

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***LEISHMANIA* PARAZİTLERİNDEN LİPOFOSFOGLİKAN (LPG)
SAFLAŞTIRILMASI VE AŞI MODELİ OLARAK LPG-POLİMER KONJUGATININ
ANTİLEİSHMANİAL ETKİNLİĞİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO* İNCELENMESİ**

RABİA ÇAKIR KOÇ

DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. ADİL M. ALLAHVERDİYEV

İSTANBUL, 2012

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***LEISHMANIA* PARAZİTLERİNDEN LİPOFOSFOGLİKAN (LPG)
SAFLAŞTIRILMASI VE AŞI MODELİ OLARAK LPG-POLİMER KONJUGATININ
ANTİLEISHMANİAL ETKİNLİĞİNİN *İN VİTRO* VE *İN VİVO* İNCELENMESİ**

Rabia ÇAKIR KOÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 10.12.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü'nde **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Z. Tanıl KOCAGÖZ
Acıbadem Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Murat HÖKELEK
İstanbul Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Melahat Bağirova
Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'ın 1085170SBAG–4007 numaralı projesi ve TUBİTAK-BİDEB Yurt İçi Doktora Burs Programı ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca akademik bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, değerli danışman hocam Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV' e; çalışmalarım boyunca aynı ilgi ve desteği gösteren hocam Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA' ya;

Tezin gerçekleşmesinde katkı sağlayan Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK'a, Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığı'na, Yıldız Teknik Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ediyorum.

Bölümümüzün kurucusu Prof. Dr. Mehmet Mustafa AKDESTE'ye ve kurucu üyelerden Prof. Dr. Huriye KUZU'ya teşekkürü bir borç bilip bu iki değerli hocamızı saygı ve minnet ile anıyorum.

Ayrıca bu çalışmayı 1085170SBAG-4007 numaralı proje ile destekleyen ve yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca burs desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK);

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'ne (YÜDETAM) ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na;

Tez çalışmalarım sırasında laboratuvarımızı ziyaret ederek destek ve önerilerde bulunan Prof. Dr. Kwang Poo Chang (Rosalind Franklin University) ve Prof. Dr. Sam Turco'ya (University of Kentucky Chandler Medical Center);

Tezin gerçekleşmesinde katkıları bulunan değerli tez izleme komitesi hocalarım Prof. Dr. Dilek T. BALIK, Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ ve TÜBİTAK projesinde yer alan hocalarım Yrd. Doç.Dr. Zeynep AKDESTE, Doç.Dr. Sevil DİNÇER'e ve Araştırma Görevlisi Murat TOPUZOĞULLARI'na;

Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği grubumuza özellikle de, Sezen CANIM ATEŞ, Serhat ELÇİÇEK, Serap YEŞİLKIR BAYDAR, Olga Nehir ÖZTEL, Emrah Şefik ABAMOR ve Serkan YAMAN'a;

Doktora dönemim boyunca göstermiş olduğu anlayış ve destek için eşim Hakan KOÇ'a; Hayatımın her anında desteklerini benden esirgemeyen babam Muharrem ÇAKIR, annem Güler ÇAKIR ve çok sevgili ablalarım;

Bu tezin hazırlanmasında emeği geçen herkese,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER

Aralık, 2012

Rabia ÇAKIR KOÇ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	xi
KISALTMA LİSTESİ	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÇİZELGE LİSTESİ	xviii
ÖZET	xx
ABSTRACT	xxiii
BÖLÜM 1.....	2
GİRİŞ.....	2
1.1 Literatür Özeti	2
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Bulgular	5
BÖLÜM 2.....	8
GENEL BİLGİLER.....	8
2.1 Leishmaniasis	8
2.2 Parazitin Morfolojisi ve Yaşam Döngüsü	8
2.3 Taksonomi.....	10
2.4 Epidemiyoloji	11
2.5 Leishmaniasisin Epidemiyolojisinde Rol Oynayan Faktörler.....	12
2.6 Leishmaniasisin Klinik Yönleri	13
2.7 VL Hastalığının Gelişmesi	14
2.8 Tanı.....	16
2.9 Tedavi.....	17
2.10 <i>Leishmania</i> Parazitlerinin Kültürü.....	18
2.11 Leishmaniasise Karşı İmmün Yanıt Mekanizması	19
2.11.1 Th1 Th2'ye Karşı.....	21
2.11.2 <i>Leishmania</i> Parazitlerinin Fagositik Hücreleri İstila Etmesi	23

