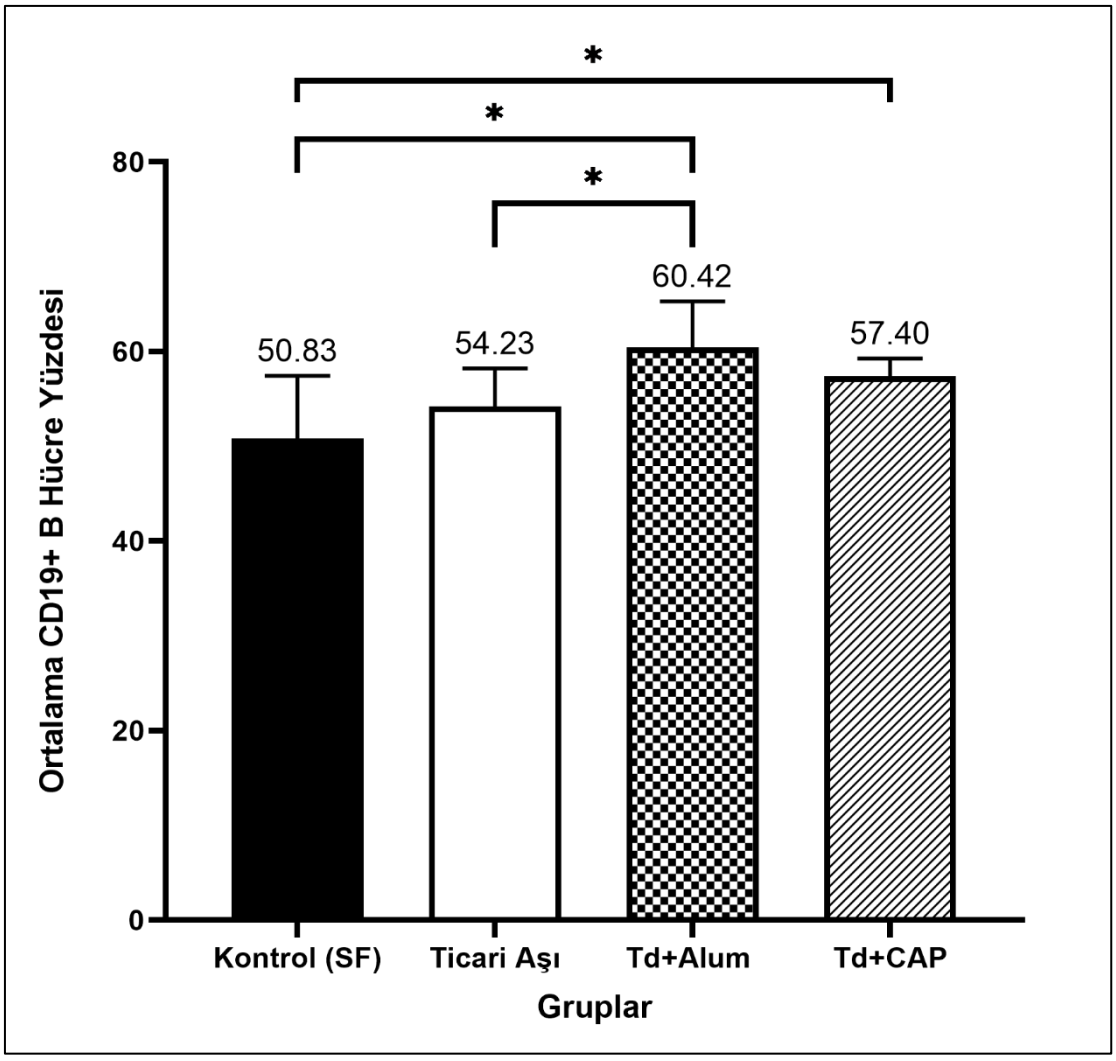
Enjeksiyon yapılan her grup için sitotoksik T hücre belirteci olan CD8 molekülü ekspresyon oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri belirlenerek karşılaştırıldı. Kontrol grubu için ortalama CD8+ T hücre yüzdesi %14,33 olarak bulunurken, ticari aşı için %13,70 olarak saptandı. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05). Td+Alum grubu ortalama CD8+ T Hücre yüzdesi %10,73 olarak saptandı ve kontrol grubuna göre görülen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05). Td+CAP grubunun ortalama CD8 ekspresyonu %11,67'dir. Kontrol grubu ile Td+CAP grubu CD8 ekspresyonu arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0,05). Alum adjuvanı içeren ticari aşı grubu CD8 ekspresyonu, yine alum adjuvanı içeren TT+Alum grubu CD8 ekspresyonuna göre artmış ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05). TT+Alum ile TT+CAP grupları arasındaki CD8 ekspresyonu arasında ise anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05).

Subkütan enjeksiyon yapılan farelerin dalak $CD19^+$ B hücre bulguları

Enjeksiyon yapılan 4 gruptaki farelerin dalak mononükleer hücrelerinin B hücre belirteci olan CD19 ekspresyonu PE ile işaretli fare Anti-CD19 antikoru kullanılarak akım sitometri yöntemi ile saptandı. Tüm farelerin CD19+ B Hücre yüzdelerini gösteren histogram grafikleri Şekil 4.9'da gösterildi. Gruplar arasındaki CD19+ B hücre yüzdeleri açısından karşılaştırmalar yapıldı.



Şekil 4.9. Subkütan enjeksiyon yapılan farelerin CD19+ B hücre yüzdeleri



Şekil 4.10. Subkütan enjeksiyon yapılan grupların ortalama CD19+ B Hücre yüzdeleri karşılaştırması (*; p<0,05)

Her gruptaki farenin CD19+ B hücre yüzdelerinin ortalama ve standart sapma değerleri belirlendi (Şekil 4.10). Üç doz subkütan Td enjeksiyonu yapılan farelerde, kontrol grubu için ortalama CD19+ B Hücre yüzdesi %50,83 olarak bulunurken, ticari aşı için %54,23 olarak saptandı. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05). TT+Alum grubu ortalama CD19+ B hücre %60,42 olarak bulunmuş ve kontrol grubuna göre bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p< 0,05). TT+CAP grubundaki farelerin dalak mononükleer hücrelerinin ortalama yüzdesi %57,40'dır. Kontrol grubu ile TT+CAP grubu ortalama CD19+ B hücre yüzdesi arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0,05). Alum adjuvanı içeren ticari aşı grubu ortalama CD19+ B Hücre yüzdesi ile TT+Alum grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). TT+Alum ve TT+CAP grupları

karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05).

4.1.2. Tetanoz ve difteri toksoidlerinin (Td) intraperitoneal (İP) enjeksiyonu *ex vivo* çalışma bulguları

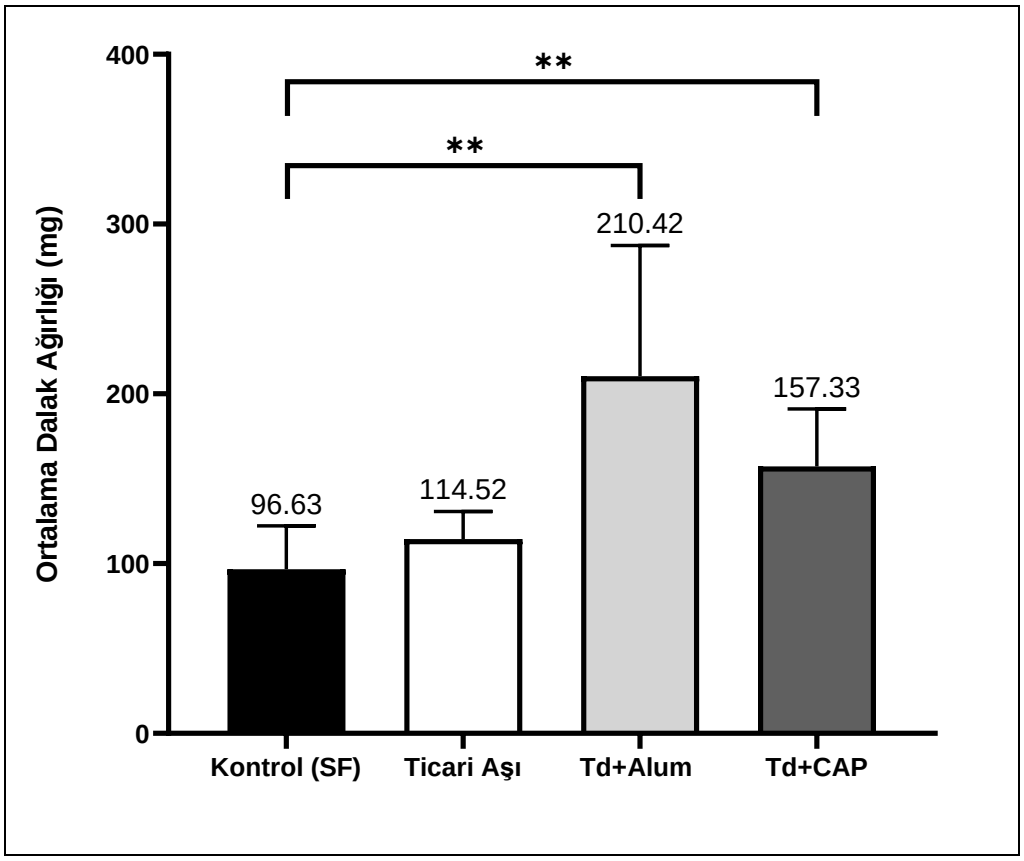
Subkütan enjeksiyon grupları ile benzer şekilde fareler, kontrol grubunda SF enjekte edilen fareler, piyasada mevcut ticari aşı grubu (Td-VAC, KEYMEN İLAÇ SAN. ve TİC. LTD. ŞTİ.), Td+Alum ve TD+CAP olmak üzere gruplara ayrılarak her grubun ortalama dalak ağırlıkları, farelerin dalak mononükleer hücre sayısı ve grupların ortalama dalak mononükleer hücre sayıları ve her bir farenin dalak mononükleer CD4, CD8 ve CD19 ekspresyonları ile grupların ekspresyon ortalamaları belirlendi. Karşılaştırılan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı saptandı.

<u>İP tnjeksiyon yapılan farelerin dalak ağırlığı ve mononükleer hücre sayıları bulguları</u>

Birinci enjeksiyondan 90 gün sonra, her grupta 6 adet dişi Balb/c fare olmak üzere, 4 gruptaki tüm farelerin dalakları çıkarılarak ağırlıkları mg cinsinden ölçüldü (Çizelge 4.3). Gruplardaki farelerin ortalama dalak ağırlıkları ve standart sapma (SS) değerleri hesaplanarak gruplar arasında dalak ağırlıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı değerlendirildi (Şekil 4.11.).

Çizelge 4.3. İP enjeksiyon yapılan farelerin dalak ağırlıkları, ortalama ve standart sapma değerleri

	Dalak Ağırlığı (mg)			
Fare No	**Kontrol (SF)**	**Ticari Aşı**	**Td+Alum**	**Td+CAP**
1.Fare	69,5	116,8	233,2	110
2.Fare	111,6	98,2	355	128,5
3.Fare	140,2	143,6	189,5	188,3
4.Fare	87,4	113,4	182,1	162,2
5.Fare	92,9	100,6	154,2	197,7
6. Fare	78,2	114,5	148,5	157,3
Ortalama±SS	96,63±25,7	114,52±16,2	210,42±77	157,33±33,7

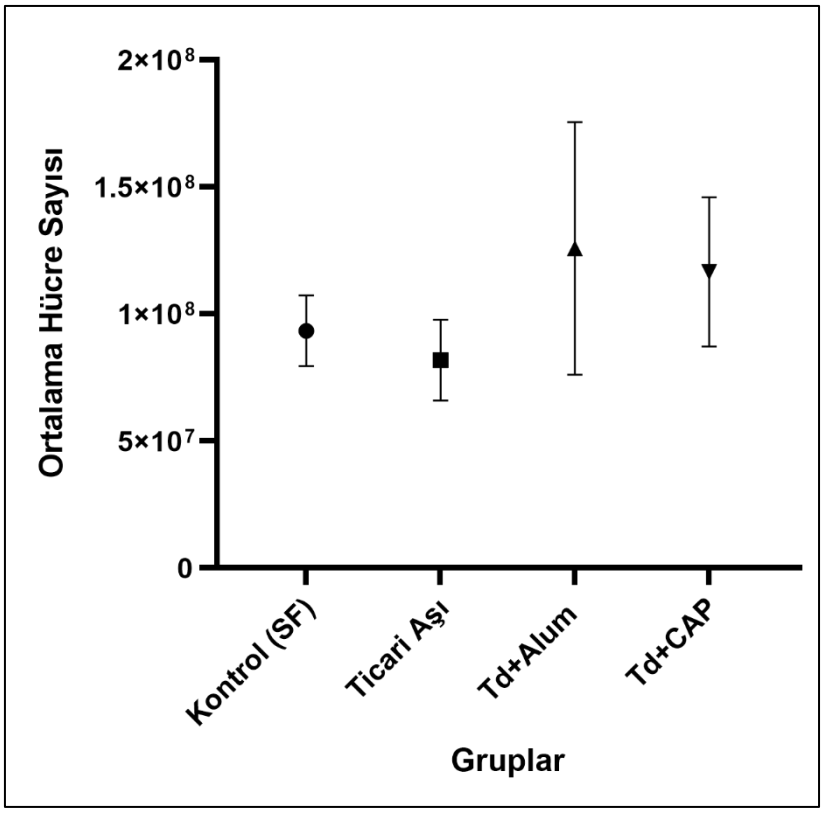


Şekil 4.11. İP enjeksiyon yapılan gruplardaki farelerin dalak ağırlık ortalamaları

Kontrol grubundaki farelerin ortalama dalak ağırlığı 96,63±25,7 mg, ticari aşı enjekte edilen grupta ortalama dalak ağırlığı 114,52±16,2 olarak bulundu. Bu iki grup arasında ortalama dalak ağırlıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Fakat Td+Alum grubunda ortalama dalak ağırlığı 210,42±77 mg ve Td+CAP grubunda ortalama dalak ağırlığı 157,33±33,7 mg olarak ölçüldü. Bu iki grupta dalak ağırlıklarında görülen belirgin artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Dalakları ezilen farelerden elde edilen dalak mononükleer hücreleri tripan mavisi dışlama yöntemi ile sayılarak miktarları Çizelge 4.4'de sunuldu. Gruplar arasında hücre sayıları açısından fark olup olmadığı değerlendirildi (Şekil 4.12).

Çizelge 4.4. İP enjeksiyon yapılan farelerin hücre sayıları, ortalama ve standart sapma değerleri

	Dalak Mononükleer Hücre Sayısı (Hücre/3ml)			
Fare No	**Kontrol Grubu**	**Ticari Aşı Grubu**	**TT+Alum**	**TT+CAP**
1. fare	93 X10^6	91,5 X10^6	199,5 X10^6	73,75 X10^6
2.fare	96,75 X10^6	59,25 X10^6	164 X10^6	91,5 X10^6
3.fare	119,25 X10^6	93,75 X10^6	138,75 X10^6	153,75 X10^6
4.fare	82,5 X10^6	98,25 X10^6	82,5 X10^6	124,5 X10^6
5.fare	85,5 X10^6	66 X10^6	92,25 X10^6	135,75 X10^6
6.fare	83,25 X10^6	82 X10^6	78 X10^6	12 X10^7
Ortalama±SS	93,375 X10^6± 13884118,6	81 791 667± 15910229,9	125 833 333± 49686936,6	116 541 667 ±29281144,4



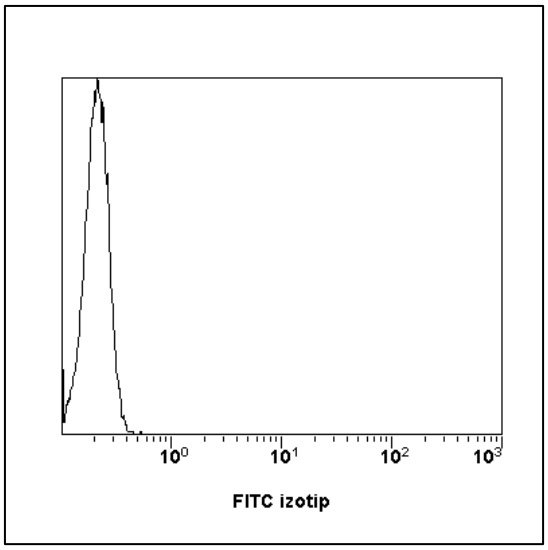
Şekil 4.12. İP enjeksiyon yapılan grupların ortalama dalak mononükleer hücre sayıları karşılaştırması (p>0,05)

Kontrol grubunda ortalama 93,375 X10^6 hücre/3ml bulunurken, ticari aşı grubunda ortalama 81 791 667 hücre/3ml bulundu. TT+Alum grubunda ortalama 125 833 333 hücre/3ml, TT+CAP grubunda ise ortalama 116 541 667 hücre/3ml bulundu.

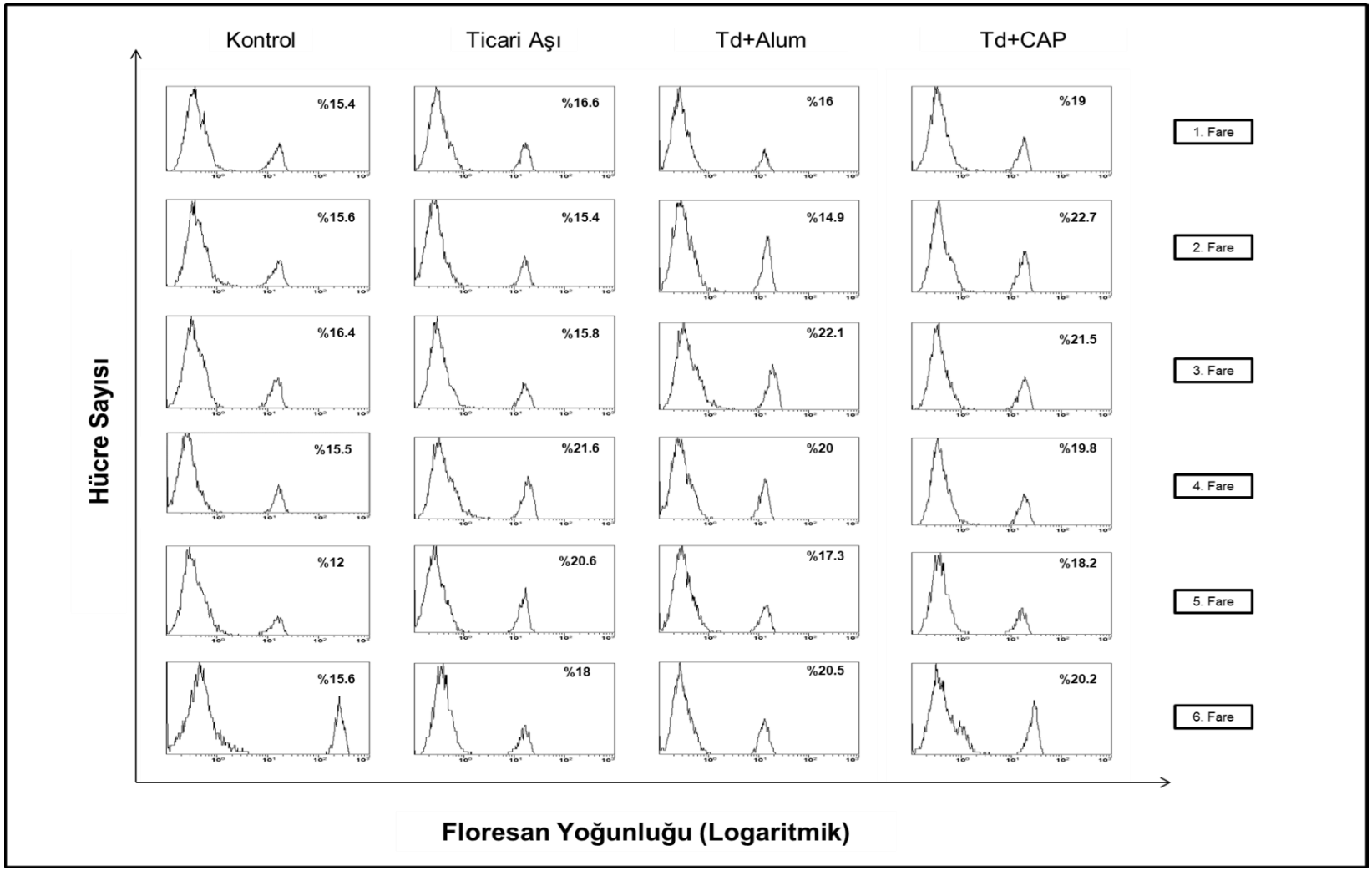
Ortalama dalak mononükleer sayılarına bakıldığında, Td+Alum ve Td+CAP gruplarında kontrol ve ticari aşı gruplarına göre artış olduğu görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.12).

İP enjeksiyon yapılan farelerin dalak $CD4^+$ T hücre bulguları

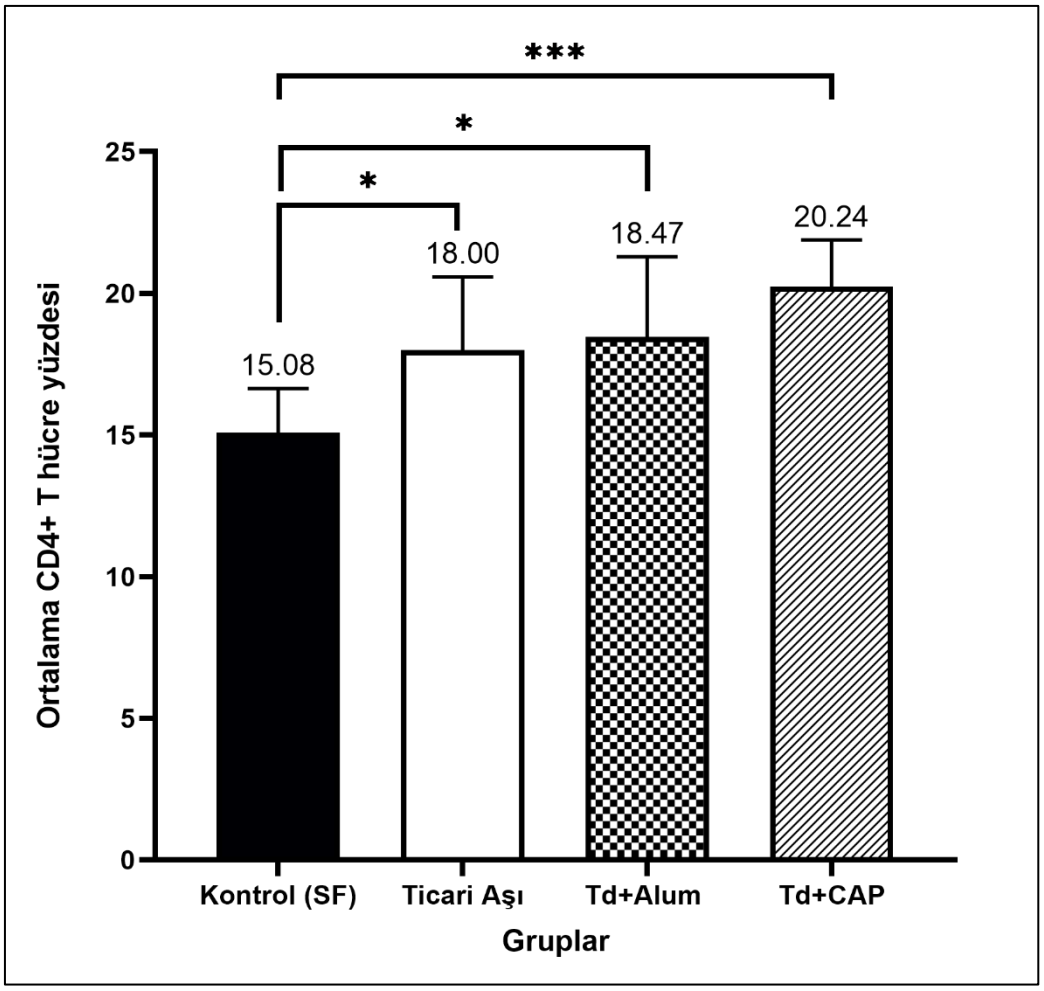
İP yolla üç doz Td enjeksiyonu yapılan tüm gruplardaki farelerin dalak mononükleerlerinin, yardımcı T hücre belirteci olan CD4 molekülü ekspresyonunu belirlendi. Dalak mononükleer hücreleri FITC ile işaretli anti fare CD4 antikoru ile boyandı ve akım sitometri yöntemi ile ekspresyon oranları belirlendi. Bütün farelerin CD4 ekspresyonları histogram grafiği şeklinde gösterildi (Şekil 4.14.). FITC ile işaretli izotipik antikor ile kontrol boyaması yapıldığında herhangi bir boyanma görülmedi (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. İP enjeksiyon yapılan fare dalak mononükleer hücrelerinin FITC işaretli izotipik antikor ile boyanma görüntüsü



Şekil 4.14. İP enjeksiyon yapılan farelerin CD4+ T Hücre Yüzdeleri

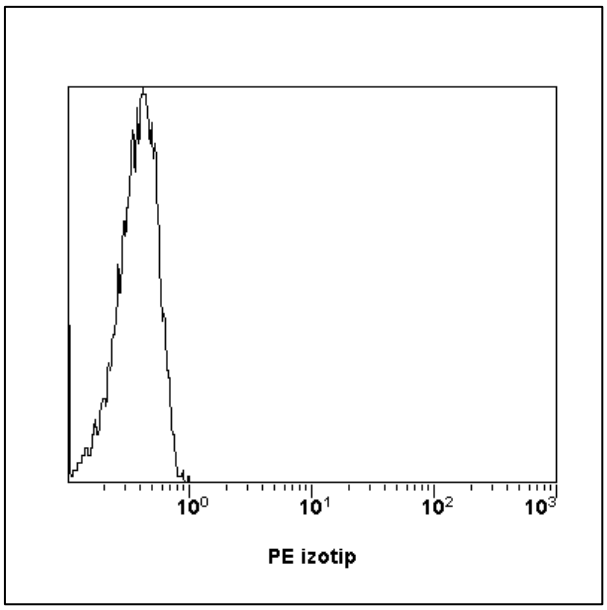


Şekil 4.15. İP enjeksiyon yapılan grupların ortalama CD4+ T Hücre yüzdeleri karşılaştırması (*;p<0,05, **; p<0,05, ***; p<0,05).

