

**T.C.**  
**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**  
**MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİBRİDOMA TEKNİĞİ KULLANILARAK**  
**KARSİNOEMBRYONİK ANTİJEN' E**  
**ÖZGÜL MONOKLONAL ANTİKOR**  
**ÜRETİM ÇALIŞMALARI**

**Emine DEREBAY**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GEBZE**  
**2005**

T.C.  
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ  
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİBRİDOMA TEKNİĞİ KULLANILARAK  
KARSİNOEMBRYONİK ANTİJEN' E  
ÖZGÜL MONOKLONAL ANTİKOR  
ÜRETİM ÇALIŞMALARI

Emine DEREBAY  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. İ. Yavuz SEZEN

GEBZE  
2005

## ÖZET

Karsinoembriyonik antijen (CEA) kolorektal kanserlerde yaygın olarak kullanılan bir tümör belirleyicisidir. Bununla birlikte meme, akciğer, mide, pankreas, mesane, tiroid, karaciğer kanserlerinde ve bazı benign hastalıklarda serum CEA değerleri artış gösterebilir. Günümüzde anti-CEA monoklonal antikorlar, tek ya da diğer tümör belirleyicileri ile birlikte kolorektal kanserlerin tanısında oldukça etkili bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, CEA ile immünize edilen BALB/c farelerin serumlarındaki antikor seviyeleri belirli zaman aralıklarında tespit edildi. En yüksek antikor aktivitesi veren fare füzyon işlemi için kullanıldı. Füzyon sonrası spesifik antikor üreten hibrit hücreler dolaylı ELISA yöntemi ile belirlendi. Pozitif reaksiyon veren klonlara sınırlı seyreltme işlemi uygulanarak alt klonlama yapıldı.

Elde edilen monoklonal antikorların özgünlüğü farklı proteinler kullanılarak yapılan çapraz ELISA aktivite testi ile belirlendi. Karsinoembriyonik antijene karşı yüksek özgünlükte anti-CEA monoklonal antikor üreten 6B<sub>7</sub>, 8B<sub>6</sub> ve 8E<sub>1</sub> hibrit hücreler elde edildi. Bu hibrit hücrelerin immunoglobülin tiplerinin IgM olduğu saptandı. *In vitro* olarak serumlu ve serumsuz besiyerinde geniş ölçekte üretilen hibrit hücrelerin üst sıvılarına amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve distile suya karşı diyaliz edilerek saflaştırıldı.

## SUMMARY

Carcinoembryonic antigen (CEA) is a widely used tumor marker for colorectal cancers. As in colorectal cancers, serum CEA levels may also be elevated in carcinoma of the breast, lung, stomach, pancreas, bladder, thyroid, liver and some benign diseases. Currently, anti-CEA monoclonal antibodies, alone or in combination with other tumor markers, are effectively being used in the diagnosis of colorectal cancers.

In this study, antibody levels in the sera of BALB/c mice immunized with CEA were detected at certain time intervals. The mouse giving the highest antibody activity was used for the fusion process. After the fusion, hybrid cells producing specific antibodies were determined by indirect ELISA. The clones showing positive reactions were subcloned by using limiting dilution procedure.

The monospecificity of the monoclonal antibodies obtained by this means was determined by performing cross ELISA activity test using different proteins. Hybrids cells (6B<sub>7</sub>, 8B<sub>6</sub> and 8E<sub>1</sub>) producing high specific monoclonal antibody against CEA were obtained. It was then determined that immunoglobulin isotypes of these hybrids cells were IgM. Supernatants of hybrid cells produced *in vitro* in large quantities in medium with or without serum were precipitated with ammonium sulfate and purified by dialysing against distilled water.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli bilgi birikiminden yararlandığım ve bana her konuda imkan sağlayan danışman hocam GYTE Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. İ.Yavuz SEZEN'e,

Tez konumun belirlenmesinde ve tüm deney aşamalarında tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Tuba YILDIRIM'a

Çalışmanın araştırma ve deney bölümünün yürütülmesindeki yardımlarından dolayı Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT'a,

Deney hayvanlarının sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen Transgen Laboratuvar Uzman Araştırmacıları Doç. Dr. Haydar BAĞIŞ, Doç. Dr. Sezen ARAT ve Transgen Laboratuvar Teknisyeni Şakir SEKMEN'e,

Deney hayvanlarının her türlü bakım ve ihtiyaçlarını büyük bir özveriyle karşılayan Veteriner Hekim İbrahim BİRGÜL ve Ahmet KIY'a,

Çalışmalarım süresince bana hertürlü desteği veren Sezgin YILDIZ, Arzu TAŞ, Tolga AKKOÇ ve tüm arkadaşlarıma,

Öğrenimim süresince bana gösterdikleri özveri, destek ve tüm yardımlarından dolayı aileme teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

|                                                                   | <b><u>Sayfa</u></b> |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------|
| ÖZET                                                              | iv                  |
| SUMMARY                                                           | v                   |
| TEŞEKKÜR                                                          | vi                  |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ                                                | vii                 |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ                                    | x                   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                                   | xi                  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ                                                 | xiii                |
| TABLOLAR DİZİNİ                                                   | xiv                 |
| 1. GİRİŞ                                                          | 1                   |
| 2. GENEL BİLGİLER VE KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR                   | 3                   |
| 2.1. Tümör Belirleyicileri                                        | 3                   |
| 2.1.1. Karsinoembriyonik Antijen (Carcinoembryonic Antigen = CEA) | 6                   |
| 2.1.1.1. Biyolojik Özellikleri                                    | 7                   |
| 2.1.1.2. İmmünolojik Özellikleri                                  | 8                   |
| 2.1.1.3. Tayin Yöntemleri                                         | 9                   |
| 2.1.1.4. Fizyolojisi                                              | 9                   |
| 2.1.1.5. Patolojisi                                               | 10                  |
| 2.1.1.6. CEA'nın Klinikteki Önemi                                 | 12                  |
| 2.1.2. AFP (Alfa-fetoprotein)                                     | 14                  |
| 2.1.3. PSA (Prostat Spesifik Antijen)                             | 15                  |
| 2.1.4. CA 15-3                                                    | 15                  |
| 2.1.5. CA 19-9                                                    | 15                  |
| 2.1.6. CA 27-29                                                   | 16                  |
| 2.1.7. CA 125                                                     | 16                  |
| 2.1.8. CA 72-4                                                    | 16                  |
| 2.1.9. Enzimler                                                   | 17                  |
| 2.1.10. Hormonlar                                                 | 18                  |
| 2.2. Tümör Belirleyicilerinin Kullanım Alanları                   | 19                  |
| 2.3. Monoklonal Antikorlar ve Hibridoma Teknolojisi               | 20                  |
| 2.3.1. Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları                  | 23                  |
| 2.4. Hibridoma Teknolojisi ile Monoklonal Antikorların Üretilmesi | 26                  |

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.1. İmmünizasyon Protokolü                                     | 28 |
| 2.4.1.1. Antijen Saflığı                                          | 28 |
| 2.4.1.2. Hayvan Seçimi                                            | 29 |
| 2.4.1.3. İmmünizasyon                                             | 30 |
| 2.4.2. Füzyon Protokolü                                           | 32 |
| 2.4.2.1. Miyeloma Hücrelerinin Seçimi                             | 32 |
| 2.4.2.2. Besleyici Hücreler                                       | 33 |
| 2.4.2.3. Füzyon                                                   | 33 |
| 2.4.2.4. Hücre Seçimi                                             | 34 |
| 2.4.3. Klonlama                                                   | 36 |
| 2.4.4. Monoklonal Antikorlarının Depolanması                      | 36 |
| 2.4.5. Hibridoma Üretiminde Karşılaşılan Güçlükler                | 37 |
| 2.5. ELISA Yöntemi (Enzime bağlı immünolojik tanı yöntemi)        | 37 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM                                             | 42 |
| 3.1. MATERYAL                                                     | 42 |
| 3.1.1. Cihazlar                                                   | 42 |
| 3.1.2. Steril Malzemeler                                          | 42 |
| 3.1.3. Kimyasal Maddeler                                          | 43 |
| 3.1.4. Antijenler                                                 | 44 |
| 3.1.5. Hücreler                                                   | 44 |
| 3.1.6. Besiyerleri                                                | 45 |
| 3.1.7. Tamponlar                                                  | 45 |
| 3.2. YÖNTEM                                                       | 46 |
| 3.2.1. Farenin CEA (Karsinoembriyonik Antijen) ile Bağışıklanması | 46 |
| 3.2.2. İmmün Yanıtın ELISA ile Belirlenmesi                       | 46 |
| 3.2.3. Füzyon İşlemi                                              | 47 |
| 3.2.3.1. Besleyici Hücrelerin Elde Edilmesi                       | 47 |
| 3.2.3.2. Fare Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi                    | 47 |
| 3.2.3.3. Miyeloma Hücrelerinin Pasajlanması                       | 48 |
| 3.2.3.4. Hücrelerin Sayılması                                     | 48 |
| 3.2.3.5. Polietilen Glikol ile Hücrelerin Birleştirilmesi         | 49 |
| 3.2.3.6. Hibrit Hücrelerin Seçilmesi                              | 49 |
| 3.2.3.7. Klonlama İşlemi                                          | 49 |

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.3.8. Çapraz ELISA ile Aktivite Tayini                                                            | 50 |
| 3.2.3.9. Hibrit Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması                                                | 50 |
| 3.2.4. Anti-CEA Monoklonal Antikorlarının Saflaştırılması                                            | 50 |
| 3.2.4.1. Anti-CEA Monoklonal Antikorlarının Serumlu ve Serumsuz Besiyerinde Geniş Ölçekte Üretilmesi | 50 |
| 3.2.4.2. Amonyum Sülfat Çöktürme İşlemi                                                              | 51 |
| 3.2.4.3. Anti-CEA Monoklonal Antikorların Distile Suyu Karşı Diyalizi                                | 51 |
| 4. BULGULAR                                                                                          | 52 |
| 4.1. CEA ile İmmünizasyon Sonrası IgM ve IgG Yanıtları                                               | 52 |
| 4.2. Füzyon Denemelerinden Elde Edilen Sonuçlar                                                      | 57 |
| 4.3. Çapraz ELISA Aktivite Sonuçları                                                                 | 58 |
| 4.4. Distile Su Karşı Diyaliz İşlemi ile Saflaştırma                                                 | 60 |
| 4.4.1. Serumsuz Besiyerinde Üretilen Monoklonal Antikorların Distile Su Karşı Diyalizi               | 60 |
| 4.4.2. % 10 Serumlu Besiyerinde Üretilen Monoklonal Antikorların Distile Su Karşı Diyalizi           | 60 |
| 5. TARTIŞMA                                                                                          | 61 |
| KAYNAKLAR                                                                                            | 68 |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                             | 79 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                 |                                                          |
|-----------------|----------------------------------------------------------|
| AFP             | : Alfa-fetoprotein                                       |
| AP              | : Alkalen fosfataz                                       |
| ASCO            | : Amerikan Klinik Onkoloji Birliği                       |
| BPH             | : Benign prostat hiperplazisi                            |
| BSA             | : Sığır serum albümini                                   |
| BTA             | : Mesane tümör antijeni                                  |
| CA 15-3         | : Kanser antijeni 15-3                                   |
| CA 19-9         | : Kanser antijeni 19-9                                   |
| CA 27-29        | : Kanser antijeni 27-29                                  |
| CA 72-4         | : Kanser antijeni 72-4                                   |
| CA 125          | : Kanser antijeni 125                                    |
| CD              | : Farklılaşma bölgesi                                    |
| CDR             | : Komplementerliği belirleyen bölgeler                   |
| CEA             | : Karsinoembriyonik antijen                              |
| CRC             | : Kolorektal kanser                                      |
| CT              | : Bilgisayarlı tomografi                                 |
| DMSO            | : Dimetil sülfoksit                                      |
| ELISA           | : Enzim bağımlı immün tanı yöntemi                       |
| F <sub>ab</sub> | : Antijen bağlayan bölge                                 |
| F <sub>c</sub>  | : Antikoru sabit bölgesi                                 |
| FBS             | : Fetal sığır serumu                                     |
| FCA             | : Freund'un tam adjuvanı                                 |
| FIA             | : Freund'un tam olmayan adjuvanı                         |
| GPI             | : Glikozilfosfatidil inositol                            |
| H               | : Ağır zincir                                            |
| HAMA            | : İnsan anti-fare antikor                                |
| HAT             | : Hipoksantin/aminopterin/timidin                        |
| HCC             | : Hepatoselüler karsinoma                                |
| hCG             | : İnsan koryonik gonadotropin                            |
| HEPES           | : N-2-hidroksietilpiperazin N'-2-aminoetan sülfonik asit |

|          |                                                         |
|----------|---------------------------------------------------------|
| HGPRT    | : Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz            |
| HRP      | : Horseradish peroksidaz                                |
| HT       | : Hipoksantin/timidin                                   |
| Ig       | : İmmünoglobülin                                        |
| kDa      | : Kilodalton                                            |
| L        | : Hafif zincir                                          |
| LDH      | : Laktat dehidrogenaz                                   |
| mAb      | : Monoklonal antikor                                    |
| NSE      | : Nöron spesifik enolaz                                 |
| PAP      | : Prostatik asit fosfataz                               |
| PBS      | : Fosfat tuzu tamponu                                   |
| PCR      | : Polimeraz zincir reaksiyonu                           |
| PEG      | : Polietilen glikol                                     |
| PNPP     | : 4-paranitrofenilfosfat                                |
| PSA      | : Prostat spesifik antijen                              |
| RIA      | : Radyoaktifimmün deney                                 |
| RIGS     | : Radyoimmünokaynaklı operasyon                         |
| RIL      | : Radyoimmünolokalizasyon                               |
| SDS-PAGE | : Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi |
| TAA      | : Tümör ilişkili antijen                                |
| TK       | : Timidin kinaz                                         |
| TMUGS    | : Tümör belirleyici kullanım derecelendirme sistemi     |
| TPA      | : Doku polipeptid antijeni                              |
| VIP      | : Vazoaktif inhibitör polipeptid                        |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <b><u>Sekil</u></b>                                                                                                  | <b><u>Sayfa</u></b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2.1. Karsinoembriyonik antijenin molekül yapısı                                                                      | 8                   |
| 2.2. Monoklonal antikor üretimi                                                                                      | 28                  |
| 2.3. HAT kültür ortamında bulunan aminopterin ile de-novo yolunun<br>inhibe edilmesi ve salvage yolunun kullanılması | 35                  |
| 2.4. Dolaylı ELISA yöntemi                                                                                           | 39                  |
| 2.5. Sandviç ELISA yöntemi                                                                                           | 40                  |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

| <b><u>Cizelge</u></b>                                                            | <b><u>Sayfa</u></b> |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 4.1. CEA'ya karşı BALB/c fare serumlarında oluşan IgM yanıtı                     | 53                  |
| 4.2. CEA'ya karşı BALB/c fare serumlarında oluşan IgG yanıtı                     | 53                  |
| 4.3. CEA'ya karşı BALB/c fare serumlarındaki IgM yanıtı                          | 54                  |
| 4.4. CEA'ya karşı BALB/c fare serumlarındaki IgG yanıtı                          | 54                  |
| 4.5. BALB/c fare serumlarında BSA'ya karşı gelişen IgM yanıtı                    | 55                  |
| 4.6. BALB/c fare serumlarında BSA'ya karşı gelişen IgG yanıtı                    | 55                  |
| 4.7. CEA ile bağışıklanmış fare serumlarında süt tozuna karşı gelişen IgM yanıtı | 56                  |
| 4.8. CEA ile bağışıklanmış fare serumlarında süt tozuna karşı gelişen IgG yanıtı | 56                  |
| 4.9. Monoklonal antikorların tipleri                                             | 59                  |

## TABLÖLAR DİZİNİ

| <b><u>Tablo</u></b>                                                    | <b><u>Sayfa</u></b> |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2.1. Kolon dışı malign kanserlerde CEA yükseklik frekansı              | 11                  |
| 3.1. Füzyon işleminde kullanılan hücreler                              | 44                  |
| 4.1. Üç farklı füzyon çalışması ile elde edilen sonuçlar               | 57                  |
| 4.2. Yedi farklı proteine karşı elde edilen çapraz reaksiyon sonuçları | 58                  |

# 1. GİRİŞ

Günümüzde kanser ölüme neden olan en önemli hastalıklardan birisidir ve son kırk yıl içinde melanom, çoklu melanom, non-Hodgkin lenfoma, akciğer, prostat ve meme kanserleri gibi kanser türlerinde artış görülmüştür. Her yıl yaklaşık bir milyon yeni kanser vakası ortaya çıkmaktadır. Tümör belirleyicileri (tümör markırları) ile ilgili araştırmalar, kanserin erken tanı ve taramasında, tedavinin değerlendirilmesinde ve hastalığın tekrar oluşumunun takibinde bu markırların kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır (Way B.A., Kessler G., 1996).

Tümör belirleyicileri kanda veya vücut sıvılarında, tümör hücreleri tarafından üretilen veya tümörle ilişkili olarak ortaya çıkan maddeler olarak tanımlanır. Kandaki ya da salgılardaki ölçümlere dayalı olarak, tümör belirleyicileri neoplastik dokunun normal dokudan ayırtilmesinde kullanılabilirler. Bu markırlar hücre, doku, beyin-omurilik sıvısı, serum, plazma ve süt gibi vücut sıvılarında bulunurlar. İdeal bir tümör belirleyici, kanserin tanısında, derecelendirilmesinde ve prognozunda, tedavi etkilerinin izlenmesinde, hastalığın tekrar oluşumunun takibinde, tümörlerin lokalizasyonunda ve genel popülasyonlarda kanser taramasında etkin bir şekilde kullanılabilmelidir. Fakat tümör belirleyicilerinin çoğu ideal tümör markır özelliklerini taşımaz. Tümörle ilişkili antijenler, enzimler, izoenzimler, hormonlar, spesifik proteinler, karbohidrat epitoplara, onkogenler ve onkogen ürünleri tümör belirleyicileri olarak kullanılabilir (Karlıkaya C. et al., 2003).

Karsinoembriyonik antijen (CEA), %45-55 oranında karbohidrat içeren, 180 kDa ağırlığında, sedimentasyon oranı 7-8 S olan bir glikoproteindir. CEA molekülü, N-terminal ucunda lizin bulunan 641 aminoasitli bir ana protein zinciri ile yan karbohidrat zincirlerinden meydana gelmektedir. Karbohidrat miktarı, özellikle tümör orijinine bağlı olarak değişmektedir. CEA, embriyonik yaşam süresince kolon epitel hücrelerinde önemli miktarlarda sentezlenen tümör ilişkili bir antijendir. Serum CEA seviyeleri normal yetişkin bireyin kolon dokusunda oldukça düşüktür (2.5-5 ng/ml). CEA kolorektal kanser için en yaygın kullanılan tümör belirleyicidir. Meme, akciğer, mide, pankreas, mesane, tiroit, karaciğer, yumurtalık, serviks

kanserlerinde de yüksek CEA seviyelerine rastlanabilir. Siroz, yangılı bağırsak hastalığı, kronik akciğer hastalığı ve pankreatit gibi hastalıklarda serum CEA düzeyi artış gösterebilir. Günümüzde serumdaki CEA miktarları, kolorektal kanserli hastaların klinik açıdan değerlendirilmesinde ve etkili bir tedavi sonrasında hastalığın izlenmesinde, kemoterapi veya radyoterapi uygulanan meme, akciğer ve beyin zarı kanseri hastalarda operasyon sonrası kanser gelişiminin belirlenmesinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Crawford N.P.S. et al., 2003). CEA'ya yönelik monoklonal antikolar, tek olarak ya da diğer tümör belirleyicileri ile birlikte kolorektal adenokarsinom tanısında oldukça etkili bir şekilde kullanılmıştır (Alvarez J.A. et al.,1995).

Bu tez çalışmasında hibridoma tekniği kullanılarak, kolorektal kanserin tümör belirleyicisi olarak tanımlanan ve ilk onkofetal antiijenlerden biri olan karsinoembriyonik antijene karşı monoklonal antikor üretimi amaçlanmıştır. Çalışmadan elde edilen monoklonal antikoların kolorektal kanserli hastalarda diğer hastalık bulgularıyla birlikte değerlendirilerek kullanılmak üzere kanserli dokuların tanısına, tedavinin izlenmesine, tümörlü bölgelerin belirlenmesine ya da ilgili tanı kitlerinin oluşturulmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER VE KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Tümör Belirleyicileri

Kanda çözünür moleküller halinde bulunan tümör belirleyicileri, monoklonal antikorlar tarafından tespit edilebilen çoğunlukla glikoprotein yapısındaki antijenlerdir (Perkins G.L. et al., 2003).

İlk bilinen tümör belirleyici 1846 yılında Henry Bence-Jones tarafından bulunan, multiple miyelomalı hasta idrarında 50°C’de çöken ve kaynatılınca kaybolan Bence-Jones monoklonal immünoglobülinin hafif zinciridir ve halen tümör belirleyici olarak kullanılmaktadır (Diamandis E.P., 2002).

1996 yılında yapılan Amerikan Klinik Onkoloji Birliği (ASCO) toplantısında tümör belirleyici çalışmaları için Tumor Marker Utility Grading System (TMUGS) adı altında bir çerçeve çizilmiştir. Buna göre tümör belirleyicileri belirli kategorilere ayrılmıştır:

**1. Tanıda kullanılan tümör belirleyicileri:** Bu tümör belirleyicileri malign (kötü huylu) hastalığa ve ilgili dokuya özgü olmalıdır. Bu tip belirleyicilerin benign (iyi huylu) hastalıklarda ve başka organlarda belirlenmesi mümkün olmamalıdır. Ayrıca duyarlılığı ve spesifitesi yüksek olmalıdır. Bu özelliğe sahip olan tümör belirleyici, tanıda ve tedavinin seçiminde büyük önem taşımaktadır.

Tanıda kullanılan tümör belirleyicilerinin alt grubu olarak kabul edilen belirleyiciler, taramada kullanılan tümör belirleyicileridir ve populasyon içinde kanserli bireylerin belirlenmesinde yararlanılırlar. Bu tip belirleyicilerin de duyarlılığının ve spesifitesinin yüksek olması gerekmektedir.

**2. Prognostik belirleyiciler:** Bu gruptaki belirleyiciler hastalığın gelişimi ve hastanın geleceği açısından bilgi veren belirleyicilerdir. Genellikle ilk tedavi süresince kullanılırlar ve hastanın sonraki tedavi başarısını gösterirler. Bu markırlar hasta sistemik tedavi almadan önce test edilmeli ve tedavi boyunca yinelenmelidir.

**3. Prediktif (ön tanıda kullanılan) belirleyiciler:** Hastanın tedaviye verdiği cevabı veya direnci gösteren belirleyicilerdir. Prognostik belirleyiciler hastalığın ilerlemesini veya tekrarını belirleyebilirler. Bu sebeple, birçok belirleyici hem prognostik, hem de prediktif belirleyici olarak kullanılabilir. Yapılacak olan diğer çalışmalarla, yeni ve güçlü prediktif belirleyicilerin bulunması halinde tedavi teknikleri gelişecek ve tedavi seçimi kolaylaşacaktır.

**4. Tedavinin izlenmesinde kullanılan belirleyiciler:** Bu belirleyiciler klinik uygulamalarda yararlı olan belirleyicilerdir. Bunlar tedavi esnasında kullanılan, tedavi etkinliğini ve tedaviye cevabı gösteren belirleyicilerdir. Tedavi esnasında yükselen tümör belirleyici düzeyleri ilk tedavi tipinin değiştirilmesi gerektiğini gösterir (Chan D.W. et al., 2002).

Tümör belirleyicilerinin çoğu neoplastik hücrelerden (tümör hücrelerinden) türevlenirken, tümör oluşumuna ya da yayılımına yanıt olarak organizma tarafından da üretilirler. Tümör belirleyicileri farklı derecelerde tümör spesifitesi gösterirler. Spesifik bir doku tipine özgü, seçici özellikte alfa-fetoprotein (AFP), tiroglobülin ve prostat-spesifik antijen gibi tümör belirleyicileri vardır. Bu markırlar doğru teşhisin konulmasında önemli rol oynarlar. Müsin, sitokeratin ve karsinoembriyonik antijen gibi diğer tümör belirleyicileri ise çeşitli doku tipleri ve ilgili neoplazmalar ile ilişkilidirler. Bu markırların düşük seçicilik özellikleri, klinik uygulamalarda her zaman göz önünde bulundurulmalıdır. Birçok tümör belirleyicinin normal ve yangılı hastalıklarda da oluştuğu gözlenir (Seregini E. et al., 2001).

Tümör belirleyicilerinin serumdaki miktarları diğer testlerle birlikte değerlendirildiği zaman bazı kanser türlerinin belirlenmesinde ve tanısında etkili olabilir. Tümör markır seviyeleri tek başına kanser tanısında yeterli değildir:

- İyi huylu tümörlerin varlığında tümör markır seviyeleri artabilir.
- Her kanserli hastada özellikle hastalığın erken safhalarında tümör markır seviyelerinin yüksek olmadığı görülür.
- Birçok tümör belirleyici özel bir kanser türü için spesifik değildir; bir tümör belirleyicinin kandaki miktarı birden fazla kanser türünde artış gösterebilir ([http://cis.nci.nih.gov/fact/5\\_18.htm](http://cis.nci.nih.gov/fact/5_18.htm)).