2.11.3	Th1/Th2 Birikimi ve Aşı Geliştirilmesi	23
2.12	<i>Leishmania</i> Parazitlerinin Önemli Glikokonjugatları	24
2.12.1	Promastigotlardan Elde Edilen LPG' nin Yapısı	24
2.12.2	Amastigotlardan Elde Edilen LPG'nin Yapısı	26
2.12.3	Vektör ile Etkileşimde LPG'nin Rolü.....	27
2.12.4	Omurgalı Konak– <i>Leishmania</i> Etkileşimlerinde LPG	29
2.12.4.1	LPG' nin Hücrel Komponentler ile Etkileşimi.....	30
2.12.4.2	Fagozom-endozom Füzyonunun ve Oksidatif Patlamanın LPG Tarafından Engellenmesi	31
2.12.4.3	Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentazın (iNOS) Düzenlenmesi	32
2.12.4.4	Hücrel Sinyal İletimi ve Sitokin Üretimi	33
2.12.4.5	Parazitofor Vakuoller içinde <i>Leishmania</i> Parazitlerinin Hayatını Sürdürmesi.....	35
2.12.4.6	Hidrolitik Enzimlerin İnhibisyonu	35
2.12.4.7	Kalsiyum Bağlanması.....	36
2.12.4.8	C-Fos Gen Ekspresyonunun İnhibitörü.....	36
2.12.4.9	Kemotaksisin İnhibisyonu	37
2.12.4.10	Toksik Oksijen Metabolitlerinin Temizlenmesi	37
2.12.4.11	IL-1 Üretiminin İnhibisyonu	37
2.12.4.12	TNF- α Reseptörlerinin Değiştirilmesi	37
2.12.5	Aşı Adayı Olarak Lipofosfoglikanın Önemi	38
2.13	<i>Leishmaniasis</i> Karşı Aşı Geliştirilmesi.....	38
2.13.1	<i>Leishmaniasis</i> Karşı Aşı Geliştirilmesinde Kullanılan Deney Hayvan Modelleri	39
2.13.2	Birinci Nesil Aşılar.....	41
2.13.2.1	Zayıflatılmış <i>Leishmania</i> Aşıları	42
2.13.2.2	İntihar Kasetleri	43
2.13.2.3	Ölü <i>Leishmania</i> Aşıları	43
2.13.3	İkinci Nesil Aşılar	44
2.13.3.1	gp63.....	44
2.13.3.2	PSA-2/gp46/M-2	45
2.13.3.3	LACK	46
2.13.3.4	FML.....	46
2.13.3.5	LiESA-MDP	47
2.13.3.6	Sistein Proteinaz (CP)	47
2.13.3.7	Glukoz-düzenleyici protein 78 (GRP78)	48
2.13.3.8	Amastigot Antijenleri (P4, P8,A2)	48
2.13.3.9	HASPB1.....	49
2.13.3.10	LCR1.....	49
2.13.3.11	Histon 1 (H1)	49
2.13.3.12	Open Reading Frame Fragment (ORFF)	49
2.13.3.13	dp72	50
2.13.3.14	P0	50
2.13.3.15	Kinetoplastid Membran Proteini-11 (KMP-11).....	50
2.13.3.16	Flajellar rod proteini-2 (PFR-2).....	51
2.13.3.17	Poliprotein aşıları	51