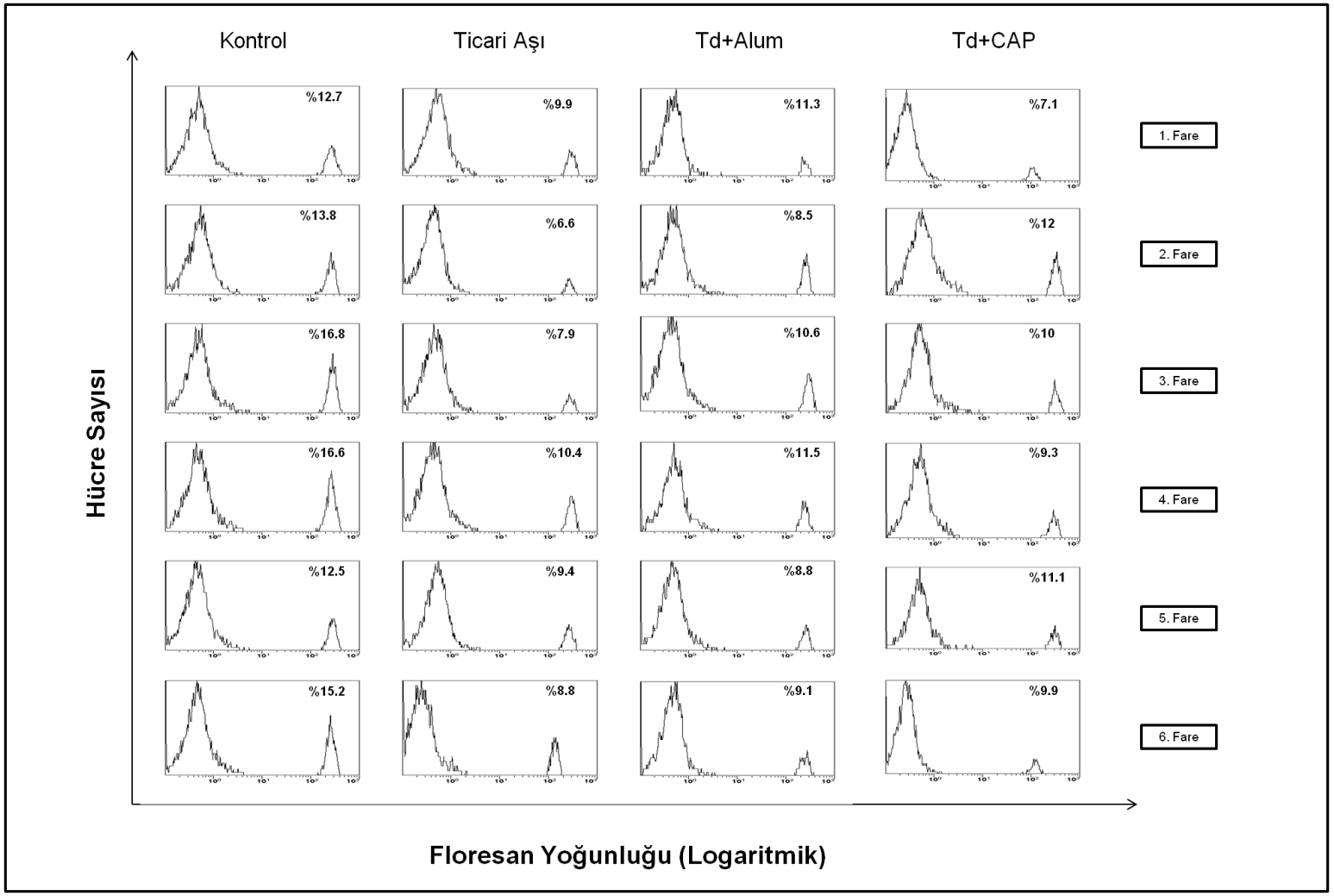
İP olarak 30 gün ara ile 3 doz enjeksiyon yapılan tüm gruplar için, yardımcı T hücre belirteci olan CD4 molekülü ekspresyon oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri belirlendi. SF enjeksiyonu yapılan kontrol grubu için ortalama CD4+ T hücre yüzdesi %15,08 olarak bulunurken, ticari aşı için %18, Td+Alum grubu için %18,47 olarak saptandı. TT+CAP grubunun ortalama CD4+ T hücre yüzdesi de %20,24 bulunmuş ve tüm aşı gruplarının kontrol grubuna göre CD4+ T hücre yüzdelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05) (Şekil 4.15.). Alum adjuvanı içeren ticari aşı ve Td+Alum grupları arasındaki CD4+ T hücre yüzdeleri arasında ve Td+Alum ile Td+CAP grupları arasındaki CD4+ T hücre yüzdeleri karşılaştırıldığında gruplar arasında CD4 ekspresyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05).

İP enjeksiyon yapılan farelerin dalak CD8+ T hücre bulguları

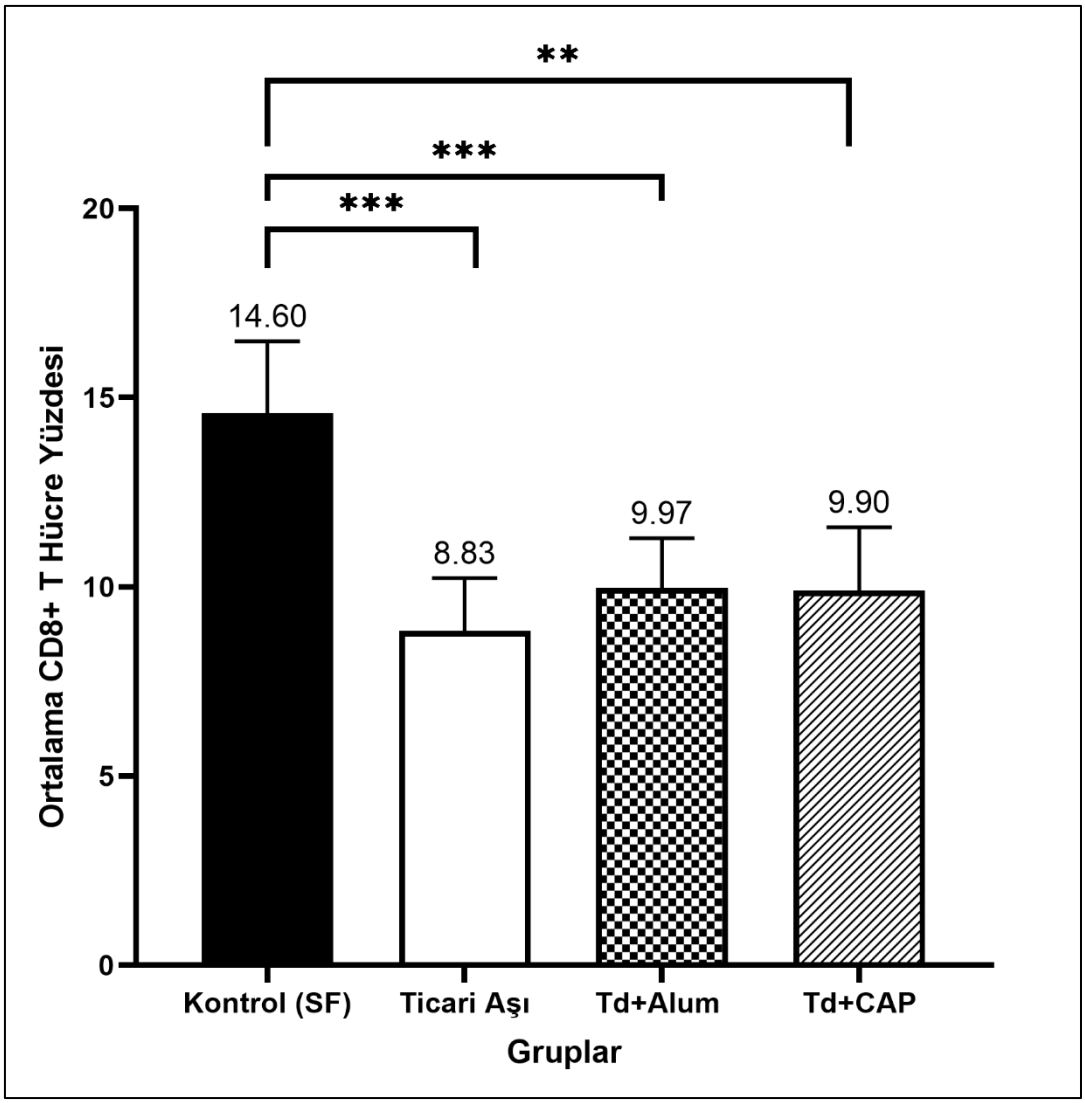
Enjeksiyon yapılan 4 gruptaki farelerin dalak mononükleerlerinin sitotoksik T hücre belirteci olan CD8 molekülü ekspresyonunu belirlendi. Bu amaçla dalak mononükleer hücreleri PE ile işaretli anti fare CD8a antikoru ile işaretlenerek akım sitometri yöntemi ile incelendi. Her gruptaki farelerin CD8 ekspresyon oranlarını gösteren histogram grafikleri elde edildi (Şekil 4.17.). PE ile işaretli izotipik antikor ile kontrol boyaması yapıldı ve herhangi bir boyanma olmadığı görüldü (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. İP enjeksiyon yapılan fare dalak mononükleer hücrelerinin PE işaretli izotipik antikor ile boyanma görüntüsü



Şekil 4.17. İP enjeksiyon apılan farelerin CD8+ T Hücre yüzdeleri

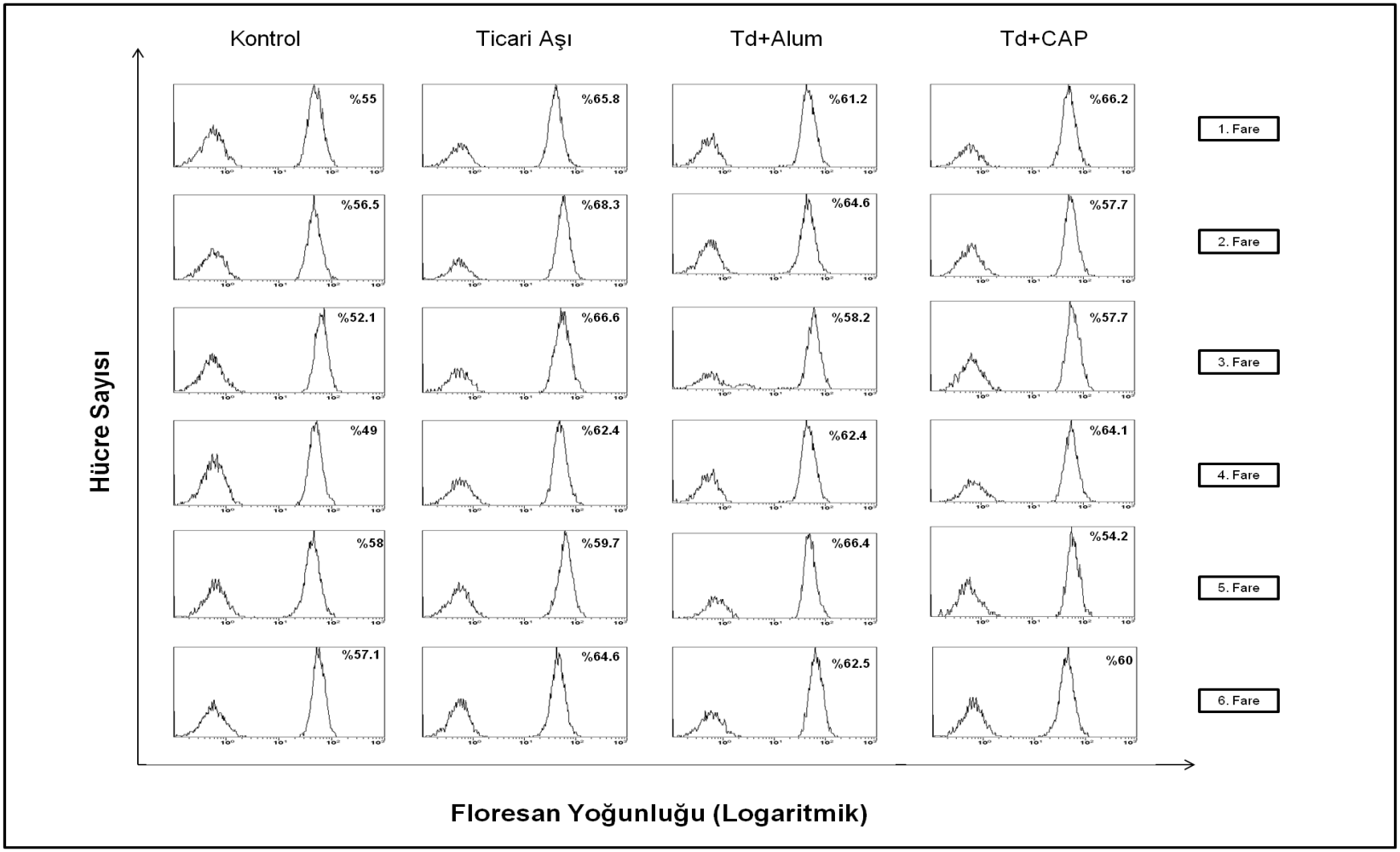


Şekil 4.18. İP enjeksiyon yapılan grupların ortalama CD8+ T Hücre yüzdeleri karşılaştırması (**; p<0,05 , ***; p<0,05).

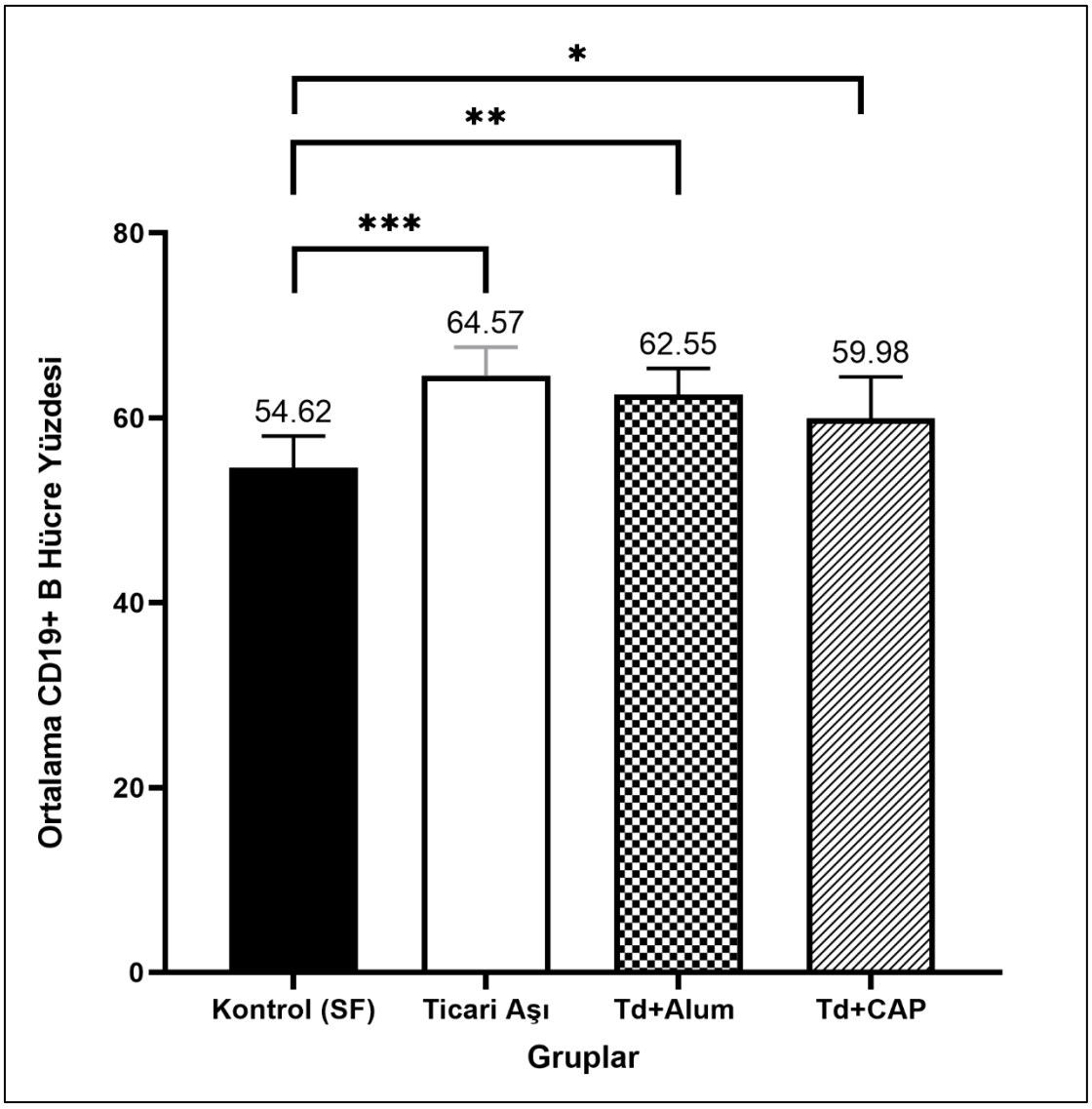
İP enjeksiyon yapılan her grup için sitotoksik T hücre belirteci olan CD8 molekülü ekspresyon oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri belirlenerek karşılaştırıldı. Karşılaştırılan grupların ortalama CD8+ T hücre yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı belirlendi. Kontrol grubu için ortalama CD8+ T hücre yüzdesi %14,60 iken, ticari aşı için %8,8, Td+Alum grubu için %10, Td+CAP için ise %9,9 olarak saptandı. Kontrol grubuna göre diğer 3 grupta görülen CD8 ekspresyonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Alum adjuvanı içeren ticari aşı grubu CD8 ekspresyonu ile alum adjuvanı içeren Td+Alum grubu ve Td+Alum ile Td+CAP grupları CD8 ekspresyonu karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p< 0,05$).

İP enjeksiyon yapılan farelerin dalak $CD19^+$ B hücre bulguları

Enjeksiyon yapılan 4 gruptaki farelerin dalak mononükleer hücrelerinin B hücre belirteci olan CD19 ekspresyonu PE ile işaretli anti fare CD19 antikoru kullanılarak akım sitometri yöntemi ile saptandı. Tüm farelerin CD19+ B hücre yüzdelerini gösteren histogram grafikleri Şekil 4.19.'da sunuldu.



Şekil 4.19. İP enjeksiyon yapılan farelerin CD19+ B Hücre yüzdeleri



Şekil 4.20. İP enjeksiyon yapılan grupların ortalama CD19+ B Hücre yüzdeleri karşılaştırması (*; p<0,05 ,**; p<0,05 , ***; p<0,05).

Her grubun B hücre belirteci olan CD19 molekülü ekspresyon oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri belirlendi. Üç doz subkütan Td enjeksiyonu yapılan farelerde, SF enjekte edilen kontrol grubu için dalak hücrelerinin ortalama CD19+ B hücre yüzdesi %54,62 olarak bulunurken, ticari aşı için %64,57, Td+Alum grubunda %62,55 ve Td+CAP grubunda %59,98 olarak saptandı. Kontrol grubuna göre diğer 3 gruptaki CD19 ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p< 0,05). Alum adjuvanı içeren ticari aşı grubu ortalama CD19+ B hücre yüzdesi ile Td+Alum grubu arasında ve Td+Alum ile Td+CAP grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (p>0,05).

4.1.3. ELISA bulguları

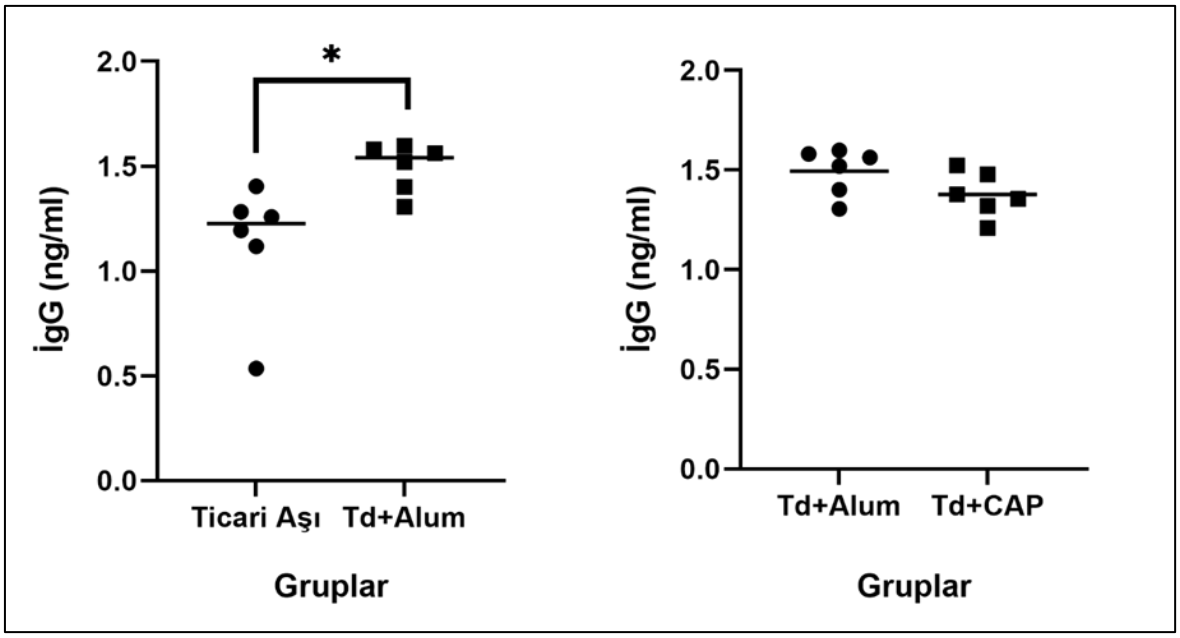
Birer ay ara ile üç doz subkütan ve intraperitoneal enjeksiyon yapılarak immünize edilen farelerde oluşan hümoral immün yanıtları saptamak amacıyla ELISA testi yapıldı. Fare serumları kalp kanından elde edildi. Serum örnekleri ile, ELİSA kitlerinde yazılan talimatlara göre çalışıldı. Elde edilen sonuçlar sırasıyla gösterildi.

Fare anti-tetanoz toksoid İgG ELISA sonuçları

Fare anti tetanoz toksoid İgG ELISA Kiti kullanılarak fare serumlarında aşılama ile oluşan anti tetanoz toksoid antikoru miktarları saptandı. Bu amaçla Mybiosource marka Fare Tetanoz Toksoid İgG Antikor (TT-İgG) ELISA Kiti kullanıldı. Her bir fareye ait antikor konsantrasyonları elde edildi. Serumlar, 30 gün ara ile 3 doz subkütan (SK) ve 3 doz intraperitoneal (İP) Td enjeksiyonu yapılan farelerden elde edildi.

Subkütan enjeksiyon yapılan grupların anti tetanoz toksoid İgG konsantrasyonları

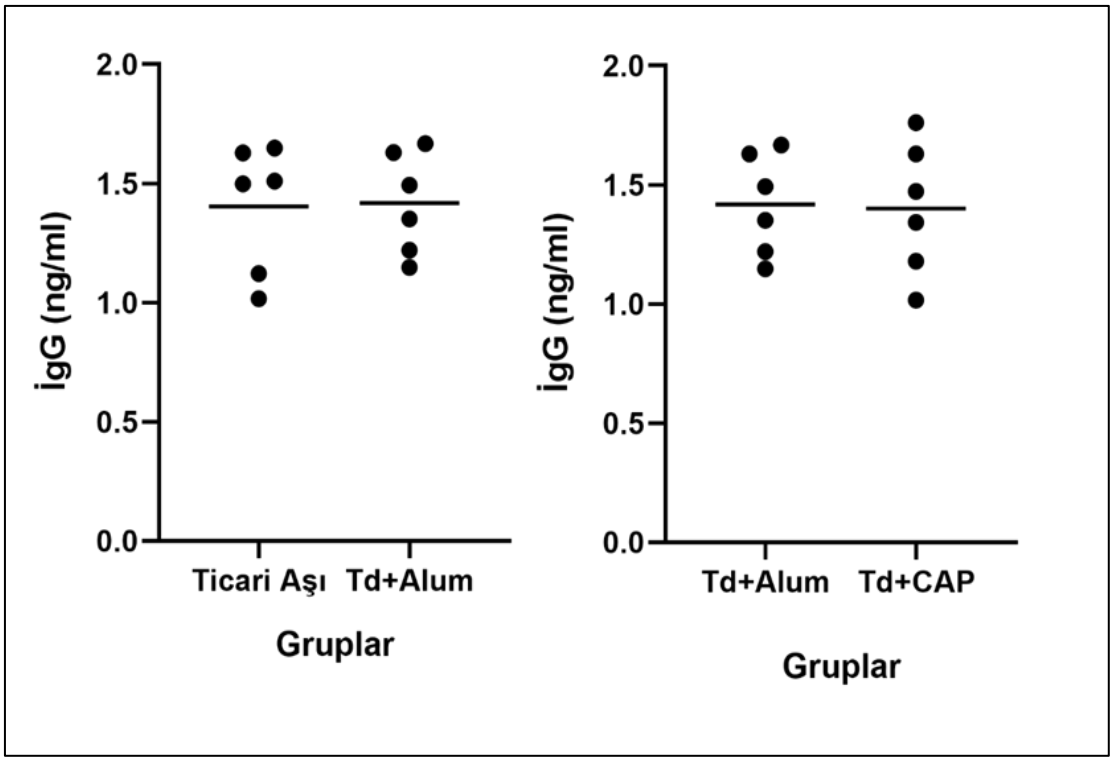
Her grupta 6 adet 17-22 gram dişi Balb/c fare bulunan ve 30 gün ara ile üç doz SK enjeksiyon yapılan Ticari aşı (Td-VAC), Td+Alum ve Td+CAP gruplarına ait fare serumlarında antikor konsantrasyonları karşılaştırıldı (Şekil 4.21). Ticari Aşı grubu ortalama anti tetanoz İgG antikor miktarı 1,13 ng/ml, Td+Alum grubunda 1,50 ng/ml ve Td+CAP grubunda 1,38 ng/ml bulundu. Ticari aşı ile Td+Alum grubu karşılaştırıldığında Td+Alum grubu ortalama antikor konsantrasyonu daha yüksek bulunsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Benzer şekilde Td+Alum ile Td+CAP gruplarındaki ortalama antikor miktarı karşılaştırıldığında alum adjuvanı içeren grup ortalaması daha yüksek bulunsa da aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).



Şekil 4.21. SK enjeksiyon yapılan farelerin serum anti tetanoz toksoid İgG konsantrasyonları (*;p<0,05)

İntraperitoneal enjeksiyon yapılan grupların anti tetanoz toksoid İgG konsantrasyonları

Üç doz İP enjeksiyon yapılan her grupta 6 adet 17-22 gram dişi Balb/c fare bulunan Ticari aşı (Td-VAC), Td+Alum ve Td+CAP gruplarına ait fare serumlarında antikor konsantrasyonları karşılaştırıldı. Ticari Aşı grubu ortalama anti tetanoz toksoid İgG antikor miktarı 1,40 ng/ml, Td+Alum grubunda 1,42 ng/ml ve Td+CAP grubunda 1,40 ng/ml bulundu. Ticari aşı ile Td+Alum grubu ve Td+Alum ile Td+CAP gruplarındaki ortalama antikor konsantrasyonları karşılaştırıldı. Gruplar aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05).