İdeal bir tümör belirleyici sadece belirli bir kanser türü için spesifik ve kanserin derecesini gösterecek kadar duyarlı olmalıdır. Tümör markır testinde gereken örneklerin kolayca elde edilmesi gerekir ve bunun için serolojik örnek tercih edilir. Tümör markır testinin uygulanması kolay, hızlı, güvenilir ve hastalığın evresi ile tedaviye alınan yanıtın arasında uygunluk sağlamalıdır (Crawford N.P.S. et al., 2003). Günümüzde prostat-spesifik antijen (PSA) dışında tümör belirleyicileri, tümör hücrelerinin tanımlanmasında yeterli duyarlılığa ve spesifiteye sahip değildir. Fakat tümör belirleyicileri normal hastalarla kanserli hastaların ayırtedilmesinde, tümör hücrelerinin tanımlanmasında ve kanser takibinde veya kanser tedavisine alınan yanıtın izlenmesinde etkin bir rol oynarlar. Hastalığın tekrarlanması bakımından hastaların takibinde, sadece etkili bir tedavi yönteminin uygulanacağı durumlarda kandaki tümör markır seviyeleri belirlenmelidir (Seregni E. et al., 2001; Perkins G.L. et al., 2003).

Tümör antijenleri hem monoklonal antikorlar hem de poliklonal antiserumlar tarafından tanımlanan ve genellikle onkofetal antijenler olarak isimlendirilen markırları içerirler. Onkofetal antijenler sadece kanserli hücrelerde değil, normal fetal hücreler üzerinde de yer alırlar. Bu antijenler immün sistemin henüz gelişmediği embriyonik gelişim evresinde ortaya çıkarlar. En iyi bilinen onkofetal antijenler karsinoembriyonik antijen ve alfa-fetoproteindir (Kuby J., 1994; <http://www.tc-cancer.com/tumormarkers.html> ).

### **2.1.1. Karsinoembriyonik Antijen (Carcinoembryonic Antigen = CEA)**

Karsinoembriyonik antijen, normal mukoza hücrelerinde bulunan ve özellikle kolorektal kanser gibi adenokarsinomlarda seviyeleri artan bir onkofetal glikoproteindir. İlk kez 1965 yılında Gold ve Freedman tarafından bir kolon kanserli doku örneğinden izole edilmiştir (Gold P., Freedman S.O., 1965). Yapılan çalışmada kolon adenokarsinomlarının ekstraktları ile tavşanlar immünize edilmiştir (Shuster J. et al.,1974). Tavşan antiserumu ile sağlıklı insan kolon dokusu ve serumunun jel diffüzyon teknikleri ile absorbe edilerek yapılan çalışmalar sonucunda antijenin hepsinin endodermal olarak gastrointestinal sistemin adenokarsinomlarından köken aldığı anlaşılmış ve tümöre özgü olduğu kabul edilmiştir (Shuster J. et al.,1974; Kraft S.C., Kirsner J.B., 1976; Loewenstein M.S., Zamcheck N., 1977). Bu antijen, gebeliğin ilk iki üç aylık sürecinde (trimestri), fetal ve embriyonik bağırsakta, karaciğerde ve pankreasta da saptanmıştır. Gold ve Freedman, bu antijeni, tümör dokusu ve embriyodaki dağılımı nedeniyle 'karsino-embriyonik antijen' olarak adlandırmışlardır. Böylece CEA tümör ilişkili antijenler (tumour-associated antigen/TAA) arasında yer almıştır (Dykes P.W., King J., 1972; Haubrich W.S., Berk J.E., 1976; Kraft S.C., Kirsner J.B., 1976).

CEA normalde sağlıklı bireylerin kanında az miktarlarda bulunurken kanserli kişilerde ya da bazı iyi huylu tümörlerin varlığında serumdaki seviyeleri artabilir. CEA'ya yönelik monoklonal antikörlerin üretilmesi, kolon, rektum, mide, pankreas, ince bağırsak, tiroid, karaciğer, mesane, yumurtalık, meme, serviks ve akciğer kanserlerini kapsayan birçok adenokarsinomlarda yüksek seviyelerde bulunan CEA protein miktarının tespit edilmesine olanak sağlamıştır. CEA'nın kandaki normal seviyesi sigara içmeyen yetişkin bir bireyde <2.5 ng/ml iken, sigara içenlerde <5.0 ng/ml'dir. CEA'nın sigara içenlerin %19'unda ve sağlıklı kontrol popülasyonunun %3'ünde yüksek seviyelerde olduğu bulunmuştur. Serumda 10 ng/ml'den fazla CEA markırının bulunması genellikle kanser oluşumunu gösterir. Kanser oluşumu dışında peptik ülser, divertikülit, pankreatit, yangılı kalın bağırsak hastalığı, kolelityazis (safra taşı oluşumu), siroz, hepatit, hipotiroidizm, safra tıkanıklığı, bronşit ve böbrek

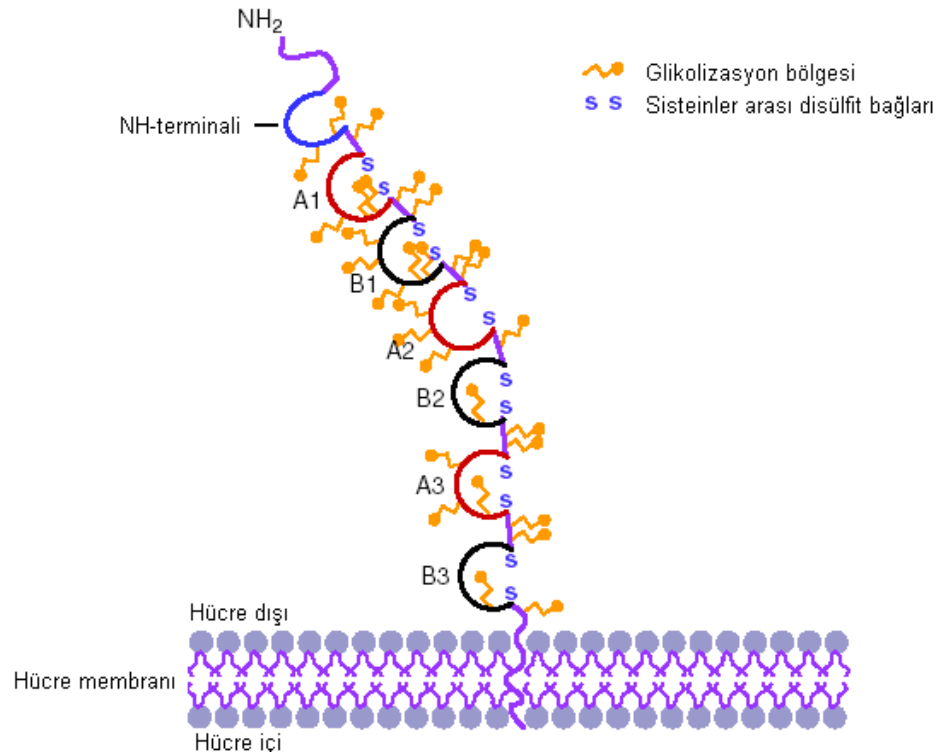
yetmezliği gibi akut ve kronik iltihabi hastalıklarda serum CEA değerleri artış gösterebilir (Hörię H. et al., 2000; Seregni E. et al., 2001; Perkins G.L. et al., 2003).

Karsinoembriyonik antijen diğer CEA ailesi üyelerine ait CD 66 grubunun bir alt tipi olan CD66e hücre yüzey reseptörüne sahiptir (Madjic O., 1989). CEA hücre yüzeyinden dokulararası boşluğa oradan da kanserli hastanın kan dolaşımına geçebilir (Thomson D.M.P. et al., 1969).

#### **2.1.1.1. Biyolojik Özellikleri**

1986 yılında yapılan immünolojik çalışmalar, CEA'nın büyük bir hücre-yüzey protein ailesinden meydana geldiğini göstermiştir. CEA gen ailesi, 19. kromozom üzerinde tanımlanmış iki grupta, 19q13.1 ve 19q13.3 arasındaki 29 gen-benzeri baz dizilimlerini kapsar (Beauchemin N. et al., 1987; Zimmermann W. et al., 1988; Thompson J.A. et al., 1989). CEA ailesinde 36'dan fazla glikoprotein tanımlanmıştır. CEA molekülü % 45-55 oranında karbohidrat içeren, 180 kDa ağırlığında bir glikoproteindir (Seregni E. et al., 2001).

Klonlanmış CEA gen dizilimi ile ilgili çalışmalar, CEA proteininin 107 aminoasitlik bir NH-terminal baz dizisi, bunu izleyen her biri 178 aminoasitten oluşan oldukça korunmuş, birbirine disülfid bağları ile bağlı homolog üç domaini içeren tek bir polipeptid zinciri (Oikawa S. et al., 1987; Benchimol S. et al., 1989) ve 26 aminoasitlik bir hidrofobik C-terminal bölgesinden oluştuğunu göstermiştir. CEA, glikozilfosfatidil inositol (GPI) kısmından kovalent olarak hücre membranına bağlanır ve bu özelliği ile CEA ailesinin diğer üyelerinden ayrılır (Hefta S.A. et al., 1988). Karbohidrat yan zincirleri, CEA molekülü üzerinde tanımlanmış 28 potansiyel Asn-bağlı glikozilasyon bölgesi ile protein kor bölgesine bağlanır (Benchimol S. et al., 1989). CEA ve ilgili moleküllerin domain yapısı IgG'nin ağır  $\alpha$ -zincirinin domain yapısına oldukça benzerlik gösterir. Bu nedenle immünoglobülin gen süper ailesine dahildir (Seregni E. et al., 2001) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Karsinoembriyonik antijenin molekül yapısı (Hörig H. et al., 2000).

### 2.1.1.2. İmmünolojik Özellikleri

İnsan tümörlerinin antijenik özelliklerini açıklamak için değişik yollar izlenmiştir. Çeşitli immünolojik yöntemler kullanılarak, tümör dokusuna karşı olan hümmoral-hüccresel immün yanıtlar belirlenmiş ve tümörlü hastaların çoğunda, kendi tümörlerine karşı immün yanıtın geliştiğı görölmüşür. İnsan tümör antijenlerini açıklamak için diğcr bir yaklaşım, insan tümör dokusu ile heterojen hayvan türlerinin immünizasyonu esasına dayanır (Shuster J. et al., 1974).

1968’de, lokalize kolon tümörlü hastalarda, CEA’ya karşı anti-CEA antikorları bulunmuştur. CEA’ya karşı gelişen hümmoral immüniteden antijenin karbohidrat kısmındaki antijenik determinantların, hüccresel immüniteden ise daha çok protein kısmının sorumlu olduğı sanılmaktadır (Dykes P.W., King J., 1972). Saflaştırılmış CEA enjeksiyonları ile elde edilen antiserumlardaki antikorlar protein yapıdadır (Shuster J. et al., 1974). Antikorların, hüccresel kolon kromatografisinde her ikisi de IgG olan iki fraksiyona ayrıldığı ve immünodiffüzyonla bu fraksiyonların her birinin CEA ile birer band verdiğı görölmüşür (Dykes P.W., King J., 1972).

### 2.1.1.3. Tayin Yöntemleri

CEA tayininde kullanılan yöntemler radyoimmünolojik ve immünokimyasal yöntemler olmak üzere iki grupta toplanabilir:

RIA ile serum ve vücut sıvılarında bulunan ng/ml düzeyindeki hatta 1.0 ng/ml'nin altındaki CEA miktarları ölçülebilir (Dykes P.W., King J., 1972; Kraft S.C., Kirsner J.B., 1976). Plazma ve serumda CEA'dakine benzer glikoproteinlerin ve düşük karbohidrat içeriği olan makroglobülinlerin varlığı, CEA ölçümlerinde karışıklığa neden olur. Bunu engellemek amacıyla, bu glikoprotein ve makroglobülinleri ekstrakte etmek gerekir (Shuster J. et al., 1974). Normalde CEA düzeyleri, perklorik asit ile ekstraksiyon ilk kademe olarak kullanıldığında 2.5 ng/ml'den düşük (Dykes P.W., King J., 1972; Zamcheck N., 1976), perklorik asit ile ekstraksiyon yapılmayan deneylerde normalin üst sınırı 15 ng/ml (Shuster J. et al., 1974) ve 20 ng/ml olarak tespit edilmiştir (Dykes P.W., King J., 1972).

Munjal ve arkadaşları (Munjal D., Brady P.G., 1978) yaptıkları bir çalışmada, kolonda CEA tayinini immünodiffüzyon ve immünoelektroforez yöntemi ile yapmışlardır. Coller ve arkadaşları, radyoimmünoelektroforetik bağlama yöntemini agar jel plaklarında uygulamışlardır. Bu yöntemle CEA, semikantitatif olarak ve hızla ölçülebilmektedir (Shuster J. et al., 1974).

### 2.1.1.4. Fizyolojisi

İmmünofloresans tekniklerle, CEA'nın çok az miktarda normal yetişkin bağırsağının lümene bakan epitelyal hücre membranlarında, embriyonik bağırsak ve kolon tümörlerinde birbirine bitişik konumda bulunan hücre membranlarında bulunduğu gösterilmiştir (Beauchemin N. et al., 1987). CEA, normal insan bağırsağının distalinden mideye kadar olan bölgeden elde edilen örneklerde (Dykes P.W., King J., 1972) ve kolorektal kanser nedeniyle rezeksiyon yapılan kolostomilerden alınan feçeste (Loewenstein M.S., Zamcheck N., 1977) ve mekonyumda bulunmuştur (Dykes P.W., King J., 1972).

CEA'nın benign kolon mukozasında, normal kişilerin kolon materyali ve feçesinde düşük konsantrasyonda saptanması, normal ve yangılı intestinal mukoza tarafından meydana getirilişinin kuvvetli kanıtlarıdır. Normal intestinal mukozada sentez edildiği kabul edilen CEA, lümene salgılanır ve feçes ile dışarı atılır (Loewenstein M.S., Zamcheck N., 1977).

Çok fazla sigara içmeyen sağlıklı kişilerin %97'sinde kandaki CEA düzeyleri normal (<2.5 ng/ml) bulunmuştur (Zamcheck N., 1976). Normal yetişkinlerin kolon mukozası doku gramı başına ortalama 100 ng CEA içerir. CEA, kolonun primer adenokarsinomunda doku gramı başına 1.000-18.000 ng, primer kolon kanserinin karaciğer metastazında 2.000-93.000 ng, primer ve metastatik pankreas kanserinde 5-800 ng'dır (Haverback B.J., 1976).

Kalın barsak hastalığı görülen hastaların yaklaşık %25'inde kandaki CEA miktarının yükseldiği görülmüştür. Tümörün lenf nodüllerine yayıldığı gözlenen hastaların %50'sinde ve az metastaz görülen hastaların da %75'inde CEA seviyelerinin yüksek olduğu bulunmuştur. Az farklılaşmış tümör hücrelerinin CEA üretme olasılıkları düşük olduğu halde, en yüksek CEA değerleri metastaz oluşumu ile görülmektedir (>100ng/ml) (Perkins G.L. et al., 2003). CEA, kan serumu ve tümör dokusu dışında, gastrointestinal sekresyonlarda ve diğer sistem organlarının sekresyonlarında da araştırılmıştır. CEA'ya benzer aktiviteler, immünolojik olarak, tükürük, mide, pankreas, kolon-lavaj, asit, bronş, plevra sıvılarında ve idrarda saptanmıştır (Go V.L.W., 1976; Molnar I.G. et al., 1976).

#### **2.1.1.5. Patolojisi**

##### **I. Kanserlerde CEA'nın Varlığı**

**a. Kolon kanserlerinde CEA:** Thomson ve arkadaşlarının bildirdiği ilk seri araştırmalarda (1969), kolon kanserlerinde CEA pozitiflik frekansı %97'dir. Sonraki çalışmalarda, CEA düzeylerinin kolon kanserinin hacmi ve yaygınlık derecesi ile paralellik gösterdiği ve CEA yükseklik frekansının arttığı dikkati çekmiştir. 1976'da Zamcheck ve arkadaşları, başlangıç evresindeki hastalarda yaptıkları incelemelerde,

CEA yükseklik frekansının %59'a kadar düştüğünü gözlemlemişlerdir. Birçok araştırmacı, Dukes'in yaptığı kolon kanserlerinin evresini belirten sınıflandırmayı benimsemişlerdir. Kolon kanserlerinde Dukes A'da CEA yükseklik frekansı %40, Dukes B'de %65, Dukes C'de %75, Dukes D'de %90 olarak saptanmıştır. Yaygın metastazları olan kolon kanserlerinde ise CEA yükseklik frekansı %100'dür. Kolon kanserleri içinde, CEA yükseklik frekansı en düşük olanı sekum kanserleridir (%36) (Dykes P.W., King J., 1972; Shuster J. et al., 1974; Zamcheck N., 1976).

**b. Kolon dışı malign kanserlerde CEA:** CEA'nın mide, meme, prostat, mesane, bronş, karaciğer ve pankreas kanserlerindeki yükseklik frekansları Tablo 2.1'de gösterilmiştir. CEA, kolon, akciğer ve memeden kaynak almış kanserlerin metastazlarında, lokalize kanserlere oranla daha sık olarak yükselir. CEA düzeyleri, metastazları bilinen pankreas kanserli hastaların %71'inde 10 ng/ml'den yüksek, metastaz saptanmayanlarda ise 9 ng/ml'den düşük bulunmuştur (Haubrich W.S. et al., 1976; Loewenstein M.S., Zamcheck N., 1977).

Tablo 2.1. Kolon dışı malign kanserlerde CEA yükseklik frekansı (Shuster J. et al., 1974; Loewenstein M.S., Zamcheck N., 1977).

| HASTALIK                             | CEA<br>YÜKSEKLİK FREKANSI<br>(CEA> 2.5 ng/ml) |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Sindirim sistemi kanserleri          |                                               |
| - Mide                               | % 35.5                                        |
| - Pankreas                           | % 61                                          |
| Sindirim sistemi dışındaki kanserler |                                               |
| - Meme                               | % 52                                          |
| - Bronş                              | % 72                                          |
| - Karaciğer                          | % 62.6                                        |
| - Prostat                            | % 40                                          |
| - Mesane                             | % 33                                          |
| Akut ve kronik lösemi ve lenfomalar  | % 47                                          |
| Sarkomlar                            | % 41                                          |

## II. Benign Hastalıklarda CEA'nın Varlığı

Moore ve arkadaşları 1971'de ilk kez kanser dışı birçok hastalıkta, özellikle gastrointestinal sistem organları, böbrek, karaciğer ve akciğer hastalıklarında

CEA'nın yükseldiğini bildirmişlerdir. CEA'nın kolon kanserlerinin yanısıra benign hastalıklarda da yükselebilmesi kolon kanseri tanısındaki yararını sınırlandırmasına rağmen, ülseratif kolitte yüksek seviyelerde olması kanser gelişiminin erken olarak saptanmasında CEA'nın yararlı olabileceğini göstermiştir (Dykes P.W., King J., 1972; Bullen A.W. et al., 1977; Loewenstein M.S., Zamcheck N., 1977).

Yaş ve kan gruplarının CEA konsantrasyonu üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Benign hastalıklardaki CEA düzeylerinin, gençlere oranla yaşlılarda daha yüksek olduğu saptanmasına rağmen genelde CEA'nın yaş ile ilişkili olmadığı kabul edilmektedir. Ayrıca kan grubu ile CEA düzeyleri arasında da bir ilişki saptanamamıştır (Beaudonnet A. et al., 1981).

#### **2.1.1.6. CEA'nın Klinikteki Önemi**

Genel olarak CEA'nın klinik uygulamaları arasında kanser tanısında, asemptomatik populasyonda kanser taramasında, prognozunda, tedavinin izlenmesinde, immünohistokimya, immünositokimyadaki özel patolojik tekniklerde, tümör lokalizasyonunda ve terapide ise antikora bağlanmış sitotoksik ajanlar veya CEA geni taşıyan aşı vektörleri şeklindeki kullanımları sayılabilir (Gold P., Goldenberg N.A., 1996).

İleri evre kolon kanserli hastaların %80'inden fazlasında yüksek CEA seviyelerine rastlandığı halde, kolorektal kanserin erken tanısında CEA ölçümleri tek başına yeterli değildir. CEA'nın yeterli duyarlılık ve spesifitede olmaması, asemptomatik populasyonlarda kanserin düşük oranda bulunması, birçok hatalı pozitif ve negatif sonuçların alınmasına neden olur. Fakat kolorektal adenokarsinomlu hastaların klinik açıdan değerlendirilmesinde serum CEA seviyeleri oldukça yararlıdır (Gold P., Goldenberg N.A., 1996).

Mide sıvısında CEA seviyelerinin ölçülmesi mide kanseri riski taşıyan hastaların tanımlanmasında oldukça önemlidir (Tatsuta M. et al., 1988). Serum CEA düzeyi mide kanserinin erken teşhisinde etkili bir indikatör değildir. Fakat ileri evre mide kanserli hastaların birçoğunda yüksek CEA seviyelerine rastlanmıştır (Haines

A.P. et al., 1979; Ditrich C. et al., 1985). Yapılan klinik araştırmalarda operasyon öncesi ve sonrası ölçülen CEA seviyelerinin meme, mide ve akciğer kanserlerinin değerlendirilmesinde prognostik indikatör olarak iş gördüğü tespit edilmiştir (Crawford N.P.S. et al., 2003).

Günümüzde, kolorektal kanser tedavisinin izlenmesinde kullanılan en iyi yöntem kandaki CEA seviyelerinin düzenli aralıklarla ölçülmesidir. Kolorektal kanserlerde tümörlü dokunun cerrahi müdahale ile tamamen çıkarılması sonucunda bir ya da dört ay içinde yüksek CEA seviyeleri normal değerine düşer (Arnaud J.P. et al., 1980). Eğer kandaki CEA düzeyi normale dönmezse, bu durum yapılan operasyonun yetersiz olduğunu ya da kanserin diğer organlara yayıldığını gösterir. Kemoterapi ve/veya radyoterapi uygulanan meme, akciğer ve beyin zarı kanserli hastalarda plazma ya da serum CEA seviyeleri, operasyon sonrası kanserin ilerlediğine ya da sonlandığına işaret eder (Gold P., Goldenberg N.A., 1996).

Tek olarak ya da diğer tümör belirleyicileri ile birlikte CEA'ya yönelik monoklonal antikor (mAb) teknolojisinin kullanılması, kolorektal adenokarsinom tanısında oldukça etkili olmuştur (Alvarez J.A. et al., 1995). Kim ve arkadaşları radioimmünoguided surgery (RIGS) adı verilen bir yöntemle biparatopik CEA mAb'ların kullanılabileceğini göstermişlerdir. RIGS yöntemi ile radyoaktif olarak işaretlenmiş antikorlara bağlanan tümör hücrelerinin yaydığı gama ışınları ile intraoperatif tümörün tespit edilmesi mümkündür (Crawford N.P.S. et al., 2003).

Tümör spesifik antikorun kullanıldığı radyoimmünolokalizasyon (RIL) prosedürleri, *in vivo*'da kötü huylu dokular ile iyi huylu dokuların ayırtilmesinde etkilidir. Poliklonal anti-CEA antikorları CEA ailesinin diğer üyeleri ile çapraz reaksiyon verdiğinden, tümör dokusunun yerinin belirlenmesinde sadece normal doku epitoplari ile çapraz reaksiyon vermeyen monoklonal antikorlar kullanılır. Yapılan bir çalışmada, radyoaktif olarak işaretlenmiş anti-CEA antikorları kullanılarak gastrointestinal kanserli hastaların %70-90'ında tümörün yeri tespit edilmiştir. Radyoaktif anti-CEA monoklonal antikorları kullanılarak kolorektal ve meme kanserli dokuların incelenmesi de mümkündür (Gold P., Goldenberg N.A., 1996).

Radyoimmünolokalizasyon yönteminin yardımıyla tümör bölgelerinin tespit edilebilmesi, bu tümörlerin aynı teknoloji ile tedavi edilebileceğini gündeme getirmiştir. Anti-CEA antikorlarına sitotoksik radyoaktif maddeler, ilaçlar, kemoterapötik ajanlar ya da toksinler bağlanarak spesifitesi artırılmış şekilde CEA eksprese eden tümör hücrelerine yönlendirilmeleri ile CEA üreten tümörlerin pasif immün tedavisi mümkün olabilir (Gold P., Goldenberg N.A., 1996).

CEA'nın birçok insan tümör hücresinin yüzeyinde yüksek seviyelerde bulunması, kanser aşı çalışmalarında etkin olarak kullanılmasını sağlamıştır. CEA kanser aşı çalışmaları ile otoimmün reaksiyon oluşumu görülmeden yüzeylerinde CEA ekspresyonu olan hücrelere karşı immün yanıtın harekete geçirilmesi hedeflenmektedir (Crawford N.P.S. et al., 2003).

### **2.1.2. AFP (Alfa-fetoprotein)**

AFP karaciğer, yumurta kesesi ve gastrointestinal sistem tarafından sentezlenen ve albümin ile benzer baz dizilimine sahip normal bir fetal serum proteindir. Hamileliğin 12. haftasında 3 mg/ml konsantrasyona ulaşan, fetal plazmanın önemli bir bileşenidir. Doğumdan sonra serumdaki AFP seviyeleri düşmeye başlar ve genellikle hamilelik dışında sağlıklı kişilerin kanında tespit edilemez. 3.5 günlük bir yarı ömre sahiptir ve yetişkin serumundaki konsantrasyonu 20 ng/ml'den azdır (Way B.A., Kessler G., 1996).