Protein Q.....	51
Leish-111f.....	51
LPG	52
2.13.4 Üçüncü Nesil <i>Leishmania</i> Aşıları: DNA Aşıları	52
2.13.4.1 Heterolog prime-boost aşısı	54
2.13.5 Kum Sineği Tükürük Antijenlerini İçeren Aşılar	55
2.13.6 Dendritik Hücre Temelli Aşılar	56
2.13.7 Leishmaniasise Karşı Non-Patojenik Aşı Adayı olan <i>L. tarentolae</i> ..	56
2.13.8 <i>Leishmania</i> Aşı Adaylarında Test Edilen Adjuvanlar	57
2.13.8.1 İnterlökin-12 (IL-12)	58
2.13.8.2 Granülosit makrofaj-koloni stimulating faktör (GM-CSF)	58
2.13.8.3 Bacille Calmette Guerin (BCG)	59
2.13.8.4 Montanide ISA 720.....	59
2.13.8.5 Alüminyum Tuzları	59
2.13.8.6 Monofosforil Lipid A.....	60
2.13.8.7 CPG Oligodeoksinükleotit (CpG ODN).....	60
2.13.8.8 Lipozomlar.....	60
2.13.8.9 Glukan	60
2.13.8.10 <i>Corynebacterium parvum</i> (<i>C. parvum</i>)	60
2.13.8.11 Saponinler (Quil-A, ISCOM and QS-21).....	61
2.13.8.12 Freund's Adjuvans.....	61
2.13.9 Adjuvan Özellikli Polimerler	62
2.13.9.1 İnsanlar İçin Polielektrolit İmmün Uyarıcılar.....	65
2.13.9.2 Poliakrilik Asit	67
BÖLÜM 3.....	70
DENEYSEL ÇALIŞMALAR	70
3.1 DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Çözeltiler	70
3.1.1 DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	70
3.1.2 DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri	72
Çizelge 3. 1 Deneylerde kullanılan maddeler (devam)	73
3.1.3 Çözeltilerin Hazırlanması	74
3.1.3.1 1x PBS Tampon Hazırlanması	74
3.1.3.2 1x Tripsin solusyonu	74
3.1.3.3 DMEM-F12 Besiyerinin Hazırlanması	74
3.1.3.4 RPMI-1640 Besiyerinin Hazırlanması	75
3.1.3.5 Hücre Dondurma Çözeltisinin Hazırlanması	75
3.1.3.6 Beyin Kalp İnfüzyon Besiyerinin Hazırlanması	75
3.1.3.7 Coomassie Brilliant Blue Reaktifinin hazırlanması.....	75
3.1.3.8 MTT Solüsyonunun Hazırlanması.....	75
3.1.3.9 50 mg/mL ve 0,5 mg/mL PAA (MA: 100,000 Da) Çözeltisinin Hazırlanması.....	76
3.1.3.10 Sitokin Çözeltilerinin Hazırlanması.....	76
3.1.3.11 Bağlama Tamponu Hazırlanması.....	77
3.2 Hücre Kültür Çalışmaları	77