Şekil 4.22. İP enjeksiyon yapılan farelerin serum anti tetanoz toksoid İgG konsantrasyonları karşılaştırması (p>0,05)

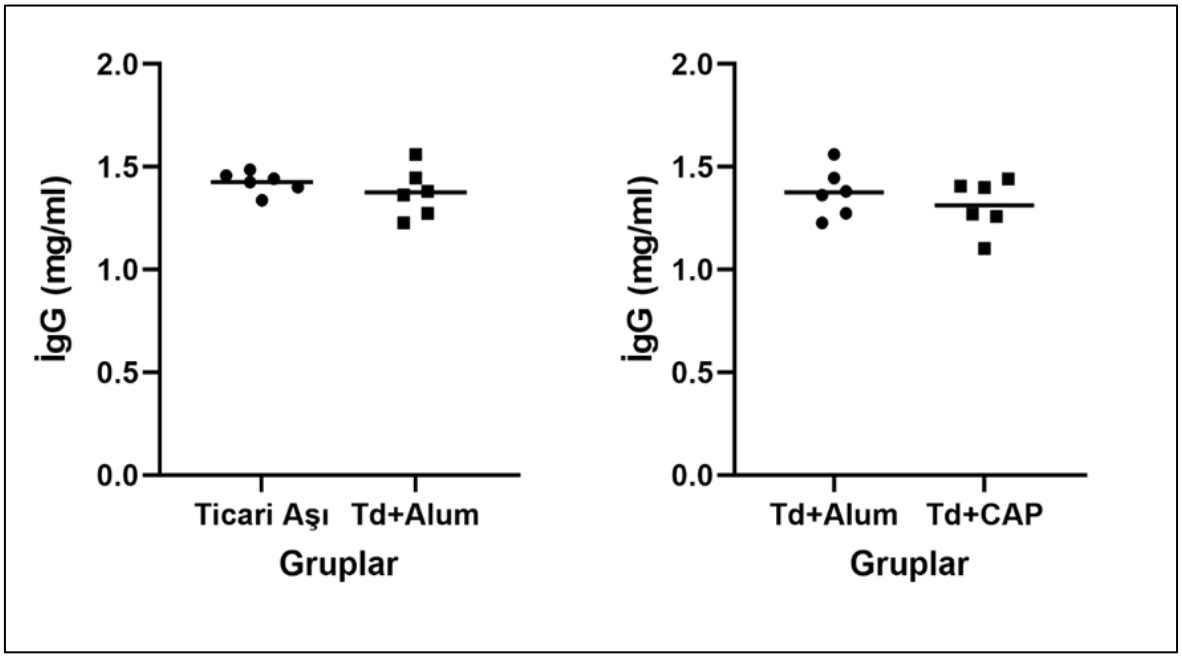
Fare anti-difteri toksoid İgG ELISA sonuçları

Fare anti difteri toksoid ELISA Kiti kullanılarak fare serumlarında oluşan antikor miktarları saptandı. Ticari olarak mevcut Mybiosource marka Fare Difteri Antikor Yarışmalı ELISA Kiti kullanılmıştır. Her bir fareye ait antikor konsantrasyonları bulundu. Serumlar, 3 doz subkütan ve 3 doz intraperitoneal (İP) Td enjeksiyonu yapılan farelerden elde edildi. Tetanoz ELISA ile benzer şekilde birinci enjeksiyondan 90 gün sonra alınan serumlar kullanıldı.

Subkütan enjeksiyon yapılan grupların anti difteri İgG konsantrasyonları

Üç doz SK enjeksiyon yapılan ve her grupta 6 adet 17-22 gram dişi Balb/c fare bulunan Ticari aşı, Td+Alum ve Td+CAP gruplarına ait fare serumlarında anti difteri İgG antikor konsantrasyonları saptandı. Ticari Aşı grubu ortalama anti difteri İgG antikor miktarı 1,43 mg/ml, Td+Alum grubunda 1,38 mg/ml ve Td+CAP grubunda 1,31 mg/ml bulundu. Ticari aşı ile Td+Alum grubu ve Td+Alum ile Td+CAP

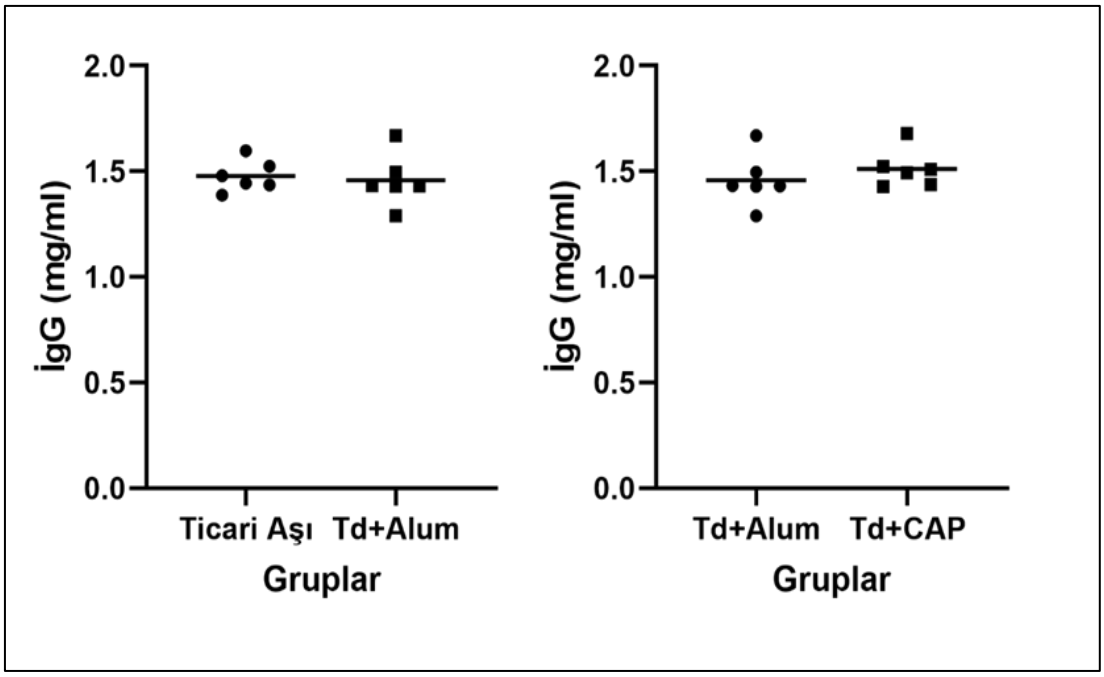
gruplarındaki antikor konsantrasyonları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05).



Şekil 4.23. SK enjeksiyon yapılan farelerin serum anti difteri toksoid İgG konsantrasyonları karşılaştırması (p>0,05)

İntraperitoneal enjeksiyon yapılan grupların anti difteri İgG konsantrasyonları

Üç doz İP enjeksiyon yapılan Ticari aşı, Td+Alum ve Td+CAP gruplarına ait fare serumlarında anti difteri toksoid İgG antikor konsantrasyonları saptandı. Ticari Aşı grubu ortalama anti difteri toksoid İgG antikor miktarı 1,48 mg/ml, Td+Alum grubunda 1,46 mg/ml ve Td+CAP grubunda 1,51 mg/ml bulundu.Ticari aşı ile Td+Alum grubu ve Td+Alum ile Td+CAP gruplarındaki antikor konsantrasyonları karşılaştırıldı. Gruplar aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05).

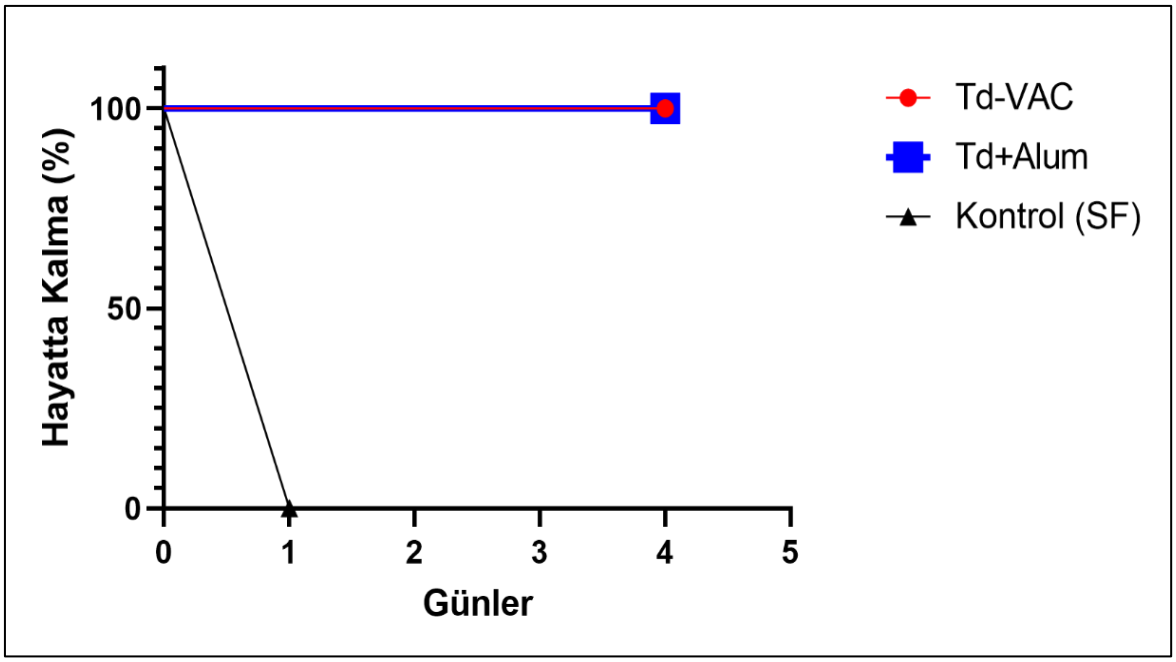


Şekil 4.24. İP enjeksiyon yapılan farelerin serum anti difteri toksoid İgG konsantrasyonları karşılaştırması (p>0,05)

4.1.4. Tetanoz toksoidi "challenge" deneyi bulguları

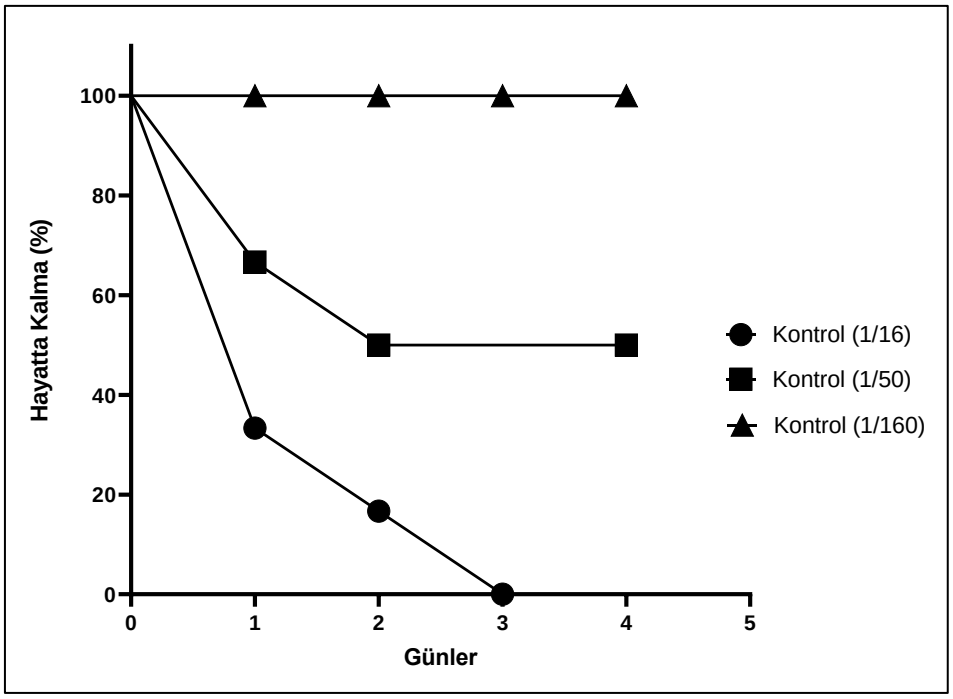
Erişkin tipi Difteri-Tetanoz aşısının koruyucu etkisini saptayabilmek ve piyasada mevcut olarak bulunan ve alum adjuvanı içeren aşı ile etkinliğini karşılaştırabilmek amacıyla "challenge" deneyleri yapıldı. Metot 3.2.13'de anlatıldığı şekilde fareler gruplara ayrılarak tek doz subkütan yolla enjeksiyonlar yapıldı.

İmmünizasyondan 5 hafta sonra farelere tetanoz toksininin LD_{50} değerinin 50 katı subkütan yolla verildi. Fareler enjeksiyon sonrası 4 gün boyunca gözlemlendi, ölü ve canlı fare sayıları ve gruplardaki canlılık oranları belirlendi (Şekil 4.25). Ayrıca toksinin etkinliğini doğrulamak için her grupta 17-22 gr ağırlığında 6 adet dişi Balb/c fare olacak şekilde gruplar oluşturuldu. Tetanoz toksininin LD_{50} değerinin 50 katı hazırlanmıştı. Kontrol 1/16 grubunda; toksinin $50xLD_{50}$ değerinin 1/16 dilüsyonu, Kontrol 1/50 grubunda; 1/50 dilüsyonu ve Kontrol 1/160 grubunda; 1/160 dilüsyonları hazırlandı ve subkütan yolla enjekte edildi. Fareler enjeksiyon sonrası 4 gün boyunca gözlemlenerek ölü ve canlı fare sayısı saptandı (Şekil 4.26).



Şekil 4.25. Tetanoz toksoidi hayatta kalma grafiği. Kırmızı nokta ile gösterilen Td-VAC grubunda ve mavi kare ile gösterilen Td+Alum grubunda fare ölümü görülmedi. SF enjeksiyonu yapılan immünize olmamış farelere toksin verilerek oluşturulan kontrol grubunda ise birinci günde farelerin tamamı öldü.

Aşıların sulandırılmadan enjekte edildiği gruplarda hayatta kalma oranı 4 gün içerisinde hiçbir fare ölmediği için >%99,9 olarak bulundu. Kontrol olarak SF enjekte edilen farelerde 1. gün farelerin tamamı öldüğü için canlılık oranı %0'dır.



Şekil 4.26. Tetanoz toksini hayatta kalma grafiği. Kontrol 1/16 grubunda 6 adet fare öldü. Kontrol 1/50 grubunda 3 adet fare ölürken, Kontrol 1/160 grubunda ise hiçbir farenin ölmediği görüldü.

Tetanoz toksininin etkinliğinin doğrulandığı kontrol gruplarındaki canlılık oranları ise şöyledir: $50XLD_{50}$ dozunun 1/16 sulandırımının enjekte edildiği 6 adet farenin tamamı öldüğü için canlılık oranı %0 olarak bulundu. Toksinin $50XLD_{50}$ dozunun 1/50 sulandırımında 3 adet fare öldüğü için canlılık oranı %50 iken, $50XLD_{50}$ dozunun 1/160 sulandırımında ise hiçbir fare ölmediği için canlılık %100 olarak saptandı.

4.1.5. Vero Hücre Yöntemi (*Vero Cell Assay*) ile Difteri Toksoidine Karşı oluşan immün serumların titrasyonu

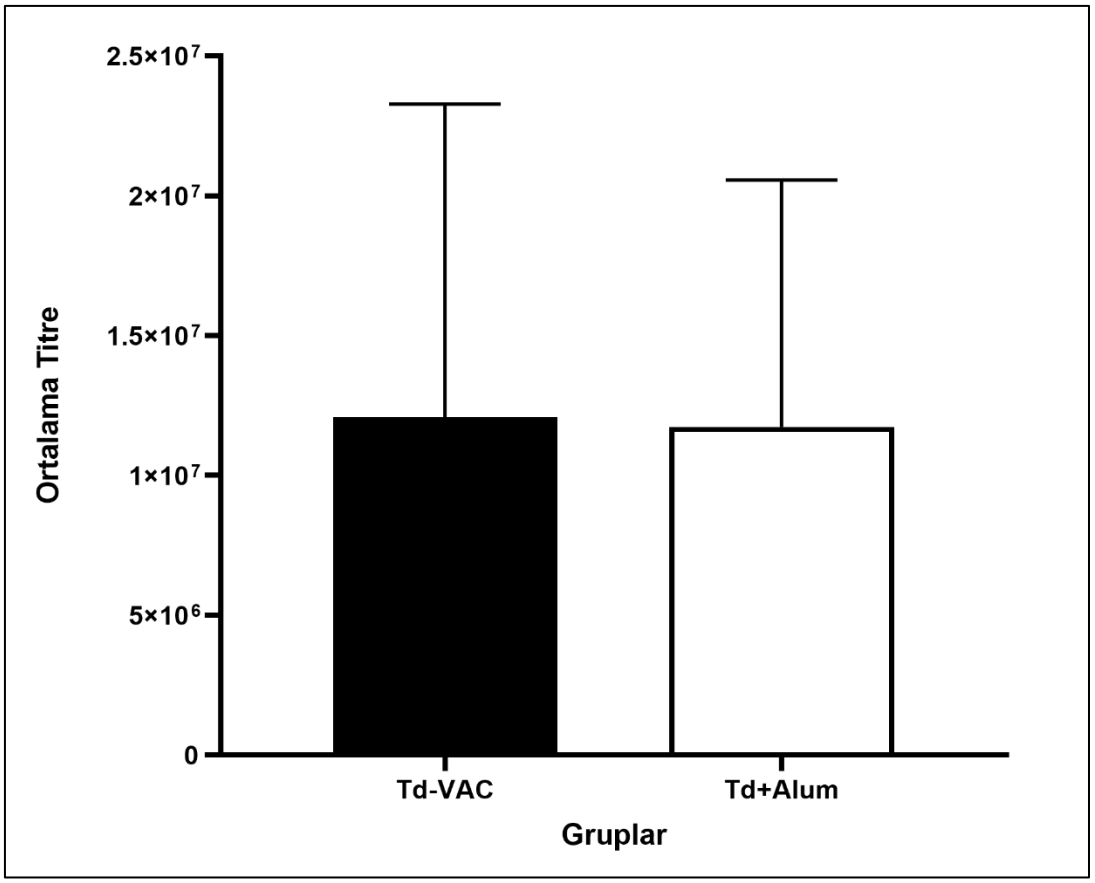
Metot 3.2.12'de anlatıldığı şekilde difteri toksoidine karşı farelerde oluşan serumlar titre edilerek karşılaştırıldı. Kontrol antitoksin titresi 12 800 olarak hesaplandı. Kontrol antitoksin titresi ile de tüm farelerin serumlarının titreleri belirlendi.

Serum örnekleri her grupta 6 adet fare olacak şekilde oluşturuldu. Her gruptaki farelerin serum örneklerinin titreleri MTT yöntemi ile hesaplanarak belirlendi. Her grup için ortalama titreler bulunarak standart sapma değerleri hesaplandı (Çizelge 4.11). Ortalama serum titrasyonları gruplar arasında karşılaştırıldı. Karşılaştırma

grupları ticari aşının sulandırılmadan uygulandığı, SF ile 1/25, SF ile 1/50 , SF ile 1/100 sulandırılması ve Td+Alum'un sulandırılmadan uygulandığı, SF ile 1/25, SF ile 1/50 ve SF ile 1/100 sulandırılması şeklinde yapıldı.

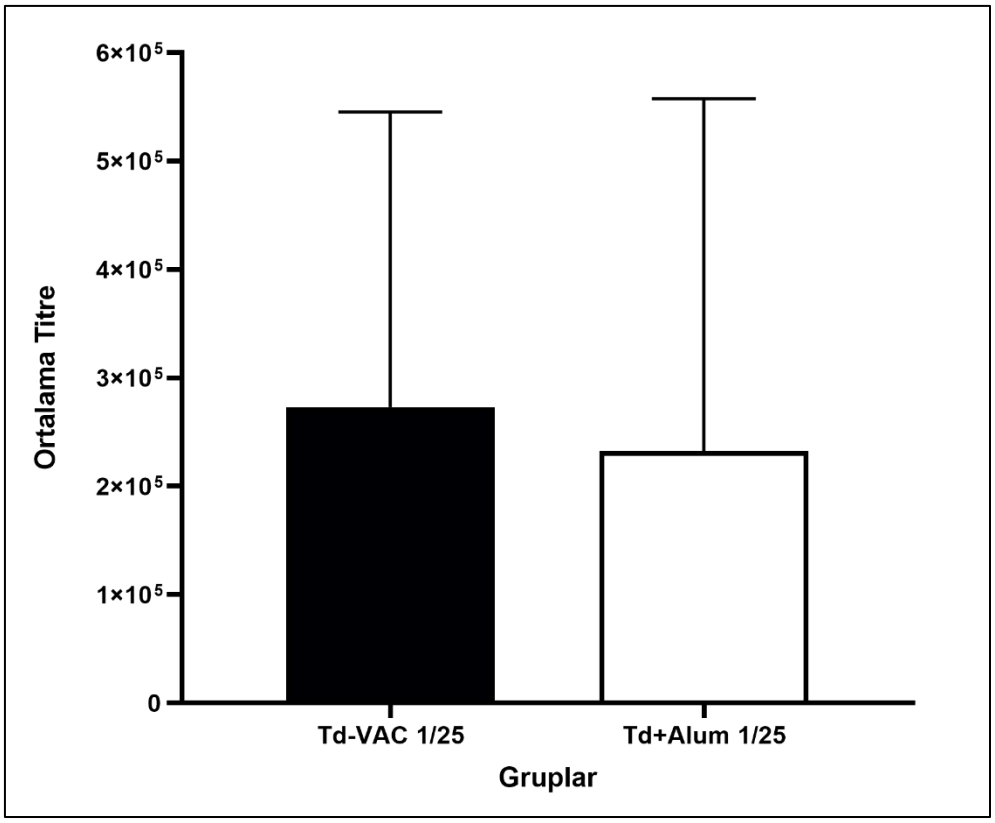
Çizelge 4.5. Difteri toksoidine karşı oluşan immün serumların titrasyonu

Fare No	Td-VAC	Td+Alum	Td-VAC 1/25	Td+Alum 1/25	Td-VAC 1/50	Td+Alum 1/50	Td-VAC 1/100	Td+Alum 1/100
1	26 214 400	16 384 000	204 800	6 400	6 400	102 400	51 200	6 400
2	6 553 600	13 107 200	102 400	51 200	204 800	6 400	25 600	6 400
3	26 214 400	13 107 200	204 800	6 400	6 400	204 800	12 800	6 400
4	409 600	3 276 800	102 400	819 200	6 400	6 400	6 400	12 800
5	6 553 600	26 214 400	819 200	409 600	102 400	6 400	6 400	6 400
6	6 553 600	13 107 200	204 800	102 400	102 400	102 400	6 400	25 600
Ortalama	12 083 200	11 741 867	273 066,7	232 533,3	71 466,67	71 466,67	18 133,33	12 800
SS	11 201 643	8 817 981,8	272 212	324 844,4	80 489,17	80 489,17	17 835,99	9 914,837



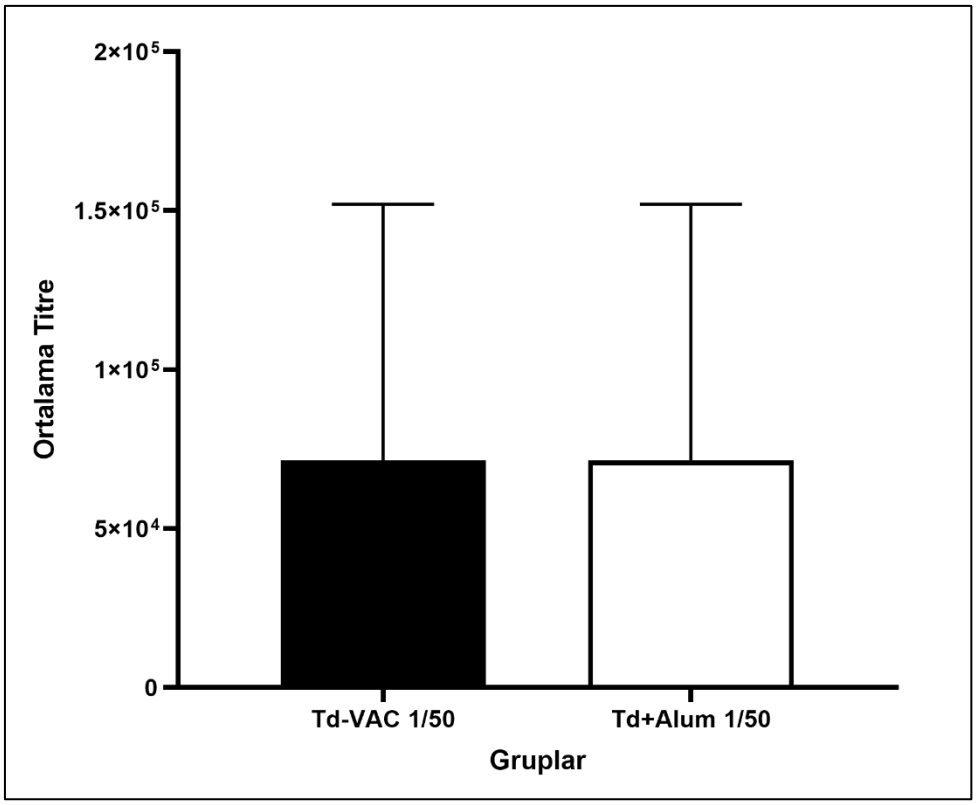
Şekil 4.27. Td-VAC ve Td+Alum enjeksiyonu yapılan grupların serum titrasyonlarının karşılaştırılması (p>0,05)

Her grupta 17-22 gram ağırlığında, 6 adet dişi Balb/c fare olacak şekilde, tek insan dozu Td-VAC ve tek insan dozu Td+Alum enjeksiyonu yapılan grupların difteri toksoidine karşı oluşan serum titrasyon ortalamaları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (p>0,05) (Şekil 4.27.).



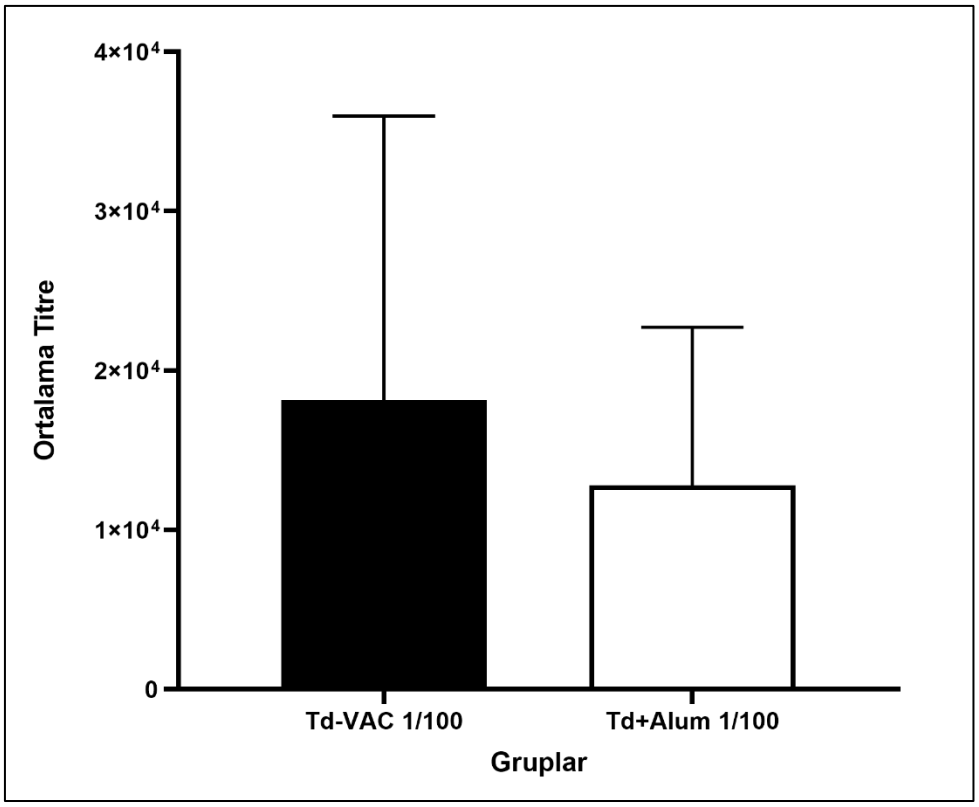
Şekil 4.28. Td-VAC 1/25 ve Td+Alum 1/25 enjeksiyonu yapılan grupların serum titrasyonlarının karşılaştırılması (p>0,05)

Tek insan dozu Td-VAC ve Td-Alum aşıları ile benzer şekilde aşıların SF ile 1/25 sulandırılarak uygulanan enjeksiyonları ile elde edilen serumların titrasyonları karşılaştırıldığında da aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05) (Şekil 4.28.).