AFP seviyelerinin artışı, primer karaciğer kanserinin, yumurtalık ya da testis üreme hücresi kanserinin varlığını gösterir. Hepatoselüler karsinoma (HCC) için AFP'nin duyarlılığı %98 ve spesifitesi %65 olduğundan HCC için en uygun belirleyicidir. Aynı zamanda, AFP seviyesi için HCC tanısında prognostik indikatör olarak iş görür. AFP'nin hCG ile kombinasyonu, üreme hücresi tümörlerinin tanısında, derecelendirilmesinde ve izlenmesinde oldukça yararlıdır. Nadiren mide kanseri gibi diğer kanser türlerinde de serum AFP seviyeleri artar. AFP düzeyinin artmasına sebep olan kanserin görülmediği durumlar ise siroz ya da hepatit gibi benign karaciğer hastalıkları, Wiscott-Aldrich sendromu ve hamileliktir ([http://cis.nci.nih.gov/fact/5\\_18.htm](http://cis.nci.nih.gov/fact/5_18.htm)).

### 2.1.3. PSA (Prostat Spesifik Antijen)

PSA, prostat dokusunda ve az miktarda süt, amniyon sıvısı ve meme dokusunda bulunan bir serin proteazdır. Erişkin erkeklerin kanında düşük konsantrasyonlarda bulunur ve tüm prostat hücreleri tarafından üretilir. Prostatit, benign prostat hiperplazisi (BPH), akut üriner idrar tutulması gibi benign prostat hastalıklarında ya da prostat bölgesindeki malign kanser oluşumlarında serum PSA seviyeleri artabilir. Bu durumda bu hastalıkların ayırte edilmesi güçleşir ve yüksek bir PSA seviyesi kanser tanısı için diğer testlerin de gerekli olduğunu gösterebilir. 50 yaş üzeri tüm erkekler için dijital rektal incelemesi ile kandaki PSA seviyelerinin ölçümleri her yıl yapılmaktadır. Taramadaki kullanımına ek olarak PSA sıklıkla prostat kanser tedavisinin izlenmesinde kullanılır (Way B.A., Kessler G., 1996; <http://www.survivingandwinning2.com/breakthroughs/imaging/tumor-markers.htm>).

### 2.1.4. CA 15-3

Serum CA 15-3 seviyeleri, meme kanseri özellikle ileri evre meme kanseri teşhisi konmuş bayanlarda tedavi sürecinin izlenmesinde etkin rol oynar. Meme kanserinin erken safhalarında da nadiren CA 15-3 seviyeleri artar. Yumurtalık, akciğer ve prostat kanserleri de serum CA 15-3 düzeyinin yükselmesine neden olur. Benign meme ya da yumurtalık hastalığı, endometriyoz, iltihabi pelvik hastalığı ve hepatit gibi kanser dışında görülen hastalıklarla kandaki seviyeleri artabilir. Hamilelik ve emzirme de CA 15-3 düzeyinin artmasına neden olabilir ([http://cis.nci.nih.gov/fact/5\\_18.htm](http://cis.nci.nih.gov/fact/5_18.htm)).

### 2.1.5. CA 19-9

İlk olarak kolorektal kanserli hastalarda gözlenen CA 19-9, aynı zamanda pankreas, mide ve safra kanalı kanserlerinde tanımlanmıştır. Araştırmacılar, pankreas kanserinin oldukça ilerlemesi sonucu hastalarda CA 19-9 seviyelerinin arttığını göstermişlerdir. Safra taşı oluşumu, pankreatit, siroz ve kolesistit gibi hastalıklarda da serum CA 19-9 seviyeleri artabilir (<http://www.tc-cancer.com/tumormarkers.html>).

### 2.1.6. CA 27-29

Meme kanseri, yumurtalık ve akciğer kanserlerinde, normal hamileliğin ilk üç ayında, benign meme hastalığında, siroz ve hepatit gibi karaciğer hastalıklarında yüksek seviyelerde bulunur. Meme kanserinin teşhisi için yeterli duyarlılığa ve spesifiteye sahip değildir ve benign meme hastalığına sahip hastaların erken evre kanserli hastalardan ayırtedilmesinde kullanılmaz. Fakat CA 27.29 yeniden gelişen meme kanserinin erken tanısında etkilidir (Way B.A., Kessler G.,1996).

### 2.1.7. CA 125

Ovaryum kanserlerinin %80'inde görülen bir antijendir. Farenin insan ovaryum kanser hücre dizisi ile bağışıklanması sonucunda elde edilen bir monoklonal antikor (OC 125) tarafından tanımlanır. CA 125 genellikle ovaryum kanserli hastaların serumunda bulunduğundan markır olarak kullanımına ilişkin çalışmalar sürdürülmektedir. Uterus, boyun, pankreas, karaciğer, göğüs, kolon, akciğer, meme ve sindirim kanalı kanseri gibi diğer kanser türlerinde serumdaki düzeyi artabilir. Endometriyoz, iltihabi pelvik hastalığı, peritonit, pankreatit, karaciğer hastalığı gibi kanser dışındaki hastalıklarda, menstrüasyon ve hamilelik döneminde de yüksek CA 125 seviyelerine rastlanabilir. CA 125 yumurtalık kanseri için tedavi yönteminin belirlenmesinde ve hastaların takibinde kullanılır. Kemoterapi tedavisi gören yumurtalık kanserli kadınlarda seviyesinin düşmesi, genellikle kanserin tedaviye verdiği yanıtı gösterir (<http://www.tc-cancer.com/tumormarkers.html>).

### 2.1.8. CA 72-4

Yumurtalık kanseri ve gastrointestinal sistemde oluşan kanserler için kullanılan yeni bir testtir ve yumurtalık kanseri için uygulanan CA 125 testine yardımcı niteliktedir ([http://cis.nci.nih.gov/fact/5\\_18.htm](http://cis.nci.nih.gov/fact/5_18.htm)).

### 2.1.9. Enzimler

Enzimler ya da izoenzimler tümör belirleyici olarak kullanılmak yerine hastalık safhalarının değerlendirilmesinde kullanılırlar.

**a. Asit fosfataz:** Bu enzim primer ve metastatik prostat kanserlerinde, normal prostatta yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve hastalığın ileri safhasında hastaların takibinde kullanılabilir.

**b. Galaktozil transferaz II:** Çeşitli kanser türlerinde özellikle gastrointestinal sistem kanserlerinde yüksek seviyelerde bulunan galaktozil transferazın bir izozimidir. Kolon kanserlerinde, bu enzimin seviyeleri hastalığın derecesine ve gelişimine bağlı olarak değişir. Pankreas kanserinde malign hastalığın benign olandan ayırtedilmesinde bu enzimin CEA ve diğer testlerden daha duyarlı ve spesifik olduğu görülmüştür.

**c. Nöron spesifik enolaz (NSE):** Beyin ve nöroendokrin dokusundaki glikolitik yolda rol oynayan bir izozimdir. Nöroblastom, Wilms tümörü (nefroblastom), melanom ve tiroid, böbrek, testis ve pankreas kanserli hastalarda tespit edilmiştir. Özellikle nöroblastomlu hastalarda NSE seviyesinin ölçümü hastalığın derecesi, hastanın tedaviye verdiği yanıt ve prognozu hakkında bilgi verebilir (<http://www.tc-cancer.com/tumormarkers.html>).

**d. Laktat dehidrogenaz (LDH) :** Her türlü kanser ve diğer birçok hastalıkta LDH seviyeleri artış gösterdiğinden belirli bir kanser türünün tanısında kullanılamaz. Testis kanseri, Ewing sarkomu, Hodgkin-dışı lenfoma ve bazı lösemi türleri gibi kanser tedavilerinin izlenmesinde kullanılabilir. Kalp yetmezliği, hipotiroidizm, anemi, akciğer ya da karaciğer hastalıklarında da yüksek LDH seviyelerine rastlanabilir.

**e. Prostatik asit fosfataz (PAP):** Normalde kanda az miktarda bulunurken bazı kanserli hastalarda serum PAP seviyeleri artabilir. PAP'ın prostat tarafından üretildiği bilinmesine rağmen, testis kanseri, lösemi ve Hodgkin-dışı lenfoma,

Gaucher hastalığı, Paget hastalığı, osteoporoz, siroz ve hiperparatiroidizm gibi kanser oluşumu dışındaki durumlarda da yüksek PAP seviyelerine rastlanabilir ([http://cis.nci.nih.gov/fact/5\\_18.htm](http://cis.nci.nih.gov/fact/5_18.htm)).

### 2.1.10. Hormonlar

Benzer hormonlarla çok az çapraz reaksiyon veren ya da hiç çapraz reaksiyon vermeyen bir hormonun spesifik olarak tanımlanabilmesi, hormonların tümör belirleyicileri olarak kullanılabilmelerini sağlamıştır.

#### a. İnsan koryonik gonadotropin (Human chorionic gonadotropin = hCG):

Normalde hamilelik döneminde plasenta tarafından üretilen bir glikoproteindir. hCG seviyeleri trofoblastik hastalığının görüldüğü tüm hastalarda, üreme hücresi kanseri olan hastaların %70'inde ve daha az sıklıkla seminomada (başkalaşımı tam olmayan testis tümörü) artar. Trofoblastik tümörler için hCG'nin duyarlılığı ve spesifitesi yaklaşık %100'dür. hCG'nin AFP ile kombinasyonu üreme hücresi tümörlerinin tanısında, derecelendirilmesinde ve gelişiminin izlenmesinde oldukça yararlıdır. Testis, yumurtalık, meme, akciğer, melanoma, karaciğer, mide, pankreas ve yumurtalık kanserlerinde daha düşük oranda markır artışına rastlanır. Normal hamilelik, siroz, duodenal ülser ve yangılı bağırsak hastalığı gibi bazı kanser dışındaki durumlarda da hCG seviyeleri artış gösterir. hCG seviyeleri tümör miktarı ve tedavi başarısı ile ilişkilidir, tedavinin izlenmesinde ve hastalığın tekrar oluşumunun gözlenmesinde kullanılır (Way B.A., Kessler G., 1996; [http://cis.nci.nih.gov/fact/5\\_18.htm](http://cis.nci.nih.gov/fact/5_18.htm)).

**b. Kalsitonin:** Tiroid bezinde bulunan parafolüküler C hücreleri tarafından üretilen bir hormondur. Kandaki kalsiyum seviyelerini düzenlemede rol oynar. Kanserinin erken teşhisinde kullanılabilen nadir tümör belirleyicilerinden biridir. Medüller tiroid kanseri olarak bilinen parafolüküler C hücre kanserlerinde kandaki kalsitonin seviyeleri artış gösterir.

**c. Tiroglobülin:** Tiroid bezi tarafından üretilir ve birçok tiroid hastalığında kandaki seviyeleri artar. Tiroglobülin düzeyinin 10 ng/ml'nin üstüne çıkması kanserin tekrar oluşmaya başladığını gösterir. Metastatik tiroid kanser tedavisinin sonuçlarını değerlendirmek için de tiroglobülin seviyelerinden yararlanılabilir ([http://cis.nci.nih.gov/fact/5\\_18.htm](http://cis.nci.nih.gov/fact/5_18.htm)).

Tümör belirleyicileri olarak kullanılan diğer hormon ve polipeptid faktörleri; vazoaaktif inhibitör polipeptid (VIP), inhibin ve gastrin (Way B.A., Kessler G.,1996), mesane tümör antijeni (BTA), kromogranin A, serum gamma globülin, serum Her-2/neu, NMP22, S-100, TA-90, doku polipeptid antijeni (TPA)'dir ([http://cis.nci.nih.gov/fact/5\\_18.htm](http://cis.nci.nih.gov/fact/5_18.htm)).

## 2.2. Tümör Belirleyicilerinin Kullanım Alanları

**A. Kanser taramaları ve teşhisi:** Tümör belirleyicileri genellikle kanser tanısında kullanılmazlar. Kanser belirtilerine rastlanmayan hastalarda kanserin teşhisi için geliştirildikleri halde, bu görevi sadece prostat-spesifik antijen (PSA) yerine getirir. Fakat bu markırlar, daha önce kanser oluşumu görülmemiş bir hastada kanserin kaynağının belirlenmesine yardımcı olurlar.

**B. Kanser yeniden oluşumunun belirlenmesi:** Tümör belirleyicileri hastalığın yeniden oluşması durumunda erken tanının konulmasında kullanılabilirler. Meme kanseri tedavisi gören birçok bayanda, kandaki CA 15-3 seviyeleri her yıl ölçülmektedir. Böylece hastada kanser belirtisi görülmeden kanserin tekrar oluşma olasılığı tespit edilebilmektedir. Fakat hiçbir tümör belirleyici bu konuda yeterli duyarlılığa sahip olmadığından uygulanan testin güvenilirliği tam değildir. Gestasyonal trofoblastik tümörler, prostat, epitelyal ovaryum, yumurtalık ve testis üreme hücre kanserleri için etkili bir tedavi sonrasında kanda ilgili tümör belirleyici seviyelerinin ölçülmesi yararlı olabilir.

**C. Kanser ileri evrelerinin tespiti:** Tümör belirleyicilerinin yaygın olarak ileri evre kanser tedavisi gören hastaların izlenmesinde kullanıldığı bilinmektedir. Uygulanan tedavi yönteminin yeterli olup olmadığını belirlemek amacıyla, kandaki

tümör markır seviyelerinin ölçülmesi göğüs röntgen filminin çekilmesinden, bilgisayarlı tomografi (CT) ve diğer birçok testin defalarca yapılmasından daha kolay ve ucuz bir yöntemdir. Kandaki tümör belirleyici miktarının azalması tedavinin yeterli olduğunu, tümör markır seviyelerinin artması ise tedavi yönteminin değiştirilmesi gerektiğini gösterir. Bu durum ile ilgili istisna ise kanserin belirli bir kemoterapi tedavisine çok duyarlı olmasıdır. Kemoterapi, birçok kanserli hücrenin hızla ölmesine ve çok miktarda tümör belirleyicinin kan dolaşımına geçmesine neden olduğundan kandaki markır seviyeleri geçici olarak artar ([http://www.cancer.org/docroot/PED/content/PED\\_2\\_3X\\_TumorMarkers.htm](http://www.cancer.org/docroot/PED/content/PED_2_3X_TumorMarkers.htm)).

**D. Tedavinin izlenmesi:** Bazı tümör belirleyicilerinin serumdaki miktarları uygun tedavi yönteminin seçilmesine, bazı kanser türlerinde hastalığın hangi evrede olduğunun gösterilmesine, tedavi sırasında hastanın tedaviye vereceği yanıtın izlenmesine ve uygulanan tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesine yardımcı olur ([http://cis.nci.nih.gov/fact/5\\_18.htm](http://cis.nci.nih.gov/fact/5_18.htm)).

**E. İmmün tanıdaki rolü:** Tümör ile ilişkili antijenlere karşı üretilen radyoaktif işaretli ya da tek olarak kullanılan monoklonal antikorlar yüksek antijen seviyelerinin veya belirli bir bölgedeki antijen varlığının belirlenmesi amacıyla tümör tanısında etkin bir şekilde kullanılabilirler. Monoklonal antikorlar farklılaşmamış tümör hücrelerinin tanımlanmasında ve kemik iliği, beyin omurilik sıvısı, lenfoid organlar gibi vücudun belli bölgelerindeki mikrometastazların tespit edilmesinde de kullanılırlar (Roitt I. et al., 2001).

## 2.3. Monoklonal Antikorlar ve Hibridoma Teknolojisi

1960'ların başlarına kadar miyeloma proteinlerinin yapısı immünologlar tarafından açıklanamamıştır. Daha sonra Michael Potter, ilk olarak miyelomaların farelerde uyarılmasını sağlamış ve bu sayede çok miktarda monoklonal antikor üretebilmiştir. Ancak birçok denemeye rağmen enjekte edilmiş bir antijene karşı antikor sentezleyebilen tümörleri indüklemek mümkün olamamıştır. Leo Sachs, Kenko Haribata, Edwin S. Lennox ve Melvin Cohn doku kültüründe bir fare miyeloma hücre dizisi üretmeyi başarmışlar, fakat daha sonra bu hücre dizisi

korunamamıştır. 1973'te Richard G. Cotton, David S. Secher ve Cesar Milstein ilk kez hücre dizisi tarafından salgılanan bir fare miyeloma proteininin yapısal mutantlarını kültürde üretmişlerdir (Köhler G., 1985).

1975'te C. Milstein ve G. Köhler, hücre füzyonunu harekete geçiren bir ajanın varlığında, belirli bir antijenle immünize edilmiş farelerin dalağında alınmış lenfositler ile fare miyeloma hücrelerini (kemik iliği kanserli B lenfosit hücreleri) birleştirmişlerdir. İlk denemeler için immünojen olarak koyun kırmızı kan hücrelerini tercih etmişlerdir. Oluşan hibridoma hücreleri B lenfositlerinden antikor salgılama özelliklerini, miyeloma hücrelerinden ise ölümsüzlük özelliklerini almışlardır. Tek bir antijenik determinanta karşı çok miktarda antikor üreten klonlar kültürde üretilmiştir. İlk kez, spesifitesi önceden tespit edilen bir monoklonal antikor salgılayan füzyon hücresi kültürlerde sürekli olarak geliştirilebilmiştir. Aynı yıllarda Jonathan C. Howard ve Geoffrey W. Butcher tarafından fare doku uygunluk antijenlerine karşı bir dizi monoklonal antikor üretilmiştir (Köhler G., 1985).

Köhler ve Milstein'ın geliştirdiği hibridoma tekniği mAb üretiminde önemli bir dönüm noktası olmuştur. Bu yöntemle, istenilen spesifitede mAb üreten hibrit hücreleri seçmek için oluşturulan hibridomaların deney hayvanlarına (farelere veya sıçanlara) enjekte edilmesiyle sınırsız sayıda mAb üretimi mümkündür. Bunun dışında çok sayıda hibrit hücre elde etmek için *in vitro* uygulanan çeşitli yöntemler vardır. Bu üretim sistemlerinin başarısı, hücrenin çoğalması ve mAb üretme aktivitesi gibi hibridoma özelliklerine bağlıdır (Geus B.D., Hendriksen C.F.M., 1998; Breedveld F.C., 2000).

Hibridoma tekniği, monoklonal antikor üretiminde bugüne kadar kullanılan en etkili yöntemdir ve araştırma-tanılama materyalleri olarak monoklonal antikorların geliştirilmesinde birçok ticari firma tarafından rutin olarak kullanılmaktadır. 1975'ten beri çeşitli antijenlere karşı monospesifik reaksiyon gösteren 10.000'den fazla hücre klonu geliştirilmiştir. Fakat bilinen birçok enfeksiyöz ajana yönelik mAb henüz üretilmemiştir ve yeni ortaya çıkan enfeksiyon hastalıklarına karşı tedavide kullanılmak üzere monoklonal antikor geliştirme çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır (Michaud G. et al., 2003).

Hibridoma tekniğinin dezavantajları arasında; füzyon işleminin çoğunlukla kemirgen hayvanların dalağındaki B hücreleri ile sınırlı olması, kimyasal füzyon işleminin rastgele meydana gelmesi, kompleks karışımlara karşı antikor üretiminin oldukça zor olması, doku kültürü uygulamaları için gereken besiyeri, FBS ve bunun gibi malzemelerin pahalı olması sayılabilir (Berry J.D., 2004).

Hibridoma tekniği bu olumsuzlukların yanısıra uygulanması kolay, oldukça etkili ve güvenilir bir yöntemdir. Hibrit hücreler, epitop haritalama çalışmalarında ve *in vivo* modellerde kullanılabilecek glikozillenmiş monoklonal antikorlar üretebilirler. Sınırsız sayıda antikor üretme kapasitesindedirler. Homojen preparat elde etmek için basit bir kültüvasyon ve saflaştırma işlemine gerek duyulmaktadır. Serum içermeyen kültür kullanılarak da daha düşük maliyette monoklonal antikor üretimi gerçekleştirilebilir (Berry J. D., 2004).

Bir hayvanın immünizasyonu (bağışıklanması) ile B lenfositleri aktif hale gelir ve ardından antijen üzerindeki çok sayıda epitop bölgesinin tanınması sonucunda antikor üretimi gerçekleşir. Her bir memeli B hücresi, genellikle 6-12 aminoasitten oluşan tek bir epitopu tanıyan antikor üretme yeteneğine sahiptir. Tek bir B hücresi yüzlerce antikor üretmesine rağmen, bunların antijen bağlama bölgeleri benzer yapıdadır. Oluşan immün yanıtın derecesi enjekte edilen antijenin immünojenitesine bağlı olarak değişir. Birçok farklı B hücresi tarafından üretilen bu antikor toplulukları çeşitli B hücre klonundan türevlendikleri için poliklonal olarak isimlendirilirler. B hücreleri bir hayvandan alınıp *in vitro* kültüre edildiklerinde, herhangi bir değişikliğe uğratılmamış ya da ölümsüz hale getirilmemişlerse hızla ölürlür. Poliklonal antikor karışımından izole edilmiş ve ölümsüzleştirilmiş tek bir B hücre klonuna monoklonal denir. Poliklonal antikorlar ile kıyaslandığında monoklonal antikorlar monospesifik ve homojen özellik gösterirler. Bu özellikler, monoklonal antikorları tanı kitlerinin ve terapötiklerin geliştirilmesinde ve uygulanmasında çok etkili bir materyal haline getirmiştir (Stewart S.J., 2001).

Birçok durumda bir poliklonal antikor, tarama testlerinin geliştirilmesi için yeterli değildir. Patojen üzerindeki çoklu epitop bölgesini ya da antijeni, korunmuş

yüzey epitopları ile patojenin birçok serolojik suşunu tanır, fakat ilgili suşları birbirinden ayırt edemeyebilir. Konukçu hayvanda üretilen antikorlar içerisinde polispesifik antikorlar da bulunur. Bu antikorlar, deneyde kullanılan antijen preparatındaki kontaminantlarla istenmeyen reaksiyonlara yol açabilirler. Monoklonal antikorların en önemli özelliklerinden biri son derece spesifik olmalarıdır. Bir hibridoma soyu geliştirildiği zaman, monoklonal antikorlar büyük miktarlarda kolayca üretilirler. Aynı zamanda bu antikorların kullanımı, poliklonal antikor preparatlarında görülen çapraz reaksiyonları önler ve bağışıklanmış hayvanlardan yüksek afiniteli monoklonal antikorlar kolayca elde edilebilir (Goding J.W., 1980; Berry J.D., 2004).

### **2.3.1. Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları**

Uzun yıllardan beri antijeni tanımlamak, saflaştırmak, miktarını tespit etmek, genetik haritasını çıkarmak, modifiye etmek, seçmek ve yerini belirlemek için ticari serumlar kullanılmıştır. Buna karşın monoklonal antikorlar sınırsız sayıda elde edilebilen saf kimyasal maddeler oldukları için zamanla serumların yerini almışlar ve antikor ile ilgili reaksiyonlarda kullanılmışlardır (Köhler G., 1985).

Monoklonal antikorlar çok yüksek spesifiteye ve etkinliğe sahip olmaları nedeniyle tıp ve veterinerlik alanlarında çok fazla kullanılmaktadır. Monoklonal antikorlar enfeksiyon hastalıklarının araştırılmasında, tanısında ve tedavisinde kullanılabilirler. Enfeksiyon etkenlerinin (bakteri, virüs, mantar, parazit, vs.) alt gruplarının belirlenmesinde, çeşitli hücrelerin yüzey antijenik moleküllerine göre birbirinden ayrılmasında ve antijenik haritalarının çıkarılmasında, moleküllerin afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmasında, iyi bir protein yapısı elde etmek için prob olarak kullanılmasında, hormon ve ilaçların RIA tekniği ile belirlenmesinde, aşı üretiminde kullanılabilecek uygunlukta immünojenlerin seçilmesinde ve koruyucu antijen/epitopların tanımlanmasında, kan hücrelerinin yüzey moleküllerinin ve kan gruplarının belirlenmesinde, nörokimya ve embriyoloji alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Goding J.W., 1980; Coligan J.E. et al., 1991).

Monoklonal antikorlar, benzer histolojik görünümde olan tümörlerin yüzey antijenik moleküllerinin belirlenmesinde, kanda bulunan veya hücrelere bağlanmış olan tümör antijenlerinin ve alt tiplerinin tayininde, immünotoksinlerin hazırlanmasında, antitümör spesifik antikorlara bağlantılı sitotoksik ajanlarla terapide ve tümörle ilgili teşhise yönelik çalışmalarda kullanılmaktadırlar (Roitt I.M., Delves P.J., 2001).

Teorik olarak, herhangi bir enfeksiyöz ya da yangılı bir hastalığın klinik seyrini değiştiren bir monoklonal antikor üretilebilir. Bu hipotez, monoklonal antikorların çeşitli klinik hastalıklarda özellikle alloimmün ve otoimmün hastalıklarda kullanımına ilişkin çok sayıda çalışmanın yapılmasına öncülük etmiştir. Monoklonal antikorlar, romatoid artrit hastalığında yangının düzenlenmesinde, Rh-hemolitik, doku uyumsuzluğu reaksiyonu ve kronik iltihabi bağırsak hastalığı (Crohn hastalığı), kronik astım, lenfoma, miyokardiyal enfarktüs ve ülseratif kolit gibi birçok hastalığın önlenmesinde başarıyla kullanılmışlardır. Son yıllarda monoklonal antikorların sepsisin ve septik şokun patojenezisinin değişiminde kullanılması deneysel ve klinik alanda büyük ilgi uyandırmıştır (Pine La R.T., Hill R.T., 2001).