3.2.1	<i>L. donovani</i> Promastigot Formlarının <i>in vitro</i> Devamlı Kültürünün Yapılması	77
3.2.1.1	Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı	77
3.2.1.2	Kültürün ve Kullanılan Besiyerlerinin Sterillik Kontrolü	77
3.2.1.3	<i>Leishmania</i> Promastigotlarının Büyümesini Destekleyen Farklı Kültür Koşullarının İncelenmesi	78
	MCF-7 hücre metabolitlerinin alınması	78
	MCF-7 hücre metabolitlerinin <i>Leishmania</i> promastigotlarının gelişimine etkisi	78
3.2.2	İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (MCF-7)	78
3.2.2.1	MCF-7 Hücre Serisinin Kültür ve Kriyoprezervasyonunun Yapılması	78
3.2.3	Fare Fibroblast Hücre Hattı (L929)	79
3.2.3.1	L929 Kültürünün Kültür ve Kriyoprezervasyonunun Yapılması ..	80
3.2.4	Fare Makrofaj Hücre Hattı (J774)	80
3.2.4.1	J774 Hücre Serisinin Kültür ve Kriyoprezervasyonu Yapılması ..	81
3.2.5	<i>L. donovani</i> Parazitlerinin Amastigot Formlarının <i>in vitro</i> Kültürünün Yapılması	81
3.2.5.1	Enfektifliğin Hesaplanması	82
3.3	<i>Leishmania</i> Parazitlerinden Lipofosfoglikanın İzole Edilmesi	82
3.3.1	<i>L. donovani</i> Parazitlerinin Büyük Ölçekli Kültürünün Yapılması	82
3.3.2	Santrifüj ile Parazit Biyomasının Elde Edilmesi	84
3.3.3	Sonikatör ile Biyomasın Parçalanması	84
3.3.4	Propanol Ekstraksiyonu	84
3.3.5	Elde Edilen Ekstraktların Liyofilize Edilmesi	85
3.3.6	Lipofosfoglikanın Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması	85
3.3.6.1	Oktil-Sefaroz Kolonun Paketlenmesi ve Dengelenmesi:	86
3.3.6.2	Lipofosfoglikanın İzolatının Kolona Yüklenmesi	86
3.3.6.3	Lipofosfoglikanın Hidrofobik Oktil Gruplarına Bağlanması	86
3.3.6.4	Lipofosfoglikanın Elüsyonu	86
3.3.6.5	Kolonun Rejenerasyonu	87
3.3.7	Lipofosfoglikanın Karakterizasyonu	87
3.3.7.1	İnce Tabaka Kromatografisi ile LPG Varlığının Saptanması	87
3.3.7.2	Coomassie Brilliant Blue Yöntemi ile Protein Açısından Saflığın Tayini	87
3.3.7.3	Fenol Sülfürik Asit Metodu	88
3.4	Lipofosfoglikanın Polimerlerle Konjugasyonunun Yapılması	88
3.4.1	Polimerlerin <i>Leishmania</i> Parazitlerinden İzole Edilen Lipofosfoglikanın ile Konjugasyonu	88
3.4.2	Lipofosfoglikanın-Polimer Konjugatının Karakterizasyonunun Yapılması ..	89
3.4.2.1	GPC Analizi	89
3.5	Sentezlenen Polimerlerin, Konjugatın ve İzole Edilen Lipofosfoglikanın Toksisitesinin İncelenmesi	89
3.5.1	Sentezlenen Polimerlerin, Konjugatın ve İzole Edilen Lipofosfoglikanın Toksisitesinin MTT Yöntemiyle İncelenmesi	89

3.5.2	PAA'nın L929 ve MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi.....	89
3.5.3	LPG'nin J774, L929 ve MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi.....	90
3.5.4	LPG-PAA Konjugatının J774, L929 ve MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi.....	90
3.5.5	PAA, LPG ve LPG-PAA Konjugatının J774 ve L929 Hücreleri Üzerindeki Toksisitesinin Flow Sitometrik Olarak İncelenmesi	91
3.6	<i>In Vivo</i> Deney Hayvanı Çalışmaları.....	91
3.6.1	Çeşitli Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması	91
3.6.2	LPG İçeren Çeşitli Aşı Formülasyonlarının BALB/c Farelere Enjekte Edilmesi.....	92
3.6.3	BALB/c Farelerden Serum Örneklerinin Alınması	92
3.6.4	ELISA (Enzyme-linked İmmunosorbent Testi) Yöntemi ile Serumdaki İmmünoglobulin Miktarlarının Tayini	92
3.6.5	Fare Serum Örneklerindeki Antikoru IFAT (İndirekt Floresans Antikor Testi) ile İncelenmesi	93
3.6.6	Elde Edilen Antikoru <i>In Vitro</i> Hücre Kültüründe Antileishmanial Etkisinin İncelenmesi	93
3.6.7	İmmünize Edilen Farelerin <i>L. donovani</i> Parazitleri ile Enfekte Edilmesi.....	94
3.6.8	Giemsa Boyama ve Mikro Kültür Yöntemi (MKY) ile Fare Periferik Kanında Parazit Varlığının ve Miktarının Tespit Edilmesi	94
3.6.9	Farelerin Sakrifiye Edilmesi ve Organlarının Ayrılması	95
3.6.10	Peritoneal Makrofaj Hücrelerinin İzolasyonu ve <i>Leishmania</i> Promastigotları ile <i>in vitro</i> Enfeksiyonu	95
3.6.11	Enfekte Olmuş Periton Makrofajlarının Giemsa ile Boyanması.....	96
3.6.12	Karaciğer ve Dalaktan Yayma Hazırlanması ve Enfeksiyonun Değerlendirilmesi.....	96
3.6.13	Dalaktan Sitokin Üretiminin Değerlendirilmesi	97
3.6.13.1	INF- γ ve IL-2.....	97
3.6.13.2	IL-4 ve IL-10	98
3.7	İstatistikî Değerlendirme.....	98
BÖLÜM 4		99
DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA		99
4.1	<i>In Vitro</i> Kültür Çalışmaları	99
4.1.1	<i>Leishmania</i> Promastigotlarının Büyümesini Destekleyen Farklı Kültür Koşulları.....	99
4.1.2	<i>L. donovani</i> Parazitlerinin Beyin Kalp İnfüzyon Besiyesinde Büyük Ölçekli Kültürünün Yapılması	101
4.1.3	<i>Leishmania</i> Parazitlerinin Amastigot Formlarının <i>in vitro</i> Kültürünün Yapılması	103
4.2	<i>Leishmania</i> Parazitlerinden LPG'nin İzole Edilmesi	104
4.2.1	LPG'nin Karakterizasyonu	104
4.2.1.1	İnce Tabaka Kromatografisi	104