Şekil 4.29. Td-VAC 1/50 ve Td+Alum 1/50 enjeksiyonu yapılan grupların serum titrasyonlarının karşılaştırılması

Td-VAC ve Td-Alum aşılarının tek insan dozunun SF ile 1/50 sulandırılarak uygulanan enjeksiyonları ile elde edilen serumların titrasyonları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.62).



Şekil 4.30. Td-VAC 1/100 ve Td+Alum 1/100 enjeksiyonu yapılan grupların serum titrasyonlarının karşılaştırılması

Td-VAC ve Td-Alum aşılarının tek insan dozunun SF ile 1/100 sulandırılarak uygulanan enjeksiyonları ile elde edilen serumların titrasyonları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.63).

4.2. Antijenlerin Karakterizasyon Bulguları

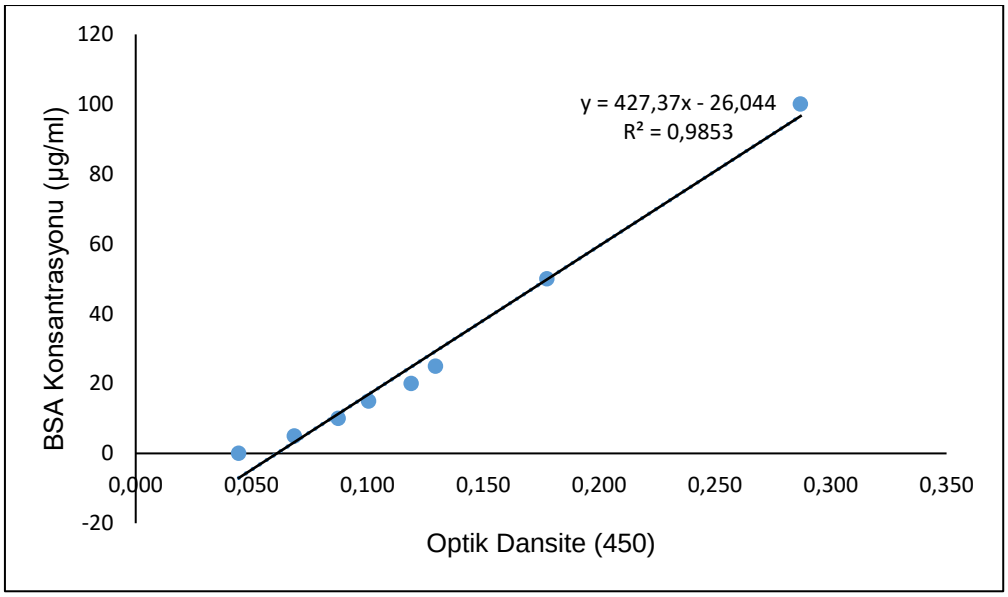
Aşılar ile oluşan immün yanıtların belirlenmesi için yapılan Tetanoz “challenge” ve difteri in vitro toksin nötralizasyon testlerinde kullanılan difteri ve tetanoz toksin antijenlerinin de karakterizasyonu yapıldı. Miktarları belirlenerek, saflıkları gösterildi, challenge ve in vitro nötralizasyon testlerinde kullanılmak üzere minimum öldürücü ve minimum sitopatik dozları belirlendi.

4.2.1. Protein miktarı bulguları

Tetanoz ve difteri antijenlerinin miktarlarını belirlemek amacıyla Lowry Protein Assay yöntemi ve flokülasyon testi yapıldı.

Lowry protein tayini ile total protein miktarı ölçme bulguları

Total protein miktarını tespit etmek amacıyla kullanılan Lowry Protein Tayini yöntemi ile difteri ve tetanoz toksin miktarları hesaplandı. Bu amaçla standart olarak kullanılan % 0.1 BSA ile grafik çizildi, formül oluşturuldu (Şekil 4.31.) ve buna karşılık gelen toksin miktarları mg/ml cinsinden standart sapmaları ile hesaplanarak belirlendi. Tetanoz toksini 1,49±0,3 mg/ml, difteri toksini ise 1,34±0,1 mg/ml konsantrasyonda bulundu (Çizelge 4.6).



Şekil 4.31. BSA Standart Eğri Grafiği

Çizelge 4.6. Antijen Konsantrasyonları

Antijen Adı	**Optik Dansite Ortalaması**	**Konsantrasyon (mg/ml)**
Tetanoz Toksini	0,0165	1,49±0,3
Difteri Toksini	0,0161	1,34±0,1

Flokülasyon testi ile Lf ve Kf bulguları

Çizelge 4.7. Antijenlerin Lf ve Kf değerleri

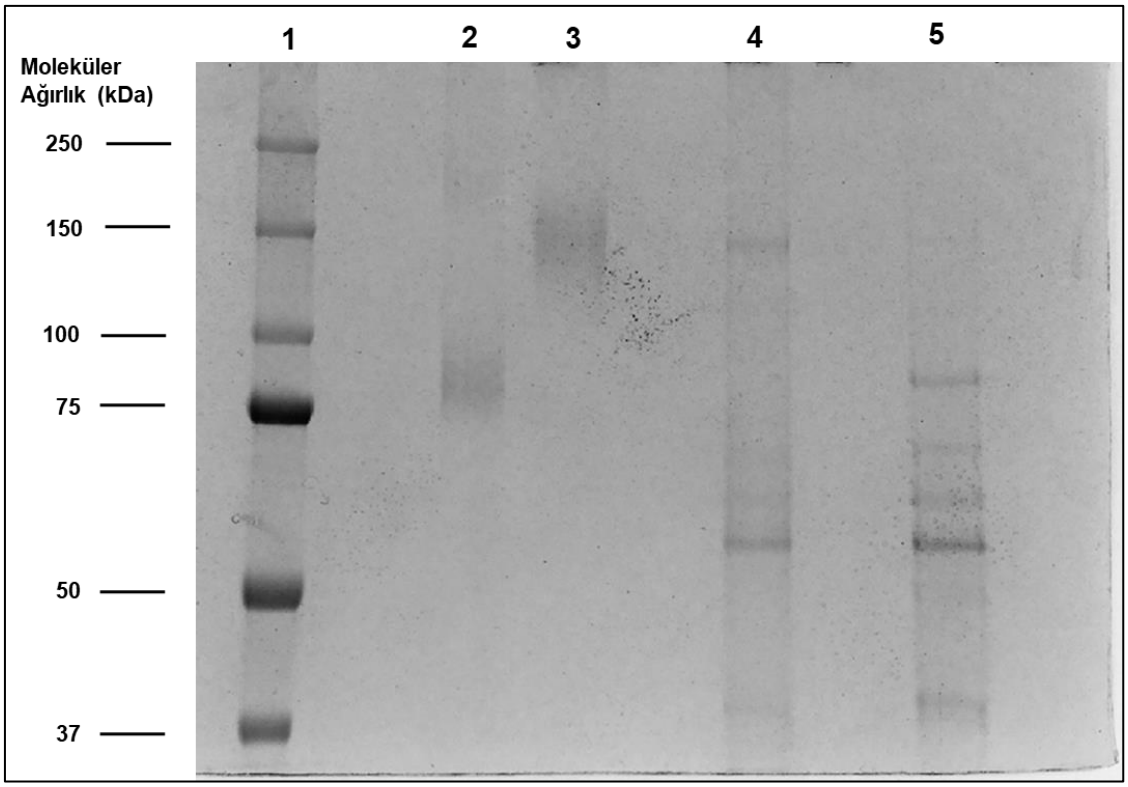
Toksoid Adı	Lf/ml	Kf (dakika)
Tetanoz Toksini	50	5
Difteri Toksini	60	15

4.2.2. SDS-PAGE jel elektroforezi bulguları

Protein yapıdaki tetanoz ve difteri toksinlerinin saflıklarının gösterilmesi amacıyla SDS-PAGE Jel elektroforezi yapıldı. Toksinler, standart toksoidlerle karşılaştırmalı olarak gösterildi.

Tetanoz antijenleri SDS-PAGE jel elektroforezi bulguları

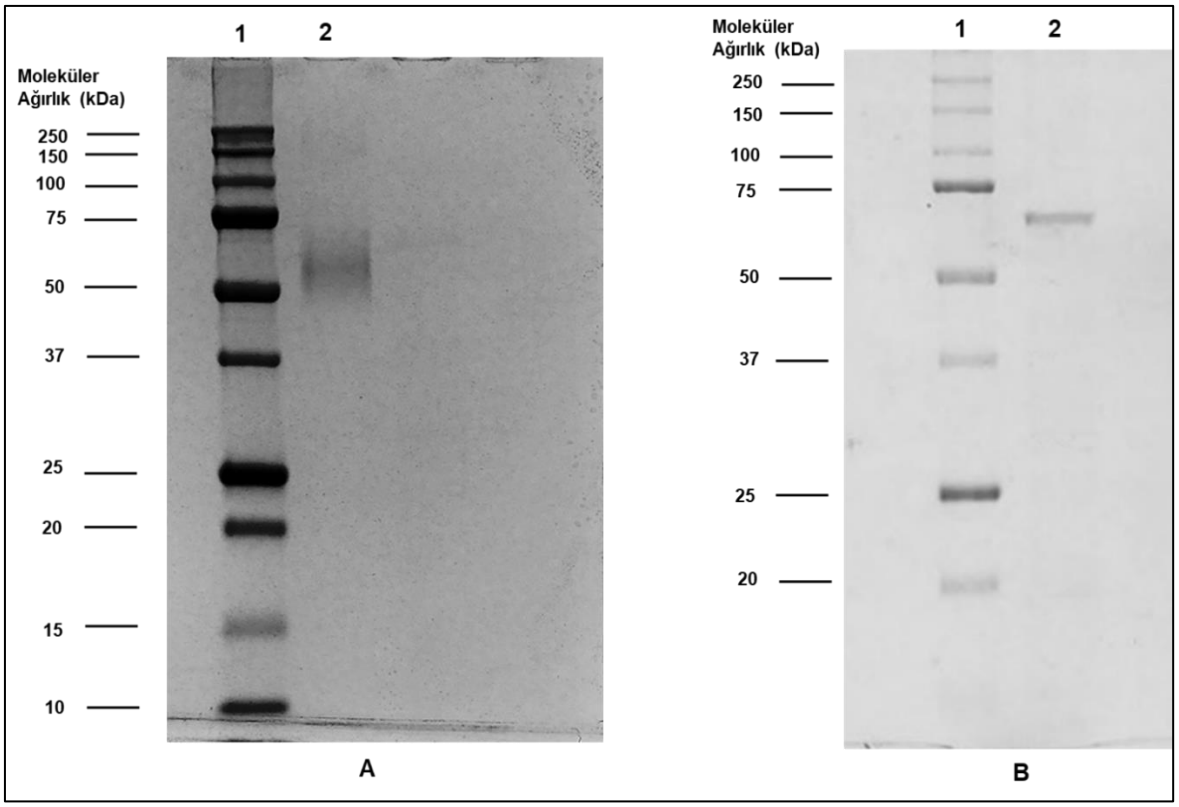
Tetanoz toksini ve toksoidini göstermek için, %7 konsantrasyondaki tris-glisin SDS-PAGE jelde yürütüldükten sonra Coommassie Brillant Blue G250 boyası ile boyandı. Proteinlerin moleküler ağırlıklarını gösteren belirteçler ile tetanoz toksininin indirgenmemiş koşullarda 150 kD ağırlığında olduğu, indirgenmiş koşullarda da 100kD ve 50 kD ağırlığındaki alt üniteleri gösterildi. Ayrıca hem indirgenmemiş hem de indirgenmiş koşullarda, bu bantların dışında, 37-100 kD arasında çeşitli ağırlıklarda protein bantları olduğu görüldü. İzole edilen toksin ile birlikte kontrol amaçlı olarak, DSÖ standart tetanoz toksoidi de jelde yürütülerek gösterildi. Toksoidin, indirgenme koşullarında alt ünitelerine parçalanmadığı gözlendi (Şekil 4.32.).



Şekil 4.32. Tetanoz Toksin ve Toksoid SDS-Page Jel Görüntüsü (1) Belirteç (2) İndirgenmemiş koşullarda standart tetanoz toksoidi (5µg) (3) İndirgenmiş koşullarda tetanoz toksoidi (5µg) (4) İndirgenmemiş koşullarda tetanoz toksini (5µg) (5) İndirgenmiş koşullarda tetanoz toksini (5µg)

Difteri antijenleri SDS-PAGE jel elektroforezi bulguları

Yaklaşık 58-62 kD ağırlığındaki difteri toksininin gösterilmesi amacıyla %12 konsantrasyondaki tris-glisin jelde yürütüldü. Coomassie Brilliant Blue G250 boyası ile boyanarak görüntülendi. İzole edilen difteri toksininin ve standart toksoidin 50-75 kD'luk belirteçler arasına karşılık geldiği görüldü (Şekil 4.33.).



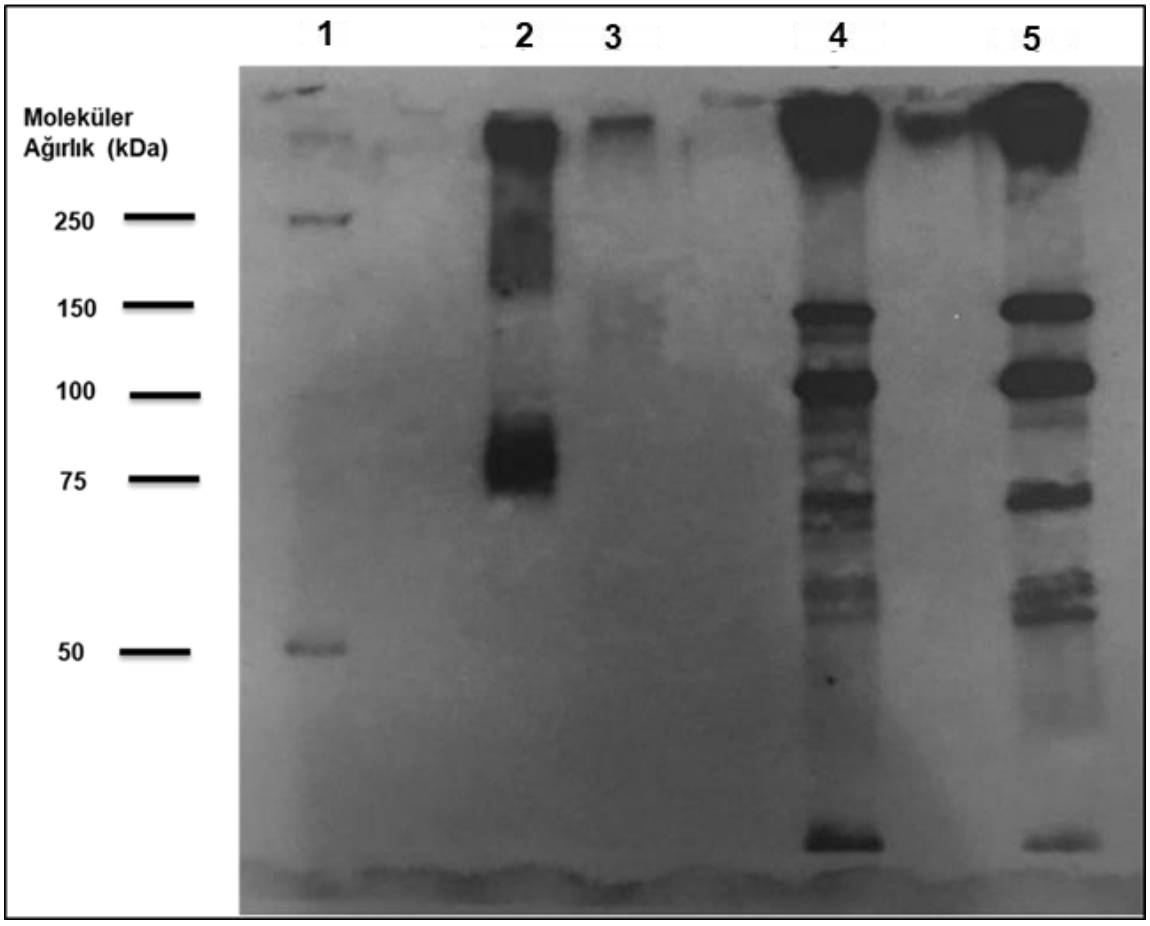
Şekil 4.33. Difteri toksin ve toksoidi SDS-PAGe jel görüntüsü. (A1) Belirteç (A2) DSÖ 3. Uluslararası Standart Difteri Toksoidi (5µg) (B1) Belirteç (B2) Difteri toksini (5µg)

4.2.3. Antijenlerin western blot ile gösterilmesi bulguları

SDS-PAGE ile gösterilen difteri ve tetanoz toksinlerinin doğrulama amacıyla Western Blot analizi yapıldı. Bu amaç doğrultusunda, belirteçler, tetanoz ve difteri toksinleri ve standart toksoidler tris-glisin SDS-PAGE jelde yürütülmelerinin ardından PVDF membrana aktarıldı. Bloklama çözeltisi ile bloklandıktan sonra membranlar birincil ve ikincil antikorlarla işaretlendi. İnsan İg yapısındaki DSÖ standart antitoksinleri primer antikor olarak kullanıldı. Primer antikorlara spesifik, anti-insan İgG antikorları ile işaretlenen bantlar, membranların yıkanması sonrası görüntüleme işlemine geçilerek görüntülendi. Bu yöntemde belirteç olarak kullanılan protein standartları 10-250 kD arasındadır (Bio-Rad Precision Plus Western C Standarts). Belirteç bantlar da bu çalışmada gösterildi. Görüntüleme işlemi sonucu elde edilen bulgular difteri ve tetanoz toksin ve standart toksoidleri için ayrı ayrı gösterildi.

Tetanoz western blot bulguları

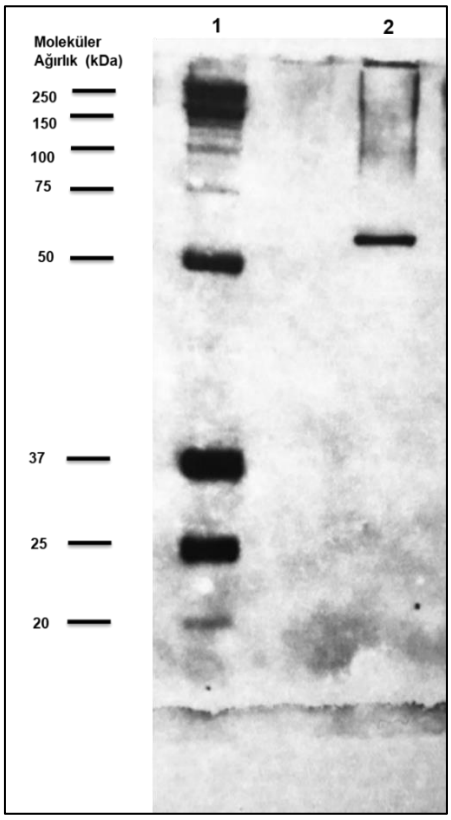
Tetanoz toksini ve DSÖ 2.uluslararası standart toksoidi %7 konsantrasyondaki tris-glisin SDS-PAGE jelde yürütüldü. Proteinlerin PVDF membrana aktarılma işlemi sonrası membran bloklandı. Primer antikor olarak DSÖ Tetanoz İnsan İmmunoglobulini kullanıldı. Sekonder antikor olarak ise HRP ile işaretli anti-insan İgG antikoru kullanıldı. Görüntüleme işlemi yapılarak oluşan bantlar belirlendi (Şekil 4.34). Standart tetanoz toksoidi 150 kDa ve 75-100 kDa arasında olmak üzere iki bant oluşturdu. Tetanoz toksini ise indirgenmiş ve indirgenmemiş koşullarda 150 kDa ve iki alt ünitesi olan 100 ve 50 kDa ağırlığında bantlar olarak görüldü. Ayrıca SDS-PAGE jelde de görülen yaklaşık 100 ve 50 kDa arasındaki bantların da toksine spesifik olduğu belirlendi.



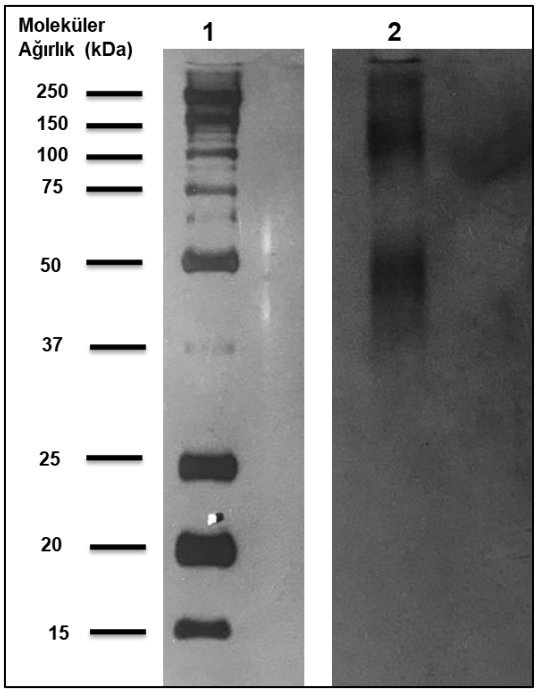
Şekil 4.34. Standart Tetanoz Toksoidi ve Tetanoz Toksini Western-Blot Görüntüsü (1) Belirteç (2) İndirgenmemiş koşullarda standart tetanoz toksoidi (3) İndirgenmiş koşullarda tetanoz toksoidi (4) İndirgenmemiş koşullarda tetanoz toksini (5) İndirgenmiş koşullarda tetanoz toksini

Difteri western blot bulguları

SDS-PAGE jel elektroforezi ile yürütülen ve 50-75 kD arasında görülen difteri toksininin varlığının doğrulanması için western-blot analizi yapıldı. Bu amaçla toksin 5µg olarak yüklendi. Primer antikor olarak difteri toksinine spesifik olan DSÖ standart anti-difteri antitoksini kullanıldı. Sekonder antikor olarak Difteri Antitoksin, İnsan İgG (1.Uluslararası Standard) kullanıldı. Difteri toksini 58-62 kD büyüklüğünde bir proteindir. Western-blot ile SDS-Page jeldeki ile benzer şekilde 50-75 kD arasında tek bir bant olarak gösterildi (Şekil 4.35.). Difteri standart toksoidi de western blot ile yaklaşık 50kD ağırlığında görüldü (Şekil 4.36.).



Şekil 4.35. Difteri toksini Western-Blot görüntüsü. (1) Belirteç (2) Difteri Toksini



Şekil 4.36. Difteri Standart Toksoidi western blot görüntüsü. (1) Belirteç (2) Standart Difteri Toksoidi

4.2.4. Tetanoz toksini LD_{50} ve PD_{50} belirleme bulguları

Tetanoz toksininin etkinliğini gösterebilmek için minimum öldürücü ve minimum paraliz dozu belirlendi. Tetanoz toksini metod 3.2.8'de anlatıldığı şekilde sulandırılarak, her sulandırmadan 6 adet fareye enjeksiyon yapılarak, 4 gün içinde farelerin %50'sini öldüren en düşük doz, LD_{50} dozu olarak belirlendi. İlk 4 gün içerisinde farelerin yarısında paraliz bulgusu gözlenen en düşük doz ise PD_{50} olarak saptandı. LD_{50} ve PD_{50} dozları Çizelge 4.8'de sunuldu.

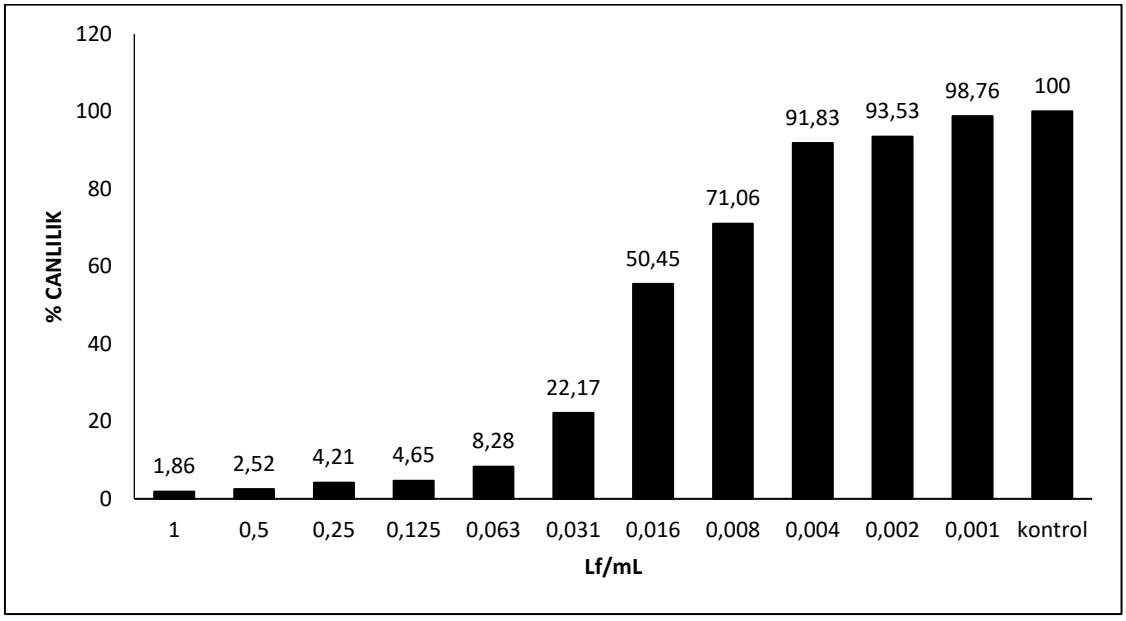
Çizelge 4.8. Tetanoz Toksini LD_{50} ve PD_{50} Tablosu

LD_{50} Dozu	**PD_{50} Dozu**
1.2 ng / 0.5 ml	0.1 ng / 0.5 ml

4.2.5. Difteri toksini minimum sitopatik doz belirleme bulguları

Difteri toksini minimum sitopatik dozunu (MSD) belirlemek için Vero hücreleri ile MTT testi yapıldı. Difteri toksini 1 Lf/ml konsantrasyonda olacak şekilde DMEM besiyerinde sulandırıldı. Seri dilüsyon yapılarak toksin Vero hücrelerinin bulunduğu

96 kuyucuklu hücre kültürü plağına eklendi. Altı gün inkübasyon sonrası her kuyucuğa MTT ayracı eklendi. Dört saat 37 °C'de inkübasyonun ardından çözücü solüsyon eklenerek bir gece 37 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün 590-660 nm dalga boyunda plak okuyucu ile okutularak OD değerleri belirlendi. Toksin eklenmeyen kontrol grubu ortalama OD değerinin %50'den az olduğu OD değerinin görüldüğü konsantrasyon MSD olarak belirlendi. Difteri toksininin MTT analizi ile Vero hücrelerindeki minimum sitopatik dozu 0,016 Lf/ml olarak belirlendi.