Monoklonal antikorların ve türevlerinin kanser tedavisinde kullanımına yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Öncü B ve olgun B lenfositlerinin yüzeyinde yer alan bir transmembran proteini olan CD20'e karşı üretilen bir kimerik IgG-1 olan Rituximab (Mabthera) kanser tedavisi için geliştirilen ilk mAb'dır. Günümüzde sadece insan kökenli bir mAb olan palivizumab (Synagis) respiratuvar sinsityal virüse yönelik olarak geliştirilmiş, prematüre bebeklerde bronşlarda ve akciğerlerde görülen displazi hastalığının tedavisinde başarıyla kullanılmıştır (Breedveld F.C., 2000).

Monoklonal antikorların kanser tedavisindeki kullanımına ilişkin bir diğer yöntem, tümör hücresinin etrafına zararlı radyasyon ışını yayabilen radyoaktif maddeleri antikorlara bağlayarak onları daha etkili hale getirmektir. Bu yöntemin avantajı, tümör belirleyicinin kodlandığı tek bir tümör hücresinin hedef alınması ile hücrenin yakınındaki diğer tümör hücrelerinin ölmesidir. Tümör hücreleri için toksik olduğu bilinen kemoterapötik ilaçlar da bu amaçla kullanılabilir. Bu yöntemde

sitotoksik ajanlar tümör hücrelerine özgü yönlendirmede kullanılarak, sistemik ilaç uygulamalarının doz sınırlayıcı yan etkileri olmaksızın tümör bölgelerinde yüksek konsantrasyonlarda etki edebilirler. Diğer yaklaşımlardan birisi de risin, difteri ya da *Pseudomonas* toksini gibi bitki ve bakteriyel biyolojik toksinlerin doğrudan monoklonal antikorlara bağlanarak kullanılmalarıdır. Bunlar hücre içine girdiklerinde düşük konsantrasyonlarda protein sentezini inhibe ederler ve insanlarda güçlü immün yanıt oluşumuna neden olurlar. Bu durum toksinlerin devamlı olarak kullanılmalarını kısıtlamaktadır. Doksorubisin ve Calicheamisin gibi ilaçlar doğrudan monoklonal antikorlara bağlanabilirler. Calicheamisinin bu şekilde vücuda verilmesi klinik alanda kullanımını sağlarken tek başına uygulanmasının ise tüm vücuda toksik etki yaptığı belirlenmiştir (Hörig H.et al., 2000; Harris M., 2004).

İlk klinik uygulamalarda fare monoklonal antikorları kullanılmıştır. Bu antikorların insanlarda tedavi amaçlı kullanımları üç temel nedenden dolayı kısıtlanmaktadır. (1) Spesifik efektör fonksiyonu yerine getirmek üzere farenin  $F_c$  domaininin, insan hücresel  $F_c$  reseptörleri ile etkileşiminde değişken özellik göstermesi, (2) monoklonal antikorların insan vücudundaki yarı-ömürlerinin oldukça düşük olması ve (3) bu antikorlar ile tedavi edilen hastaların yaklaşık %80’inde tekrarlanan dozlar sonrasında fare antikorlarına karşı immün yanıtın oluşmasıdır. İnsan anti-fare antikor (HAMA) yanıtlarının oluşması, mAb’ların tedavideki kullanılmalarını kısıtlayan en önemli engellerden biridir. Fare kökenli mAb ile yapılan tedavi sonrasında anafilaksi ve alerji oluşumu görülebilir ve bu şekilde uygulanan tedavi yönteminin etkisi önceki tedaviden daha az olabilir (Breedveld F.C., 2000; Dijk M.A. et al., 2001).

Son yıllarda genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak kimerik ya da bütünüyle insansı antikorların üretilmesi ve diğer tedavi uygulamalarıyla immün yanıtın baskılanması karşılaşılan bu sorunların çözümünde etkili olabilir. Kimerik antikor yapılarının %65-90’ı insan kökenlidir ve antijenin tanınmasından sorumlu fare değişken bölgelerinin insan antikorunun sabit ya da efektör bölgeleri ile birleşmesinden oluşurlar. İnsansı antikorların yaklaşık %95’i insan kökenlidir ve antikor spesifitesini belirleyen fare antikorunun çok değişken bölgesinin (hypervariable region) ya da tamamlayıcı determinant bölgelerinin (complementary

determining regions, CDR) bir insan antikor yapısına bağlanmasıyla elde edilirler. İnsan kökenli antikorlar fare antikorlarından daha düşük immünojenite gösterirler ve  $F_c$  kısmına bağlı fonksiyonların yerine getirilmesinde daha etkilidirler. Fare mAb'larının insan kan dolaşımındaki yarı ömrü iki gün iken kimerik mAb'ların yarı ömrü yaklaşık iki haftadan fazladır. Genetik yapısı değiştirilmiş transgenik fare üretiminin gelişmesi ve sentetik insan antikor kütüphanelerinin oluşturulmasındaki ilerlemeler, bütünüyle insansı antikorların ticari ölçekte üretimini mümkün kılmıştır (Bodey B., 2000; Harris M., 2004).

Hibridoma hücre DNA'sındaki ağır ve hafif zincirleri kodlayan bölgelerin gen kütüphanelerini oluşturmak amacıyla polimeraz zincir reaksiyonundan (PCR) yararlanılır. Bu yöntemde birçok ağır ve hafif zincir rastgele bir şekilde birleştirilerek oluşan  $F_{ab}$  klonlarının istenilen antijene karşı antikor aktivitesi tespit edilir. Bu teknoloji ile immünizasyona gerek kalmadan ve özellikle insan monoklonal antikorlarında olduğu gibi üretim güçlüğüyle karşılaşılmadan farklı spesifitede milyonlarca hücre klonu üretmek, bunların istenilen spesifitede olup olmadıklarını hızla belirlemek ve istenilen monoklonal  $F_{ab}$  yapılarını oluşturmak mümkündür (Benjamini E. et al., 2000; Breedveld F.C., 2000).

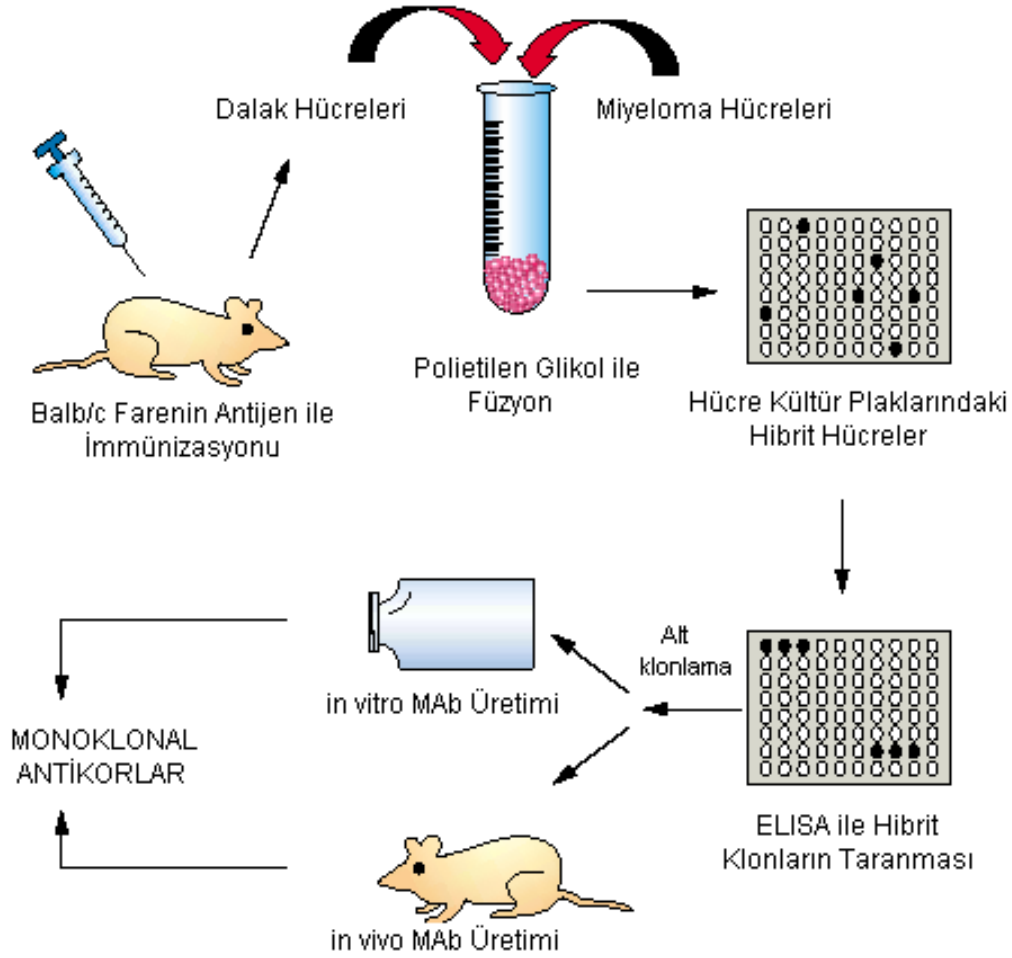
## **2.4. Hibridoma Teknolojisi ile Monoklonal Antikorların Üretilmesi**

Günümüzde monoklonal antikor üretiminde; klasik hibridoma teknolojisi ve immün antikor kütüphaneleri olmak üzere iki temel yöntem kullanılmaktadır. Monoklonal antikor salgılayan hibridomaların üretimi için uygun olduklarından fareler yaygın olarak kullanılırlar. Monoklonal antikor kütüphanelerinin üretiminde ise insan, fare, tavşan ve kuşlar kullanılır. Bir monoklonal antikoru tanı, araştırma ya da tedavi amacıyla kullanımı, monoklonal antikor üretiminde uygulanması gereken yöntemin seçilmesinde etkilidir. Tanılayıcı bir monoklonal antikor üretilmek isteniyorsa ve bol miktarda saf antijen varsa, en uygun yöntem bağışıklanmış fareler kullanılarak hibrit hücreler üretmektir. Ancak antijen saflaştırılamıyorsa antikor kütüphane oluşturma tekniği kullanılabilir (Coligan J.E. et al., 1991).

Uygun miyeloma hücre soylarının bulunmaması, hibridoma tekniğinin kemirgenler dışındaki türlerde yaygın olarak kullanımını engellemiştir. Birçok laboratuvarıda tavşan, koyun, sığır gibi kemirgen olmayan türler için hibridoma teknikleri geliştirilmiştir. Bu türler için hibridoma füzyonlarının kullanımı hetero-miyeloma füzyon eşleri ile mümkündür ve oluşan klonlar düşük kararlılık gösterdiklerinden bu yöntem yaygın olarak kullanılmaz (Coligan J.E. et al., 1991).

Monoklonal antikor üretim basamaklarını; 1. İmmünizasyonda kullanılacak antijen kaynağının, besiyerlerinin, mutant hücre soyunun ve hücre seçim metodunun belirlenmesi, 2. Hayvanların bağışıklanması ve immün yanıtın izlenmesi, 3. Füzyon, 4. Hibrit süpernatantların taranması, klonlanması ve dondurularak saklanması oluşturmaktadır (Stewart S.J., 2001).

Monoklonal antikor üretiminde doku kaynağı önemli yer tutar. Bağışıklanmış bir farede kompleks bir antijene yanıt olarak 1000-10 000 arasında antijene spesifik B hücreleri oluşur. Başarılı bir monoklonal antikor üretimi, bu B hücrelerinin yeterli miktarda seçilmesine ve üretilen antikorların etkili bir test yöntemi ile taranmasına bağlıdır. Bağışıklanmış hayvanlarda, immün yanıt oluşumu artmaya başladığında B hücre havuzunun seçimi önemlidir. Kanda sınırlı sayıda aktif B hücreleri bulunur. Bu nedenle, rekombinant antikor kütüphanelerinin ya da hibridomaların üretimi için kan uygun bir lenfosit kaynağı değildir. Farelerdeki en iyi aktif B hücre kaynağı dalaktır. Bağışıklanmış olgun bir farenin dalağı B hücrelerinin yaklaşık %54'ünü içerir. Kemik iliği ve lenf nodülleri gibi antijene spesifik plazmablastlarca zengin dokular da bu işlemler için uygundur (Thompson M.A., Cancro M.P., 1982; Berry J.D., 2004) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Monoklonal antikor üretimi (Shankar K.M. et al, 2000).

## 2.4.1. İmmünizasyon Protokolü

### 2.4.1.1. Antijen Saflığı

Hibridoma üretiminin önemli bir avantajı, saf antijen ile immünizasyon işleminin yapılabilmesi ve bu antijene özgü spesifikitenin tespit edilebilmesidir. Yüksek saflık derecesinde olan bir antijenle bağışıklık yapılması durumunda hibridoma üretimi daha başarılı olur. Bu durum sadece başarı şansını artırmakla kalmaz, immün yanıtın tayininde rastlanılan problemlerin ve harcanan zamanın da önemli oranda azalmasını sağlar (Stewart S.J., 2001).

Saflaştırılmış lenfokin ve sitokinleri, çözünmüş hücre membranlarını, SDS-poliakrilamid jellerden izole edilmiş protein bandlarını ve tüm hücreleri kapsayan birçok antijen preparatları monoklonal antikor üretiminde başarıyla kullanılmıştır. İmmünizasyonda kullanılacak antijen preparatının yapısı, antijenin hazırlanışındaki kolaylık, uygulanacak tarama testi, istenilen özellikte monoklonal antikor üretimi gibi birçok faktöre bağlıdır. İstenilen özgünlükte monoklonal antikor salgılayan hibridomaların sayısını artırmak için saflaştırılmış antijenle bağışıklama yapılması uygundur. Protein saflaştırma işlemi ile moleküller çoğunlukla denatüre olduklarından ve doğal formlarında bulunmadıklarından, sentetik peptidler ve saflaştırılmış proteinlerle immünizasyon sonucunda antijeni denatüre formda tanıyan monoklonal antikorlar üretilir. Bu tür monoklonal antikorlar immün presipitasyon ve immün blot çalışmalarında kullanılırlarken, hücre yüzey antijenlerinin flow sitometri testlerinde ya da antijenin doğal formda bağlandığı fonksiyonel testlerde kullanılamazlar (Coligan J.E. et al., 1991).

İmmünojen preparatlarındaki kontaminantlar istenmeyen antikor yanıtlarına neden olur. Hücre artığı, BSA stabilizatörleri ya da doku kültüründeki FBS gibi kontaminantlar farelerde antikor yanıtının oluşmasına yol açabilirler. Saflaştırılmış virüs preparatları ve rekombinant proteinler gibi saf antijenler ideal immünojenlerdir ve yüksek kaliteli monoklonal antikor üretiminde etkin bir şekilde kullanılabilirler (Berry J.D., 2004).

#### **2.4.1.2. Hayvan Seçimi**

Monoklonal antikor üretiminde fare, sıçan, hamster ve tavşan gibi hayvan türleri kullanılabilir. Belirli bir türün dalak hücreleri kemirgenlerin miyeloma hücre soyu ile kararlı monoklonal antikor oluşturan hibridomalar üretebilmelidir. Filogenetik olarak fareden farklı hayvanlar kullanılarak kararlı monoklonal antikor üreten hibridomalar elde etmek oldukça güçtür. İnsan antijenleri gibi çoğu ksenogenetik antijen için en iyi seçim farelerdir. Bunların bakımı daha kolaydır ve her bir farede Ig izotipine spesifik anti-Ig antikorları yaygın olarak bulunmaktadır. Genellikle fare monoklonal antikorunu saflaştırmak sıçan monoklonal antikorundan daha kolaydır. İmmünizasyon için en uygunu BALB/c türü faredir. Bu farelerin

dalakları genelde diğer fare suşlarının dalaklarından daha büyüktür. Ayrıca füzyon sonucunda oluşan hibridomalar tamamen BALB/c kökenli olacağından asit sıvı üretimi için hibrit hücreler bu farelerde üretilmelidir (Coligan J.E. et al., 1991). Farelerin farklı inbred soyları arasında immün yanıtın oluşumu bakımından önemli derecede bir varyasyon vardır. Özellikle SJL fareleri genellikle güçlü bir immün yanıt oluşumuna neden olurlar. Aktif hibritlerin üretilmesinde güçlükle karşılaşılsa farklı fare suşları kullanılabilir (Ledbetter, J.A., Herzenberg L.A., 1979).

Son yıllarda dalak hücre vericisi olarak farelerden daha çok sıçanların kullanımı önem kazanmıştır. Sıçanlarda hibridomalar *in vivo* üretildiklerinde daha fazla hacimlerde asit sıvı ya da serum salgırlar. Sıçan IgG moleküllerinin stafilokokal protein A'ya bağlanması ise bir dezavantajdır. Bu durumda bazı antikor saflaştırma yöntemleri kullanılmalıdır (Ledbetter, J.A., Herzenberg L.A., 1979; Goding J.W., 1980). Normal donör ile miyeloma hücresi arasında ne kadar büyük bir filogenetik ayrım olursa, o kadar kararsız hibritler elde edilir. Sıçan-fare hibritleri oldukça başarılı sonuçlar verirken tavşan-fare hibritlerinde aynı başarı elde edilememiştir (Goding J.W., 1980).

İmmünizasyonda kullanılacak farelerin yaşam süreleri ve zamanla fibroblastların gelişme gösterme olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır. Tipik olarak, 6-8 haftalık fareler immünize edilir ve 6 ay içinde füzyon gerçekleştirilir. Çeşitli nedenlerle oluşabilecek ölüm riskine karşılık en az üç fare benzer bir şekilde immünize edilmelidir (Stewart S.J., 2001). Konukçu hayvanın cinsiyeti immünizasyon işlemi için önemli değildir. İmmünizasyon işlemi uzun sürebileceğinden çoğunlukla genç hayvanların bağışıklanması tavsiye edilir. Yaşlı hamsterların (>6 ay) dalakları kullanılarak elde edilen hibrit hücreler fazla miktarda fibroblast içerebilirler (Coligan J.E. et al., 1991).

#### 2.4.1.3. İmmünizasyon

Normal dalak vericisinin immünizasyonu iki temel amaca yönelik olarak gerçekleştirilir. İmmünizasyonun ana fonksiyonu, B hücrelerinin bölünmesini ve hibrit oluşturabilecek hücrelere farklılaşmasını sağlamaktır. Diğer bir amacı ise,

istenilen klonları çoğaltmak ve böylece uygun hibritin elde edilme şansını artırmaktır (Goding J.W., 1980).

İlk immünizasyon subkutan (deri altı) olarak gerçekleştirilir ve karın bölgesinde 2-4 farklı yere eşit olarak dağıtılır. İkinci immünizasyon intraperitoneal (karın zarı boşluğu) olarak uygulanır. Son immünizasyon ise füzyondan 3-4 gün önce kuyruk damarından intravenöz (damar içi) olarak verilir. Böylece immünojenin dalağa ulaşması ve B hücrelerinin maksimum uyarımı sağlanabilir (Stewart S.J., 2001). İmmünizasyonun çoğu intraperitoneal olarak uygulandığında iyi sonuçlar elde edilebilir. Birçok araştırmacı son immünizasyonun adjuvansız intravenöz olarak uygulanmasını önermektedir. Bu işlem farede kuyruk damarından olurken, sıçanda ya da hemstırda genellikle intravenöz enjeksiyonlar uygulanamaz. Bu tür intravenöz immünizasyonların öldürücü sistemik reaksiyonlara neden olabileceği unutulmamalıdır (Coligan J.E. et al., 1991).

Ardı ardına uygulanan immünizasyon işlemleri arasında geçen zaman üretilen antikorun affinitesini büyük ölçüde etkiler. İki immünizasyon arasında geçen zaman arttıkça, antijen seviyeleri azalır ve sadece yüksek affiniteli B hücreleri son immünizasyona yanıt verir. Oluşan yanıt çoğunlukla daha immünojenik antijene karşı gerçekleşir. Bu olayın büyük bir kısmı antijenle aktif hale gelmiş B hücreleri ve foliküler dendritik hücreler tarafından oluşturulan germinal merkezlerde meydana gelir (Stewart S.J., 2001).

Sekonder bir bağışık cevap sırasında ortalama antikor affinitesinin artması ve izotip sınıf dönüşümünün olabilmesi için 4-5 günlük bir zamana ihtiyaç vardır. İmmün sistemin spesifik bir immünojene karşı ilk yanıtı IgM antikor üretimi şeklinde gerçekleşir. Bu yanıtın oluşumundan sonra, her bir B hücresi kendi immüoglobülin izotipinden bir sınıf değişimi geçirebilir. Son hatırlatma olarak bilinen immünizasyon işleminden önce en az 3 haftalık bir dinlenme periyodu izlenirse, oluşan ürünlerin IgG ve IgA alt sınıfı antikorlar oldukları görülür. Sandwich ELISA testi ile antikorun belirlenmesi, antijenin immün afinite yöntemiyle saflaştırılması gibi birçok antikor kullanım alanlarında, stabiliteleri ve fiziksel avantajları bakımından IgM izotipinden üstün olduklarından genellikle IgG antikorları tercih edilir (Stewart S.J., 2001).

Genel olarak, bozulmamış hücreler üzerinde yer alan hücre yüzey antijenleri oldukça immünojenik olduğundan birçok araştırmacı bunlarla birlikte adjuvanların kullanımına gerek duymamıştır. Diğer taraftan, çözünür proteinler genellikle sulu çözeltide çok zayıf immünojenik özellik gösterirler. Bu nedenle çözünür antijenlerle *B. pertussis* organizması içeren complete Freund veya incomplete Freund adjuvanları kullanılmıştır (Goding J.W., 1980).

## 2.4.2. Füzyon Protokolü

### 2.4.2.1. Miyeloma Hücrelerinin Seçimi

Kullanılan tipik mutant hücre soyları SP2/0-Ag-14, P3-X63-Ag8.653, S194/5.XXO ve FO'dır (Delves P.J., 1997). Bu miyeloma hücre soylarının tümü BALB/c kökenlidir. Bunlar immünoglobülin salgılamazlar ve yaygın olarak füzyon için kullanılırlar. Bu hücre soyları %5 CO<sub>2</sub>, %96 nem ve 37°C ortam koşullarını sağlayan steril bir inkübatörde muhafaza edilmelidir ve 3-6.10<sup>5</sup> hücre/ml'de log fazında üremeye bırakılmalıdır (Stewart S.J., 2001). Birçok sıçan ve fare tümör hücre soyu başarıyla kullanıldığı gibi SP2/0-Ag-14 fare hücre soyu hafif ya da ağır zincir içermeyen bir miyeloma hücresi olduğundan monoklonal antikor üretiminde tercih edilir (Coligan J.E. et al., 1991).

Hibridoma üretiminde kullanılan en yaygın hücre dizileri, IgG<sub>1</sub> moleküllerini salgılayan bir BALB/c miyeloma hücresi olan MOPC-21'dir. Bu hücre dizisi Horibata ve Harris (1970) tarafından doku kültüründe çalışılmış ve P3K olarak yeniden isimlendirilmiştir. P3K'nın azoguanine dirençli bir alt dizisi Milstein'in laboratuvarında tespit edilmiş ve P3-X63-Ag-8 olarak adlandırılmıştır. Bu hücre dizisine kısaca X63 denilmektedir ve ilk kez dalak-miyeloma füzyonlarında kullanılmıştır. Bu füzyonlar sonucunda, X63'ün  $\gamma_1$  ve  $\kappa$  zincirlerinin yanı sıra dalak hücreleri ile birlikte immünoglobülinlerin salgılandığı görülmüştür. Daha sonra  $\gamma_1$  ağır zincirini içermeyen ve P3-NS1-Ag4-1 olarak isimlendirilen bir hücre dizisi mAb üretiminde yaygın olarak kullanılmıştır (Goding J.W., 1980).

IR 983F ve YB2/O hücrelerini içeren sıçan miyeloma hücreleri sıçan hibridomalarının üretimi için geliştirilmiştir. Ayrıca sıçanların Lou suşundan kökenlenen ve ağır zincirler yerine  $\kappa$  zincirlerini salgılayan 210-RCY3-AG1 sıçan miyeloma dizisi de elde edilmiştir (Delves P.J., 1997; Stewart S.J., 2001). GM4672 gibi lenfoblastoid hücre soyları ile füzyon sonucunda insan-insan hibridomaları başarıyla üretilebilmiştir (Newkirk M.M. et al., 1993).

#### 2.4.2.2. Besleyici Hücreler

Besleyici hücreler genellikle timositler, makrofajlar ya da fibroblastlardır. Füzyon ürünlerinin çoğalmalarını sağlamak amacıyla birlikte kültüre edilirler. Bu hücreler kültürde zamanla ölürler fakat fibroblastların bölünmelerini ve hibritlerden daha fazla çoğalmalarını önlemek amacıyla bu hücreler radyasyona maruz bırakılmalıdırlar. Besleyici hücrelerin eklenmesi kültür için her zaman avantaj sağlar ve birçok araştırmacı tarafından bunun gerekli olduğu düşünülmektedir (Stewart S.J., 2001).

#### 2.4.2.3. Füzyon

1970'li yılların başından itibaren iki somatik hücrenin birleştirilmesi ile heterokaryon adı verilen bir hibrit hücre elde etmek mümkündür. Füzyon işlemi, iki hücrenin Sendai virüsü denilen aktif olmayan zarflı virüs ya da polietilen glikol (PEG) ile inkübe edilmesiyle gerçekleştirilebilir. Bu yöntemlerle plazma membranları birleştirilerek iki ayrı hücrenin sitoplazma ve çekirdeği tek bir hibrit hücrede biraraya getirilir (Kuby J.,1994; Stewart S.J., 2001).