4.2.1.2	Fenol Sülfürik Asit Metodu	105
4.2.1.3	Coomassie Blue Yöntemi Spektrofotometrik Protein Tayini	105
4.3	LPG'nin PAA ile Konjugasyonunun Yapılması	106
4.3.1	PAA'nın <i>Leishmania</i> Parazitlerinden İzole Edilen LPG ile Konjugasyonu ve Karakterizasyonunun Yapılması	106
4.4	PAA'nın, LPG-PAA Konjugatının ve İzole Edilen LPG'nin Toksisitesinin İncelenmesi	109
4.4.1	PAA'nın L929 ve MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi	109
4.4.2	LPG'nin J774 ve L929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi	110
4.4.3	LPG - PAA Konjugatının J774, L929 ve MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi	111
4.4.4	PAA, İzole Edilen LPG ve PAA-LPG Konjugatının L929 ve J774 Hücreleri Üzerindeki Toksisitesinin Flow Sitometrik Olarak İncelenmesi	113
4.5	<i>In Vivo</i> Deney Hayvanı Çalışmaları	114
4.5.1	ELISA Yöntemi ile Serumdaki İmmünoglobulin Miktarlarının Tayini	114
4.5.2	Fare Serum Örneklerindeki Antikor Varlığının IFAT (İndirekt Fluoresans Antikor Testi) ile İncelenmesi	116
4.5.3	Çeşitli Aşı Formülasyonları ile İmmünize Edilen BALB/c Fare Serumunun <i>in vitro</i> Ortamda <i>L. donovani</i> Promastigotlarının Canlılığı Üzerine Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi	117
4.5.4	Giemsa Boyama ve Mikro Kültür Yöntemi (MKY) ile Fare Periferik Kanında Parazit Varlığının ve Miktarının Tespit Edilmesi	118
4.5.5	Dalak Ağırlıklarının Tespit Edilmesi	119
4.5.6	Peritoneal Makrofaj Hücrelerinin İzolasyonu ve <i>Leishmania</i> Promastigotları ile <i>In Vitro</i> Enfeksiyonu	119
4.5.7	Karaciğer ve Dalaktan Yayma Hazırlanması ve Enfeksiyonun Değerlendirilmesi	121
4.5.8	İmmünize Fare Dalak Hücrelerinin IFN- γ , IL-2, IL-4 ve IL-10 Sitokin Üretimi	121
4.6	TARTIŞMA	123
BÖLÜM 5		131
SONUÇ VE ÖNERİLER		131
5.1	Sonuç Değerlendirmesi	131
5.2	Öneriler	134
KAYNAKLAR		135
EK-A		171
ÖZGEÇMİŞ		174