Şekil 4.37. Difteri Toksini Minimum Sitopatik Doz Grafiği

5. TARTIŞMA

Aşılar ile oluşan immün yanıtların karakterizasyonu, geliştirilen ve kullanılan aşıların etkinliklerinin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu sayede elde edilen veriler ışığında, aşı çalışmalarına yön verilmekte, veriliş dozu, veriliş yolu ya da adjuvan içerikleri gibi değişkenlerin en uygun şekli ile uygulanması sağlanmaktadır.

Çalışmamız kapsamında Erişkin Tip Tetanoz-Difteri (Td) aşıları ile oluşan immün yanıtların karakterizasyonunu yapabilmek için, aşılama sonrası farelerde oluşan hümoral ve hücresel immün yanıtlar test edilmiştir. Aşılar, Gazi üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji AD'da geliştirilen, aluminyum hidroksit (Alum) ve kalsiyum fosfat (CAP) olmak üzere iki farklı çeşit adjuvan içeren Erişkin tipi Td aşıları ve ticari olarak piyasada mevcut olan erişkin tip difteri tetanoz aşısı olan Td-VAC (Keymen İlaç Sanayi)' dır. Bu aşılar ile oluşan immün yanıtlar karşılaştırmalı olarak çalışılmış ve oluşan immün yanıtlar değerlendirilmiştir.

Aşılama sonrası farelerde oluşan hücresel immün yanıtları saptamak için fare dalaklarından mononükleer hücreleri elde edilerek akım sitometride analiz edilmiştir. Farelerde dalak mononükleer hücreleri, hücre içeriği ve dağılımları açısından insanlardaki periferik kan mononükleer hücrelerine benzerlik göstermektedir. Bu nedenle enjeksiyon sonrası farelerin dalak mononükleer hücreleri çalışmamız kapsamında kullanılmıştır. Bu hücrelerdeki yardımcı T hücre belirteci olan CD4, sitotoksik T hücre belirteci olan CD8 ve B hücre belirteci olan CD19 molekülleri hücre yüzey boyamaları ile saptanarak, yüzde oranları belirlenmiştir.

Alum adjuvanlarının daha çok CD4+ T hücreler aracılığı ile Th2 yönünde bir yanıt oluşturduğu, zayıf bir CD8 yanıtına neden olduğu bilinmektedir. Kalsiyum fosfat adjuvanının ise daha dengeli bir Th1/Th2 yanıtına neden olduğu düşünülmektedir [201]. Bununla birlikte McKee ve ark. alum adjuvanı enjeksiyonundan birkaç saat sonra eozinofil, monosit, nötrofil ve NK hücreleri ile karakterize bir tip 2 T hücre yanıtı ve antikor üretimi olduğunu gösterdikleri çalışmada, alum adjuvanı ile CD8+ T hücre aktivasyonu sağlandığını da göstermiştir. Makrofaj ve/veya mast hücreden yoksun farelerde antijene özgü ve alum ile uyarılmış CD4 ve CD8 hücre sayısında ve yüzdesinde herhangi bir fark olmadığını saptamışlardır [79]. Çalışmamızda

subkütan enjeksiyon yapılan ticari aşı grubunda kontrol grubuna göre ortalama $CD4^+$ T hücre %'sinde herhangi bir fark görülmezken, Td+Alum ve Td+CAP grubu ortalama CD4+ T hücre yüzdesi kontrol ve aşı grubuna göre daha az bulunmuştur. Bununla birlikte Td+Alum ve Td+CAP gruplarının ortalama $CD19^+$ B hücre yüzdesi kontrol ve ticari aşı grubuna göre daha yüksektir. Aşılar, intraperitoneal olarak uygulandığında ise kontrol grubuna göre tüm aşı gruplarının $CD4^+$ T hücre ve B hücre yüzdelerinde artış görülmüştür. Bilindiği gibi $CD4^+$ T hücreleri, antikor sınıf değişimi prosesi yüksek afiniteli antikor yanıtları, uzun ömürlü plazma ve bellek B hücrelerinin indüksiyonunu gibi B hücre aracılı bağışıklığı güçlendirmek için çok önemlidir [279]. İntraperitoneal enjeksiyon ile kontrol grubuna göre aşı gruplarında artan $CD4^+$ T hücre ve B hücre yüzdeleri bu durumu doğrular nitelikte bulunmuştur. Elde edilen bu veriler veriler ile, oluşan immün yanıtların T hücre farklılaşmasını Th1 veya Th2 olarak hangi yöne yönlendirdiği ile ilgili ileri araştırmaların yapılabileceği düşünülmüştür.

Farelere SK ve İP yolla uygulanan aşıların dalak üzerine etkileri de çalışmamızda değerlendirilmiştir. Bu amaçla, enjeksiyon grupları arasında ortalama dalak ağırlıklarında herhangi bir değişim olup olmadığı ve izole edilen dalak mononükleer hücre sayılarında gruplar arasında herhangi bir fark olup olmadığı karşılaştırılmıştır. Enjeksiyonlar sonrası fare dalaklarında meydana gelebilecek inflamasyona bağlı splenomegalinin tespit edilmesi hedeflenmiştir. SK ve İP enjeksiyonların her ikisinde de ortalama dalak ağırlığı ve dalak mononükleer hücre sayılarının, Td+Alum ve Td+CAP gruplarında kontrol grubuna göre artmış olduğu görülmüştür. Pek çok farklı adjuvanın çeşitli toksik etkileri olabildiği bilinmektedir. Örneğin antijenin, antijen sunucu hücreler tarafından alınımını güçlendiren bir saponin olan ve QS-21 adı verilen adjuvanın farelerde splenomegaliye ve insanlarda eritrosit lizisine sebep olduğu bilinmektedir [280]. Lim ve ark. pristan, CFA (Complete Freund's adjuvant), IFA (*incomplete freund's adjuvant*), phytol ve phytol türevi olan PHIS-01 gibi farklı adjuvanlar ile yaptıkları çalışmada, farelere intraperitoneal yolla adjuvanları vererek enjeksiyondan 1 hafta sonra dalaklarını çıkarılarak tartmış ve ortalama dalak ağırlığı ve hücre sayılarını belirlemiştir. PBS enjekte edilen kontrol grubuna göre dalak ağırlıkları ve hücre sayılarında IFA, CFA, phytol ve PHIS-01 gruplarında belirgin artış olduğu görülmüştür [281]. Muttaqi ve ark. ticari olarak mevcut alüminyum hidroksit jeli olan Alhydrogel, alüminyum hidroksit mikropartikülleri ve alüminyum

hidroksit nanopartikülleri ve kontrol grubu olarak PBS ile yaptıkları çalışmada, adjuvanları farelere 0,16, 1,28, 10,24 ve 81,92 mg/kg dozlarda her grupta 5 fare olacak şekilde intarperitoneal yolla uygulayarak grupların ortalama dalak ağırlıklarını saptamışlardır. Enjeksiyondan 14 gün sonra alınan dalaklar ile yapılan analizde nanopartikül formundaki adjuvan uygulanan farelerde, PBS grubuna göre ortalama dalak ağırlığında artış saptanmış olsa da dalakların histopatolojik bulguları tüm gruplar için normal bulunmuştur [282].

ELISA metodu aşı ile oluşan hümoral immün yanıtların *in vitro* olarak saptanması ve titrelerin ölçülmesinde sıklıkla kullanılan güvenilir bir yöntemdir. İnsan, fare, kobay, tavşan gibi pek çok türe özgü geliştirilmiş ve ticari olarak satılan ELISA kitleri bulunmaktadır. Bu kitler kullanılarak serumda anti tetanoz antikorları varlığı ve miktarları saptanabilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü rehberlerinde İgG titreleri 0.01 IU/ml'nin altında olan insanlarda korunmanın minimal düzeyde olduğunu, 0,1 IU/ml üzerinin ise sağlam bir koruma sağladığı belirtilmektedir. İnsan serumunda tetanoz toksoidine karşı oluşan İgG tipi antikorları saptamak için geliştirilmiş 5 adet farklı ELISA kitinin karşılaştırıldığı Perry ve ark. yaptığı çalışmada kitlerin performans karşılaştırması yapılabilmiştir [283]. Farzad ve ark. CBA/Ca ve Balb/c türü farelerde yaptıkları çalışmada biri aşı diğeri pürifiye tetanoz toksoidi olan iki çeşit tetanoz toksoidi ile immünize ettikleri farelerde, çeşitli zamanlarda fare serumları elde ederek farklı izotiplerdeki antikor yanıtlarını değerlendirmiştir. İgG, İgM ve İgA tipindeki antikorlar ELISA metodu ile saptanmıştır [156]. Çalışmamızda hem SK hem de İP enjeksiyon yapılan tüm aşı gruplarında anti tetanoz İgG ve anti difteri İgG antikorlarının varlığı ve konsantrasyonları saptanmıştır. SK enjeksiyonda en yüksek anti tetanoz antikoru titresi Td+Alum grubunda bulunmuştur. Bu grup aynı zamanda en yüksek CD19 molekül ekspresyonuna sahip olan gruptur. Anti difteri İgG antikor titreleri karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. İP enjeksiyonda da SK enjeksiyona benzer şekilde gruplar arasında hem tetanoz hem de difteri antikor konsantrasyonları açısından bir fark bulunmamıştır.

Toksoid aşılar ile oluşan antikorların nötralizan özellikte olması önemlidir. Antikorların nötralizan etkisi *in vitro* ya da *in vivo* yöntemler kullanılarak belirlenebilmektedir. Pasif hemaglutinasyon, ELISA, toksin bağlanma inhibisyonu (TOBI: toxin-binding inhibition) testi gibi yöntemler, antikorların nötralizasyon

etkinliklerini saptamada kullanılmaktadır. *in vivo* olarak çoğunlukla aşı ile immünizasyon sonrası deney hayvanına ilgili toksinin verilerek sağkalımların belirlenmesi olarak test edilen “challenge” deneyleri kullanılmaktadır. *in vitro* toksin nötralizasyon belirlemede ise hayvanlar immünize edilerek elde edilen serumlarının *in vitro* ortamlarda toksinleri nötralize etme kapasitesi ölçülmektedir. Bu amaçla VERO hücreleri gibi difteri toksinine duyarlı olduğu bilinen hücre hatları kullanılarak sitotoksisite deneyleri yapılmaktadır [152-154]. ELISA yöntemi ile varlığını tesbit ettiğimiz anti tetanoz ve anti difteri antikorlarının nötralizan özellikleri de çalışmamız kapsamında yapılan tetanoz toksini “challenge” deneyi ve difteri toksini *in vitro* toksin nötralizasyon deneyi ile gösterilmiştir.

“Challenge” testleri ile test edilen aşının referans aşıya göre potensi paralel doğru analizi ile saptanabilmektedir [153, 226]. Özcengiz ve ark. liyofilize adsorbe DT, Td, TT aşıları testinde karşılaştırılmalı olarak sıvı adsorbe TT aşısını kullanmışlardır. Bu aşıları 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 olarak sulandırıp her sulandırımdan 10’ar adet her biri 17-22 gr olan farelerin derialtına 0,5 ml enjekte etmişlerdir. Bağışıklanmayan 10 adet fareyi toksin kontrolü olarak kullanmışlardır. İmmünizasyondan 40 gün sonra 100XLD_{50}/0,5ml dozu ile farelerdeki ölü ve canlı fare sayısını belirleyerek, sonuçlarını referans aldıkları aşıya göre paralel doğru metodu ile IU olarak saptamışlardır. DTB aşısını 144.86 IU, DT aşısını 116.5IU, Td aşısını 98.25 IU ve TT aşısını 96.2 IU olarak bulunmuştur [284]. Choi ve ark. 2018 yılında yaptıkları çalışmada ulusal referans standartları kullanarak erişkin tip difteri ve tetanoz toksoid aşılarının potensini belirledikleri çalışmada referans tetanoz toksoidi 2,5 IU/ml olacak şekilde hazırlayarak seri dilüsyonları ile fareleri immünize etmiştir. İmmünizasyondan 28 gün sonra 100 LD_{50}/0.5 ml tetanoz toksini farelere verilerek 4 gün boyunca izlenmiştir. Toksinin de 100 LD_{50} dozunun 1/10, 1/50, 1/250 ve 1/1250 dilüsyonlarını yaparak farelere subkütan yolla enjekte etmiş, 4 gün boyunca izlemişlerdir. Sonuçlar değerlendirilmiş ve aşıların potensleri hesaplanmıştır [285]. Çalışmamızda da fareler Td-VAC ve TD+Alum aşıları ile SK yolla immünize edilmiştir. İmmünizasyondan 5 hafta sonra farelere 50xLD_{50} tetanoz toksini subkütan yolla verilerek fareler 4 gün boyunca gözlemlenmiştir. Her iki grupta da 6 adet farenin hiç birinin ölmediği görülmüş ve hem ticari aşı hem de test edilen aşı ile %100 koruma sağlandığı saptanmıştır.

İn vitro toksin nötralizasyon testi ile elde edilen serum titre ortalamaları karşılaştırıldığında, aşıların hem sulandırım yapılmadan uygulanan dozlarında hem de uygulanan 1/25, 1/50 ve 1/100 sulandırımlarda ticari aşı ile geliştirilen Td+Alum arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Wenzel ve ark. difteri toksinine karşı geliştirdikleri monoklonal antikorların nötralizasyon kapasitelerini belirlemek için *in vitro* toksin nötralizasyon testini VERO hücrelerinde MTT yöntemi ile test etmişlerdir. Geliştirdikleri monoklonal antikorlardan 22 tanesinin 4XMSD difteri toksini dozunu kullanarak nötralizasyon kapasitesini 3.3 pM ile18.8 µM arasında bulmuşlardır [251]. Dular 1993 yılında yaptığı bir çalışmada farklı üreticiler tarafından üretilen kombine aşılarda *in vivo* toksin nötralizasyon ve VERO hücresi yöntemlerini karşılaştırmalı olarak kullanarak difteri toksoidi potensini belirlemiştir. Kobaylar kullanılarak yapılan çalışmada immünizasyondan 4 hafta sonra serumlar alınarak VERO hücresi yöntemi ile aşıların ortalama potenslerini 0,588 IU/ml olarak saptamıştır [286].

Bu tez çalışması kapsamında yapılan challenge ve *in vitro* toksin nötralizasyon testleri ile ticari aşı ve geliştirilen aşıların immün yanıtlarının karşılaştırması yapılmıştır. Bu testlerden elde edilen veriler, geliştirilen aşıların potenslerinin belirlenebilmesi için önemli bir yol göstericidir. Ayrıca geliştirilen aşıların en az piyasada mevcut bulunan ticari aşı kadar koruyucu etkinliği olduğu saptanmıştır.

Tetanoz aşısının koruyucu etkinliğinin belirlendiği “challenge” testi için kullanılacak olan tetanoz toksininin LD_{50} ve PD_{50} dozlarının bilinmesi gerekmektedir. Tez çalışması kapsamında da kullanılan tetanoz toksininin LD_{50} ve LD_{100} dozları belirlenmiştir. DSÖ tetanoz toksininin LD_{50} belirleme kriteri olarak, enjeksiyon yapılan gruplardaki farelerin 4 gün içerisinde %50’sini öldüren en düşük dozu olarak (LD_{50}) belirlemiştir. PD_{50} ise farelerin %50’sinde 4 gün içerisinde paraliz bulgusu oluşturan en düşük doz olarak ifade edilmektedir [152, 153]. Buna göre tetanoz toksininin LD_{50} değeri 1.2 ng/0,5ml ve PD_{50} değeri ise 0,1ng/0,5 ml olarak bulunmuştur. Yu ve ark. rekombinant olarak ürettikleri tetanoz toksini ile bizim çalışmamıza benzer şekilde yaptıkları LD_{50} saptama çalışmasında tetanoz toksininin LD_{50} dozunu 15,8 ng/kg olarak bulmuştur [287]. Ayrıca saptanan LD_{50} değeri ile yapılan “challenge” deneyinde kullanılan dozun doğrulaması da yapılmıştır. İmmünize edilmeyen fareler toksin kontrolü olarak kullanılarak, farelere

50XLD$_{50}$/0,5ml dozu, 1/160, 1/50 ve 1/16 şeklinde sulandırımlarla uygulanmıştır. En yüksek dozda farelerin tümü öldüğü görülmüştür. 1/50 sulandırmada ise LD50 dozuna karşılık geleceği için farelerin yarısının ölmesi beklenmektedir. Beklendiği şekilde, 1/50 sulandırmada farelerin yarısı ölmüştür. 1/16 sulandırımda ise hiçbir farenin ölmediği görülmüştür. Böylece kullandığımız tetanoz toksininin etkinliği de yeniden ispatlanmıştır.

Pek çok memeli türü difteri toksinine duyarlı olmasına rağmen, fare ve ratlar doğal olarak difteri toksinine dirençlidir. Cha ve ark. transgenik olarak ürettikleri farelere difteri toksininin bağlanabileceği bir reseptör genini aktararak duyarlı hale getirmişlerdir [288]. DSÖ de difteri aşılarının üretim ve kalite kontrol aşamalarında test etmek için, difteri toksininin fareler üzerinde test edilmesinin mümkün olamayacağını ve kobaylar üzerinde denenmesi gerektiğini söylemektedir. Letal ya da non-letal difteri toksin çalışmalarının kobaylar üzerinde yapılmasının yanında, difteri toksininin VERO hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi sebebiyle alternatif yöntem olarak kullanılabileceğini belirtmektedir. Toksoid aşılar ile immünize edilen farelerin serumları ile difteri toksini nötralize edilerek VERO hücrelerinde sitopatik etkileri belirlenmektedir. Öncelikle minimum sitopatik doz (MSD) belirlenerek toksinin etki dozu saptanır. Difteri toksini ile 6 gün boyunca inkübe edilen VERO hücrelerinde saptanan sitopatik etki MTT yöntemi kullanılarak belirlenmektedir. [152]. Hoy ve ark. 1994 yılında yaptıkları çalışmada difteri toksininin sitopatik etkisini bu yöntemi kullanarak 20 pg/ml olarak saptamış ve etkinliğini göstermişlerdir [289]. Çalışmamızda kullanılan difteri toksininin minimum sitopatik dozu (MSD) MTT yöntemi ile 0,016 Lf/ml olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda kullanılan antijenlerin miktar belirleme çalışmaları amacıyla kullanılan Lowry protein yöntemi, en çok kullanılan protein tayin yöntemlerinden biridir. Oliver H. Lowry tarafından bulunan bu yöntemde, bazik ortamda proteinlerin peptit bağlarındaki azotların bakır iyonlarıyla mor renkli kompleks oluşturması ilkesine dayanır. Oluşan renk ile kantitatif ölçüm yapılabilmektedir. Çalışmamızda kullanılan toksinlerin konsantrasyonları difteri toksini için 1,34 mg/ml, tetanoz toksini için ise 1,49 mg/ml bulunmuştur.

DSÖ difteri, tetanoz ve boğmaca aşılarının üretim ve kalite kontrol klavuzunda toksoidlerin ve toksinlerin antijenik gücü ve saflığı ve ayrıca antijen içeriği, flokülasyon (Lf) birimleriyle ifade edildiğini, tanım olarak da 1 Lf birimi, 1 Lf eşdeğeri spesifik antitoksin ile en kısa sürede flokülasyon oluşturan toksoid (veya toksin) miktarı olarak belirtmektedir. Flokülasyonun ilk görüldüğü ana kadar geçen zaman ise Kf değeri olarak belirlenmiştir [152, 226]. Lf ve Kf değerleri her üretim aşamasında ve lotlarda farklı şekilde olabilir. Chellamani ve ark. tetanoz toksin üretiminin standardizasyonu çalışmalarında farklı besiyeri ortamlarını test ederken çeşitli zamanlarda üretip saflaştırdıkları toksinlerin Lf cinsinden konsantrasyonlarını 30 Lf/ml ile 70Lf/ml arasında değişen miktarlarda saptamışlardır. Toksinlerin Kf değerleri ise 9-40 dakika arasında değişen zamanlar olarak belirlenmiştir [290]. Bu tez çalışmada DSÖ tarafından önerildiği şekilde yapılan flokülasyon testleri ile difteri ve tetanoz toksinlerinin Lf cinsinden değeri tetanoz toksini için 50Lf/ml, difteri toksini için 60Lf/ml olarak bulunmuştur. Özcengiz ve ark. yaptıkları adsorbe tetanoz aşısı proses geliştirme ve üretim çalışmalarında DSÖ önerdiği şekilde 40-200 Lf/ml arasında değişen miktarlarda ve 15-45 dk arasında değişen zamanlarda Lf ve Kf değerleri bulmuşlardır [291]. Çalışmamızda da tetanoz toksini 50 Lf/ml ve Kf değeri 5 dakika olarak bulunurken, difteri toksini 60Lf/ml ve Kf değeri 15 dakika olarak mevcut literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi farklı moleküler ağırlıktaki proteinlerin gösterilebilmesi için sıklıkla laboratuvarlarda kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde proteinler bir güç kaynağı yardımı ile yüklerine göre ayrıştırılır. Bir belirteç yardımı ile molekül ağırlıkları saptanabilir. Biz de çalışmamız kapsamında antijenlerimizi gösterebilmek amacı ile SDS-Page Jel elektroforezi gerçekleştirdik. Helting ve ark. yaptıkları çalışmada tetanoz toksininin indirgenmemiş koşullarda 150kD ağırlığında bir protein olduğunu, yaklaşık 100kD ve 50kD ağırlıklarında alt üniteleri olduğunu SDS-PAGE jelde göstermiştir [292]. Guilhen ve ark. ise 2014 yılında yaptıkları tetanoz ve difteri toksinlerinin üretim proseslerinin karakterize ettikleri bir diğer çalışmada farklı üretim zamanlarında elde ettikleri tetanoz toksidlerini SDS-PAGE jelde görüntülemiş ve oluşan bantları göstermişlerdir. Bu çalışmada da 150kD, 55kD, 60kD, 70kD ve 50kD altında farklı ağırlıklarda protein bantları saptanmıştır. Guilhen ve ark. 150kD, 100kD ve 50kD ağırlığındaki bantların tetanozun daha önce de tanımlanan ağır zincir, hafif zincir ve tüm toksine ait bantlar

olduğunu, oluşan diğer bantların da üç sebebi olabileceğini açıklamışlardır. Birincisi bu bantlar toksin dışındaki *C.tetani* proteinleri ile ilgili olabilir, ikincisi toksin hafif zincirinin oluşturulduğu besiyerindeki diğer başka molükellerle kompleksler oluşturabileceği, üçüncüsü de toksin ağır zincirinin parçalanmış formları olabileceğidir. Bu parçalanmanın üretim ya da izolasyon aşamalarında olabileceği düşünülmüştür [293]. Çalışmamızda da benzer şekilde tetanoz toksini indirgenmemiş koşullarda 150 kD ağırlığında bir bant ve 75-40 kD arasında değişen ağırlıklarda bantlar olarak görülmüştür. İndirgenmiş koşullarda 150kD ağırlığında silik bir bant ve 100-37kD ağırlıkları arasında değişen ağırlıklarda bantlar oluştuğu görülmüştür. Tetanoz standart toksoidi de indirgenmemiş koşullarda 150-250kD belirteçler arasında silik bir bant ve 100-75kD belirteçler arasında bir bant olarak görülmüştür. İndirgenmiş koşullarda ise toksoid 150kD ağırlığında tek bant olarak saptanmıştır. Çalışmamızda kullanılan toksinlerin ve standart toksoidin SDS-PAGE jelde oluşturduğu bantların tetanoz toksinine ait olduğunu doğrulamak amacıyla western blot analizi yapılmıştır. Tetanoz toksinine karşı gelişen insan immunoglobulinlerinden oluşturulan DSÖ standartının primer antikor olarak kullanıldığı analizde görülen tüm bantların tetanoz toksin ve toksoidine ait olduğu teyid edilmiştir. Western blot yönteminde kullanılan, aranılan proteine özgü antikorlar sayesinde proteinlerin spesifik olarak gösterilmesini sağlanmaktadır [268].

Difteri toksini yaklaşık olarak 58-62 kDa ağırlığındadır. Collier ve ark. difteri toksinini yapı ve aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında saflaştırma sonrası toksinin yaklaşık 63kD ağırlığında bir bant olarak görüldüğünü söylemişlerdir [294]. Yine Guilhen ve ark. difteri toksoidini SDS-PAGE'de gösterdikleri çalışmalarında 53kD ağırlığında bir bant ve çeşitli ağırlıklarda başkaca bantlar saptamışlardır. Western blot ile doğrulamasını yaptıkları analizlerinde 53kD'luk bantın toksoide ait olduğunu göstermişlerdir [293]. Biz de çalışmamızda difteri standart toksoidi ve toksinini SDS-PAGE jelde 50-75kD belirteçler arasında saptadık. Ayrıca difteri toksoidi yüksek moleküler ağırlıkta bir bant olarak görülmüştür. İndirgenmemiş koşullarda oluşan bu yüksek molekül ağırlığındaki bantın toksoid oluşturmada kullanılan formaldehitin proteinleri kompleks hale getirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Formaldehit fikse edici, stabilize edici ve çapraz-bağlayıcı (*crosslinking*) bir ajan olarak protein ile karıştırıdığında, metilen köprüleri ile molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanmalara sebep olarak etki göstermektedir. Formaldehit ile muamele

edilen toksoidler bu nedenle muamele edilmemiş toksinlere göre daha yüksek moleküler ağırlıkta görülebilmektedir [295]. Western blot çalışmasıyla yapılan doğrulamada, kullanılan DSÖ insan anti difteri immünoglobunlerinden oluşan antitoksin ile saptanan bantların difteri toksin ve toksoidine ait olduğu ispatlanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Erişkin tip tetanoz ve difteri (Td) aşıları ile elde edilen sonuçlar

Erişkin Tip Difteri-Tetanoz toksoid aşısının alüminyum hidroksit ve kalsiyum fosfat adjuvanları içeren formları ile piyasada mevcut olan Erişkin tip Difteri tetanoz aşısı (Td-VAC) ile oluşan immün yanıtlar karşılaştırıldı. Aşıların 30 gün ara ile yapılan üç doz subkütan ve üç doz intraperitonel uygulama sonuçları elde edildi. Td+Alum ve Td+CAP gruplarında dalak ağırlıklarında ve elde edilen dalak mononükleer hücre sayılarında SF enjeksiyonu yapılan kontrol grubuna göre artış saptandı. Aşılara karşı oluşan immün yanıtta rol alan T hücrelerin CD4 ve CD8 ve B hücrelerdeki CD19 molekül ekspresyon oranları akım sitometri yöntemi ile gösterildi. İntraperitoneal enjeksiyon yapılan aşı gruplarında kontrole göre artan $CD4^+$ T hücre oranı ve artan $CD19^+$ B hücre oranı saptandı. Subkütan enjeksiyon yapılan gruplarda da kontrol grubuna göre artan $CD19^+$ B hücre oranı gösterildi. Hem SK hem de İP enjeksiyonlarda tüm aşı gruplarında hem difteri hem de tetanoz toksoidlerine karşı oluşan İgG tipinde antikor yanıtları ELISA yöntemi ile gösterildi. Ayrıca tetanoz toksini ile yapılan “challenge” testi ve difteri toksini ile yapılan *in vitro* toksin nötralizasyon testi ile tüm aşıların koruyucu etkinlikleri saptandı. Böylece geliştirilen aşıların oluşturduğu immün yanıtlar gösterildi. Yapılan bu preklinik çalışmalar doğrultusunda, geliştirilen aşıların faz çalışmalarının yapılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca elde edilen veriler doğrultusunda geliştirilen aşıların patent başvuruları EK-2’de sunulmuştur.