Füzyon protokolleri için yaklaşık  $10^8$  miyeloma hücresine ihtiyaç duyulur. Miyeloma hücreleri eksponensiyal büyüme safhasında olmalıdırlar. Eğer hücreler aşırı çoğalmışlarsa ya da canlılıkları %98-99'dan az ise başarılı bir füzyonun gerçekleşme olasılığı düşüktür. Füzyon sırasında dalak hücreleri ile miyeloma hücrelerinin birleşme oranı önemli olmamakla birlikte en iyi sonuçlar 1:1-10:1 (dalak:miyeloma) arasındaki oranlarda elde edilmiştir (Goding J.W., 1980).

Hibrid hücrelerin canlı kalabilmeleri için füzyondan sonraki ilk 10 gün en kritik dönemdir. Diploid bir fare hücresi 40 kromozom içerdiğinden bir hibrit hücre ortalama 80 kromozom içerir. Fakat, ilk birkaç gün içinde bu kromozomların birçoğu travmatik ve kararsız membran füzyon olaylarından dolayı kaybolur. Sonuç olarak belirli kromozomların kaybolması; hücre ölümüne, hücre üremesinin durmasına, immünoglobülin sentezleme yeteneğinin kaybolmasına ve buna bağlı olarak monoklonal antikor üretmeyen hibritlerin oluşmasına neden olur (Stewart S.J., 2001).

#### 2.4.2.4. Hücre Seçimi

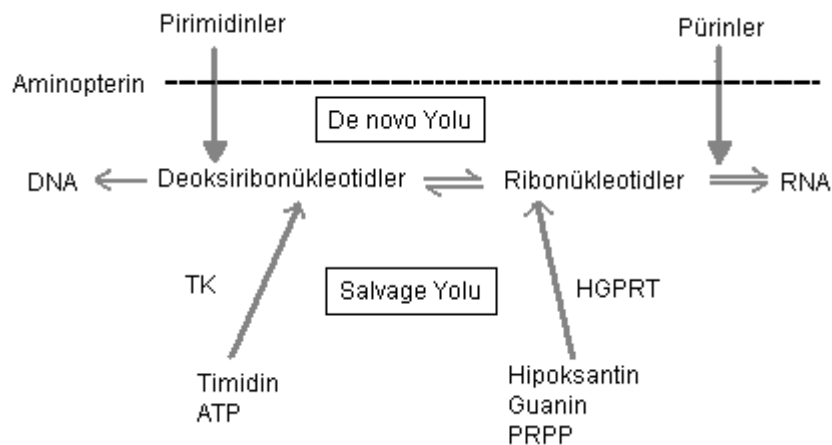
Füzyon işleminden sonra kültürde birçok hücre tipi bulunur. Fakat, hibridomalar ve birleşmemiş miyeloma hücreleri dışında bu hücrelerin tümü ölür. Miyeloma hücreleri hibritlerden daha fazla çoğalacağı için hibridomaları spesifik olarak seçmek gerekir. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan yöntem, hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) enziminden yoksun miyeloma hücre soylarını kullanmak ve hücreleri HAT içeren seçici bir besiyerinde kültüre etmektir. HAT besiyeri, de novo yolunu bloke eden aminopterin ve salvage yolu ile DNA sentezini sağlayan hipoksantin ve timidin içerir. Bu nedenle sadece hibrit hücrelerinin üremesine izin verir (Kuby J., 1994; Stewart S.J., 2001).

Normal hücreler her iki sentez yolunu kullanarak nükleotid sentezlerler. Bu hücrelere 8-azoguanin eklendiğinde, hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) enzimi ile katalizlenen salvage yoluyla 8-azoguanin hücrelerin DNA'sına girer. Baz değişikliği nedeniyle fonksiyon gösteremeyen bu tür hücreler ölürler. HGPRT içermedikleri için salvage yolu kullanamayan hücreler, 8-azoguanine dirençlidirler ve ölmezler. Bu tür HGPRT<sup>(-)</sup> mutantlar 8-azoguanin kullanılarak seçilebilir ve immünoglobülinin H ve L zincirlerini üretme yeteneğine sahip olmadıklarından füzyon için miyeloma hücreleri olarak kullanılabilirler (Golub E.S., Green D.R., 1991).

İlk kez 1964 yılında Littlefield tarafından, pürin ve pirimidinlerin temel biyosentetik yolunun folik asit antagonisti olan aminopterin tarafından bloke edilebileceği öne sürülmüştür. Aminopterin, bir seri karbon transferini önler ve

dihidrofolatın tetrahidrofata dönüşümünü sağlayarak temel sentetik yolda önemli rol oynar. Aminopterin varlığında hücre de novo yolu ile nükleotid sentezi yapamaz ve bu nedenle salvage yolunu kullanmak zorunda kalır. Normal bir hücre aminopterin varlığında canlılığını korurken bir HGPRT<sup>(-)</sup> hücresi üreyemez. Normal B hücreleri HGPRT enzimine sahip olduğundan HGPRT<sup>(-)</sup> miyeloma hücreleri ile birleştirildiğinde oluşan hibridomalar aminopterin varlığında üreyebilirler (Stewart S.J., 2001).

De novo yolu çalışmadığında, hücre pürin ve pirimidin sentezinin yapıldığı salvage yolunu kullanarak DNA sentezleyebilir. Salvage yolunu katalizleyen enzimler hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) ve timidin kinazdır (TK). Bu enzimlerin herhangi birinde meydana gelen mutasyon salvage yolunu bloke eder. Bu nedenle eğer ortamda TK ve HGPRT enzimleri bulunursa ve hücreye timidin ile hipoksantin sağlanırsa DNA sentezi gerçekleşebilir. Eğer dalak hücreleri TK ve HGPRT enzimlerini içermeyen miyeloma hücreleri ile birleştirilirse hipoksantin, aminopterin ve timidin (HAT) içeren bir besiyerinde sadece hibrit hücreler üreyebilir. Doku kültüründe uzun süre yaşayamadıklarından birleşmeyen normal dalak hücreleri, aminopterin varlığında ise birleşmeyen miyeloma hücreleri ölür. Bu işleme HAT seçimi denir (Goding J.W., 1980; Golub E.S., Green D.R., 1991; Stewart S.J., 2001) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. HAT kültür ortamında bulunan aminopterin ile de novo yolunun inhibe edilmesi ve salvage yolunun kullanılması (Abbott C., Povey S., 1995).

### 2.4.3. Klonlama

Spesifik olarak monoklonal antikor ürettiği tespit edilen hibrit hücreler klonlanabilir. Hücreler oluşan hibritlerin gerçekten monoklonal özellikte olup olmadıklarından emin olmak ve onları ortamdaki monoklonal antikor üreticisi olmayan diğer hibritlerden ayırmak amacıyla klonlanırlar. Klonlama işlemi ile tek tip hibrit hücresinin izolasyonu ve çoğaltılması amaçlanır (Goding J.W., 1980; Stewart S.J., 2001).

Pratikte hücre klonlanmasında kullanılan iki yöntem bulunmaktadır. En yaygın kullanılan klonlama yöntemi olan alt klonlamada temel amaç, hücreleri füzyon plaklarındaki her bir kuyucukta tek bir hücre bulununcaya kadar seyreltmektir. Füzyondan sonra hücrelerde sıklıkla kromozom kaybı görülür ve bu nedenle ilk klonlama ile sadece az miktarda aktif hücre elde edilebilir. İlk klonlama işlemi birkaç kez tekrarlanmalı ve herbir klonlama sonrasında klonlama verimliliği ve aktif hücre sayısı artmış olmalıdır. Sonunda hücreler kısmen kararlı hale geleceklerdir. Klonlama için kullanılan ikinci yöntem ise agaroz jel gibi katı bir besiyerinde hücreleri üretmektir. Çeşitli jel sistemlerine serum, aminoasit ve antibiyotik eklenerek hücrelerin üremesi sağlanır. Oluşan hücre kümeleri pastör pipeti yardımıyla besiyerinden toplanıp füzyon plaklara konularak çoğaltılabilirler (Milstein C., 1980).

### 2.4.4. Monoklonal Antikorlarının Depolanması

Hibrit hücrelerin ölümsüzlük özelliklerinin korunması amacıyla dondurularak saklanmaları gerekir. Antikorlar genelde oldukça dayanıklı moleküller olmalarına rağmen doğru şekilde saklanmazlarsa aktivitelerini kaybedebilirler. Özellikle immünoglobülinin konsantrasyonu düşük ise, hücreyi sürekli dondurma ve yeniden çözme işlemleri denatürasyona neden olur. Kültür sıvısının, serumun ya da saflaştırılmış hibridoma proteinlerinin liyofilizasyonu genelde aktivite kaybına yol açar. Hücreler dondurulmadan saklanırlarsa kontaminasyon ve mutasyon riski taşırlar. Antikor üreten hibritler  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de sıvı azot içerisinde dondurularak saklanabilirler.  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de dondurma işlemi memeli hücrelerinin uzun süreli

muhafazası için yeterli değildir. Dondurma öncesi hücreler dimetil sülfoksit (DMSO) içeren besiyerine konurlar. DMSO dondurma işlemi sırasında oluşan buz kristallerinin oluşumunu ve hücre içi organellerin zarara uğramalarını önler (Milstein C., 1980; Stewart S.J., 2001).

#### 2.4.5. Hibridoma Üretiminde Karşılaşılan Güçlükler

**a. Enfeksiyon:** İyi bir doku kültürü tekniği kullanıldığında bakteriyel enfeksiyon oluşma riski azalır. Birçok araştırmacı güvenlik ajanı olarak penisilini ve streptomisini (100 µg/ml) tercih etmektedir.

**b. Üretim kaybı:** Bazı hibritler doğal olarak diğerlerinden daha kararlı olsalar da, hibrit hücreler genellikle kromozom kaybetme eğilimine sahiptirler. Bu nedenle, tekrarlı klonlama işlemlerine rağmen, bazı hücre dizilerinde üretim kaybı gözlenir. Başlangıçta pozitif sonuç veren kültürlerin %50-70'inde aktivite kaybı olacaktır. Sağlıklı bir kültürde antikor üretiminin düşmesi, üretici olmayan varyantların aşırı ürediğinin bir göstergesidir. Hibridoma üretiminde hücre gelişiminin invert faz mikroskobu kullanılarak sürekli izlenmesi çok önemlidir.

**c. Hatalı HAT seçimi:** Hücreler iyi üreme gösterdikleri halde tüm süpernatantlar antikor üretimi bakımından negatif sonuçlar veriyorsa, bu durum HAT seçiminde bir hata olduğunu gösterir. Aminopterin bozulması da bu duruma neden olabilir. HAT seçiminin etkinliği, miyeloma hücrelerinin birkaç gün HAT besiyerinde üretilmesi ile test edilebilir (Goding J.W., 1980).

### 2.5. ELISA Yöntemi (Enzime Bağlı İmmünolojik Tanı Yöntemi)

Günümüzde enzim substrat ilişkisini temel alan bütün çalışmalar için kullanılan ELISA teknikleri, 1960'lı yıllardan beri giderek artan yoğunlukta biyolojik ve biyokimyasal çalışmalarda kullanılmaktadır. Avrameas ve Uriel (1966), ilk olarak enzim işaretli konjugatları dokudaki antijenleri belirlemede kullanmışlar ve bu konjugatların en az floresan konjugatlar kadar spesifik olduğunu göstermişlerdir.

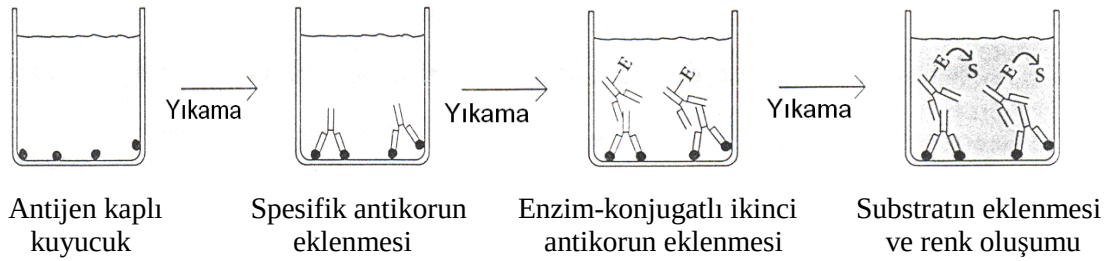
Engvall ve Perlmann ile Van Weeman ve Schuurs (1971), eş zamanlı ancak farklı enzimler kullanarak ELISA'yı ilk kez serolojik yöntem olarak kullanmışlardır. Bu yöntemin serumun tüm elemanları ile reaksiyon verme yeteneği serolojik çalışmalarda önemini artırmıştır. İşaretli konjugat ve hedef molekül arasındaki ilişki sadece protein-protein ile sınırlı kalmayıp protein-glikoprotein, protein-glikolipid, glikoprotein-glikolipid ve karbohidrat-protein ilişkilerinde de başarıyla kullanılmaktadır (Engvall E., Perlmann P.O., 1971).

Bu yöntem fetal gelişimin izlenmesinde, enfeksiyon hastalıklarında, adli tıpta ve moleküler biyolojik yöntemlerin kullanıldığı ürünlerdeki mutajenik kirlenmelerin belirlenmesi gibi birçok alanda kullanım imkanı bulmuştur. Diğer klasik serolojik tekniklere olan üstünlüğü ise sadece konjugatın çeşitliliği ile sınırlı değildir. ELISA yöntemi antijen-antikor ve enzim-substrat ilişkisinin katkısı ile son derece özgül, duyarlı, hızlı, basit ve aynı anda çok sayıda örneğin çalışılmasına imkan veren otomatizasyon özelliklerine sahiptir. Ayrıca konjugasyon işleminde kolay elde edilir, toksik olmayan ve uzun ömürlü enzimlerin kullanılması, bu yöntemi RIA ve floresan antikor yöntemine göre daha avantajlı hale getirmiştir (Köksal F., 2000).

ELISA yöntemi bir serolojik testten beklenen antijeni veya antikoru ölçebilme, kalitatif ve kantitatif sonuçlar üretebilme, antikor alt gruplarını belirleyebilme, avidite/affinite, materyallerinin kolay bulunabilir, ucuz ve güvenilir olması gibi tüm özelliklere sahiptir. ELISA testi, antikor ya da antijenin tespitinde ve miktarının belirlenmesinde kullanılır. Antijen ya da antikoru bilinen konsantrasyonlarına dayalı standart bir eğri hazırlanarak bir örneğin bilinmeyen konsantrasyonu belirlenebilir. Genellikle antikor antijenin tanımlanmasını sağlayan bir enzimle işaretlenir. ELISA testlerinde en yaygın kullanılan enzimler horseradish peroksidaz (HRP) ve alkalin fosfat (AP)'dir. Yaygın olarak kullanılmamakla birlikte  $\beta$ -galaktosidaz, asetil kolinesteraz ve katalaz enzimleri de bulunmaktadır (Kuby J., 1994).

Spesifik antikorları, çözünür antijenleri ya da hücre-yüzey antijenlerini tespit etmek amacıyla altı farklı ELISA sistemi kullanılmaktadır:

**a. Spesifik antikorları tespit etmede kullanılan dolaylı ELISA:** Mg seviyelerinde saf ya da yarı-saf haldeki antijen varlığında, antiserumların ya da spesifik antikorlar için hibrit üst sıvılarının taranmasında bu immünoassay kullanılır. Antikorlar, antijenlerin ELISA plaklarındaki kuyucuklara adsorbe edilmesi, kaplanan plakların spesifik antikorları içeren örnekler ile inkübe edilmesi ve bağlanmayan antikorların yıkanarak uzaklaştırılması ile tespit edilirler. Protein A, protein G ile bağlı alkalen fosfataz gibi konjugatlar kuyucuklara eklenir. İnkübasyondan sonra bağlanmayan konjugat yıkanarak uzaklaştırılır ve substrat eklenir. İkinci bir inkübasyondan sonra hidroliz olan substrat miktarı bir spektrofotometre ya da spektrofiorometre ile belirlenir. Ölçülen substrat miktarı örnekte bulunan spesifik antikorun miktarı ile orantılıdır (Kuby J., 1994) (Şekil 2.4).

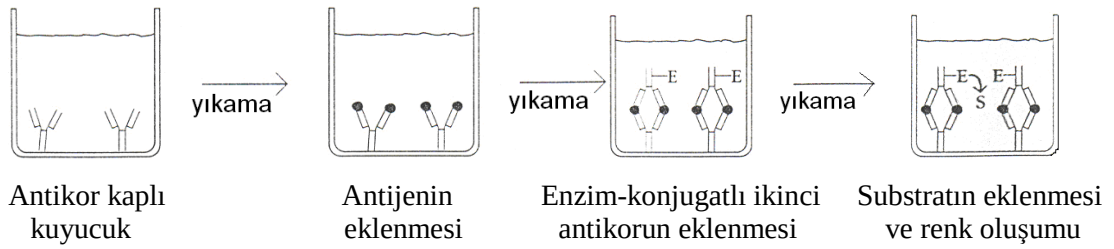


Şekil 2.4. Dolaylı ELISA yöntemi (Kuby J., 1994)

**b. Çözünür antijenleri tespit etmede kullanılan dolaysız yarışmalı ELISA:** Bu yöntem çözünür antijenlerin tespitinde ya da miktar tayininde kullanılır. Spesifik bir antikorun veya mg seviyelerinde saf ya da yarısaf haldeki antijenin varlığında kullanımı uygundur. Çözünür antijenlerin belirlenmesi için ELISA plakları antijen ile kaplanır ve bu plaklara bağlanan spesifik antikor-enzim konjugatları, çözünür antijen içeren örnekler ile inhibe edilirler. Antijen kaplı kuyucuklarda inhibitör antijen ile antikor-enzim konjugat karışımının inkübasyonundan sonra, bağlanmayan konjugat yıkanarak uzaklaştırılır ve substrat eklenir. Örneklerde bulunan antijen miktarı, substrat hidrolizinin inhibisyonu ile orantılıdır ve antikor solüsyonunun seri dilüsyonları ile oluşturulan standart antijen-inhibisyon eğrisinden tespit edilir (Kuby J., 1994).

**c. Çözünür antijenleri tespit etmede kullanılan antikor-sandviç ELISA:** Antijenin direkt olarak katı faza bağlandığı ELISA yöntemlerinden 2-5 kat daha

duyarlı olduğundan antijen tayini için en kullanışlı yöntemdir. Antijeni belirlemek amacıyla kuyucuklar spesifik tutuklayıcı antikor ile kaplanır ve daha sonra antijen içeren örnekler ile inkübe edilir. Bağlanmayan antijen yıkanır, enzime bağlı farklı bir antijen-spesifik antikor eklenir ve daha sonra bu konjugat ile antijen inkübe edilir. Bağlanmayan konjugat yıkanarak uzaklaştırılır ve ardından substrat eklenir. İnkübasyon işleminden sonra, substrat hidrolizinin derecesi ölçülür. Hidroliz edilen substrat miktarı, örnekte bulunan antijen miktarı ile orantılıdır (Kuby J., 1994) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Sandviç ELISA yöntemi (Kuby J., 1994).

**d. Spesifik antikorların tespiti için kullanılan çift antikor-sandviç ELISA:** Bu yöntem, az miktardaki spesifik antikor varlığında ve saf antijenin olmadığı durumlarda spesifik antikorların taranmasında, aynı antijene karşı üretilen farklı monoklonal antikorların epitop haritalanmasında kullanılabilir. ELISA plakları, bağışıklanan türden elde edilen immünoglobülin için spesifik tutuklayıcı antikorlar ile kaplanır. Test edilecek antikor karışımı kuyucuklara ilave edildikten sonra plaklar yıkanır ve antijenle inkübe edilir. Tekrar yıkama işleminin ardından enzime bağlı spesifik antikor ile inkübasyondan sonra bağlanmayan konjugat yıkanarak uzaklaştırılır ve substrat eklenir. Hidroliz için pozitif sonuç veren kuyucuklar antijene spesifik antikorları içerir (Coligan J.E. et al., 1991).

**e. Hücre-yüzey antijenlerinin tespitinde kullanılan dolaysız hücresel ELISA:** Hücre-yüzey antijenlerinin ya da reseptörlerinin ekspresyonu, mevcut antikorlar ya da hücre-yüzey moleküllerine spesifik diğer ligandlar kullanılarak ölçülür. Hücreler bir hücre-yüzey molekülüne spesifik antikorlara bağlı enzim ile inkübe edilirler. Bağlanmayan konjugat yıkanarak uzaklaştırılır ve substrat eklenir. Antijen ekspresyon seviyesi, hidroliz edilen substrat miktarı ile orantılıdır. Bu yöntem bir

hücre popülasyonu üzerindeki antijen ekspresyon seviyesinin ölçülmesinde flow sitometri analizi kadar duyarlıdır (Coligan J.E. et al., 1991).

**f. Hücre-yüzey antijenleri için spesifik antikorların tespitinde kullanılan dolaylı hücresel ELISA:** Yüzey antijenlerine karşı üretilen antikorlar, tüm hücrelerin primer antikoru içeren bir örnekle inkübe edilmesi sayesinde tespit edilirler. Bağlanmayan antikor yıkanarak uzaklaştırılır ve hücreler daha sonra primer antikora spesifik antikorlara bağlı bir enzim ile inkübe edilirler. Bağlanmayan enzim konjugatı yıkanarak uzaklaştırılır ve substrat solüsyonu eklenir. Bağlanan primer antikorun seviyesi hidrolize olmuş substrat miktarı ile orantılıdır (Coligan J.E. et al., 1991).

## 3. MATERİYAL VE YÖNTEM

### 3.1. MATERİYAL

#### 3.1.1. Cihazlar

Laminar kabin (Heraeus)  
 CO<sub>2</sub> inkübatör (%5 CO<sub>2</sub>, %96 nem ve 37°C) (VTB Binder)  
 Invert mikroskop ve ışık mikroskobu (Nikon)  
 ELISA okuyucu (Bio-Tek)  
 Spektrofotometre (Bio-Rad)  
 Yüksek hızlı santrifüj (Beckman)  
 Masaüstü santrifüj (Heraeus)  
 Sıvı azot tankı (Tylor-Wharton)  
 Buzdolabı (-20°C ve -70°C derin dondurucu) (Arçelik)  
 Manyetik karıştırıcı (IKA-Labortechnik)  
 Sıcak su banyosu (37°C) (Memmert)  
 Vorteks (IKA-Labortechnik)  
 Mikropipet (0.5-1000 µl) (Trefflab)  
 8 kanallı pipet (Trefflab)  
 Pipet tabancası (Eppendorf)  
 Pleyt yıkayıcısı (Sigma)  
 Filtrasyon sistemi (Milipore)

#### 3.1.2. Steril Malzemeler

96 kuyucuklu ELISA ve füzyon plakları (TPP)  
 Kültür kapları (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 150 cm<sup>2</sup>) (TPP)  
 Santrifüj tüpleri (10 ml ve 50 ml) (TPP)  
 Dondurma tüpleri (TPP)  
 4, 6 ve 24 kuyulu kostar (TPP)  
 Otoklavlanabilir cam şişe (100-1000 cc) (Iso Lab)  
 Petri kapları (Iso Lab)  
 Cam pipet (1-25 cc) (Iso Lab)

Cam baget (Iso Lab)  
 Hücre küreği (TPP)  
 Enjektör (1-5 cc) (Hayat)  
 0.22 µm filtre (Sartorius)  
 Thoma lamı (Iso Lab)  
 Eppendorf tüpler (0.5, 1.5 ml)  
 Makas, pens, süzgeç

### 3.1.3. Kimyasal Maddeler

Freund's Complete (FCA) ve Incomplete Adjuvantı (FIA) (Sigma)  
 Anti-fare polivalen antikoru alkalen fosfataz (AP) konjugatı (Sigma)  
 Anti-fare IgG-AP konjugatı (Sigma)  
 Anti-fare IgM-AP konjugatı (Sigma)  
 Para-nitrofenil fosfat (PNPP) (Merck)  
 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Gibco)  
 RPMI-1640 medium (Gibco)  
 8-Azoguanin (Sigma)  
 Polietilen glikol (PEG-4000) (Merck)  
 Sığır Serum Albümini (BSA) (Applichem)  
 Fetal Sığır Serum (FBS) (Biochrom)  
 Süt tozu (Pınar)  
 Hipoksantin aminopterin timidin (HAT) (Gibco)  
 Hipoksantin timidin (HT) (Gibco)  
 Gentamisin (Gibco)  
 β-merkapto etanol (Gibco)  
 Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma)  
 Glisin (Merck)  
 MgCl<sub>2</sub> (Sigma)  
 ZnCl<sub>2</sub> (Sigma)  
 Hepes (Sigma)  
 Sodyum sitrat (Merck)  
 Amonyum sülfat (Merck)

Tween 20 (Merck)  
 NaHCO<sub>3</sub> (Merck)  
 NaOH (Merck)  
 KOH (Merck)  
 Monoklonal antikor izotip kiti (Roche)  
 Albümin bovin serum (ABS) (Sigma)  
 Lizozim (Sigma)  
 Jelatin (Sigma)  
 Diyaliz membranı (Sigma)

### 3.1.4. Antijenler

Karsinoembriyonik Antijen (CEA) (Fitzgerald Inc.)  
 Alfa-fetoprotein (AFP) (Fitzgerald Inc.)

### 3.1.5. Hücreler

Hibridoma çalışmalarındaki hücre soyları Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Füzyon işleminde kullanılan hücreler

| Hücre                         |                          | Kaynak             |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------|
| Miyeloma tipleri              | P3X63Ag 8.653            | ATCC CRL-1580      |
|                               | FO                       | ATCC CRL -1646     |
| Besleyici hücreler            | Periton sıvısı hücreleri | BALB/c fare        |
| Dalaktan elde edilen hücreler | Lenfositler              | BALB/c fare dalağı |

### 3.1.6. Besiyerleri

**RPMI-1640 Besiyeri:** RPMI-1640 (10.3 gr), Hepes (5.96 gr),  $\text{NaHCO}_3$  (2 gr) tartıldı. 10 M NaOH ile pH 7.2 olacak şekilde ayarlandı. Steril filtreden (0.22  $\mu\text{m}$ ) geçirildi. Deney esnasında 1/1000 oranında gentamisin, %10 FBS ve  $\beta$ -merkapto etanol eklendi.