SİMGE LİSTESİ

Balb/c	Laboratuvar soy albino deney faresi (Albino laboratory bred mouse strain)
bp	Baz çifti
cc	Santimetre küp
Da	Dalton
Mw	Ağırlıkça-ortalama molekül kütlesi
Mn	Sayıcı-ortalama molekül kütlesi
M	Molar
mM	Milimolar
N	Normal
µg	Mikrogram
mg	Miligram
L	Litre
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
g	Gram
°C	Santigrat derece
J774	Fare monosit tümör makrofaj hattı

MCF-7	İnsan meme kanser hücresi
L929	Fare fibroblast hücresi
kDa	Kilo dalton
Mb	Megabaz
Sb	Antimon
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ϵ	Epsilon
μ	Mü

KISALTMA LİSTESİ

7-AAD	7 -Amino-Aktinomisin D
AFCs	Antikor formlu hücre
AIDS	Edinilmiş bağışık yetersizliği hastalığı
APC	Antijen-sunan hücreler
ATP	Adenozin Trifosfat
BCG	Bacille Calmette Guerin
BSA	Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albümine)
CD4+	CD4 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit
CD8+	CD8 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit
CO ₂	Karbondioksit
COOH	Karboksilik asit
CP	Sistein proteinaz
DAT	Direk aglutinasyon testi
DC	Dendritik hücre
DHFR	Dihidrofolat redüktaz
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSO	Dünya Sağlık Örgütü
EDC	Karbodiimid
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Test (Enzyme Linked İmmünosorbent Assay)
FAST	Fast Agglutination Screening Test
FBS	Sığır Fetal Serum (Fetal Bovine Serum)

FCA	Freund's tam adjuvanı
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FML	Fuktoz-mannoz ligandı
GM-CSF	Granülosit makrofaj-koloni stimulating faktör
gp63	<i>Leishmania</i> yüzey membran metaloproteazı
gp46	Membran glikoprotein 46
GPC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
GPI	Glikozilfosfatidil inozitol
GPILs	Glikoinozitolfosfolipit
GRP78	Glucose Regulated Protein 78
H2O2	Hydrogen peroxide
HASPB1	Açılınmış hidrofilik yüzey proteini B1
HCl	Hidroksi klorik asit
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
ICT	İmmünokromatografik test (İmmünocromatografic Test)
IFAT	İmmunofloresan antikör testi (İmmünofluorescent Antibody Test)
IFN- γ	İnterferon gama IgAİmmünoglobulin A
IgD	İmmünoglobulin D
IgE	İmmünoglobulin E
IgG	İmmünoglobulin G
IgM	İmmünoglobulin M
IL	İnterlökin
iNOS	Nitric oxide synthase
K ₂ HPO ₄	Potasyum fosfat (di)
KCl	Potasyum klorür
kDNA	Kinetoplasta ait deoksiribonükleik asit
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat (mono)
KMP-11	Kinetoplastid Membran Proteini-11
KL	Kütanöz Leishmaniasis
L-AMB	Lipozomal amfoterisin B
LACK	Leishmania aktive C kinaz için homolog reseptör
LAMP	Lizozoma bağlı membran proteini
LCs	Langerhans hücresi

LD1	Leishmania DNA 1
LDU	Leishman-Donovan Units
LPG	Lipofosfoglikan
LPS	Lipopolisakkarit
LRR	Lösinden zengin tekrarlar
MAPKs	Mitojen aktive protein kinaz
MARCKS	Fosforile miristoile edilmiş alaninden zengin C kinaz substratı
mDH	Myeloid DH
MHC	Major Histocompatibility Complex
MKL	Mukokütönöz leishmaniasis
MKY	Mikrokültür yöntemi
MLEE	Çoklu lokus enzim elektroforezi
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
Na ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaCNBH ₃	Sodium cyanoborohydride
NaOH	Sodyum hidroksil
NaN ₃	Sodyum azid
NET	Hücre dışı tırlar
NH ₂	Amin
NH ₃	Nucleoside hydrolase
NK	Doğal katil hücreler
NO	Azot monoksit(Nitrik oksit)
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
ORFF	Open Reading Frame Fragment
PAA	Poliakrilik asit
PAMP	Patojen ilişkili pattern
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate buffered saline)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
pH	Potansiyel hidrojen
PKCα	Protein Kinaz C α
PPG	Proteofosfoglikan