Antijenler ile elde edilen sonuçlar

Tetanoz toksininin miktarı Lowry protein yöntemi ve flokülasyon testi ile saptanarak, 1.49±0.3 mg/ml ve 50 Lf/ml olarak bulundu. Toksinin saflığı ve moleküler ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile standart toksoid ile karşılaştırmalı olarak gösterildi. Toksinin 150kD ağırlığındaki ağır zinciri ve 100kD ve 50kD ağırlığındaki hafif zincirleri gösterildi. Western blot yöntemi ile bantların tümünün toksine ait bantlar olduğu tesbit edildi. Tetanoz toksininin etkinliği hem LD_{50} belirleme çalışmasında hem de “challenge” deneyi sırasında gösterildi. Toksinin LD_{50} değeri 1,2ng/ml, PD_{50} değeri ise 0,1ng/ml olarak saptandı. Bulunan LD_{50} değeri aşıların etkinliğinin gösterilmesi

çalışmalarında 50X LD_{50} dozu olarak kullanıldı. Difteri toksininin de tetanoz toksini ile benzer şekilde miktarı Lowry protein yöntemi ve flokülasyon testi ile saptanarak, 1.34±0.1 mg/ml ve 60 Lf/ml olarak bulundu. Toksinin saflığı ve moleküler ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile standart toksoid ile karşılaştırmalı olarak gösterildi. Difteri toksininin indirgenmemiş koşullarda yaklaşık 58kD ağırlığında tek bir bant olduğu gösterildi. Western blot yönteminde kullanılan anti difteri toksin insan immünoglobulinlerinden oluşan standart antitoksin ile SDS-PAGE yönteminde gösterilen bantın toksine ait olduğu gösterildi. Difteri toksininin VERO-E6 hücrelerindeki sitopatik etkisi MTT yöntemi ile gösterildi ve MSD 0,016Lf/ml olarak bulundu. Bulunan bu konsantrasyon ile 4XMSD konsantrasyonu kullanılarak aşıların etkinlik belirleme çalışmaları gerçekleştirildi. Böylece kullanılan antijenlerin de etkinlikleri gösterildi.

KAYNAKLAR

1. İnternet: The power of vaccines: still not fully utilized. (2017). Web: https://www.who.int/publications/10-year-review/vaccines/en/ 28 Ekim 2020 tarihinde alınmıştır.

2. Clem, A. S. (2011). Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of global infectious diseases,* 3(1), 73-78.

3. Embgenbroich, M., ve Burgdorf, S. (2018). Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. *Frontiers in Immunology,* 9(1643).

4. Korsholm, K. S., Petersen, R. V., Agger, E. M., ve Andersen, P. (2010). T-helper 1 and T-helper 2 adjuvants induce distinct differences in the magnitude, quality and kinetics of the early inflammatory response at the site of injection. *Immunology,* 129(1), 75-86.

5. Awate, S., Babiuk, L. A., ve Mutwiri, G. (2013). Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in Immunology,* 4, 114.

6. De Silva, N. S., ve Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature reviews. Immunology,* 15(3), 137-148.

7. Elsner, R. A., ve Shlomchik, M. J. (2020). Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity. *Immunity,* 53(6), 1136-1150.

8. Cook, T. M., Protheroe, R. T., ve Handel, J. M. (2001). Tetanus: a review of the literature. *British Journal of Anaesthesia,* 87(3), 477-487.

9. Dong, M., Masuyer, G., ve Stenmark, P. (2019). Botulinum and Tetanus Neurotoxins. *Annual Review of Biochemistry,* 88, 811-837.

10. MacGregor, R. R. (2015). 206 - Corynebacterium diphtheriae (Diphtheria). In J. E. Bennett, R. Dolin, & M. J. Blaser (Editörler). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders, s. 2366-2372.e2361.

11. Schuster, M., Schnell, L., Feigl, P., Birkhofer, C., Mohr, K., Roeder, M., Carle, S., Langer, S., Tippel, F., Buchner, J., Fischer, G., Hausch, F., Frick, M., Schwan, C., Aktories, K., Schiene-Fischer, C., ve Barth, H. (2017). The Hsp90 machinery facilitates the transport of diphtheria toxin into human cells. *Scientific Reports,* 7(1), 613.

12. Tiwari, T. S. P., ve Wharton, M. (2013). 12 - Diphtheria toxoid. In S. A. Plotkin, W. A. Orenstein, & P. A. Offit (Editörler). *Vaccines (Sixth Edition)*. London: W.B. Saunders, s. 153-166.

13. Kroger, A. T., Pickering, L. K., Wharton, M., Mawle, A., Hinman, A. R., ve Orenstein, W. A. (2015). 321 - Immunization. In J. E. Bennett, R. Dolin, & M.

J. Blaser (Editörler). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders, s. 3516-3553.e3515.

14. Yadav, D. K., Yadav, N., ve Khurana, S. M. P. (2014). Chapter 26 - Vaccines: Present Status and Applications. In A. S. Verma & A. Singh (Editörler). *Animal Biotechnology*. San Diego: Academic Press, s. 491-508.

15. Nagorsen, D., ve Marincola, F. M. (2005). Monitoring Antigen-specific T Cell Responses. In D. Nagorsen & F. M. Marincola (Editörler). *Analyzing T Cell Responses: How to Analyze Cellular Immune Responses against Tumor Associated Antigens*. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 1-7.

16. Bercovici, N., Duffour, M. T., Agrawal, S., Salcedo, M., ve Abastado, J. P. (2000). New methods for assessing T-cell responses. *Clinical and diagnostic laboratory immunology,* 7(6), 859-864.

17. Strugnell, R., Zepp, F., Cunningham, A., ve Tantawichien, T. (2011). Vaccine antigens. *Perspectives in Vaccinology,* 1(1), 61-88.

18. Garçon, N., Leroux-Roels, G., ve Cheng, W.-F. (2011). Vaccine adjuvants. *Perspectives in Vaccinology,* 1(1), 89-113.

19. Leo, O., Cunningham, A., ve Stern, P. L. (2011). Vaccine immunology. *Perspectives in Vaccinology,* 1(1), 25-59.

20. Porcelli, S. A. (2017). Chapter 17 - Innate Immunity. In G. S. Firestein, R. C. Budd, S. E. Gabriel, I. B. McInnes, & J. R. O'Dell (Editörler). *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology (Tenth Edition)*. Elsevier, s. 274-287.

21. Gasteiger, G., D'Osualdo, A., Schubert, D. A., Weber, A., Bruscia, ve E. M., Hartl, D. (2017). Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *Journal of Innate Immunity,* 9(2), 111-125.

22. Wade, W. F. (2015). Chapter 26 - Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Network. In Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, & J. Schwartzman (Editörler). *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. Boston: Academic Press, s. 449-474.

23. Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., ve Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews,* 249(1), 158-175.

24. Akira, S., Takeda, K., ve Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology,* 2(8), 675-680.

25. Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology,* 1(2), 135-145.

26. Rehli, M. (2002). Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends in Immunology,* 23(8), 375-378.

27. Barton, G. M., ve Kagan, J. C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature Reviews Immunology,* 9(8), 535-542.

28. Jin, M. S., ve Lee, J.-O. (2008). Structures of the Toll-like Receptor Family and Its Ligand Complexes. *Immunity,* 29(2), 182-191.

29. Kawasaki, T., ve Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers Immunology,* 5, 461.

30. van Duin, D., Medzhitov, R., ve Shaw, A. C. (2006). Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends in Immunology,* 27(1), 49-55.

31. Zakeri, A., ve Russo, M. (2018). Dual Role of Toll-like Receptors in Human and Experimental Asthma Models. *Frontiers in Immunology,* 9(1027).

32. Kool, M., Petrilli, V., De Smedt, T., Rolaz, A., Hammad, H., van Nimwegen, M., Bergen, I. M., Castillo, R., Lambrecht, B. N., ve Tschopp, J. (2008). Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *Journal of Immunology,* 181(6), 3755-3759.

33. Didierlaurent, A. M., Morel, S., Lockman, L., Giannini, S. L., Bisteau, M., Carlsen, H., Kielland, A., Vosters, O., Vanderheyde, N., Schiavetti, F., Larocque, D., Van Mechelen, M., ve Garcon, N. (2009). AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *Journal of Immunology,* 183(10), 6186-6197.

34. Franchi, L., Warner, N., Viani, K., ve Nunez, G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunological Reviews,* 227(1), 106-128.

35. Saxena, M., ve Yeretssian, G. (2014). NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. *Frontiers in Immunology,* 5(327).

36. Kim, Y. K., Shin, J. S., ve Nahm, M. H. (2016). NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Medical Journal,* 57(1), 5-14.

37. Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., ve He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *International journal of molecular sciences,* 20(13), 3328.

38. Sun, B., Wang, X., Ji, Z., Li, R., ve Xia, T. (2013). NLRP3 inflammasome activation induced by engineered nanomaterials. *Small,* 9(9-10), 1595-1607.

39. Franchi, L., ve Núñez, G. (2008). The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *European journal of immunology,* 38(8), 2085-2089.

40. Ghimire, T. R. (2015). The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm. *SpringerPlus,* 4, 181-181.

41. Li, H., Willingham, S. B., Ting, J. P., ve Re, F. (2008). Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *The Journal of Immunology,* 181(1), 17-21.

42. Li, H., Nookala, S., ve Re, F. (2007). Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *Journal of Immunology,* 178(8), 5271-5276.

43. Eisenbarth, S. C., Colegio, O. R., O'Connor, W., Sutterwala, F. S., ve Flavell, R. A. (2008). Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature,* 453(7198), 1122-1126.

44. Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A., ve Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology,* 9(8), 847-856.

45. Maisonneuve, C., Bertholet, S., Philpott, D. J., ve De Gregorio, E. (2014). Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 111(34), 12294-12299.

46. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S., Baker, D. L., ve Baker, A. (2018). *Cellular and molecular immunology*.

47. Dunkelberger, J. R., ve Song, W.-C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research,* 20(1), 34-50.

48. Johnson, R. J. (2013). Chapter II.2.4 - The Complement System. In B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, & J. E. Lemons (Editörler). *Biomaterials Science (Third Edition)*. Academic Press, s. 533-545.

49. Thurman, J. M., ve Holers, V. M. (2006). The Central Role of the Alternative Complement Pathway in Human Disease. *The Journal of Immunology,* 176(3), 1305-1310.

50. Harboe, M., ve Mollnes, T. E. (2008). The alternative complement pathway revisited. *Journal of cellular and molecular medicine,* 12(4), 1074-1084.

51. Atkinson, J. P., Du Clos, T. W., Mold, C., Kulkarni, H., Hourcade, D., ve Wu, X. (2019). 21 - The Human Complement System: Basic Concepts and

Clinical Relevance. In R. R. Rich, T. A. Fleisher, W. T. Shearer, H. W. Schroeder, A. J. Frew, & C. M. Weyand (Editörler). *Clinical Immunology (Fifth Edition)*. London: Elsevier, s. 299-317.e291.

52. Murphy, K., Weaver, C., ve Janeway, C. (2017). *Janeway's immunobiology*.

53. Bredius, R. G., Driedijk, P. C., Schouten, M. F., Weening, R. S., ve Out, T. A. (1992). Complement activation by polyclonal immunoglobulin G1 and G2 antibodies against Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae type b, and tetanus toxoid. *Infection and Immunity,* 60(11), 4838-4847.

54. Ramanathan, V. D., Badenoch-Jones, P., ve Turk, J. L. (1979). Complement activation by aluminium and zirconium compounds. *Immunology,* 37(4), 881-888.

55. Guven, E., Duus, K., Laursen, I., Hojrup, P., ve Houen, G. (2013). Aluminum hydroxide adjuvant differentially activates the three complement pathways with major involvement of the alternative pathway. *PloS one,* 8(9), e74445.

56. Pool, V., Mege, L., ve Abou-Ali, A. (2020). Arthus Reaction as an Adverse Event Following Tdap Vaccination. *Vaccines (Basel),* 8(3).

57. Peng, B., Wei, M., Zhu, F.-C., ve Li, J.-X. (2019). The vaccines-associated Arthus reaction. *Human vaccines & immunotherapeutics,* 15(11), 2769-2777.

58. Gordon, S., ve Plüddemann, A. (2019). The Mononuclear Phagocytic System. Generation of Diversity. *Frontiers in Immunology,* 10(1893).

59. Lavoie, P. M., ve Levy, O. (2017). 125 - Mononuclear Phagocyte System. In R. A. Polin, S. H. Abman, D. H. Rowitch, W. E. Benitz, & W. W. Fox (Editörler). *Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition)*. Elsevier, s. 1208-1216.e1203.

60. Martinez, F. O., ve Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports,* 6, 13.

61. Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., ve Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology,* 877, 173090.

62. Shah, B., Burg, N., ve Pillinger, M. H. (2017). Chapter 11 - Neutrophils. In G. S. Firestein, R. C. Budd, S. E. Gabriel, I. B. McInnes, & J. R. O'Dell (Editörler). *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology (Tenth Edition)*. Elsevier, s. 169-188.e163.

63. Roos, D. (1998). Neutrophils. In P. J. Delves (Editör). *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*. Oxford: Elsevier, s. 1854-1858.

64. de Bont, C. M., Boelens, W. C., ve Pruijn, G. J. M. (2019). NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cellular and Molecular Immunology,* 16(1), 19-27.

65. Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K. N., ve Wood, J. G. (2016). Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Frontiers in Immunology,* 6(620).

66. Stone, K. D., Prussin, C., ve Metcalfe, D. D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology,* 125(2 Suppl 2), S73-S80.

67. Rigoni, A., Colombo, M. P., ve Pucillo, C. (2018). Mast cells, basophils and eosinophils: From allergy to cancer. *Seminars in Immunology,* 35, 29-34.

68. Patente, T. A., Pinho, M. P., Oliveira, A. A., Evangelista, G. C. M., Bergami-Santos, P. C., ve Barbuto, J. A. M. (2018). Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology,* 9, 3176.

69. Tan, J. K., ve O'Neill, H. C. (2005). Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *Journal of Leukocyte Biology,* 78(2), 319-324.

70. Upham, J. W., ve Hughes, T. L. (2006). DENDRITIC CELLS. In G. J. Laurent & S. D. Shapiro (Editörler). *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. Oxford: Academic Press, s. 10-15.

71. Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M. C., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A., ve Vicari, A. (2000). Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Seminars in Immunopathology,* 22(4), 345-369.

72. Nagai, T. (2017). Difference between Immature Dendritic Cells (imDCs) and Mature Dendritic Cells (mDCs) Derived from Human Monocytes. *The Journal of Immunology,* 198(1 Supplement), 201.216.

73. ten Broeke, T., Wubbolts, R., ve Stoorvogel, W. (2013). MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting. *Cold Spring Harbor perspectives in biology,* 5(12), a016873-a016873.

74. Tanne, A., ve Bhardwaj, N. (2017). Chapter 9 - Dendritic Cells: General Overview and Role in Autoimmunity. In G. S. Firestein, R. C. Budd, S. E. Gabriel, I. B. McInnes, & J. R. O'Dell (Editörler). *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology (Tenth Edition)*. Elsevier, s. 126-144.e126.

75. Kool, M., Fierens, K., ve Lambrecht, B. N. (2012). Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *Journal of Medical Microbiology,* 61(Pt 7), 927-934.

76. Marichal, T., Ohata, K., Bedoret, D., Mesnil, C., Sabatel, C., Kobiyama, K., Lekeux, P., Coban, C., Akira, S., Ishii, K. J., Bureau, F., ve Desmet, C. J. (2011). DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature Medicine,* 17(8), 996-1002.

77. Riteau, N., Baron, L., Villeret, B., Guillou, N., Savigny, F., Ryffel, B., Rassendren, F., Le Bert, M., Gombault, A., ve Couillin, I. (2012). ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death & Disease,* 3(10), e403-e403.

78. Lu, F., ve HogenEsch, H. (2013). Kinetics of the inflammatory response following intramuscular injection of aluminum adjuvant. *Vaccine,* 31(37), 3979-3986.

79. McKee, A. S., Munks, M. W., MacLeod, M. K. L., Fleenor, C. J., Van Rooijen, N., Kappler, J. W., ve Marrack, P. (2009). Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950),* 183(7), 4403-4414.

80. Calabro, S., Tortoli, M., Baudner, B. C., Pacitto, A., Cortese, M., O'Hagan, D. T., De Gregorio, E., Seubert, A., ve Wack, A. (2011). Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine,* 29(9), 1812-1823.

81. Ulanova, M., Tarkowski, A., Hahn-Zoric, M., ve Hanson, L. A. (2001). The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. *Infection and Immunity,* 69(2), 1151-1159.

82. Stephen, J., Scales, H. E., Benson, R. A., Erben, D., Garside, P., ve Brewer, J. M. (2017). Neutrophil swarming and extracellular trap formation play a significant role in Alum adjuvant activity. *NPJ Vaccines,* 2(1), 1.

83. Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology,* 2(5), 309-322.

84. Hogquist, K. A., Xing, Y., Hsu, F.-C., ve Shapiro, V. S. (2015). T Cell Adolescence: Maturation Events Beyond Positive Selection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950),* 195(4), 1351-1357.

85. Mak, T. W., ve Saunders, M. E. (2006). 14 - T Cell Activation. In T. W. Mak & M. E. Saunders (Editörler). *The Immune Response*. Burlington: Academic Press, s. 373-401.

86. Budd, R. C., ve Fortner, K. A. (2017). Chapter 12 - T Lymphocytes. In G. S. Firestein, R. C. Budd, S. E. Gabriel, I. B. McInnes, & J. R. O'Dell (Editörler). *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology (Tenth Edition)*. Elsevier, s. 189-206.

87. Corthay, A. (2006). A three-cell model for activation of naïve T helper cells. *Scand J Immunol,* 64(2), 93-96.

88. Zhu, J., Yamane, H., ve Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol,* 28, 445-489.

89. Sallusto, F., ve Lanzavecchia, A. (2009). Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *European journal of immunology,* 39(8), 2076-2082.

90. Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q., ve Yoshimura, A. (2016). Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol,* 37(11), 803-811.

91. Chapter 9 - T Cell Development, Activation and Effector Functions. (2014). In T. W. Mak, M. E. Saunders, & B. D. Jett (Editörler). *Primer to the Immune Response (Second Edition)*. Boston: Academic Cell, s. 197-226.

92. Chtanova, T., ve Mackay, C. R. (2001). T Cell Effector Subsets: Extending the Th1/Th2 Paradigm. In F. J. Dixon (Editör). *Advances in Immunology* (Vol. 78). Academic Press, s. 233-266.

93. Zhang, Y., Zhang, Y., Gu, W., ve Sun, B. (2014). TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals. *Adv Exp Med Biol,* 841, 15-44.

94. Zhu, J. (2015). T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine,* 75(1), 14-24.

95. Fragoso, R. C., Wei-Chih Su, M., ve Burakoff, S. J. (2002). T Cells and Their Effector Functions. In J. R. Bertino (Editör). *Encyclopedia of Cancer (Second Edition)*. New York: Academic Press, s. 339-351.

96. Le Gros, G., ve Kyle, R. (2016). The Differentiation and Function of Th2 and Th9 Cells. In M. J. H. Ratcliffe (Editör). *Encyclopedia of Immunobiology*. Oxford: Academic Press, s. 294-306.

97. Burkett, P. R., Lee, Y., Peters, A., ve Kuchroo, V. K. (2014). Chapter 6 - T Cells and their Subsets in Autoimmunity. In N. R. Rose & I. R. Mackay (Editörler). *The Autoimmune Diseases (Fifth Edition)*. Boston: Academic Press, s. 69-86.

98. Chen, T., Guo, J., Cai, Z., Li, B., Sun, L., Shen, Y., Wang, S., Wang, Z., Wang, Z., Wang, Y., Zhou, H., Cai, Z., ve Ye, Z. (2020). Th9 Cell Differentiation and Its Dual Effects in Tumor Development. *Frontiers in Immunology,* 11, 1026.

99. Shuttleworth, S., Townsend, P., Silva, F., Cecil, A., Hill, T., Tomassi, C., Rogers, H., ve Harrison, R. (2011). Progress in the Development of Small Molecule Therapeutics Targeting Th17 Cell Function for the Treatment of Immune-Inflammatory Diseases. In G. Lawton & D. R. Witty (Editörler). *Progress in Medicinal Chemistry* (Vol. 50). Elsevier, s. 109-133.

100. Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annual Review of Immunology,* 29, 621-663.

101. Krishnaswamy, J. K., Alsén, S., Yrlid, U., Eisenbarth, S. C., ve Williams, A. (2018). Determination of T Follicular Helper Cell Fate by Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology,* 9(2169).

102. de Vinuesa, C. G., Cook, M. C., Ball, J., Drew, M., Sunners, Y., Cascalho, M., Wabl, M., Klaus, G. G., ve MacLennan, I. C. (2000). Germinal centers without T cells. *Journal of Experimental Medicine,* 191(3), 485-494.

103. Carbo, A., Hontecillas, R., Kronsteiner, B., Viladomiu, M., Pedragosa, M., Lu, P., Philipson, C. W., Hoops, S., Marathe, M., Eubank, S., Bisset, K., Wendelsdorf, K., Jarrah, A., Mei, Y., ve Bassaganya-Riera, J. (2013). Systems modeling of molecular mechanisms controlling cytokine-driven CD4+ T cell differentiation and phenotype plasticity. *PLoS Computational Biology,* 9(4), e1003027.

104. Andersen, M. H., Schrama, D., thor Straten, P., ve Becker, J. C. (2006). Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology,* 126(1), 32-41.

105. Zhang, N., ve Bevan, M. J. (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity,* 35(2), 161-168.

106. McKee, A. S., MacLeod, M. K., Kappler, J. W., ve Marrack, P. (2010). Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? *BMC Biology,* 8, 37.

107. Sokolovska, A., Hem, S. L., ve HogenEsch, H. (2007). Activation of dendritic cells and induction of CD4+ T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine,* 25(23), 4575-4585.

108. Brewer, J. M., Conacher, M., Satoskar, A., Bluethmann, H., ve Alexander, J. (1996). In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *European journal of immunology,* 26(9), 2062-2066.

109. Brewer, J. M., Conacher, M., Hunter, C. A., Mohrs, M., Brombacher, ve F., Alexander, J. (1999). Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *Journal of Immunology,* 163(12), 6448-6454.

110. Serre, K., Mohr, E., Gaspal, F., Lane, P. J. L., Bird, R., Cunningham, A. F., ve Maclennan, I. C. M. (2010). IL-4 directs both CD4 and CD8 T cells to produce Th2 cytokines in vitro, but only CD4 T cells produce these cytokines in response to alum-precipitated protein in vivo. *Molecular immunology,* 47(10), 1914-1922.

111. Serre, K., Mohr, E., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Granjeaud, S., Bird, R., ve MacLennan, I. C. (2008). Molecular differences between the divergent responses of ovalbumin-specific CD4 T cells to alum-precipitated ovalbumin compared to ovalbumin expressed by Salmonella. *Molecular immunology,* 45(13), 3558-3566.

112. Fabricius, D., Neubauer, M., Mandel, B., Schutz, C., Viardot, A., Vollmer, A., Jahrsdorfer, B., ve Debatin, K. M. (2010). Prostaglandin E2 inhibits IFN-alpha secretion and Th1 costimulation by human plasmacytoid dendritic cells via E-prostanoid 2 and E-prostanoid 4 receptor engagement. *Journal of Immunology,* 184(2), 677-684.

113. Boniface, K., Bak-Jensen, K. S., Li, Y., Blumenschein, W. M., McGeachy, M. J., McClanahan, T. K., McKenzie, B. S., Kastelein, R. A., Cua, D. J., ve de Waal Malefyt, R. (2009). Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *Journal of Experimantal Medicine,* 206(3), 535-548.

114. Kuroda, E., Ishii, K. J., Uematsu, S., Ohata, K., Coban, C., Akira, S., Aritake, K., Urade, Y., ve Morimoto, Y. (2011). Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. *Immunity,* 34(4), 514-526.

115. Ding, Z., Van Riet, E., Romeijn, S., Kersten, G. F. A., Jiskoot, W., ve Bouwstra, J. A. (2009). Immune modulation by adjuvants combined with diphtheria toxoid administered topically in BALB/c mice after microneedle array pretreatment. *Pharmaceutical research,* 26(7), 1635-1643.

116. Mayer, S., Laumer, M., Mackensen, A., Andreesen, R., ve Krause, S. W. (2002). Analysis of the Immune Response against Tetanus Toxoid: Enumeration of Specific T Helper Cells by the Elispot Assay. *Immunobiology,* 205(3), 282-289.

117. Rowe, J., Macaubas, C., Monger, T. M., Holt, B. J., Harvey, J., Poolman, J. T., Sly, P. D., ve Holt, P. G. (2000). Antigen-Specific Responses to Diphtheria-Tetanus-Acellular Pertussis Vaccine in Human Infants Are Initially Th2 Polarized. *Infection and Immunity,* 68(7), 3873.

118. Ma, Y., ve Ross, A. C. (2005). The anti-tetanus immune response of neonatal mice is augmented by retinoic acid combined with polyriboinosinic:polyribocytidylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 102(38), 13556.

119. Schroeder, H. W., Radbruch, A., ve Berek, C. (2019). 7 - B-Cell Development and Differentiation. In R. R. Rich, T. A. Fleisher, W. T. Shearer, H. W. Schroeder, A. J. Frew, & C. M. Weyand (Editörler). *Clinical Immunology (Fifth Edition)*. London: Elsevier, s. 107-118.e101.