**DMEM Besiyeri:** DMEM (13.4 gr),  $\text{NaHCO}_3$  (2 gr), Hepes (5.96 gr), sodyum piruvat (%1) tartıldı. pH 7.2 olacak şekilde ayarlandı ve steril edildi. Bu besiyeri kullanılırken 1/1000 oranında gentamisin, %10 FBS ilave edildi.

**HAT Besiyeri:** Füzyon işleminde kullanılmak üzere RPMI veya DMEM besiyerine %2 HAT (50X) çözeltisi eklenerek hazırlandı.

**HT Besiyeri:** RPMI veya DMEM besiyerine %2 HT (50X) çözeltisi eklenerek hazırlandı.

**Dondurma Besiyeri:** %50 FBS, %40 RPMI-1640, %10 DMSO oranlarında hazırlanarak hücre dondurma işlemi gerçekleştirildi.

### 3.1.7. Tamponlar

**PBS (Fosfat) Tamponu:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mM),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (10 mM) ile pH 7.2 olacak şekilde hazırlandı ve NaCl (0.15 M) ilave edildi.

**PBS-Tween 20 Tamponu:** Fosfat tamponuna Tween 20 (%0.05) eklenerek hazırlandı.

**Substrat Tamponu:**  $\text{ZnCl}_2$  (1 mM),  $\text{MgCl}_2$  (1mM), glisin (0.1 M), KOH ile (pH=10.4) olacak şekilde hazırlandı. Kullanım anında 1 ml substrat tamponuna 1 mg PNPP ilave edildi ve karanlıkta saklandı.

**Polietilen Glikol Çözeltisi:** Polietilen Glikol (2 gr), 1 ml distile su, 1 ml PBS eklenerek 30 dakika 121°C’de steril edildi. Füzyon aşamasına kadar 37°C’de saklandı.

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Farenin Karsinoembriyonik Antijen ile Bağışıklanması

Monoklonal antikor üretiminde immünizasyon için 6-7 haftalık beş adet BALB/c türü fare kullanıldı. İlk immünizasyon için CEA, PBS tamponu içerisinde 1:1 oranında FCA ile hazırlandı. 5 fare için 25 µg CEA + 575 µl PBS + 600 µl FCA hazırlanarak fare başına 5 µg karsinoembriyonik antijen olacak şekilde karın zarı boşluğuna enjekte edildi.

İlk immünizasyondan sonra farelerden yüksek antikor yanıtı alındığından ikinci ve üçüncü immünizasyon için fare başına 3 µg CEA kullanıldı. İkinci ve üçüncü immünizasyonda 5 fare için, 15 µg CEA + 285 µl PBS + 300 µl FIA 1:1 oranında hazırlanarak karın zarı boşluğuna enjekte edildi. Fare serumlarındaki antikor yanıtının izlenmesi için immünizasyon aralıklarında farelerin kuyruk uçlarından kan alındı ve ELISA testleri yapıldı.

### 3.2.2. İmmün Yanıtın ELISA ile Belirlenmesi

İmmünizasyon işlemlerinden sonra antikor düzeyinin tespiti için CEA’ya karşı oluşan spesifik immün aktivite dolaylı ELISA yöntemi ile tespit edildi. ELISA plaklarındaki kuyucuklar PBS içinde 50 ng/ml CEA, BSA ve süt tozu olacak şekilde kuyu başına 100 µl kaplandı ve 4°C’de gece boyu inkübe edildi. Bağlanmayan antijenler PBS + %0.5’lik Tween-20 tamponu ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Boşlukların bloklanması için kuyucuklar 150 µl %1’lik BSA ve süt tozu ile kaplandı. 1 saat 37°C’de inkübe edilen plaklar yıkandıktan sonra, PBS içinde 1/100 oranında seyreltilmiş fare serumu her bir kuyuya 100 µl eklendi ve 37°C’de 2 saat bekletildi. Yıkama işleminden sonra, kuyucuklara alkali fosfatazla işaretli 1/1000 dilüsyonda

anti-fare IgG ve IgM konjugatları eklendi. ELISA plakları 37°C’de 1 saat inkübe edildikten sonra tekrar yıkandı ve 1 mg/ml PNPP, substrat tamponu içinde hazırlanarak kuyucuklara eklendi. 1 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. 60. ve 120. dakikalarda ELISA okuyucusu ile 405 nm’de absorbans ölçülerek antikor düzeyi belirlendi.

### **3.2.3. Füzyon İşlemi**

#### **3.2.3.1. Besleyici Hücrelerin Elde Edilmesi**

Füzyondan bir gün önce immünize olmamış bir fare bu işlem için kullanıldı. Fare öldürüldükten sonra bir süre alkol içerisinde bekletildi. Laminar akımlı kabinde farenin karın bölgesi steril makas ve pens yardımıyla açıldı, kuyruk tutularak üst deri pens ile boyuna doğru çekildi ve periton açığa çıkarıldı. Organlara değmeden yağsız bölgeden periton içerisine yaklaşık 5 ml RPMI veya DMEM (serumsuz) enjekte edildi ve enjektörle tekrar geri çekildi. Bu şekilde periton iç yüzeyindeki besleyici hücreler alınmış oldu. Çalışılacak hücre kültür plağı sayısına göre elde edilen bu besiyeri karışımı 100 µl olacak şekilde dağıtıldı.

#### **3.2.3.2. Fare Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi**

CEA ile immünize edilen fareler arasında en yüksek antikor aktivitesi veren fare dolaylı ELISA yöntemi ile belirlendi. Füzyondan dört gün önce bu fareye hatırlatma işlemi uygulandı. 5 µg CEA + 195 µl PBS adjuvan kullanılmadan, farenin el ve ayak içlerine, kuyruk damarına ve karın zarı boşluğuna uygulandı. Füzyon işleminde kullanılacak olan fare öldürüldükten sonra %70’lik alkol içerisinde bekletildi. Laminar akımlı kabinde bağışıklanmış farenin sol kaburga bölgesinden kesilerek dalak, yağ dokusundan arındırılmış bir şekilde 10 ml PBS tamponu bulunan petri kabına alınarak küçük bir süzgeçte cam baget ile ezildi, hücreler açığa çıkarıldı ve cam pipet ile süspanse edildi. Hücreler, PBS tamponunda 1100 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Üst sıvı atıldıktan sonra çöken hücrelerin üzerine 45 ml PBS eklenerek hücre sayımı yapıldı.

ELISA çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanmak için farenin kalbinden 50 µl kan alındı, Na-sitratlı ependorf tüp içine konuldu ve kısa süreli santrifüj edildi. Üst fazdaki serum yeni bir tüpe alındı ve numune -20°C’de saklandı.

### 3.2.3.3. Miyeloma Hücrelerinin Pasajlanması

Füzyondan 10 gün önce P3 veya FO miyeloma hücreleri, hücre kültür kaplarında %10 FBS içeren RPMI-1640 ya da DMEM besiyerlerinde çoğaltılmaya başlandı. Bunun için sıvı azot tankında dondurularak saklanan P3 veya FO miyeloma hücreleri 37°C sıcaklıkta çözülüp PBS tamponu içine alınarak 1100 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti %10 serumlu RPMI-1640 ya da DMEM besiyeri ile çözülerek kültür kaplarına aktarıldı. Birkaç gün sonra hücre pasajlama işlemi için kültür kabındaki besiyeri atılarak yerine 5-10 ml PBS koyuldu, cam pipet ya da hücre küreği ile kabın zeminine yapışmış olan hücreler kaldırıldı. PBS içinde süspanse edilen bu hücreler 1100 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Üst faz atıldıktan sonra çöken hücreler %10 serumlu besiyeri ile süspanse edildi ve 25 cm<sup>2</sup>’lik ve daha sonra 75 cm<sup>2</sup>’lik kültür kaplarına aktarıldı.

Miyeloma hücrelerinin çoğaltılması sırasında kültür kaplarına 8-azoguanin 1/100 oranında eklenerek HGPRT<sup>(+)</sup> mutan hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Füzyon günü kültür kaplarındaki üst sıvılar cam şişede toplandı ve hücreler pasajlanarak 50 ml’lik santrifüj tüpü içerisine alındı ve 1100 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Üst sıvı atıldıktan sonra çöken hücrelerin üzerine 45 ml PBS eklendi ve hücre sayımı yapıldı.

### 3.2.3.4. Hücrelerin Sayılması

Hücre karışımından 25 µl örnek Thoma lamı üzerine alınarak 16 mm<sup>2</sup>’ye düşen hücreler sayıldı. Formülden füzyona girecek olan toplam hücre sayısı belirlendi.

$$10^4 \text{ (Sabit Katsayı)} \times \text{Lamdaki Hücre Sayısı} \times \text{Dilüsyon Hacmi} = \text{Toplam Hücre}$$

### 3.2.3.5. Polietilen Glikol ile Hücrelerin Birleştirilmesi

Hücre sayımı yapılan miyeloma hücreleri ve dalak hücreleri 1. füzyonda 1/4 (P3 miyeloma/dalak), 2. füzyonda 1/10 (P3 miyeloma/dalak), 3. füzyonda ise 1/25 (FO miyeloma/dalak) oranında birleştirildi ve 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra çöken hücre karışımına 37°C'de inkübe edilen 1 ml polietilen glikol 1 dakika boyunca yavaş bir şekilde eklendi. 37°C'de 1 dakika bekletildikten sonra 4 ml RPMI, 20 ml RPMI ve son olarak %15 FBS içeren 20 ml RPMI 2 dakikalık süre içerisinde hücrelerin üzerine yavaş bir şekilde ilave edildi. Karışım CO<sub>2</sub> inkübatörde 37°C'de 1 saat bekletildikten sonra santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra çöken hücrelere %2 HAT ve %20 FBS içeren RPMI besiyeri ilave edildi. Bir gün önce hazırlanmış olan besleyici hücreler üzerine 150 µl/kuyu olacak şekilde yüklendi.

### 3.2.3.6. Hibrit Hücrelerin Seçilmesi

Bu kültür 10 gün süresince CO<sub>2</sub> inkübatörde 37°C'de bekletildikten sonra %10 FBS içeren HAT'lı RPMI ile beslendi. 3. füzyonda ise DMEM besiyeri kullanılarak aynı işlemler tekrar edildi. Bu süre içerisinde hibrit hücreler HAT seçici besiyerinde çoğalarak hücre klonları oluşturdular. Füzyon hücre plaklarındaki hibrit hücreler invert mikroskopta taranarak işaretlendi. HAT besiyerinde yaklaşık bir ay süresince çoğaltılan hücreler %2 HT içeren besiyerinde en az iki hafta geliştirilmeye bırakıldı. Oluşan hibritlerin aktivitelerinin belirlenmesi için ELISA testleri yapıldı ve CEA'ya karşı spesifik olarak antikor üreten hibrit hücre klonları seçilmiş oldu.

### 3.2.3.7. Klonlama İşlemi

Füzyon işlemi sonucunda tek klondan oluşan hibrit hücre soyunu elde etmek amacıyla antijene spesifik olarak antikor üreten hibrit hücrelere sınırlı seyreltme işlemi uygulandı. Bu işlem için füzyonun yaklaşık 10.-20. günlerinde yüksek antikor aktivitesi gösteren hibrit hücreler klonlama için kullanıldı. Bu hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra, 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarında tek hücre olacak şekilde dağıtıldı (Coligan J.E. et al., 1991).

### 3.2.3.8. Çapraz ELISA ile Aktivite Tayini

Tek klondan oluşan bu hibrit hücrelerin spesifik antikor düzeylerinin belirlenmesi için çapraz ELISA yöntemi kullanıldı. ELISA plaklarındaki kuyucuklar 50 ng/ml CEA, AFP, albümin bovin serum (ABS), lizozim, jelatin, FBS ve süt tozu ile 100 µl kaplanarak 4°C’de gece boyu bekletildi. Bağlanmayan antijenler yıkama tamponu ile uzaklaştırıldı. Kuyucuklar 150 µl %1’lik süt tozu ile bloklandı ve 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Plaklar yıkandıktan sonra herbir kuyucuğa 100 µl hibrit üst sıvısı eklendi ve 37°C’de 2 saat bırakıldı. Tekrar yıkama işleminden sonra, kuyucuklara 1/1000 dilüsyonda alkalen fosfatazla işaretlenmiş anti-fare polivalen AP konjugatı eklendi ve 37°C’de 1 saat inkübe edilen plaklar yıkandı. Son olarak 1mg/ml PNPP substrat tamponu hazırlanarak herbir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde eklendi. 405 nm’de absorbans değeri ölçüldü. Renk değişiminin oluşması ile substratın parçalanma oranı saptanarak CEA’nın farklı proteinlerle olan çapraz reaksiyonları gösterildi.

### 3.2.3.9. Hibrit Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hibrit hücreler PBS ile yıkanarak 1100 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra dondurma besiyerinde yaklaşık  $1-2 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde dondurma tüplerine alındı. Bu tüpler -80°C’de bir gün bekletildikten sonra, uzun süre saklamak için sıvı azot tankına (-196°C) konuldu.

## 3.2.4. Anti-CEA Monoklonal Antikorlarının Saflaştırılması

### 3.2.4.1. Anti-CEA Monoklonal Antikorlarının Serumlu ve Serumsuz Besiyerinde Geniş Ölçekte Üretilmesi

8B6 ve 8E1 anti-CEA monoklonal antikorlarını geniş ölçekte üretmek için sırasıyla %10, %5 ve %0 FBS içeren RPMI besiyerinde 75 cm<sup>2</sup> ve 150 cm<sup>2</sup>’lik kültür kaplarında, iki günlük aralıklarla çoğaltıldı. 1100 rpm’de santrifüjlendikten sonra hücre üst sıvıları 4°C’de saklandı (Başalp A. et al., 2000).

### **3.2.4.2. Amonyum Sülfat Çöktürme İşlemi**

%10 serumlu ve serumsuz ortamda üretilen 8B6 ve 8E1 anti-CEA monoklonal antikorlarını içeren kültür üst sıvıları üzerine %45 oranında amonyum sülfat, soğuk bir ortamda 30 dakika içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla yavaş yavaş eklendi. Bu şekilde gece boyu 4°C’de bekletildi.

### **3.2.4.3. Anti-CEA Monoklonal Antikorların Distile Suyu Karşı Diyalizi**

Elde edilen 8B6 ve 8E1 anti-CEA hibrit hücrelerin monoklonal antikor izotip kiti ile immüoglobülin tiplerinin IgM olduğu belirlendi. Bu tip antikorlar için uygun olan bir saflaştırma tekniği kullanıldı. %10 serumlu ve serumsuz besiyerinde geniş ölçekte üretilen anti-CEA monoklonal antikorlarının üst sıvılarına 10.000 rpm’de 15 dakika santrifüjleme işlemi uygulandı. Elde edilen üst kesimler 2 gün boyunca distile suya karşı diyaliz edildi (Friboulet A., Izadyar Demichele L., 1995). Diyaliz sonrası örnek 13.000 rpm’de 50 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan pelet PBS ile çözüldü. Elde edilen antikor örneğinin protein miktarı spektrofotometrede OD<sub>280</sub>’de belirlendikten sonra ELISA ile aktiviteleri test edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. CEA ile İmmünizasyon Sonrası IgM ve IgG Yanıtları

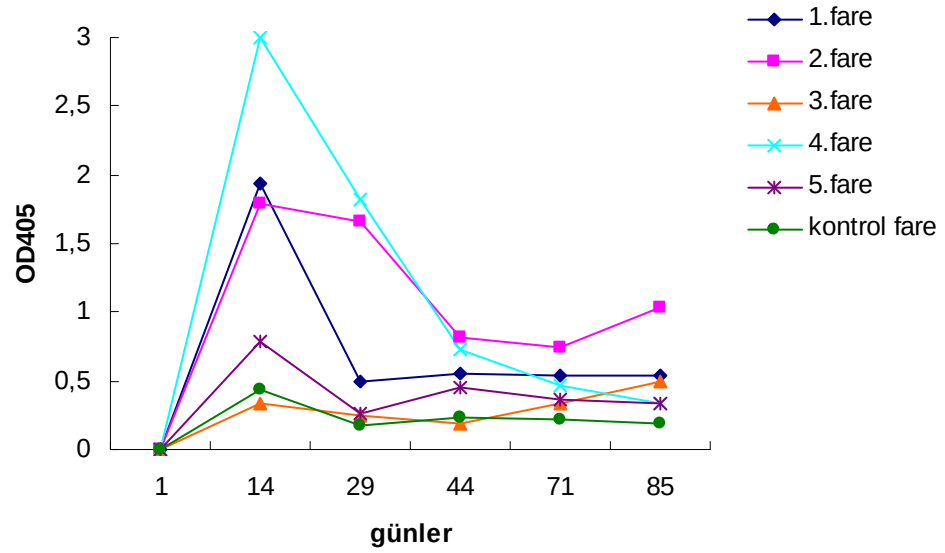
BALB/c farelerin CEA ile birinci immünizasyonu sonrası 14. 29. ve 44. günlerde, ikinci immünizasyonu sonrası 71. ve 85. günlerde 1/100 oranında seyreltilmiş fare serumlarında CEA, BSA ve süt tozuna karşı gelişen IgM ve IgG antikor yanıtları ELISA ile izlendi.

İmmünize edilmiş farelerde CEA'ya karşı oluşan antikor yanıtının IgM-AP ile elde edilen sonuçları Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.3'te ve IgG-AP ile elde edilen sonuçları Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.4'te gösterilmektedir. Birinci immünizasyon sonrası 14. günde süt tozu ile bloklanmış kuyucuklardaki fare serumlarının CEA'ya karşı düşük ve BSA ile bloklanmış kuyucuklarda ise daha yüksek bir IgM yanıtının geliştiği belirlendi. 29. ve 44. günler arasında ise BSA ve süt tozu ile bloklanmış kuyucuklarda IgM yanıtının zamanla azaldığı, IgG yanıtının hızla artmaya başladığı gözlemlendi. İkinci immünizasyon sonrası 71.ve 85. günlerde CEA'ya karşı gelişen IgG yanıtının artmaya devam ettiği, IgM yanıtının ise aynı seviyede kaldığı tespit edildi.

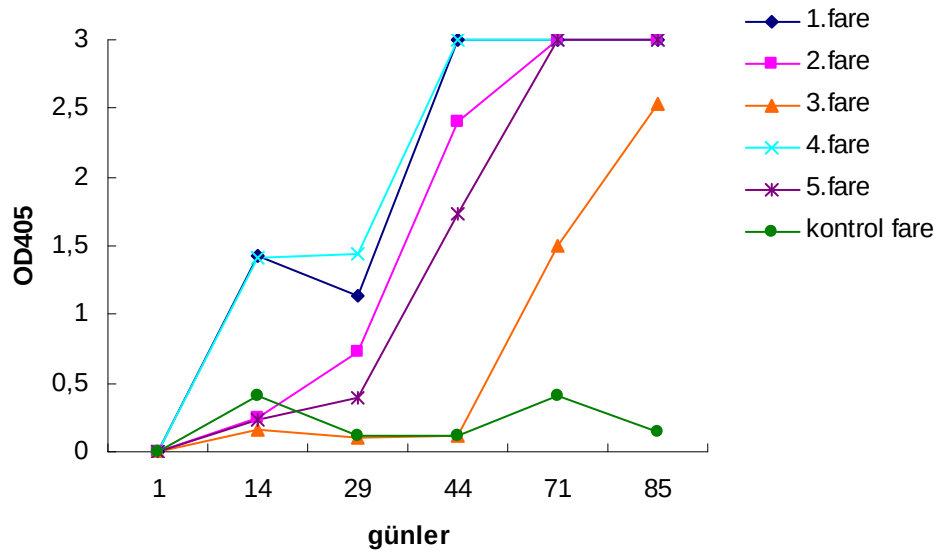
CEA ile immünize edilmiş farelerin serumlarında BSA'ya karşı gelişen antikor yanıtının IgM-AP ile elde edilen sonuçları Çizelge 4.5.'te, IgG-AP ile elde edilen sonuçları ise Çizelge 4.6.'da gösterilmektedir. Tüm fare serumlarında BSA'ya karşı IgM yanıtları oluştu ve özellikle 14. ve 44. günler arasında BSA ile daha yüksek çapraz reaksiyon alındı. Buna karşın fare serumlarındaki IgG yanıtlarında ise BSA ile çapraz aktivite vermediği gözlemlendi.

Farelerin CEA ile immünizasyonları sonrasında farklı günlere ait serumlarında süt tozuna karşı gelişen antikor yanıtının IgM-AP ile elde edilen sonuçları Çizelge 4.7.'de, IgG-AP ile elde edilen sonuçları Çizelge 4.8.'de gösterilmektedir. Fare serumlarındaki IgM yanıtlarının BSA'ya karşı gelişen antikor yanıtına göre daha

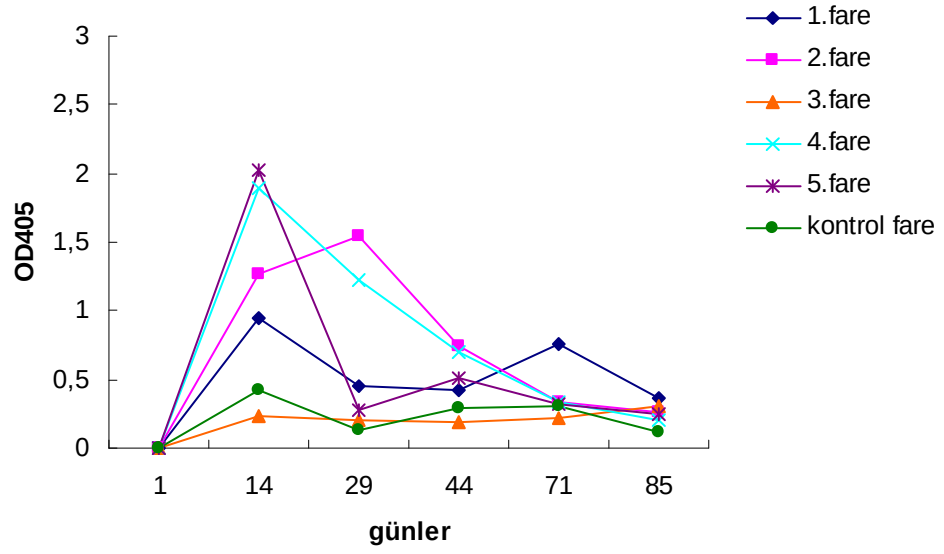
düşük, IgG yanıtlarının ise BSA antikor yanıtı ile benzer olduğu gözlemlendi. Fare serumlarındaki IgG yanıtlarında süt tozu ile çapraz reaksiyon tespit edilmedi.