PS	Fosfatidilserinin
PSA	Promastigot yüzey antijeni 2
PV	Parazitofor vakuol
PVP	Poli-4-vinilprimidin
RNA	Ribonükleik asit
RNS	Nitrogen
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Revolutions per minutes
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
SAG	Sodyum amonyum glukonat
SB	Sağlık Bakanlığı
SP15	Tükrük proteini 15
SPE	Sentetik Polielektrolit
SSG	Sodyum stiboglukonat
Th ₁	T helper 1 (Yardımcı T hücre yanıtı alt sınıf 1)
Th ₂	T helper 2 (Yardımcı T hücre yanıtı alt sınıf 2)
TLR	Toll-Like reseptör
TNF- α	Tümör nekroz faktör- α
TS	Timidilat sentaz
TSA	Tiyole özgü antioksidanın
UV	Ultraviyole
WB	Western Blot
VL	Visseral leishmaniasis
ZnCl ₂	Çinko klorür

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1 <i>Leishmania</i> parazitlerinin hayat döngüsü	10
Şekil 2. 2 Türkiye’de Leishmaniasis Dağılımı	12
Şekil 2. 3 LPG’nin yapısı [6].....	25
Şekil 2. 4 Adjuvan özellikli polimerler	63
Şekil 2. 5 Hücre membranında bulunan ve iyon pompası olarak görev alan protein yapılar	64
Şekil 2. 6 a) LPG molekülünün yapısı, b) LPG’nin NaIO ₄ ile aldehid türevine yükseltgenmesi, c) LPG’nin etilen daimin ve sodyumsiyanoborohidrür ile aminlenmesi, d) LPG ve PAA’nın karbodiimid kullanılarak konjugasyonu ..	69
Şekil 3. 1 Büyük ölçekli flasklarda kültürün yapılması.....	83
Şekil 3. 2 Kültürün (A) 25 cm ² (B) 75 cm ² ve (C) 150 cm ² ’lik flasklarda yapılması	83
Şekil 4. 1 %10 FBS içeren kültür ortamında parazitlerin morfolojileri	100
Şekil 4. 2 Metabolit içeren kültür ortamında parazitlerin morfolojileri (× 20)	100
Şekil 4. 3 <i>Leishmania</i> promastigotları ile enfekte olmuş makrofajlar (A. 24. saat, B. 48. saat, ×100).....	104
Şekil 4. 4 İnce tabaka kromatografisi ile LPG varlığının saptanması	105
Şekil 4. 5 <i>Leishmania donovani</i> ile enfekte edilmiş periton makrofajları, LPG (A); Kontrol (B)	120