120. Chapter 9 - Antibodies. (2012). In D. K. Flaherty (Editör). *Immunology for Pharmacy*. Saint Louis: Mosby, s. 70-78.

121. Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., ve Gilliland, G. L. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel, Switzerland),* 8(4), 55.

122. Maity, P. C., Datta, M., Nicolò, A., ve Jumaa, H. (2018). Isotype Specific Assembly of B Cell Antigen Receptors and Synergism With Chemokine Receptor CXCR4. *Frontiers in Immunology,* 9(2988).

123. Chi, X., Li, Y., ve Qiu, X. (2020). V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology,* 160(3), 233-247.

124. Antibody structure–function relationships. (2012). In W. R. Strohl & L. M. Strohl (Editörler). *Therapeutic Antibody Engineering*. Woodhead Publishing, s. 37-595.

125. Schatz, D. G., ve Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nature Reviews Immunology,* 11(4), 251-263.

126. Roth, D. B. (2014). V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiology spectrum,* 2(6), 10.1128/microbiolspec.MDNA1123-0041-2014.

127. Leichner, T., ve Kambayashi, T. (2014). White Blood Cells and Lymphoid Tissue *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier.

128. 2 - ANTIGENS, IMMUNOGENS, VACCINES, AND IMMUNIZATION. (2004). In J. M. Cruse, R. E. Lewis, & H. Wang (Editörler). *Immunology Guidebook*. San Diego: Academic Press, s. 17-45.

129. Vos, Q., Lees, A., Wu, Z. Q., Snapper, C. M., ve Mond, J. J. (2000). B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological Reviews,* 176, 154-170.

130. Hess, C., Winkler, A., Lorenz, A. K., Holecska, V., Blanchard, V., Eiglmeier, S., Schoen, A.-L., Bitterling, J., Stoehr, A. D., Petzold, D., Schommartz, T., Mertes, M. M. M., Schoen, C. T., Tiburzy, B., Herrmann, A., Köhl, J., Manz, R. A., Madaio, M. P., Berger, M., Wardemann, H., ve Ehlers, M. (2013). T cell–independent B cell activation induces immunosuppressive sialylated IgG antibodies. *The Journal of Clinical Investigation,* 123(9), 3788-3796.

131. Sagaert, X., Sprangers, B., ve De Wolf-Peeters, C. (2007). The dynamics of the B follicle: understanding the normal counterpart of B-cell-derived malignancies. *Leukemia,* 21(7), 1378-1386.

132. Kranich, J., ve Krautler, N. J. (2016). How Follicular Dendritic Cells Shape the B-Cell Antigenome. *Frontiers in Immunology,* 7(225).

133. Haynes, N. M., Allen, C. D. C., Lesley, R., Ansel, K. M., Killeen, N., ve Cyster, J. G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1^{High} Germinal Center-Associated Subpopulation. *The Journal of Immunology,* 179(8), 5099.

134. Xu, Z., Zan, H., Pone, E. J., Mai, T., ve Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nature Reviews Immunology,* 12(7), 517-531.

135. Gatto, D., ve Brink, R. (2010). The germinal center reaction. *The Journal of allergy and clinical immunology,* 126(5), 898-907; quiz 908-899.

136. Brink, R. (2007). Germinal-center B cells in the zone. *Immunity,* 26(5), 552-554.

137. Stebegg, M., Kumar, S. D., Silva-Cayetano, A., Fonseca, V. R., Linterman, M. A., ve Graca, L. (2018). Regulation of the Germinal Center Response. *Frontiers in Immunology,* 9, 2469.

138. Vanderleyden, I., Linterman, M. A., ve Smith, K. G. (2014). Regulatory T cells and control of the germinal centre response. *Arthritis Research and Therapy,* 16(5), 471.

139. Allen, C. D., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., ve Cyster, J. G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature Immunology,* 5(9), 943-952.

140. Allen, C. D., Okada, T., ve Cyster, J. G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity,* 27(2), 190-202.

141. Kennedy, D. E., Okoreeh, M. K., Maienschein-Cline, M., Ai, J., Veselits, M., McLean, K. C., Dhungana, Y., Wang, H., Peng, J., Chi, H., Mandal, M., ve Clark, M. R. (2020). Novel specialized cell state and spatial compartments within the germinal center. *Nature Immunology,* 21(6), 660-670.

142. Vinuesa, C. G., Sanz, I., ve Cook, M. C. (2009). Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology,* 9(12), 845-857.

143. Zotos, D., Coquet, J. M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L. M., Godfrey, D. I., Toellner, K. M., Smyth, M. J., Nutt, S. L., ve Tarlinton, D. M. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *Journal of Experimental Medicine,* 207(2), 365-378.

144. DeFranco, A. L. (2016). The germinal center antibody response in health and disease. *F1000Research,* 5.

145. Luther, S. A., Serre, K., Cunningham, A. F., Khan, M., Acha-Orbea, H., MacLennan, I. C., ve Toellner, K. M. (2007). Recirculating CD4 memory T cells mount rapid secondary responses without major contributions from follicular CD4 effectors and B cells. *European journal of immunology,* 37(6), 1476-1484.

146. Serre, K., Mohr, E., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Bird, R., Khan, M., ve MacLennan, I. C. (2009). Early simultaneous production of intranodal CD4 Th2 effectors and recirculating rapidly responding central-memory-like CD4 T cells. *European journal of immunology,* 39(6), 1573-1586.

147. Jenks, S. A., Cashman, K. S., Woodruff, M. C., Lee, F. E., ve Sanz, I. (2019). Extrafollicular responses in humans and SLE. *Immunological Reviews,* 288(1), 136-148.

148. MacLennan, I. C., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M., Zuniga, E., Cook, M. C., ve Vinuesa, C. G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunological Reviews,* 194, 8-18.

149. Jordan, M. B., Mills, D. M., Kappler, J., Marrack, P., ve Cambier, J. C. (2004). Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. *Science,* 304(5678), 1808-1810.

150. Cain, D. W., Sanders, S. E., Cunningham, M. M., ve Kelsoe, G. (2013). Disparate adjuvant properties among three formulations of "alum". *Vaccine,* 31(4), 653-660.

151. Grasse, M., Meryk, A., Miggitsch, C., ve Grubeck-Loebenstein, B. (2018). GM-CSF improves the immune response to the diphtheria-component in a multivalent vaccine. *Vaccine,* 36(31), 4672-4680.

152. World Health, O. (2013). Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines, Geneva.

153. World Health Organization. Biologicals, U., Kansanterveyslaitos. (1994). Production and control of tetanus vaccine : a training curriculum. Geneva: World Health Organization.

154. Miyamura, K., Nishio, S., Ito, A., Murata, R., ve Kono, R. (1974). Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. *Journal of Biological Standardization,* 2(3), 189-201.

155. Gupta, R. K., ve Siber, G. R. (1994). Comparative Analysis of Tetanus Antitoxin Titers of Sera from Immunized Mice and Guinea Pigs Determined by Toxin Neutralization Test and Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Biologicals,* 22(3), 215-219.

156. Farzad, Z., ve James, K. (1986). Isotype responses of mice to tetanus-toxoid preparations. *Journal of Medical Microbiology,* 22(3), 189-193.

157. Sonobe, M. H., Trezena, A. G., Guilhen, F. B., Takano, V. L., Fratelli, F., Sakauchi, D., Morais, J. F., Prado, S. M., ve Higashi, H. G. (2007). Determination of low tetanus or diphtheria antitoxin titers in sera by a toxin neutralization assay and a modified toxin-binding inhibition test. *The Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* 40(1), 69-76.

158. Kreeftenberg, J. G., van der Gun, J., Marsman, F. R., Sekhuis, V. M., Bhandari, S. K., ve Maheshwari, S. C. (1985). An investigation of a mouse model to estimate the potency of the diphtheria component in vaccines. *Journal of Biological Standardization,* 13(3), 229-234.

159. Reder, S., Riffelmann, M., Becker, C., ve Wirsing von König, C. H. (2008). Measuring Immunoglobulin G Antibodies to Tetanus Toxin, Diphtheria Toxin, and Pertussis Toxin with Single-Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and a Bead-Based Multiplex Assay. *Clinical and Vaccine Immunology,* 15(5), 744.

160. Pimenta, F. P., Damasco, P. V., Cerbino Neto, J., Lopes, G. S., Hirata, R., Jr., Milagres, L. G., ve Mattos-Guaraldi, A. L. (2006). Diphtheria-neutralizing antibody levels in healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. *The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,* 101(4), 459-462.

161. Boylston, A. (2012). The origins of inoculation. *Journal of the Royal Society of Medicine,* 105(7), 309-313.

162. Artenstein, A. W., ve Poland, G. A. (2012). Vaccine history: the past as prelude to the future. *Vaccine,* 30(36), 5299-5301.

163. İnternet: Najera, R., F. (December, 2018). Life Before Vaccines: My Story. Web: https://www.historyofvaccines.org/content/blog/live-before-vaccines-guest-post adresinden 25 Kasım 2020 tarihinde alınmıştır.

164. İnternet: Group., O. V. (January 2019). Types of vaccine. Web: https://www.vaccines.gov/basics/types adresinden 25 Kasım 2020 tarihinde alınmıştır.

165. İnternet: Grubu., E. B. Ç. (2019). Erişkin Bağışıklama Rehberi. Web: https://www.ekmud.org.tr/haber/264-turkiye-ekmud-eriskin-bagisiklama-rehberi adresinden 20 Ekim 2020 tarihinde alınmıştır.

166. Mak, T. W., ve Saunders, M. E. (2006). 23 - Vaccines and Clinical Immunization. In T. W. Mak & M. E. Saunders (Editörler). *The Immune Response*. Burlington: Academic Press, s. 695-749.

167. Plotkin, S. (2014). History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 111(34), 12283-12287.

168. Sridhar, S., Brokstad, K. A., ve Cox, R. J. (2015). Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *Vaccines (Basel),* 3(2), 373-389.

169. Nascimento, I. P., ve Leite, L. C. (2012). Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *The Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* 45(12), 1102-1111.

170. Murray, K. (1988). Application of recombinant DNA techniques in the development of viral vaccines. *Vaccine,* 6(2), 164-174.

171. Dorji, D., Mooi, F., Yantorno, O., Deora, R., Graham, R. M., ve Mukkur, T. K. (2018). Bordetella Pertussis virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance. *Medical Microbiology and Immunology,* 207(1), 3-26.

172. van Putten, J., ve Tønjum, T. (2010). Chapter 168 - Neisseria. In J. Cohen, S. M. Opal, & W. G. Powderly (Editörler). *Infectious Diseases (Third Edition)*. London: Mosby, s. 1676-1689.

173. Pneumococcal vaccine. (2016). In J. K. Aronson (Editör). *Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition)*. Oxford: Elsevier, s. 836-840.

174. Thaysen-Andersen, M., Jørgensen, S. B., Wilhelmsen, E. S., Petersen, J. W., ve Højrup, P. (2007). Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin. *Vaccine,* 25(12), 2213-2227.

175. Hermanson, G. T. (2013). Chapter 19 - Vaccines and Immunogen Conjugates. In G. T. Hermanson (Editör). *Bioconjugate Techniques (Third Edition)*. Boston: Academic Press, s. 839-865.

176. Bull, J. J., Nuismer, S. L., ve Antia, R. (2019). Recombinant vector vaccine evolution. *PLOS Computational Biology,* 15(7), e1006857.

177. Skwarczynski, M., ve Toth, I. (2016). Peptide-based synthetic vaccines. *Chemical Science,* 7(2), 842-854.

178. Restifo, N. P., Ying, H., Hwang, L., ve Leitner, W. W. (2000). The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Theraphy,* 7(2), 89-92.

179. Robinson, H. L. (1997). Nucleic acid vaccines: an overview. *Vaccine,* 15(8), 785-787.

180. Bashiri, S., Koirala, P., Toth, I., ve Skwarczynski, M. (2020). Carbohydrate Immune Adjuvants in Subunit Vaccines. *Pharmaceutics,* 12(10).

181. Lee, S., ve Nguyen, M. T. (2015). Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Network,* 15(2), 51-57.

182. Christensen, D. (2016). Vaccine adjuvants: Why and how. *Human Vaccines & Immunotherapeutics,* 12(10), 2709-2711.

183. O'Hagan, D. T. (2006). 8 - Microparticles as vaccine delivery systems. In V. E. J. C. Schijns & D. T. O'Hagan (Editörler). *Immunopotentiators in Modern Vaccines*. London: Academic Press, s. 123-147.

184. Wang, Z. B., ve Xu, J. (2020). Better Adjuvants for Better Vaccines: Progress in Adjuvant Delivery Systems, Modifications, and Adjuvant-Antigen Codelivery. *Vaccines (Basel),* 8(1).

185. Petrovsky, N. (2015). Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs. *Drug Safety,* 38(11), 1059-1074.

186. Apostólico, J. d. S., Lunardelli, V. A. S., Coirada, F. C., Boscardin, S. B., ve Rosa, D. S. (2016). Adjuvants: Classification, and Licensing. *Journal of Immunology Research,* 2016, 1459394.

187. Shah, R. R., Hassett, K. J., ve Brito, L. A. (2017). Overview of Vaccine Adjuvants: Introduction, History, and Current Status. *Methods in Molecular Biology,* 1494, 1-13.

188. Cerofolini, L., Giuntini, S., Ravera, E., Luchinat, C., Berti, F., ve Fragai, M. (2019). Structural characterization of a protein adsorbed on aluminum hydroxide adjuvant in vaccine formulation. *NPJ Vaccines,* 4, 20.

189. Del Giudice, G., Rappuoli, R., ve Didierlaurent, A. M. (2018). Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Seminars in Immunology,* 39, 14-21.

190. HogenEsch, H., O'Hagan, D. T., ve Fox, C. B. (2018). Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. *NPJ Vaccines,* 3, 51.

191. Gupta, R. K. (1998). Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 32(3), 155-172.

192. Reed, S. G., Orr, M. T., ve Coler, R. N. (2016). Chapter 4 - Vaccine Adjuvantsa. In B. R. Bloom & P.-H. Lambert (Editörler). *The Vaccine Book (Second Edition)*. Academic Press, s. 67-76.

193. Jully, V., Mathot, F., Moniotte, N., Preat, V., ve Lemoine, D. (2016). Mechanisms of Antigen Adsorption Onto an Aluminum-Hydroxide Adjuvant Evaluated by High-Throughput Screening. *J Pharm Sci,* 105(6), 1829-1836.

194. Lindblad, E. B. (2004). Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunology & Cell Biology,* 82(5), 497-505.

195. He, P., Zou, Y., ve Hu, Z. (2015). Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Human Vaccines & Immunotherapeutics,* 11(2), 477-488.

196. İnternet: Requirements for Diphtheria, Tetanus, Pertussis and Combined Vaccines.(2003).Web:https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/dtp/en/ adresinden 8 Ağustos 2020 tarihinde alınmıştır.

197. Masson, J. D., Thibaudon, M., Belec, L., ve Crepeaux, G. (2017). Calcium phosphate: a substitute for aluminum adjuvants? *Expert Review of Vaccines,* 16(3), 289-299.

198. Goto, N., Kato, H., Maeyama, J., Shibano, M., Saito, T., Yamaguchi, J., ve Yoshihara, S. (1997). Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine,* 15(12-13), 1364-1371.

199. He, Q., Mitchell, A. R., Johnson, S. L., Wagner-Bartak, C., Morcol, T., ve Bell, S. J. (2000). Calcium phosphate nanoparticle adjuvant. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,* 7(6), 899-903.

200. Sadeghi, Z., Fasihi-Ramandi, M., ve Bouzari, S. (2020). Nanoparticle-Based Vaccines for Brucellosis: Calcium Phosphate Nanoparticles-Adsorbed Antigens Induce Cross Protective Response in Mice. *The International Journal of Nanomedicine,* 15, 3877-3886.

201. Lin, Y., Wang, X., Huang, X., Zhang, J., Xia, N., ve Zhao, Q. (2017). Calcium phosphate nanoparticles as a new generation vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines,* 16(9), 895-906.

202. Henry, R. (2012). Tetanus. *Emerging Infectious Diseases,* 18(10), 1635.

203. Yen, L. M., ve Thwaites, C. L. (2019). Tetanus. *Lancet,* 393(10181), 1657-1668.

204. Bleck, T. P. (1991). Tetanus: pathophysiology, management, and prophylaxis. *Disease-a-Month,* 37(9), 545-603.

205. Brenzel L Fau - Wolfson, L. J., Wolfson Lj Fau - Fox-Rushby, J., Fox-Rushby J Fau - Miller, M., Miller M Fau - Halsey, N. A., ve Halsey, N. A. Vaccine-preventable Diseases. BTI - Disease Control Priorities in Developing Countries.

206. İnternet: Government of Canada. (2014.). Tetanus. Web: https://www.canada.ca/en/public-health/services/immunization/vaccine-preventable-diseases/tetanus/health-professionals.html adresinden 23 Eylül 2020 'de alınmıştır.

207. Nathan, B. R., ve Bleck, T. P. (2011). CHAPTER 42 - Tetanus. In R. L. Guerrant, D. H. Walker, & P. F. Weller (Editörler). *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice (Third Edition)*. Edinburgh: W.B. Saunders, s. 284-288.

208. Kyu, H. H., Mumford, J. E., Stanaway, J. D., Barber, R. M., Hancock, J. R., Vos, T., Murray, C. J., ve Naghavi, M. (2017). Mortality from tetanus between 1990 and 2015: findings from the global burden of disease study 2015. *BMC Public Health,* 17(1), 179.

209. İnternet: T.C Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. (2018). Aşının Yararları. Web: https://asi.saglik.gov.tr/genel-bilgiler/27-asininyararlari adresinden 3 Ekim 2020 tarihinde alınmıştır.

210. Thwaites, C. L., Beeching, N. J., ve Newton, C. R. (2015). Maternal and neonatal tetanus. *Lancet,* 385(9965), 362-370.

211. Owusu-Darko, S., Diouf, K., ve Nour, N. M. (2012). Elimination of maternal and neonatal tetanus: a 21st-century challenge. *Reviews in Obstetrics and Gynecology,* 5(3-4), e151-157.

212. Cohen, J. E., Wang, R., Shen, R.-F., Wu, W. W., ve Keller, J. E. (2017). Comparative pathogenomics of Clostridium tetani. *PloS one,* 12(8), e0182909-e0182909.

213. George, E. K., De Jesus, O., ve Vivekanandan, R. (2020). Clostridium Tetani *StatPearls*. Treasure Island (FL).

214. Hodowanec, A., ve Bleck, T. P. (2015). 246 - Tetanus (Clostridium tetani). In J. E. Bennett, R. Dolin, & M. J. Blaser (Editörler). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders, s. 2757-2762.e2752.

215. Hanif, H., Anjum, A., Ali, N., Jamal, A., Imran, M., Ahmad, B., ve Ali, M. I. (2015). Isolation and Antibiogram of Clostridium tetani from Clinically Diagnosed Tetanus Patients. *The American journal of tropical medicine and hygiene,* 93(4), 752-756.

216. Burtis, D. B., ve Dobbs, M. R. (2009). CHAPTER 38 - Tetanus Toxin. In M. R. Dobbs (Editör). *Clinical Neurotoxicology*. Philadelphia: W.B. Saunders, s. 427-435.

217. Blum, F. C., Przedpelski, A., Tepp, W. H., Johnson, E. A., ve Barbieri, J. T. (2014). Entry of a recombinant, full-length, atoxic tetanus neurotoxin into Neuro-2a cells. *Infection and Immunity,* 82(2), 873-881.

218. Yousefi, M., Khosravi-Eghbal, R., Hemmati, A., ve Shokri, F. (2013). Production and characterization of recombinant light chain and carboxyterminal heavy chain fragments of tetanus toxin. *Avicenna journal of medical biotechnology,* 5(4), 220-226.

219. Brüggemann, H., Brzuszkiewicz, E., Chapeton-Montes, D., Plourde, L., Speck, D., ve Popoff, M. R. (2015). Genomics of Clostridium tetani. *Research in Microbiology,* 166(4), 326-331.

220. Chapeton-Montes, D., Plourde, L., Deneve, C., Garnier, D., Barbirato, F., Colombie, V., Demay, S., Haustant, G., Gorgette, O., Schmitt, C., Thouvenot, C., Bruggemann, H., ve Popoff, M. R. (2020). Tetanus Toxin Synthesis is Under the Control of A Complex Network of Regulatory Genes in Clostridium tetani. *Toxins (Basel),* 12(5).

221. Calvo, A. C., Olivan, S., Manzano, R., Zaragoza, P., Aguilera, J., ve Osta, R. (2012). Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. *Int J Mol Sci,* 13(6), 6883-6901.

222. Hassel, B. (2013). Tetanus: pathophysiology, treatment, and the possibility of using botulinum toxin against tetanus-induced rigidity and spasms. *Toxins (Basel),* 5(1), 73-83.

223. Roper, M. H., Wassilak, S. G. F., Scobie, H. M., Ridpath, A. D., ve Orenstein, W. A. (2018). 58 - Tetanus Toxoid. In S. A. Plotkin, W. A. Orenstein, P. A. Offit, & K. M. Edwards (Editörler). *Plotkin's Vaccines (Seventh Edition)*. Elsevier, s. 1052-1079.e1018.

224. İnternet: World Helath Organisation (2015). Neonatal Tetanus Surveillance Standards.Web:https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/WHO_SurveillanceVaccinePreventable_14_NeonatalTetanus_R1.pdf?ua=1 adresinden 1 Aralık 2020 tarihinde alınmıştır.

225. Thaysen-Andersen, M., Jorgensen, S. B., Wilhelmsen, E. S., Petersen, J. W., ve Hojrup, P. (2007). Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin. *Vaccine,* 25(12), 2213-2227.

226. World Health Organization. Expanded Programme on, I. (1977). Manual for the production and control of vaccines : tetanus toxoid. Geneva: World Health Organization.

227. Möller, J., Kraner, M. E., ve Burkovski, A. (2019). More than a Toxin: Protein Inventory of Clostridium tetani Toxoid Vaccines. *Proteomes,* 7(2), 15.

228. Demicheli, V., Barale, A., ve Rivetti, A. (2015). Vaccines for women for preventing neonatal tetanus. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (7), CD002959.

229. Njuguna, H. N., Yusuf, N., Raza, A. A., Ahmed, B., ve Tohme, R. A. (2020). Progress Toward Maternal and Neonatal Tetanus Elimination - Worldwide, 2000-2018. *The Morbidity and Mortality Weekly Report,* 69(17), 515-520.

230. İnternet:T.C Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. (2020). Aşılama takviminde değişiklik yapıldı. Web: https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/haberler/asilama-takviminde-degisiklik-yapildi adresinden 3 Ekim 2020 tarihinde alınmıştır.

231. Khan, A. A., Zahidie, A., ve Rabbani, F. (2013). Interventions to reduce neonatal mortality from neonatal tetanus in low and middle income countries--a systematic review. *BMC Public Health,* 13, 322.

232. Blencowe, H., Lawn, J., Vandelaer, J., Roper, M., ve Cousens, S. (2010). Tetanus toxoid immunization to reduce mortality from neonatal tetanus. *International Journal of Epidemiology,* 39 Suppl 1, i102-109.

233. Liang, J. L., Tiwari, T., Moro, P., Messonnier, N. E., Reingold, A., Sawyer, M., ve Clark, T. A. (2018). Prevention of Pertussis, Tetanus, and Diphtheria with Vaccines in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recommendations and Reports,* 67(2), 1-44.

234. İnternet: Sarıkaya, E. (2018). Gebelerde Aşılama. Web: https://www.tuseb.gov.tr/tacese/uploads/genel/files/yayinlar/raporlar/tacese_2018_gebelerde_asilama.pdf adresinden 28 Ekim 2020 tarihinde alınmıştır.

235. Weinberger, B. (2017). Adult vaccination against tetanus and diphtheria: the European perspective. *Clinical & Experimental Immunology,* 187(1), 93-99.

236. Kostakoglu U, Y. G. (2015). Difteri. *Turkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics,* 8(3), 1-5.

237. Chaudhary, A., ve Pandey, S. Corynebacterium Diphtheriae. BTI - StatPearls.

238. Sharma, N. C., Efstratiou, A., Mokrousov, I., Mutreja, A., Das, B., ve Ramamurthy, T. (2019). Diphtheria. *Nature Reviews Disease Primers,* 5(1), 81.

239. Miller Ma Fau - Sentz, J. T., ve Sentz, J. T. Vaccine-Preventable Diseases. BTI - Disease and Mortality in Sub-Saharan Africa.

240. Clarke, K. E. N., MacNeil, A., Hadler, S., Scott, C., Tiwari, T. S. P., ve Cherian, T. (2019). Global Epidemiology of Diphtheria, 2000-2017(1). *Emerging Infectious Disease,* 25(10), 1834-1842.

241. de Benoist, A. C., White, J. M., Efstratiou, A., Kelly, C., Mann, G., Nazareth, B., Irish, C. J., Kumar, D., ve Crowcroft, N. S. (2004). Imported cutaneous diphtheria, United Kingdom. *Emerging Infectious Disease,* 10(3), 511-513.

242. Wilson, I. E., ve Menson, E. N. (2018). Cutaneous Diphtheria. *New England Journal of Medicine,* 378(13), e17.

243. Jane, M., Vidal, M. J., Camps, N., Campins, M., Martinez, A., Balcells, J., Martin-Gomez, M. T., Bassets, G., Herrera-Leon, S., Foguet, A., Maresma, M., Follia, N., Uriona, S., ve Pumarola, T. (2018). A case of respiratory toxigenic diphtheria: contact tracing results and considerations following a 30-year disease-free interval, Catalonia, Spain, 2015. *Eurosurveillance,* 23(13).

244. Truelove, S. A., Keegan, L. T., Moss, W. J., Chaisson, L. H., Macher, E., Azman, A. S., ve Lessler, J. (2020). Clinical and Epidemiological Aspects of Diphtheria: A Systematic Review and Pooled Analysis. *Clinical Infectious Diseases,* 71(1), 89-97.

245. Kole A. K., K. D. C. (2018). Diphtheria. In D. D. Durand M. (Editör). *Infections of the Ears, Nose, Throat, and Sinuses.* . Springer, Cham, s. 231-246.

246. Murphy, J. R. Corynebacterium Diphtheriae. BTI - Medical Microbiology.

247. Titov, L., Kolodkina, V., Dronina, A., Grimont, F., Grimont, P. A., Lejay-Collin, M., de Zoysa, A., Andronescu, C., Diaconescu, A., Marin, B., ve Efstratiou, A. (2003). Genotypic and phenotypic characteristics of Corynebacterium diphtheriae strains isolated from patients in belarus during an epidemic period. *Journal of Clinical Microbiology,* 41(3), 1285-1288.

248. Tiwari, T. S. P. (2013). 37 - Diphtheria. In A. J. Magill, D. R. Hill, T. Solomon, & E. T. Ryan (Editörler). *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease (Ninth Edition)*. London: W.B. Saunders, s. 402-406.

249. Barksdale, L. (1970). Corynebacterium diphtheriae and its relatives. *Bacteriological reviews,* 34(4), 378-422.

250. Holmes, R. K. (2000). Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. *Journal of Infectious Diseases,* 181 Suppl 1, S156-167.