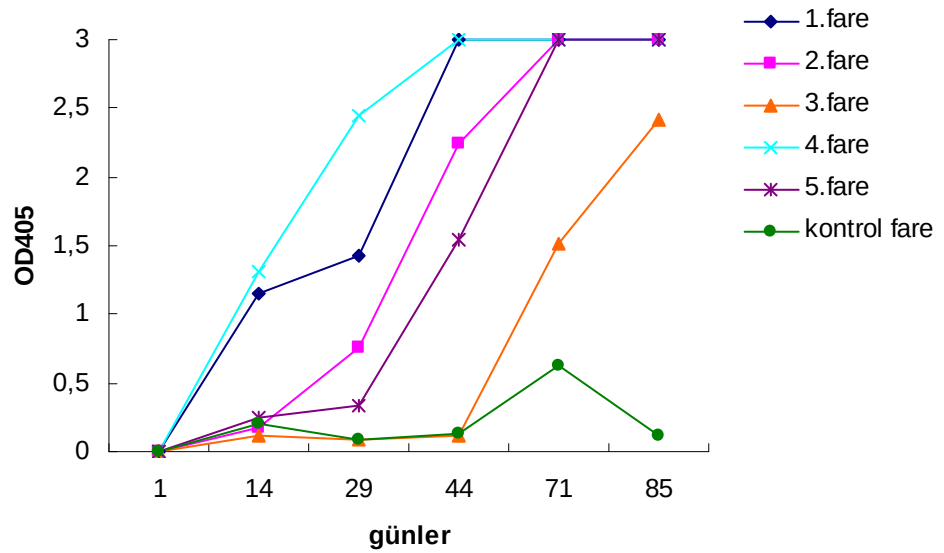
Çizelge 4.1. CEA'ya karşı BALB/c fare serumlarında oluşan IgM yanıtı (Boşluklar BSA ile bloklanmıştır)



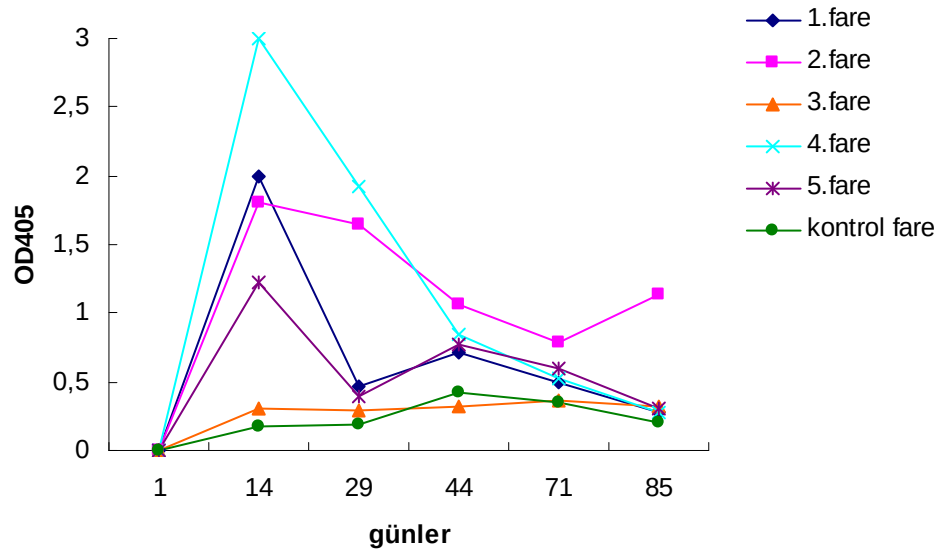
Çizelge 4.2. CEA'ya karşı BALB/c fare serumlarında oluşan IgG yanıtı (Boşluklar BSA ile bloklanmıştır)



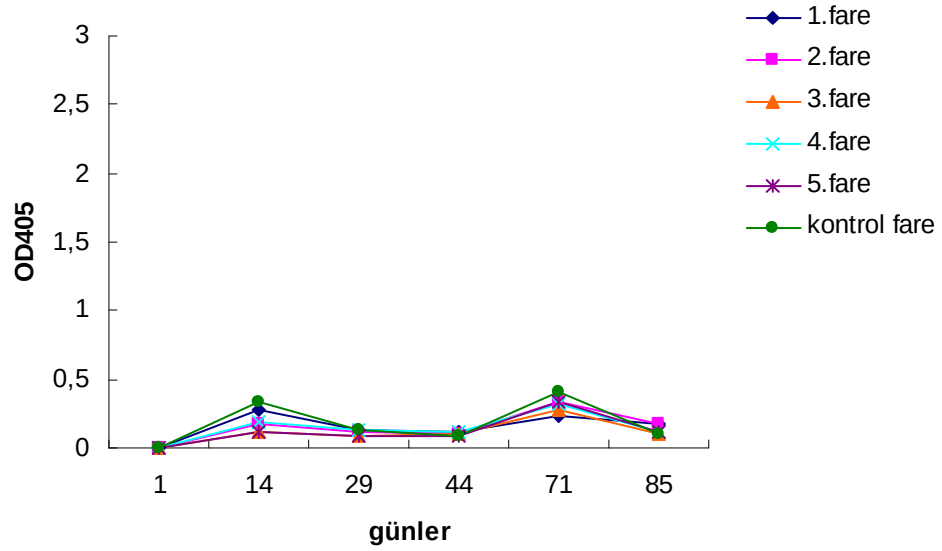
Çizelge 4.3. CEA'ya karşı BALB/c fare serumlarındaki IgM yanıtı (Boşluklar süt tozu ile bloklanmıştır)



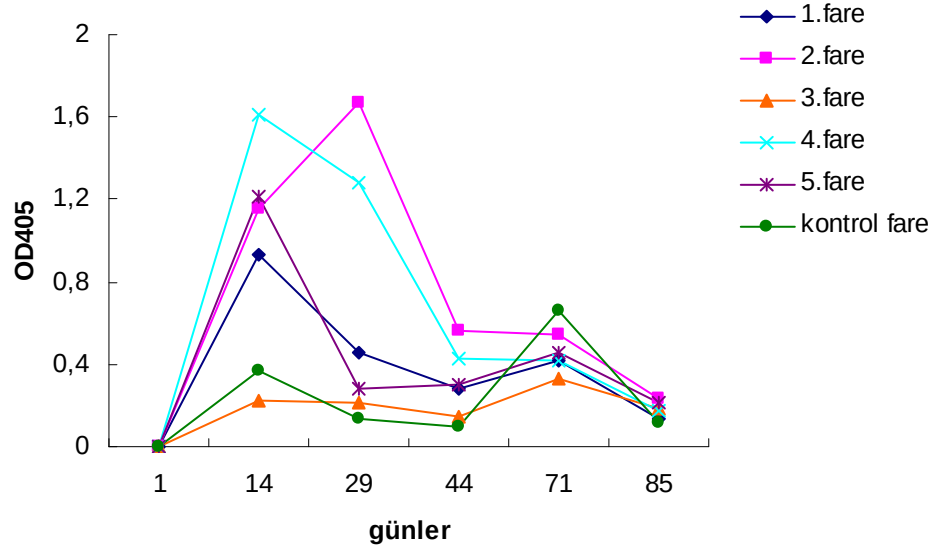
Çizelge 4.4. CEA'ya karşı BALB/c fare serumlarındaki IgG yanıtı (Boşluklar süt tozu ile bloklanmıştır)



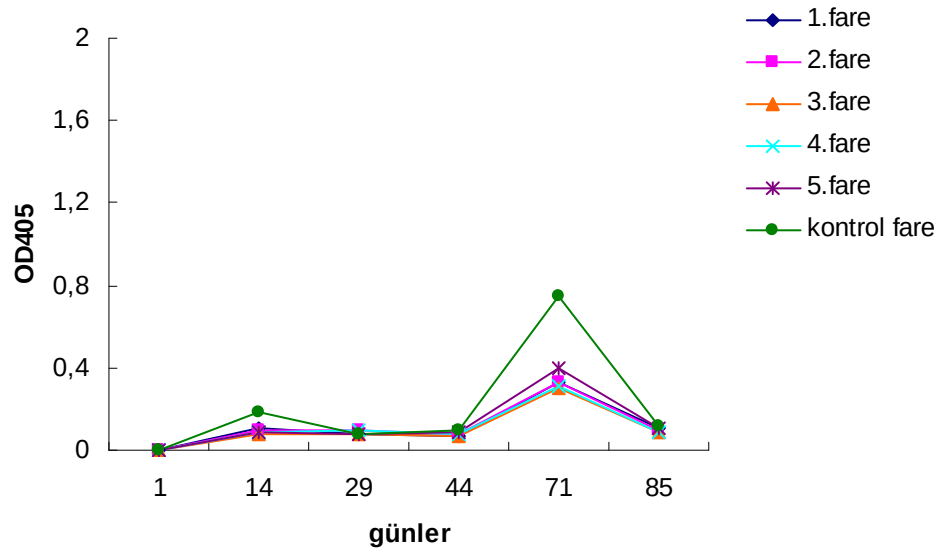
Çizelge 4.5. BALB/c fare serumlarında BSA'ya karşı gelişen IgM yanıtı



Çizelge 4.6. BALB/c fare serumlarında BSA'ya karşı gelişen IgG yanıtı



Çizelge 4.7. CEA ile bağışıklanmış fare serumlarında süt tozuna karşı gelişen IgM yanıtı



Çizelge 4.8. CEA ile bağışıklanmış fare serumlarında süt tozuna karşı gelişen IgG yanıtı

## 4.2. Füzyon Denemelerinden Elde Edilen Sonuçlar

CEA ile bağışıklanan BALB/c farelerden alınan serum ELISA ile test edilerek en yüksek antikor yanıtı veren fare füzyona alındı. Bu çalışmalar ile ilgili elde edilen füzyon sonuçları Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Birinci füzyon çalışması sonrasında elde edilen hibritlerden monospesifik antikor yanıtı alınamadığı için ikinci füzyon denemesi yapıldı. Bu füzyon çalışmasında CEA'ya özgü monoklonal antikor üreten yedi farklı hibrit hücre (2F12, 6B7, 8B6, 8E1, 9G5, 10D12, 11C7) elde edildi. Birinci ve ikinci füzyon denemelerinde P3 miyeloma hücresi kullanıldı. Farklı bir miyeloma hücresi (FO) ile üçüncü füzyon işleminin yapılması amaçlandı ancak bu çalışmada hibrit hücre oluşumu gözlenmedi. Bunun nedeninin FO miyeloma hücrelerindeki düşük gelişme hızından ve füzyon aşamasında yeterli miyeloma/dalak hücresi birleşme oranının (1/25) sağlanamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 4.1. Üç farklı füzyon çalışması ile elde edilen sonuçlar

| <b>Füzyon hücreleri</b>                      | <b>1.füzyon</b> | <b>2.füzyon</b> | <b>3.füzyon</b> |
|----------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Dalak hücre sayısı                           | 270 M*          | 200 M           | 200 M           |
| Miyeloma hücre sayısı                        | 65 M            | 20 M            | 8 M             |
| Füzyonda kullanılan toplam kuyu sayısı       | 1056            | 1056            | 672             |
| Toplam hibrit hücre sayısı                   | 240             | 872             | -               |
| Antikor aktivitesi veren hibrit hücre sayısı | 4               | 20              | -               |
| Spesifik antikor üreten hibrit hücre sayısı  | -               | 7               | -               |

(\*): Milyon

### 4.3. Çapraz ELISA Aktivite Sonuçları

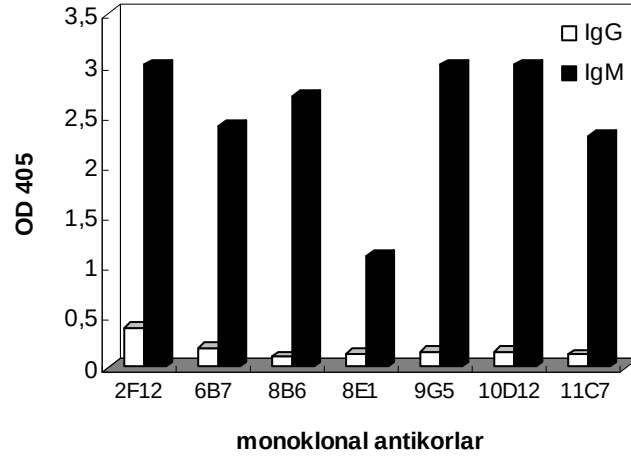
Füzyon sonrasında antikor aktivitesi olan yirmi hibrit hücreden bir kısmı aktivitelerini kaybetti, bazıları ise farklı proteinlerle (AFP, ABS, süt tozu, FBS, jelatin, lizozim) çapraz etkileşim gösterdi. Dolaylı ELISA testi sonucunda anti-CEA monoklonal antikorlarından 2F12 ve 9G5'in diğer proteinlere göre CEA'yı daha yüksek, 6B7, 10D12 ve 11C7'nin ise CEA'yı daha düşük oranda tanıdığı görüldü. 8B6 ve 8E1 anti-CEA monoklonal antikorlarının farklı proteinlere karşı daha düşük oranda çapraz reaksiyon verdiği yapılan ELISA testi sonucu belirlendi.

Füzyon sonrası yüksek antikor aktivitesi gösteren hibrit hücrelerdeki çapraz reaksiyonları tespit edebilmek için farklı proteinler ELISA plağına kaplandı. Hibrit hücrelerin bu proteinlere karşı gösterdiği çapraz reaksiyonların ELISA sonuçları Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Yedi farklı proteine karşı elde edilen çapraz reaksiyon sonuçları

| ELISA'da kullanılan proteinler | Monoklonal Antikorlar |     |     |     |     |       |      |
|--------------------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-------|------|
|                                | 2F12                  | 6B7 | 8B6 | 8E1 | 9G5 | 10D12 | 11C7 |
| <b>CEA</b>                     | 3.1                   | 1.2 | 2.1 | 2.7 | 3.0 | 0,6   | 0,8  |
| <b>AFP</b>                     | 2.1                   | 0,8 | 1.2 | 1.3 | 2,5 | 0,5   | 0,4  |
| <b>ABS</b>                     | 1,8                   | 0,7 | 0,8 | 1.2 | 2.2 | 0,6   | 0,4  |
| <b>Süt tozu</b>                | 1,7                   | 0,9 | 1.6 | 1.5 | 2,1 | 0,4   | 0,5  |
| <b>FBS</b>                     | 1,9                   | 0,5 | 0,4 | 0,2 | 1,8 | 0,2   | 0,2  |
| <b>Jelatin</b>                 | 2.0                   | 0,6 | 0,5 | 0,3 | 1,9 | 0,1   | 0,3  |
| <b>Lizozim</b>                 | 2.2                   | 0.2 | 0.6 | 1.0 | 1.1 | 0.5   | 0.1  |

Spesifik olarak anti-CEA monoklonal antikorları ürettiği belirlenen hibritlerin tek klondan oluşan soylarını elde etmek için bu hibritlere sınırlı seyreltme işlemi uygulandı. Monoklonal antikor izotip kiti ve dolaylı ELISA yöntemi kullanılarak 2F12, 6B7, 8B6, 8E1, 9G5, 10D12 ve 11C7 monoklonal antikorlarının IgM immünoglobülin tipinde olduğu belirlendi (Çizelge 4.9).



Çizelge 4.9. Monoklonal antikorların tipleri

Elde edilen 8B6 ve 8E1 anti-CEA monoklonal antikorları serumlu ve serumsuz besiyerinde geniş ölçekte üretildi. IgM tipindeki bu monoklonal antikorlar için uygun bir saflaştırma yöntemi olan distile suya karşı diyaliz işlemi yapıldı. Monoklonal antikor üreten tüm hücreler dondurularak daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere azot tankında saklandı.

## **4.4. Distile Suyu Karşı Diyaliz İşlemi ile Saflaştırma**

### **4.4.1. Serumsuz Besiyerinde Üretilen Monoklonal Antikorların Distile Suyu Karşı Diyalizi**

8B6 ve 8E1 anti-CEA monoklonal antikorlarını üreten hibrit hücreler serumsuz besiyerinde geniş ölçekte üretildi. Bu hibritlerin 100 ml'lik üst sıvılarına amonyum sülfat çöktürme işlemi uygulandı. 150 ml'lik diğer üst sıvıları ise sadece distile suya karşı diyaliz edildi. Santrifüj işlemi yapıldıktan sonra elde edilen çöken örnekteki protein miktarları OD<sub>280</sub>'de 8B6 ve 8E1 anti-CEA mAb'ları için sırasıyla 1.44 ve 2.38 mg/ml olarak belirlendi.

### **4.4.2. % 10 Serumlu Besiyerinde Üretilen Monoklonal Antikorların Distile Suyu Karşı Diyalizi**

% 10 serumlu besiyerinde geniş ölçekte üretilen 8B6 ve 8E1 anti-CEA monoklonal antikorlarının 150 ml'lik üst sıvılarına amonyum sülfat çöktürme işlemi uygulandı ve 120 ml'lik diğer üst sıvılar ise distile suya karşı diyaliz edildi. Diyaliz sonrası spektrofotometrede OD<sub>280</sub>'de ölçülerek elde edilen örnekteki protein miktarı 8B6 ve 8E1 anti-CEA mAb'ları için sırasıyla 1.51 ve 1.42 mg/ml olarak belirlendi.

## 5. TARTIŞMA

Tümör belirleyicileri, kanserli hücrelerin veya bazı iyi huylu tümörlerin varlığına yanıt olarak vücut tarafından ya da tümör hücresi tarafından üretilen maddelerdir. Kanser ilerlemesi durumunda kanda yüksek seviyelerde tümör belirleyicilerine rastlanır. Kanser erken safhasında hastalar genellikle düşük pozitif belirleyici oranlarına sahiptir ve bu nedenle erken tanı fazla önem taşımazlar. Tümör belirleyicileri, uygulanan ilk tedavi sonrası hastalığın seyrinde görülen gelişmelerin değerlendirilmesinde ve sonraki tedavilerin izlenmesinde önemli rol oynarlar. Ayrıca, kanserin derecelendirilmesinde ve kanser tanısında prognostik indikatör olarak iş görürler (Way B.A., Kessler G., 1996; Seregini E. et al., 2001).

Günümüzde, insan genom dizisinin belirlenmesi, genlerin ve kodladıkları proteinlerin yapılarının aydınlatılması, biyoinformatikler gibi bilgi birikimini artıran birçok faktör tümör belirleyicilerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. Gelecekte ise bu yeni bilgi kaynakları protein, gen ve düşük moleküler ağırlıklı tümör belirleyicilerinin ortaya çıkmasını sağlayacaktır. Bu tip tümör belirleyicileri erken tanı, ayırıcı tanı, prognoz ve tedaviye alınan yanıtın tahmini gibi konularda etkin olarak kullanılabilecek ve böylece kanser mortalite ve morbiditesinde büyük düşüşlere yol açabilecektir (Alataş Ö., 2002).

Çoğunlukla kanser tanısı çok erken safhalarda yapılamaz. X-ışınları, bilgisayarlı tomografi (CT) ya da ultrasonla kanser teşhisi için kanserli dokunun en az 1 cm'e ulaşması gerekir. Kanser oluşumu ilerledikçe üretilen ve kanser belirleyicileri olarak bilinen karakteristik maddelerin kullanıldığı yeni immünolojik yöntemlerle kanserli hücre tespit edilecek büyüklüğe erişmeden belirlenebilir. Bu tanı sistemi, hastalığın iyileşmesini geniş ölçüde artıran erken müdahalede büyük önem taşımaktadır ve elde edilen tüm sonuçları içeren diğer hastalık bulgularıyla birlikte değerlendirilmelidir (<http://www.pathlab2u.com/s-cancers.html>).

İmmün tanı ve tedavideki temel hedef tümör belirleyicileridir. Bunlar arasında sindirim kanalı orijinli adenokarsinomlardan özellikle CRC (kolorektal kanser) ile ilgili çalışmalarda en fazla kullanılan tümör belirleyicisi CEA'dır. CEA, CRC'de

belirlenen ve radyoaktif olarak işaretlenmiş poliklonal antikolar kullanılarak hastalarda tespit edilen ilk insan tümör antijenidir (Moraes D.W. et al., 1999).

Karsinoembriyonik antijen immünoglobülin süpergen ailesinin üyesi olan glikoprotein yapısında bir bileşiktir ve çeşitli salgı dokularında üretilir. Yapılan birçok araştırma gelişmekte olan ülkelerde kadın ve erkeklerde malignite sıralamasında ikinci sırayı alan kolorektal kanserlerde CEA düzeylerinin sağlıklı bireylere oranla daha fazla arttığını göstermektedir (Hammarström S., 1999). Pankreas, akciğer, meme kanserlerinde ve diğer adenokarsinomlarda yüksek plazma CEA seviyelerine rastlanmıştır. Benign hastalıklarda da serum CEA düzeyi artabilir (Bullen A.W. et al., 1977; Gold P., Goldenberg N.A., 1996; <http://www.tc-cancer.com/tumormarkers.html>).

CEA düzeyinin tek başına bilinmesi kemoterapi uygulanma kararının verilmesi için yeterli değildir. Buna karşılık kolorektal kanserlerde operasyon öncesi CEA düzeylerinin bilinmesi ve karaciğer metastazının belirlenebilmesi için CEA testi kullanılır. Karaciğer metastazının belirlenmesinde ise yüksek CEA seviyeleri duyarlılığın %100 olduğunu gösterir. Duyarlı radyoimmünolojik (RIA) ve enzimimmünolojik (ELISA) testler; meme, akciğer, prostat, mesane ve mide kanserlerinde de serum CEA seviyelerinin artabileceğini göstermiştir (Cooper M.J. et al., 1979; Moertel C.G., Fleming R., 1993; Fiella X., Molina R., 1994; Duffy M.J., Van Dalen A., 2003).

Yüksek oranda ve spesifitede antikor üretiminin güç olması, poliklonal antikolar ile pasif immün tedavi alanında yapılan çalışmaları sınırlandırmış, monoklonal antikoların geliştirilmesi sayesinde bu zorluklar ortadan kaldırılmıştır. Monoklonal antikolar zamanla poliklonal antikoların yerini almıştır ve günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Monoklonal antikolar tek ya da ilaç, toksin, sitokin veya izotoplara bağlı olarak kullanılabilirler ancak antikoların tedavi amaçlı kullanımlarında birtakım kısıtlamalar bulunmaktadır. Antikor genellikle büyük tümör kitlelerine zayıf bir şekilde penetre olur. Bu duruma çözüm olarak spesifik antijen bağlama bölgesine sahip F(ab') fragmentleri gibi daha küçük moleküller ya da tek domainli antikolar geliştirilebilir. Bunun yanında tümör kan damarlarının

endotelyumuna yönelik olarak tedavi uygulanabilir. Antikorlar hedef antijeni eksprese eden normal hücrelere ve  $F_c$  reseptörü taşıyan hücrelere özgül olmayan bir şekilde bağlanırlar. Antikor moleküllerinin rekombinant DNA teknolojisi ile genetik ya da kimyasal olarak değişikliğe uğratılması bu sorunu kısmen ortadan kaldıracaktır. Tümörlü ve normal hücreler arasındaki en iyi ayırım bu hücrelerde ayrı ayrı yer alan iki farklı antijene karşı üretilen bispesifik antikorlar ile sağlanabilir (Roitt I. et al., 2001).

CEA'ya karşı üretilen monoklonal antikorlar ilk olarak doku örneklerinin immünohistokimyasal yöntemle boyanması ve *in vivo* olarak hastalığın yerinin tespiti gibi teşhis amaçlı kullanılmıştır. Çeşitli spesifik anti-CEA antikorları kullanılarak, kolorektum, meme, akciğer, serviks, safra kesesi, mide, pankreas, karaciğer, prostat, idrar torbası ve uterus kanserlerinde ayrıca larinks, akciğer ve tiroid ile ilişkili nöroendokrin tümörlerinde CEA immünohistokimyasal olarak tanımlanmıştır (Gold P., Goldenberg N.A., 1996; Haidopoulos et al., 2000; Hörig H. et al., 2000).

CEA geninin birçok farklı insan tümörlerinde yüksek seviyelerde eksprese olması ve moleküler biyolojisi ile immünolojisi hakkında bilgi edinilebilmesi kanser aşı çalışmalarında hedef antijen olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır. CEA'ya karşı monoklonal antikorların üretilmesi, çeşitli kanser teşhis ve tedavi uygulamalarının geliştirilmesine öncülük etmiştir. Bu uygulamalar, anti-CEA monoklonal antikorlarının *in vivo* olarak tek ya da radyoizotoplara veya hücrel toksinlere bağlı olarak kullanımının yanında anti-idiotip antikorların kullanımını da içermektedir (Hörig H. et al., 2000).

Hastalığın olduğu bölgelerin tespitinde radyoaktif olarak işaretlenmiş monoklonal antikorların kullanımı büyük ölçüde artmıştır. Antikorlar radyoaktif maddeler, toksinler ya da kemoterapi ajanları gibi sitotoksik moleküllerin tümörlü bir dokuya doğrudan yönlendirilmesinde de etkin olarak kullanılırlar (Hörig H. et al., 2000). Goldenberg ve arkadaşları ilk olarak CEA'ya karşı  $^{131}\text{I}$ -işaretli poliklonal antikorların kanser tanısında kullanıldığını göstermişlerdir (Zamcheck N. et al., 1972). Mach ve arkadaşları ise anti-CEA antikorlarının yemek borusu tümörlerinin tespitinde kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (Mach J.P. et al., 1974). Bugüne

kadar birçok mAb toksinlere bağlanmış ve kanser immün tedavisinde kullanılmıştır. Bu amaçla CEA'ya karşı üretilen monoklonal antikora risin A toksini bağlanarak pankreas ve kolon kanseri tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmıştır (Bodey B. et al., 2000). Patt ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda, CEA'ya spesifik olarak üretilen IMMU 4 mAb'ı kullanılarak bu antikorun hastaların %93'ünde kolorektal kanser tanısında etkili olduğu gösterilmiştir (Patt Y.Z. et al., 1994).

Kim ve arkadaşları tarafından PR1A3 ve T84.66 anti-CEA mAb'ların indirgenmiş Fab<sup>1</sup> bölgelerinin çapraz bağlanması ile biparatopik monoklonal antikorlar hazırlanmıştır. Bu çalışmada farklı miktarlarda CEA üreten kanser hücrelerine sahip 42 fare kullanılmıştır. Bu farelerde <sup>125</sup>I-işaretli IgG F(ab<sup>1</sup>)<sub>2</sub> ile PR1A3'ün Fab<sup>1</sup> bölgesi ya da biparatopik monoklonal antikorlar kullanılarak tümörlerin yeri belirlenmiştir (Crawford N.P.S. et al., 2003).

Moraes ve arkadaşlarının ürettikleri 6D1 anti-CEA monoklonal antikor, immünoperoksidaz yöntemi ile CRC doku kesitlerindeki CEA-eksprese eden neoplastik hücreleri spesifik olarak tanıma özelliğinde olan bir IgG<sub>1</sub> antikorudur. Yapılan çalışmada, 6D1 mAb'ı *in vivo* olarak CEA eksprese eden tümörlere yönelik olarak kullanılmıştır. Bu mAb'ın sadece tümör dokusuna bağlandığı ve CRC doku kesitleri üzerindeki immünoperoksidaz reaksiyonlarda CEA'ya spesifik olduğu gösterilmiştir (Moraes D.W. et al., 1999).

Pavelic ve arkadaşları karsinoembriyonik antijenin spesifik bir epitopuna karşı bir monoklonal antikor üretmişler ve bu antikorun kolorektal adenokarsinomlarla reaksiyon verdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, 4 farklı anti-CEA mAb'ın formalin ile fikse edilmiş insan primer ve metastatik kolorektal, yumurtalık karsinomlarının doku kesitleri ile reaktiviteleri incelenmiştir. D-14, CEJ065, ZCEA1 ve SP-625 olmak üzere dört monoklonal antikor kullanılmıştır. D-14, CEJ065 ve SP-625 mAb'larının kolorektal adenokarsinom doku örneği ile reaksiyona girdikleri görülmüştür (Pavelic P.Z. et al., 1991).