251. Wenzel, E. V., Bosnak, M., Tierney, R., Schubert, M., Brown, J., Dubel, S., Efstratiou, A., Sesardic, D., Stickings, P., ve Hust, M. (2020). Human antibodies neutralizing diphtheria toxin in vitro and in vivo. *Science Report,* 10(1), 571.

252. Chenal, A., Nizard, P., ve Gillet, D. (2002). Structure and Function of Diphtheria Toxin: from pathology to engineering. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews,* 21, 321 - 359.

253. Ratts, R., Zeng, H., Berg, E. A., Blue, C., McComb, M. E., Costello, C. E., vanderSpek, J. C., ve Murphy, J. R. (2003). The cytosolic entry of diphtheria toxin catalytic domain requires a host cell cytosolic translocation factor complex. *Journal of Cell Biology,* 160(7), 1139-1150.

254. Kates, O., Starr, K., ve Bourassa, L. (2020). The Brief Case: Nontoxigenic Corynebacterium diphtheriae in a Nonhealing Wound. *Journal of Clinical Microbiology,* 58(12).

255. Mitamura, T., Umata, T., Nakano, F., Shishido, Y., Toyoda, T., Itai, A., Kimura, H., ve Mekada, E. (1997). Structure-function analysis of the diphtheria toxin receptor toxin binding site by site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry,* 272(43), 27084-27090.

256. Jamal SB, T. S., Silva A, ve Azevedo V. (2017). Pathogenesis of Corynebacterium diphtheriae and available vaccines; an overview. *Global Journal of Infectious Diseases and Clinical Research,* 3(1), 20-24.

257. Sah, R., ve Neupane, S. (2019). Diphtheria. *New England Journal of Medicine,* 381(13), 1267.

258. Acosta, A. M., ve vTiwari, T. S. P. (2020). 41 - Diphtheria. In E. T. Ryan, D. R. Hill, T. Solomon, N. E. Aronson, & T. P. Endy (Editörler). *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases (Tenth Edition)*. London: Elsevier, s. 439-445.

259. Mustafa, M., Yusof, I., Ms, J., Illzam, E., Husain, S., ve Sharifa, A. (2016). Diphtheria: Clinical Manifestations, Diagnosis, and Role of ImmunizationIn Prevention. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences,* 15, 71-76.

260. Metz, B., Michiels, T., Uittenbogaard, J., Danial, M., Tilstra, W., Meiring, H. D., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. A., Kersten, G. F. A., ve Jiskoot, W. (2020). Identification of Formaldehyde-Induced Modifications in Diphtheria Toxin. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 109(1), 543-557.

261. Huygen, K. (2016). Development of human monoclonal antibodies to diphtheria toxin: A solution for the increasing lack of equine DAT for therapeutic use? *Virulence,* 7(6), 613-615.

262. Danilova, E., Jenum, P. A., Skogen, V., Pilnikov, V. F., ve Sjursen, H. (2006). Antidiphtheria antibody responses in patients and carriers of Corynebacterium diphtheriae in the Arkhangelsk region of Russia. *Clinical Vaccine Immunology,* 13(6), 627-632.

263. İnternet: World Helath Organisation (2017, 2018). Diphtheria. Web: https://www.who.int/immunization/diseases/diphtheria/en/ adresinden 25 Ağustos 2020 tarihinde alınmıştır.

264. Mattos-Guaraldi, A. L., Moreira, L. O., Damasco, P. V., ve Hirata Junior, R. (2003). Diphtheria remains a threat to health in the developing world--an overview. *The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,* 98(8), 987-993.

265. İnternet: Ertem M, E., Günel A, Soker M, Efe M. (2000). Bir Difteri Olgusunun İncelenmesi Diyarbakır/1999. Web: https://www.ttb.org.tr/STED/sted0400/04003.html adresinden 27 Eylül 2020 tarihinde alınmıştır.

266. Mahmood, T., ve Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medicine & Science,* 4(9), 429-434.

267. Najafov, A., ve Hoxhaj, G. (2017). Chapter 1 - Introduction. In A. Najafov & G. Hoxhaj (Editörler). *Western Blotting Guru*. Academic Press, s. 1-3.

268. Kurien, B. T., ve Scofield, R. H. (2015). Western blotting: an introduction. *Methods in Molecular Biology,* 1312, 17-30.

269. Towbin, H. (1998). Western Blotting. In P. J. Delves (Editör). *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*. Oxford: Elsevier, s. 2503-2507.

270. Counts, S. E. (2010). Western Blot. In K. Kompoliti & L. V. Metman (Editörler). *Encyclopedia of Movement Disorders*. Oxford: Academic Press, s. 323-326.

271. Brehm-Stecher, B. F. (2014). Flow Cytometry. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Editörler). *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, s. 943-953.

272. Roederer, M., Parks, D. R., Herzenberg, L. A., ve Herzenberg, L. A. (1998). Flow Cytometry. In P. J. Delves (Editör). *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*. Oxford: Elsevier, s. 932-943.

273. Sykes, J. E., ve Rankin, S. C. (2014). Chapter 2 - Immunoassays. In J. E. Sykes (Editör). *Canine and Feline Infectious Diseases*. Saint Louis: W.B. Saunders, s. 10-16.

274. Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides,* 72, 4-15.

275. Lin, A. V. (2015). Indirect ELISA. *Methods in Molecular Biology,* 1318, 51-59.

276. Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., ve Morimoto, S. (2018). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *The Journal of Natural Medicines,* 72(1), 32-42.

277. Kumar, P., Nagarajan, A., ve Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols,* 2018(6).

278. Gerlier, D., ve Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods,* 94(1), 57-63.

279. Elsner, R. A., Hastey, C. J., ve Baumgarth, N. (2015). CD4+ T cells promote antibody production but not sustained affinity maturation during Borrelia burgdorferi infection. *Infection and Immunity,* 83(1), 48-56.

280. Gupta, A., ve Chaphalkar, S. R. (2015). Vaccine Adjuvants: The Current Necessity of Life. *Shiraz E-Medical Journal,* 16(7), e28061.

281. Lim, S. Y., Meyer, M., Kjonaas, R. A., ve Ghosh, S. K. (2006). Phytol-based novel adjuvants in vaccine formulation: 1. assessment of safety and efficacy during stimulation of humoral and cell-mediated immune responses. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines,* 4, 6.

282. Muttaqi, S. E., Mardliyati, E., Rahmani, S., Pambudi, S., Maimunah, S., Azki, Z. I., Nurmeilis, Sulfianti, A., Efendi, J., Setyaw, D. R., Nurhasanah, A., ve Faizal, I. (2019). Intraperitoneal Acute Toxicity of Aluminum Hydroxide Nanoparticle as an Adjuvant Vaccine Candidate in Mice. *Journal of Pharmacology and Toxicology,* 15, 22-35.

283. Perry, A. L., Hayes, A. J., Cox, H. A., Alcock, F., ve Parker, A. R. (2009). Comparison of five commercial anti-tetanus toxoid immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assays. *Clinical and Vaccine Immunology,* 16(12), 1837-1839.

284. Özcengiz E, Ü. D., Çayan H.H, Ablay PA, ve Kanik E. (2007). Liyofilize Standart Difteri – Tetanoz – Boğmaca Aşıları Geliştirme Çalışmaları. *Mikrobiyoloji Bülteni,* 41, 165-173.

285. Choi, C. W., Moon, J. H., Kim, J. O., Yoo, S. H., Kim, H. G., Kim, J. H., Park, T. J., ve Kim, S. S. (2018). Evaluation of Potency on Diphtheria and Tetanus Toxoid for Adult Vaccines by In Vivo Toxin Neutralization Assay Using National Reference Standards. *The Osong Public Health and Research Perspectives,* 9(5), 278-282.

286. Dular, U. (1993). Comparative Studies of the In Vivo Toxin Neutralization and the In Vitro Vero Cell Assay Methods For Use in Potency Testing of Diphtheria Component in Combined Vaccines/Toxoids.: 1: Standardization of a Modified Vero Cell Assay For Toxin-Antoxin Titration of Immunized Guinea-pig Sera. *Biologicals,* 21(1), 53-59.

287. Yu, R., Fang, T., Liu, S., Song, X., Yu, C., Li, J., Fu, L., Hou, L., Xu, J., ve Chen, W. Comparative Immunogenicity of the Tetanus Toxoid and Recombinant Tetanus Vaccines in Mice, Rats, and Cynomolgus Monkeys. *Toxins,* 2072-6651.

288. Cha, J. H., Chang, M. Y., Richardson, J. A., ve Eidels, L. (2003). Transgenic mice expressing the diphtheria toxin receptor are sensitive to the toxin. *Molecular Microbiology,* 49(1), 235-240.

289. Hoy, C. S., ve Sesardic, D. (1994). In vitro assays for detection of diphtheria toxin. *Toxicology in Vitro,* 8(4), 693-695.

290. Chellamani Muniandi , P. L., Kavaratty Raju Mani , ve Subashkumar Rathinasamy. Standardization of process for increased production of pure and potent tetanus toxin. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases,* 3(3), 133-140.

291. Özcengiz E, Ü. D., Çayan H.H, Büyüktanır, Ö., ve Tepeler, C. (2005). Adsorbe Tetanoz Aşısı Proses Geliştirme ve Üretim Çalışmaları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi,* 4(35), 268-274.

292. Helting, T. B.,ve Zwisler, O. (1977). Structure of tetanus toxin. I. Breakdown of the toxin molecule and discrimination between polypeptide fragments. *Journal of Biogical Chemistry,* 252(1), 187-193.

293. Guilhen, F. B., Trezena, A. G., Prado, S. M., Higashi, H. G., ve Sonobe, M. H. (2014). Characterization of production processes for tetanus and diphtheria anatoxins. *Biologicals,* 42(2), 91-100.

294. Collier, R. J., ve Kandel, J. (1971). Structure and activity of diphtheria toxin. I. Thiol-dependent dissociation of a fraction of toxin into enzymically active and inactive fragments. *Journal of Biogical Chemistry,* 246(5), 1496-1503.

295. Alsarraf, H., Dedic, E., Bjerrum, M. J., Ostergaard, O., Kristensen, M. P., Petersen, J. W., ve Jorgensen, R. (2017). Biophysical comparison of diphtheria and tetanus toxins with the formaldehyde-detoxified toxoids, the main components of diphtheria and tetanus vaccines. *Virulence,* 8(8), 1880-1889.

EKLER

EK-1. Deney Hayvanları Etik Kurulu İzni

Kobay Deney Hayvanları Laboratuarı Sanayi ve Ticaret A.Ş
İ.O.S.B 21. Cd. 520. Sk. No:2/2 Yenimahalle ANKARA
Tel & Fax: 0 (312) 394 70 94
www.kobay.com.tr

KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
BAŞVURU BİLGİLERİ	Protokol Numarası	188
	Protokol Adı	Biyobenzer ve Nanobiyoteknoloji Tabanlı Tetanoz ve Difteri Konjuge Aşı Geliştirilmesi ve Monoklonal Antikor Üretilmesi
	Başvuru Tarihi	12.03.2018
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Prof.Dr. Emin Ümit Bağrıaçık
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji A.D.
	Yardımcı Araştırmacılar	Doç Dr Resul Karakuş – Uzm.Bio. Nihan Örüklü – Vet.Hek. Dr. Burcu Ekim – Öğr. Gör. Dr. Melek Yaman - Uzm.Biyol. Aslı Akın
KARAR BİLGİLERİ	Onay Numarası	188
	Onay Tarihi	05.04.2018
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı	Dişi Balb/c fare - 250 adet
	Onay Bilgileri	Proje amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde Etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.
KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ	Etik Kurul Başkanı Veteriner Hekim A. Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL	
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Hekim Salih SALAR	
	Etik Kurul Üyesi Doç.Dr M.Orhan ULUDAĞ	
	Etik Kurul Üyesi Dr Buğra Adil BUYRUKÇU	
	Etik Kurul Üyesi Dr Can KOŞAL	
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Hekim Ergun KARAGENÇ	
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Sağlık Teknikeri Ulaş SAÇINTI	
	Etik Kurul Üyesi Turgut ALTUN	
	Etik Kurul Üyesi Oğuz GÜRAY	

EK-2. Patent Başvurusu Formları

ePATS TÜRK PATENT VE MARKA KURUMU
Elektronik Başvuru Sistemi

PATENT BAŞVURUSU

Tahakkuk No	637544	**Başvuru Numarası**	2020/22403
Evrak Numarası	2020-GE-721195	**Evrak Tarihi**	2020-12-30 13:13:41
Erken Yayın Talebi	Hayır, başvurum 18 aylık süre dolduktan sonra yayımlansın.	**Başvuru ile Birlikte Araştırma/ İnceleme Talebi**	Araştırma
Tarifname Dili	Türkçe	**Genetik Kaynak**	Hayır
Tarifname Sayfa Sayısı	4	**Kaynağın / Bilginin Coğrafi Kökeni**	-
İstem Sayısı	5	**Kamu Desteği**	Hayır
Resim Sayfa Sayısı	1	**Destek Sağlayan Kamu Kurumu**	-
Patent Yarışmasına Katılmak İstiyorum	Hayır		
		Proje Numarası	-
Patent Sınıfı	A61K		
Referans No			

BULUŞ BAŞLIĞI / ÖZETİ

Buluş Başlığı	ERİŞKİN TİP TETANOZ-DİFTERİ KARMA AŞISI
Buluş Özeti	Erişkinlerde tetanos hastalığının önlenmesi ile C. tetani veya C. diphtheriae bakterilerinin ürettiği nörotoksinlere karşı bağışıklık oluşturacak etkin bir formülasyon geliştirme amacıyla geliştirilen buluş konusu aşı formülasyonları Tetanos Toksoidi, Difteri Toksoidi, Aluminyum Hidroksit ve Thiomersal içermektedir.

BAŞVURU SAHİPLERİ

Ad Soyad/Unvan	GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ		
TC Kimlik/Vergi No	8150346288	**Sahip Türü**	Tüzel
Uyruk	TÜRKİYE	**Başvuru Hak Oranı**	
Telefon	3122022023	**E-Posta**	ozgeeken@gazi.edu.tr
Adres	EMNİYET MAH.BANDIRMA CAD. REKTÖRLÜK BİNASI6 /1 YENİMAHALLE ANKARA TÜRKİYE		

BULUŞ SAHİPLERİ

Ad Soyad/Unvan	EMİN ÜMİT BAĞRIAÇIK		
TC Kimlik/Vergi No	35944149324	**Gizlilik Beyanı**	Hayır
Uyruk	TÜRKİYE	**Başvuru Hakkı Beyanı**	Hizmet İlişkisi
Telefon	5443705770	**E-Posta**	eubagriacik@yahoo.com
Adres	GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI YENİMAHALLE ANKARA TÜRKİYE		
Ad Soyad/Unvan	NİHAN ÖRÜKLÜ		
TC Kimlik/Vergi No	14857024034	**Gizlilik Beyanı**	Hayır
Uyruk	TÜRKİYE	**Başvuru Hakkı Beyanı**	Hizmet İlişkisi
Telefon	5367616431	**E-Posta**	nihanoruklu@gmail.com
Adres	GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI YENİMAHALLE ANKARA TÜRKİYE		
Ad Soyad/Unvan	MELEK YAMAN		
TC Kimlik/Vergi No	51337300912	**Gizlilik Beyanı**	Hayır
Uyruk	TÜRKİYE	**Başvuru Hakkı Beyanı**	Hizmet İlişkisi
Telefon	5579075025	**E-Posta**	yamanmelek84@hotmail.com
Adres	GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI YENİMAHALLE ANKARA TÜRKİYE		

VEKİL BİLGİSİ

Unvan	FARMAPATENT LİMİTED ŞİRKETİ.
Vergi Numarası	3850515764

FATURA DÜZENLENECEK BAŞVURU SAHİBİ

Ad Soyad/Unvan	FARMAPATENT LİMİTEDŞİRKETİ
Tc Kimlik/Vergi No	3850515764

EK-2. (devam) Patent Başvurusu Formları

DEKONT BİLGİLERİ

Dekont Numarası	33470412272-637544

ÜCRET BİLGİLERİ

Hizmet	Miktar	B.Fiyat	Tutar
Patent Başvuru Ücreti	1	TRY 50.00	TRY 50.00
Araştırma Raporu Düzenlenmesi Ücreti (Gerçek Kişiler İçin 10, Üniversiteler İçin 100 Başvuruya Kadar)	1	TRY 350.00	TRY 350.00
		GENEL TOPLAM	TRY 400.00

2020.625860 30-12-2020

* Bu evrak Türk Patent ve Marka Kurumu tarafından oluşturulmuştur.
** Evrakın doğruluğunu **https://epats.turkpatent.gov.tr/run/TP/DOGRULA/goruntule?ID=B7ACC36B34877AAEE0535A01A8C006A6** adresinden veya QR kodu okutarak kontrol edebilirsiniz.

EK-2. (devam) Patent Başvurusu Formları

ePATS TÜRK PATENT VE MARKA KURUMU
Elektronik Başvuru Sistemi

PATENT BAŞVURUSU

Tahakkuk No	636842	**Başvuru Numarası**	2020/22372
Evrak Numarası	2020-GE-720380	**Evrak Tarihi**	2020-12-30 11:03:38
Erken Yayın Talebi	Hayır, başvurum 18 aylık süre dolduktan sonra yayımlansın.	**Başvuru ile Birlikte Araştırma/ İnceleme Talebi**	Araştırma
Tarifname Dili	Türkçe	**Genetik Kaynak**	Hayır
Tarifname Sayfa Sayısı	4	**Kaynağın / Bilginin Coğrafi Kökeni**	-
İstem Sayısı	4	**Kamu Desteği**	Hayır
Resim Sayfa Sayısı	1	**Destek Sağlayan Kamu Kurumu**	-
Patent Yarışmasına Katılmak İstiyorum	Hayır		
		Proje Numarası	-
Patent Sınıfı	A61K		
Referans No			

BULUŞ BAŞLIĞI / ÖZETİ

Buluş Başlığı	ERİŞKİN TİP TETANOZ AŞISI
Buluş Özeti	Erişkinlerde tetanos hastalığının önlenmesi ve C. tetani bakterisinin ürettiği nörotoksine karşı bağışıklık oluşturacak etkin bir formülasyon geliştirme amacıyla geliştirilen buluş konusu aşı formülasyonları Tetanos Toksoidi, Aluminyum Hidroksit ve Thiomersal içermektedir.

BAŞVURU SAHİPLERİ

Ad Soyad/Unvan	GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ		
TC Kimlik/Vergi No	8150346288	**Sahip Türü**	Tüzel
Uyruk	TÜRKİYE	**Başvuru Hak Oranı**	
Telefon	3122022023	**E-Posta**	ozgeeken@gazi.edu.tr
Adres	EMNİYET MAH.BANDIRMA CAD. REKTÖRLÜK BİNASI6 /1 YENİMAHALLE ANKARA TÜRKİYE		

BULUŞ SAHİPLERİ

Ad Soyad/Unvan	EMİN ÜMİT BAĞRIAÇIK		
TC Kimlik/Vergi No	35944149324	**Gizlilik Beyanı**	Hayır
Uyruk	TÜRKİYE	**Başvuru Hakkı Beyanı**	Hizmet İlişkisi
Telefon	5443705770	**E-Posta**	eubagriacik@yahoo.com
Adres	GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI YENİMAHALLE ANKARA TÜRKİYE		
Ad Soyad/Unvan	NİHAN ÖRÜKLÜ		
TC Kimlik/Vergi No	14857024034	**Gizlilik Beyanı**	Hayır
Uyruk	TÜRKİYE	**Başvuru Hakkı Beyanı**	Hizmet İlişkisi
Telefon	5367616431	**E-Posta**	nihanoruklu@gmail.com
Adres	GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI YENİMAHALLE ANKARA TÜRKİYE		
Ad Soyad/Unvan	MELEK YAMAN		
TC Kimlik/Vergi No	51337300912	**Gizlilik Beyanı**	Hayır
Uyruk	TÜRKİYE	**Başvuru Hakkı Beyanı**	Hizmet İlişkisi
Telefon	5579075025	**E-Posta**	yamanmelek84@hotmail.com
Adres	GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI YENİMAHALLE ANKARA TÜRKİYE		

VEKİL BİLGİSİ

Unvan	FARMAPATENT LİMİTED ŞİRKETİ.
Vergi Numarası	3850515764

FATURA DÜZENLENECEK BAŞVURU SAHİBİ

Ad Soyad/Unvan	FARMAPATENT LİMİTEDŞİRKETİ
Tc Kimlik/Vergi No	3850515764

EK-2. (devam) Patent Başvurusu Formları

DEKONT BİLGİLERİ

Dekont Numarası	33470412464-636842

ÜCRET BİLGİLERİ

Hizmet	Miktar	B.Fiyat	Tutar
Patent Başvuru Ücreti	1	TRY 50.00	TRY 50.00
Araştırma Raporu Düzenlenmesi Ücreti (Gerçek Kişiler İçin 10, Üniversiteler İçin 100 Başvuruya Kadar)	1	TRY 350.00	TRY 350.00
		GENEL TOPLAM	TRY 400.00

2020.625042 30-12-2020

* Bu evrak Türk Patent ve Marka Kurumu tarafından oluşturulmuştur.
** Evrakın doğruluğunu **https://epats.turkpatent.gov.tr/run/TP/DOGRULA/goruntule?ID=B7AAF22D88CA7D56E0535A01A8C017D7** adresinden veya QR kodu okutarak kontrol edebilirsiniz.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:



Adı Soyadı	: Nihan ÖRÜKLÜ
Uyruğu	: T.C
Doğum Tarihi ve Yeri	: 17.11.1984 Denizli
Medeni Hali	: Bekar
Tel	: 0536 761 64 31
E-mail	: nihanoruklu@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek lisans	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	2010
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi İngilizce Biyoloji Bölümü	2007
Lise		

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2019-Halen	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı	Öğretim Görevlisi
2013-2019	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Araştırma Laboratuvarı	Araştırma Asistanı
Mart 2012-Ekim 2012	Salubris A.Ş	Ar-Ge Personeli
2007-2011	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Hacettepe Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarları	Gönüllü Araştırma Asistanı
Mart-Nisan 2007	Nobelfarma İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.	Mikrobiyoloji Laboratuvarı Stajyeri

Yayınlar

Uluslararası SCI/SCIE indeksleri tarafından taranan hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

1. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome in Children with Nonmalignant Organomegaly, Chronic Immune Cytopenia and Newly Diagnosed Lymphoma. Kaya Z, Isik M, Oruklu N, Kirkiz S, Bagriacik EU, Allende LM, Díaz-Madroñero MJ, Ruiz-García R, Pinarli FG, Göçün Uyar P, Kocak U. *Turkish Journal of Hematology.* 2020 Dec 30. doi: 10.4274/tjh.galenos.2020.2020.0618.

2. Design and synthesis of some new carboxamide and propanamide derivatives bearing phenylpyridazine as a core ring and the investigation of their inhibitory potential on in-vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Kilic B, Gulcan HO, Aksakal F, Ercetin T, Oruklu N, Umit Bagriacik E, Dogruer DS. *Bioorganic Chemistry.* 2018 Sep;79:235-249.

3. Evaluation of serum procollagen C-proteinase enhancer 1 level as a fibrosis marker in patients with chronic hepatitis B. Gokce O, Ozenirler S, Atak Yucel A, Oruklu N, Yilmaz Esendagli G, Karahan S. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology.* 2018 Aug;30(8):918-924.

4. Design, Synthesis and Investigation of New Diphenyl Substituted Pyridazinone Derivatives as Both Cholinesterase and Aβ-Aggregation Inhibitors. Kilic B, Erdogan M, Gulcan HO, Aksakal F, Oruklu N, Bagriacik EU, Dogruer DS. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2018 May 23.

5. The Effects of Local and Systemic Growth Hormone Treatment on Germ Cell Population and Fertility in an Experimental Unilateral Testicular Torsion and Orchiectomy Model. Ates U, Gollu G, Bingol-Kologlu M, Billur D, Kucuk G, Oruklu N, Bagrıacik U, Hasırcı N, Dindar H. *Journal of Urology*. 2015 Dec;194(6):1816-22.

Kitap Bölümü

1. İntestinal Homeostaz: Mikrobiyota ve İmmün Sistem Etkileşimleri. Bağrıaçık EÜ, Örüklü N. Karakuş R, editör. Mikrobiyota İmmünolojisi. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2018. p.70-5.

2. COVID-19 ve T lenfosit cevapları. Bağrıaçık EÜ, Yaman M, Örüklü N. Atak Yücel A, editör. İmmünoloji ve COVID-19. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020. p.9-14.

3. COVID-19 ve B lenfosit cevabı. Yaman M, Örüklü N, Bağrıaçık EÜ. Atak Yücel A, editör. İmmünoloji ve COVID-19. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020. p.22-7.

Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:

1. Örüklü N, SENER B. Kistik Fibrozis (KF) Olgularından Izole Edilen Pseudomonas Aeruginosa Suslarındahipermutasyon: Kronik Enfeksiyon Ve Antibiyotik Direnci Ile Iliski, Poster Sunumu, 10.antimikrobik Kemoterapi Günleri, 20 Nisan 2012.

2. Tan G, Yaman M, Örüklü N, Sağlam N, Bağrıaçık EU. In vitro cytotoxicity of gold ions and gold nanoparticles on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Journal of Biotechnology 208 (2015) S5–S120

3. Tan G, Sağlam N, Yaman M, Örüklü N, Bağrıaçık EU. Toxic effects of gold nanoparticles and gold ions in human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. Journal of Biotechnology 208 (2015) S5–S120.

4. Bağrıacık EU, Bağrıaçık Y, Örüklü N, Yaman M. Development and characterization of monoclonal antibodies specific for human leptin. Journal of Biotechnology 208 (2015) S5–S120.

5. Bağrıacık EU, Örüklü N, Yaman M, Bağrıaçık Y. Development of a quantitative immunoassay for measuring surface antigen of hepatitis B virus in human serum and plasma by using two new monoclonal antibodies. Journal of Biotechnology 208 (2015) S5–S120.

6. Aluminum hydroxide and calcium phosphate adjuvants in adsorbed tetanus and diphtheria vaccines: Immunologic vs histopathologic effects. Emin Umit Bagriacik, Nihan Oruklu, Melek Yaman and Resul Karakus. J Immunol May 1, 2020, 204 (1 Supplement) 166.28.

7. Neoantigens derived from differential mutations of invasive ductal carcinomas with axillary lymph node metastasis. Emin Umit Bagriacik, Ilker Ermis, Ozgur Ekinci, Cansu Girgin, Nihan Oruklu and Orhan Bayram J Immunol May 1, 2020, 204 (1 Supplement) 242.52.

Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Sözlü Bildiriler

1. Bayram M, Ozek A, Yaman M, Örüklü N, Bagriacik EU. TSHR Expression on Mesenchymal Stem Cells Isolated from Umblical Cord of a Baby Born with Congenital Hypothyroidism. TMFM-P Perinatal Medicine 2015, İstanbul, Turkey.

2. Bağrıacık EU, Yaman M, Örüklü N. Development and characterization of monoclonal antibodies specific for vascular endothelial growth factor. European Biotechnology Congress May 2017.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