Teh ve arkadaşları tarafından yapılan farklı bir çalışmada üç metastatik kolon kanserli hastadan elde edilen serum ile fareler bağışıklanarak kolorektal kanser dokusuna spesifik iki monoklonal antikor elde edilmiştir. İmmünoperoksidaz testi ile bu antikorların kolon tümör dokusu ile reaksiyona girdikleri tespit edilmiştir. Sağlıklı ve benign hastalardan alınan doku örnekleriyle reaksiyon vermedikleri fakat kolon karsinoma doku örnekleri ile reaksiyona girdikleri tespit edilmiş ve O-1 ve I-1 mAb izole edilmiştir. Katı-faz radyoimmün testler ile her iki mAb'ın CEA ile reaksiyona girdiği, yarışmalı ELISA deneyleri sonucunda ise her iki antikorun CEA üzerindeki benzer ya da yakın ilişkili epitoplarla reaksiyon verdikleri bulunmuştur. Dokudaki CEA yerine serumdaki CEA'ya karşı anti-CEA antikorları üretildiğinde, sadece malign dokularla reaksiyona giren oldukça spesifik bir mAb üretilmiştir (Teh J.G. et al., 1988). Bu tez çalışmasında ise CEA ile bağışıklanan fare serumlarındaki anti-CEA poliklonal yanıtları dolaylı ELISA testleri ile belirlendi.

Yapılan bir çalışmada, kolorektal ve akciğer adenokarsinomlarının karaciğer metastazlarından izole edilerek saflaştırılmış karsinoembriyonik antijene karşı monoklonal antikorlar üretilmiştir. Elde edilen 11 adet anti-CEA mAb'larının IgG1 izotipinde oldukları tespit edilmiştir. Bu monoklonal antikorlardan biri dışında tümünün kolorektal veya akciğer karsinomundan izole edilen sekiz CEA preparatı üzerindeki epitopları tanıdığı ve dört mAb'ın CEA'ya spesifik olduğu belirlenmiştir (Hedins A. et al., 1986). Bu çalışmaya paralel olarak yapılan tez çalışmasında, hibridoma tekniğinden yararlanılarak karsinoembriyonik antijene özgül anti-CEA monoklonal antikorları üretildi, izotip kiti ile dolaylı ELISA yöntemleri kullanılarak bu antikorların IgM tipinde oldukları tespit edildi.

Yapılan bu tez çalışmasında yürütülen deneyler kapsamında; öncelikle ticari olarak satın alınmış olan karsinoembriyonik antijen ile BALB/c fareler bağışıklandı. Birinci ve ikinci immünizasyon sonrası farelerin serumlarında BSA ve süt tozuna karşı oluşan IgG antikor yanıtının birbirine benzer olduğu ve çapraz reaksiyon oluşmadığı belirlendi (Çizelge 4.1.-4.8.). Belirli zaman aralıklarında fare serumlarındaki antikor seviyeleri dolaylı ELISA ile belirlendikten sonra en yüksek aktiviteyi veren fare füzyon işlemi için kullanıldı. Bu farelerin lenfositleri P3 miyeloma hücreleri ile füzyona uğratıldı. Seçici HAT kültür ortamında üreyen

hibridoma hücrelerinden antijene karşı yüksek oranda antikor üreten hibritler ELISA testiyle belirlendi. Birinci füzyon çalışması sonucunda elde edilen hibrit hücrelerden monospesifik antikor yanıt alınamadı. Ancak ikinci füzyon işleminden 2F12, 6B7, 8B6, 8E1, 9G5, 10D12 ve 11C7 adı verilen yedi adet anti-CEA monoklonal antikor üreten hibrit hücreler elde edildi.

Elde edilen monoklonal antikorların monospesifik olup olmadığını belirlemek için farklı proteinler (AFP, ABS, süt tozu, FCS, jelatin, lizozim) kullanılarak çapraz aktivite testleri yapıldı. Bunun sonucunda 2F12 ve 9G5 anti-CEA monoklonal antikorların diğer proteinlere göre CEA'yı daha yüksek oranda tanıdığı gözlemlendi. Aynı zamanda elde edilen bu anti-CEA monoklonal antikorların diğer proteinlerle ortak epitop bölgelerine sahip olabilmeleri özellikleri nedeniyle çapraz aktivite oluşturdıkları görüldü. 6B7, 10D12 ve 11C7 anti-CEA monoklonal antikorların CEA'yı daha düşük oranda tanıdığı tespit edildi. 8B6 ve 8E1 anti-CEA monoklonal antikorların ise yapılan ELISA testleri sonucunda bu farklı proteinlerle yüksek oranda reaksiyon vermediği ve düşük çapraz aktiviteler oluşturduğu belirlendi.

Pozitif sonuç veren kuyucuklardaki hibridomaların tek klondan oluşan soyunu elde etmek için sınırlı seyreltme işlemi ile alt klonlanma yapıldıktan sonra bu hibrit hücreler %10 serumlu ve serumsuz besiyerinde geniş ölçekte üretildi. Hibrit hücrelerin albümin proteini içeren fetal sığır serumlu besiyerinde geliştirilmesi ABS gibi proteinlere karşı çapraz reaksiyon oluşturmaya neden olabilmektedir. Bu nedenle saf antikor eldesi için serumsuz ortamda hücre üretimi çalışmaları gerçekleştirildi.

Serumsuz ortamda hücre üretimi işlemiyle daha hızlı ve ekonomik bir şekilde monoklonal antikorların saflaştırılması sağlanmaktadır. Bu yöntemle hücre çoğaltımında serum ya da diğer bileşenlerin kullanımı gerekmemektedir. Monoklonal antikorlar tek aşamalı olarak amonyum sülfat çöktürmesi ile kolaylıkla saflaştırılabilir (Başalp A. et al., 2000).

Garcia-Gonzalez ve arkadaşları sıçandan elde edilen 9 adet IgG3 ve 8 adet IgM monoklonal antikorlarına asit sıvı filtrasyon işlemi uygulayarak distile suya karşı diyaliz etmişlerdir. 22.000 g'de 30 dakika santrifüj işleminden sonra oluşan çökelti 0.1 M Tris-HCl (pH 8) tamponuyla süspanse edilmiştir. Bu şekilde üretilen antikorların saflığı SDS-PAGE ile belirlenmiştir. Bu saf haldeki antikorun albümin, transferin ve diğer fare asidik proteinlerinden uzaklaştırılması sonucunda fonksiyonunda bir değişim gözlenmemiştir (Garcia-Gonzalez M. et al., 1988).

Vollmers ve arkadaşları insan IgM antikorunu saflaştırmak için hibridoma üst sıvısını %10 FCS içeren RPMI besiyerinde üretmişlerdir. Ultrafiltrasyon yöntemi ile konsantre edilen bu üst sıvılar distile suya karşı diyaliz edilerek saflaştırılmıştır. Bu yolla elde edilen IgM antikorun değişik amaçlarda kullanım için uygun olduğu belirtilmiştir (Vollmers H.P. et al., 1996). Yıldırım ve arkadaşlarının yapmış olduğu farklı bir çalışmada farelerin serumlarındaki BSA spesifik antikor yanıtının oluşumunu engellemek için IgM tipindeki anti-id 6C9 antikorunu distile suya karşı diyaliz edilerek saflaştırılmıştır (Yıldırım T. et al., 2004). Yapılan bu çalışmalara benzer şekilde RPMI besiyerinde üretilen 8B6 ve 8E1 anti-CEA mAb üreten hibrit hücre üst sıvılarının 100 ml'sine amonyum sülfat çöktürme işlemi uygulandı. IgM tipindeki bu antikorların 150 ml'lik diğer üst sıvıları ise distile suya karşı diyaliz edilerek saflaştırıldı. Bunun için hibrit hücrelerin üst sıvıları 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası üst kesimler 2 gün distile suya karşı diyaliz edildi ve 13.000 rpm'de 50 dakika santrifüj edildi. Bu protokolün izlenmesiyle daha saf antikor örneklerinin elde edilebileceği görüldü. Distile suyun pH değerinin 5,4 olması nedeniyle izoelektrik noktası (pI:6) ve molekül ağırlığı 970 kDa olan IgM antikorunun saflaştırılması bu yöntemle sağlanabilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında; hibridoma tekniği ile kolorektal kanser tümör belirleyicisi olan karsinoembriyonik antijene karşı monoklonal antikor üretimi gerçekleştirildi. Elde edilen anti-CEA monoklonal antikorların kolorektal kanserli dokuların tanı ve tedavisinde diğer yardımcı yöntemlerle birlikte kullanılabileceği öngörülmektedir. Ayrıca elde edilen bulguların sonradan yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalara hazırlık niteliği taşıyacağı ve ilgili test kitlerinin oluşturulmasına imkan sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Abbott C., Povey S., Making somatic cell hybrids, In: Somatic Cell Hybrids: The Basics, Oxford University Press, Oxford, 1995, pp.13-16.
2. Alataş Ö., Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu, Türk Klinik Biyokimya Derneği, Bursa, 2002.
3. Alvarez J.A., Marin J., Jover J.M., Fernandez R., Fradejas J., Moreno M., Sensitivity of monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen, tissue polypeptide antigen, alpha-fetoprotein, carbohydrate antigen 50 and carbohydrate antigen 19-9 in the diagnosis of colorectal adenocarcinoma, Diseases Colon Rectum, 1995, 38(5): 535-542.
4. Arnaud J.P., Koehl C., Adloff M., Carcinoembryonic antigen (CEA) in diagnosis and prognosis of colorectal carcinoma, Diseases Colon Rectum, 1980, 23(3): 141-144.
5. Başalp A., Çırakoğlu B., Bermek E., Simple production and purification of monoclonal antibodies in serum-free medium, Turk J. Biol., 2000, 24: 189-196.
6. Beauchemin N., Benchimol S., Cournoyer D., Fuks A., Stanners C.P., Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen, Mol. Cell. Biol., 1987, 7(9): 3221-3230.
7. Beaudonnet A., Gounon G., Pichot J., Revenant M.C., Sex- and age-related influences on carcinoembryonic antigen in blood, Clinical Chemistry, 1981, 27(5): 771.

8. Benchimol S., Fuks A., Jothy S., Beauchemin N., Shirota K., Stanners C.P., Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule, *Cell*, 1989, 57(2): 327-334.
9. Benjamini E., Coico R., Sunshine G., Monoclonal and genetically engineered antibodies, In: *Immunology a short course*, 4th Ed., John Wiley and Sons Ltd., USA, 2000, pp.107-110.
10. Berry J.D., Rational monoclonal antibody development to emerging pathogens, biothreat agents and agents of foreign animal disease: the antigen scale, *The Veterinary Journal*, 2004: 1-12.
11. Bodey B., Siegel S.E., Kaiser H.E., Genetically engineered monoclonal antibodies for direct anti-neoplastic treatment and cancer cell specific delivery of chemotherapeutic agents, *Current Pharmaceutical Design*, 2000, 6: 261-276.
12. Breedveld F.C., Therapeutic monoclonal antibodies, *The Lancet*, 2000, 355: 735-740.
13. Bullen A.W., Losowsky M.S., Carter S., Patel S., Neville A.M., Diagnostic usefulness of plasma carcinoembryonic antigen levels in acute and chronic liver disease, *Gastroenterology*, 1977, 73: 673.
14. Chan D.W., Schwartz M., Tumor Markers: Introduction and General Principles, In *Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications*, Diamandis E.P., Fritsche H., Lilja H., Chan D., Schwartz M. (Eds.), AACC Press, Washington DC, 2002: 9-18.
15. Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M., Strober W., Antibody detection and preparation, In: *Current Protocols in Immunology*, Vol 2, Suppl 1, John Wiley and Sons Ltd., USA, 1991: 1-16.

16. Cooper M.J., Mackie C.R., Skinner D.B., Moossa A.R., A reappraisal of the value of carcinoembryonic antigen in the management of patients with various neoplasms, *British Journal of Surgery*, 1979, 66(2): 120-123.
17. Crawford N.P.S., Colliver D.W., Galandiuk S., Tumor markers and colorectal cancer: utility in management, *Journal of Surgical Oncology*, 2003, 84: 239-248.
18. Delves P.J., Preparing immunogens, In: *Antibody Production Essential Techniques*, Rickwood D. (Ed.), John Wiley and Sons Ltd., UK., 1997, pp.18-26.
19. Diamandis E.P., Tumor markers: Past, Present and Future, In *Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications*, Diamandis E.P., Fritsche H., Lilja H., Chan D., Schwartz M. (Eds.), AACCC Press, Washington DC, 2002: 3-8.
20. Dijk M.A., Winkel J.G.J., Human antibodies as next generation therapeutics, *Curr. Opin. Chem. Biotech*, 2001, 5: 368-374.
21. Ditrich C., Jakesz R., Havelec L., Carcinoembryonic antigen (CEA) plasma level determination in the management of gastric cancer patients, In: *Tumor markers in cancer control*, Nieburys H.E., Holzner J.H., Valli V.E. (Eds.), New York: Alan Liss; 1985: 181.
22. Duffy M.J., van Dalen A., Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines, *Eur. J. Cancer*, 2003, 39: 718-727.
23. Dykes P.W., King J., Progress report carcinoembryonic antigen (CEA), *Gut.*, 1972, 13: 1000.

24. Engvall E., Perlmann P.O., Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G., *Immunochemistry*, 1971, 8: 871-875.
25. Filella X., Molina R., CEA as a prognostic factor in colorectal cancer, *Anticancer Res.*, 1994, 14: 705-708.
26. Friboulet A., Izadyar Demichele L., Preparation and assay of acetylcholinesterase antibody, In: *Methods in Molecular Biology: Antibody Engineering Protocols*, Vol.51, Paul S. (Ed.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 1995, pp. 211-222.
27. Garcia-Gonzalez M., Bettinger S., Ott S., Olivier P., Kadouche J., Pouletty P., Purification of murine IgG3 and IgM monoclonal antibodies by euglobulin precipitation, *J. Immunol. Methods*, 1988, 111(1): 17-23.
28. Geus B.D., Hendriksen C.F.M., In vivo and in vitro production of monoclonal antibodies: current possibilities and future perspectives, *Res. Immunol.*, 1998, 149: 533-620.
29. Go V.L.W., Simultaneous measurements of tumour-associated antigens in gastrointestinal cancer, *Clinics in Gastroenterology*, 1976, 5: 645.
30. Goding J.W., Antibody production by hybridomas, *Immunol. Methods*, 1980, 39(4): 285-308.
31. Gold P., Freedman S.O., Specific carcinoembryonic antigen of the human digestive system, *Journal of Experimental Medicine*, 1965, 122: 467.
32. Gold P., Goldenberg N.A., The carcinoembryonic antigen (CEA): Past, present and future, *Clinical Review, Perspectives in Colon and Rectal Surgery*, 1996, 9(2): 1-15.

33. Golub E.S., Green D.R., Antibodies as tools, In: Immunology a Synthesis, 2nd ed., Sinauer Associates Inc., USA ,1991, pp.134-139.
34. Haidopoulos D., Konstadoulakis M.M., Antonakis P.T., Alexiou D.G., Manouras A.M., Katsaragakis S.M., Androulakis G.F., Circulating anti-CEA antibodies in the sera of patients with breast cancer, *European Journal of Surgical Oncology*, 2000, 26: 742-746.
35. Haines A.P., Levin A.G., Fritsche H.A., Ethnic-group differences in serum levels of carcinoembryonic antigen, *Lancet*, 1979, 2(8149): 969.
36. Hammarström S., The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structure, suggested functions and expression in normal and malignant tissue, *Sem. Cancer Biol.*, 1999, 9: 67-81.
37. Harris M., Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer, *Lancet Oncol.*, 2004, 5: 292-302.
38. Haubrich W.S., Berk J.E., Malignant tumours of the colon and rectum, In: *Gastroenterology*, Bockus H.L. (Eds.), 3rd ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 1976, 2: 1009.
39. Haverback B.J., Diagnostic procedures in the study of pancreatic disorders, In: *Gastroenterology*, Bockus H.L. (Eds.), 3rd ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 1976, 3: 961.
40. Hedins A., Zoubir F., Lundgren T., Hammarström S., Epitope specificity and cross-reactivity pattern of a large series of monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen, 1986, 23(10): 1053-1061.

41. Hefta S.A., Hefta L.J., Lee T.D., Paxton R.J., Shively J.E., Carcinoembryonic antigen is anchored to membranes by covalent attachment to a glycosylphosphatidylinositol moiety: identification of the ethanolamine linkage site, PNAS, 1988, 85: 4648-4652.
42. Herbeth B., Bagrel A., A study of factors influencing plasma CEA levels in an unselected population, Oncodevelopmental Biology and Medicine, 1980, 1(4-5): 191-198.
43. Hörig H., Medina A.F., Conkright A.W., Kaufman H.L., Strategies for cancer therapy using carcinoembryonic antigen vaccines, Expert Reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Press ISSN, 2000: 1462-3994.
44. [http://cis.nci.nih.gov/fact/5\\_18.htm](http://cis.nci.nih.gov/fact/5_18.htm)
45. [http://www.cancer.org/docroot/PED/content/PED\\_2\\_3X\\_TumorMarkers.htm](http://www.cancer.org/docroot/PED/content/PED_2_3X_TumorMarkers.htm)
46. <http://www.pathlab2u.com/s-cancers.html>
47. <http://www.survivingandwinning2.com/breakthroughs/imaging/tumor-markers.htm>
48. <http://www.tc-cancer.com/tumormarkers.html>
49. Karlıkaya C., Erdoğan S., Akkoçlu A., Oktay G., Güner G., Uçan E.S., Çımrın A.H., Akciğer kanserinde çoklu tümör belirleyicisi analizi, Toraks Dergisi, 2003, 4(3): 248-259.
50. Kocatürk U., Açıklamalı Tıp Terimleri Sözlüğü, 9. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2000.

51. Köksal F., Floresan Antikor Tekniği (FAT), Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Western Blotting, Southern Blotting ve Northern Blotting Teknikleri, Mikrobiyoloji Bülteni, I. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Özel Sayısı, Meteksan Anonim Şirketi, Ankara, 2000, 34, Sayı 1-2, 77-112.
52. Köhler G., Derivation and diversification of monoclonal antibodies, *The EMBO Journal*, 1985, 4(6): 1359-1365.
53. Kraft S.C., Kirsner J.B., Immunology in gastroenterology, In: *Gastroenterology*, Bockus H.L. (Ed.), 3rd ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 1976, 4: 601.
54. Kubly J., Antigen-antibody interactions, In: *Immunology*, 2nd ed., Kubly J. (Ed.), W.H. Freeman and Company, New York, 1994: 148-150.
55. Kubly J., Cancer and the immune system, In: *Immunology*, 2nd ed., Kubly J. (Ed.), W.H. Freeman and Company, New York, 1994: 588-592.
56. Kubly J., Hybridomas and monoclonal antibody, In: *Immunology*, 2nd ed., Kubly J. (Ed.), W.H. Freeman and Company, New York, 1994: 157-163.
57. Ledbetter, J.A., Herzenberg L.A., Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens, *Immunol. Rev.*, 1979, 47: 63-90.
58. Loewenstein M.S., Zamcheck N., Carcinoembryonic antigen and the liver, *Gastroenterology*, 1977, 72: 161.
59. Mach J.P., Carrel S., Merenda C., In vivo localisation of radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma grafted into nude mice, *Nature*, 1974, 248(450): 704-706.

60. Madjic O., Cluster report: CD66, In: Leucocyte Typing IV., Knapp W. (Ed.), Oxford, England: Oxford University Press, 1989: 838.
61. Michaud G., Salcius M., Zhou F., Bangham R., Bonin J., Guo H., Snyder M., Predki P., Schweitzer B., Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays, *Nature Biotechnology*, 2003, 21: 1509-1512.
62. Milstein C., Monoclonal antibodies, *Sci. Ame.*, 1980, 243 (4): 66-74.
63. Moertel C.G., Fleming R., An evalution of the carcinoembryonic antigen (CEA) test for monitoring patients with resected colon cancer, *JAMA*, 1993, 270: 943-947.
64. Molnar I.G., Gitnick G.L., Carcinoembryonic antigen transmission by blood products, *Gastroenterology*, 1976, 70: A-63/921.
65. Moraes D.W., Lima E.N.P., Prado I.B., Cameiro C.R.W., Evaluation of an anti-carcinoembryonic monoclonal antibody suitable for immünoscentigraphy, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1999, 32: 967-74.
66. Munjal D., Brady P.G., Quantitation and immunochemical characterization of carcinoembryonic antigen and glucose phosphate isomerase in blood and washings of patients with gastric and colonic diseases, *The American Journal of Digestive Disease*, 1978, 23: 57.
67. Newkirk M.M., Rauch J., Mageed R.A., Jefferis R., Posnett D.N., Silverman G.J., Restricted immunoglobulin variable region gene usage by hybridoma rheumatoid factors from patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, *Mol. Immunol.*, 1993, 30: 255-263.

68. Oikawa S., Nakazato H., Kosaki G., Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 142(2): 511-518.
69. Patt Y.Z., Podoloff D.A., Curley S., Kasi L., Smith R., Bhadkamkar V., Charnsangavej C., Technetium 99m-labeled IMMU-4, a monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen, for imaging of occult recurrent colorectal cancer in patients with rising serum carcinoembryonic antigen levels, *J. Clin. Oncol.*, 1994, 12: 489-495.
70. Pavelic P.Z., Pavelic L., Pavelic K., Peacock J.S., Utility of anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies for differentiating ovarian adenocarcinomas from gastrointestinal metastasis to the ovary, *Gynecologic Oncology*, 1991, 40(2): 112-117.
71. Perkins G.L., Slater E.D., Sanders G.K., Prichard J.G., Serum Tumor Markers, *Am. Fam. Physician*, 2003, 68: 1075-1082.
72. Pine La R.T., Hill R.H., Monoclonal antibodies, *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 2001, 12(1): 64-70.
73. Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K., Tumour Immunology, In: *Immunology*, 6th ed., Roitt I.M. Brostoff J., Male D. (Eds.), Edinburgh ; New York : Mosby, 2001: 294-300.
74. Roitt I.M., Delves P.J., Antibody Production, In: *Roitt's Essential Immunology*, 10th ed, Roitt I.M. and Delves P.J. (Eds.), Blackwell Science Ltd., Italy, 2001: 45-53.
75. Seregni E., Ferrari L., Martinetti A., Bombardieri E., Diagnostic and prognostic tumor markers in the gastrointestinal tract, *Seminars in Surgical Oncology*, 2001, 20: 147-166.

76. Shuster J., Freedman S.O., Gold P., Fetal antigens in clinical medicine, Laboratory Diagnosis of Immunologic Disorders, Vyas G.N., Stites D.P., Brecher G. (Eds.), Grune et Stratton, New York-San Francisco-London, 1974: 204-210.
77. Stewart S.J., Monoclonal antibody production, In: Basic methods in antibody production and characterization, Howard G.C., Bethell D.R. (Eds.), CRC Press, LLC. USA, 2001: 51-67.
78. Tatsuta M., Iishi H., Yamamura H., Okuda S., Value of gastric juice carcinoembryonic antigen in identifying high-risk patients for gastric cancer, *Oncology*, 1988, 45(1): 30-34.
79. Teh J.G., Thompson C.H., McKenzie I.F.C., Production of monoclonal antibodies to serum antigens in colorectal carcinoma, *Journal of Immunological Methods*, 1988, 110(1): 101-109.
80. Thomson D.M.P., Krupey J., Freedman S.O., Gold P., The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system, *PNAS*, 1969, 64: 161-167.
81. Thompson J.A., Mauch E.M., Chen F.S., Hinoda Y., Schrewe H., Berling B., Barnert S., von Kleist S., Shively J.E., Zimmermann W., Analysis of the size of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family: isolation and sequencing of N-terminal domain exons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 158(3): 996-1004.
82. Thompson M.A., Cancro M.P., Dynamics of B cell repertoire formation: normal patterns of clonal turnover are altered by ligand interaction, *J. Immunol.*, 1982, 129: 2372-2376.

83. Vollmers H.P., Wozniak E., Stepien-Botsch E., Zimmermann U., Muller-Hermelink H.K., A rapid method for purification of monoclonal human IgM from mass culture, *Hum. Antibodies Hybridomas*, 1996, 7(1): 37-41.
84. Way B.A., Kessler G., Tumor marker overview, *Laboratory Medicine Newsletter*, 1996, 4(9): 1-15.
85. Yıldırım T., Başalp A., Yücel F., Manav A.İ., Sezen İ.Y., Generation of anti-idiotypic antibodies that mimic HbsAg and vaccination against Hepatitis B virus, *Hybridoma and Hybridomics*, 2004, 23: 3.
86. Zamcheck N., Moore T.L., Dhar P., Kupchik H., Immunologic diagnosis and prognosis of human digestive-tract cancer: carcinoembryonic antigens, *New England Journal of Medicine*, 1972, 286(2): 83-86.
87. Zamcheck N., The present status of carcinoembryonic antigen (CEA) in diagnosis detection of recurrence prognosis and evaluation of therapy of colonic and pancreatic cancer, *Clinics in Gastroenterology*, 1976, 5: 625.
88. Zimmermann W., Weber B., Ortlieb B., Rudert F., Schempp W., Fiebig H.H., Shively J.E., von Kleist S., Thompson J.A., Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors, *Cancer Research*, 1988, 48(9): 2550- 2554.

## ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Uşak'ta doğdu. Orta ve lise öğrenimini Uşak Orhan Deniz Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2002 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. Aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde Yüksek Lisans öğrenimine başladı.