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 4. 1	Farklı konsantrasyonlardaki metabolitlerin parazitlerin proliferasyonuna etkisi 100
Çizelge 4. 2	Farklı kültür ortamlarının parazit proliferasyonuna etkisi; (1) Besiyeri (FBS'siz), (2) FBS'siz ortamda çoğaltılan MCF-7 hücrelerinin metaboliti, (3) FBS'li standart besiyeri, (4) FBS'li standart besiyerinde çoğaltılmış MCF-7 hücrelerinin metaboliti 101
Çizelge 4. 3	Soğutmalı inkübatörde (27°C) flask içinde yapılan parazit kültürünün çoğalma eğrisi 102
Çizelge 4. 4	<i>L. donovani</i> promastigotlarının cam kültür şişelerinde çalkalamalı (I) ve durağan (II) kültürlerin çoğalma eğrileri (27°C) 103
Çizelge 4. 5	Fenol sülfürik asit metodu ile 490 nm'de glukoz tarafından oluşturulan standart 105
Çizelge 4. 6	Coomassie blue yöntemi 595 nm'de BSA tarafından oluşturulan standart 106
Çizelge 4. 7	İzole edilen LPG'nin GPC cihazından elde edilen kırılma indisi (a), ışık saçılması (b), viskozimetri (c) kromatogramları. 107
Çizelge 4. 8	LPG-PAA konjugatı (yeşil) ve PAA'nın (siyah) GPC cihazından elde edilen kırılma indisi (a), ışık saçılması (b), viskozimetri (c) kromatogramları 108
Çizelge 4. 9	PAA'nın farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi 109
Çizelge 4. 10	PAA'nın farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerinin canlılığına etkisi 110
Çizelge 4. 11	LPG'nin farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi 110
Çizelge 4. 12	LPG'nin farklı konsantrasyonlarının J774 fare makrofaj hücre canlılığına etkisi 111
Çizelge 4. 13	LPG-PAA konjugatının farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi 111
Çizelge 4. 14	LPG-PAA konjugatının farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerinin canlılığına etkisi 112
Çizelge 4. 15	LPG-PAA konjugatının farklı konsantrasyonlarının J774 fare makrofaj hücre canlılığına etkisi 112
Çizelge 4. 16	LPG, PAA ve LPG-PAA konjugatının J 774 hücreleri üzerindeki toksik etkisinin flow sitometrik olarak incelenmesi 113
Çizelge 4. 17	LPG, PAA ve LPG-PAA konjugatının L929 hücreleri üzerindeki toksik

	etkisinin flow sitometrik olarak incelenmesi	113
Çizelge 4. 18	10 µg LPG içeren çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmiş BALB/c fare serumlarındaki LPG'ye karşı polivalen antikor seviyeleri	115
Çizelge 4.19	35 µg LPG içeren çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmiş BALB/c fare serumlarındaki LPG'ye karşı IgG antikor seviyeleri	115
Çizelge 4. 20	Çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmiş BALB/c fare serumlarındaki LPG spesifik IgM antikor seviyelerinin IFAT yöntemi ile incelenmesi	116
Çizelge 4. 21	Çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmiş BALB/c fare serumlarının antileishmanial etkisi	117
Çizelge 4. 23	İmmünize ve kontrol grubu deney hayvanlarının dalak ağırlık ortalamaları	119
Çizelge 4. 24	10 ve 35 µg LPG içeren çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmiş BALB/c fare gruplarından <i>in vitro</i> enfekte peritoneal makrofajlarının enfeksiyon indekslerindeki düşüş yüzdeleri	120
Çizelge 4. 25	Farklı formülasyonlarda immünize edilip enfekte edilen farelerdeki parazit yükünün azalma yüzde değeri.	121
Çizelge 4. 26	İmmunize farelerden izole edilen dalak hücrelerinden IFN-γ üretimi	122

**LEISHMANIA PARAZİTLERİNDEN LİPOFOSFOGLİKAN (LPG)
SAFLAŞTIRILMASI VE AŞI MODELİ OLARAK LPG-POLİMER KONJUGATININ
ANTİLEISHMANİAL ETKİNLİĞİNİN *İN VİTRO* VE *İN VİVO* İNCELENMESİ**

Rabia ÇAKIR KOÇ

Biyomühendislik Bölümü
Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV

Leishmaniasis, enfekte *Flebotomus* cinsi sineklerin kan emme sırasında *Leishmania* protozoan parazitlerini memeli konaklara bulaştırması ile ortaya çıkan bir hastalık grubudur. Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSO) belirlediği en önemli tropikal hastalıklar listesindeki 6 hastalıktan biridir. Dünyada 350 milyon kişi leishmaniasise yakalanma riski altındadır. Bu hastalık 98 ülkede endemik olup, enfekte kişilerin sayısı ise 12 milyondur. Leishmaniasis aynı zamanda Türkiye'nin de ciddi halk sağlığı problemlerinden biri olup 20 milyondan fazla kişi bu hastalığın tehdidi altındadır. Ülkemizde hastalığın visseral ve özellikle de kutanöz formları görülmektedir. Sağlık Bakanlığı'nın son yıllardaki bilgilerine göre, Türkiye genelinde her yıl yalnızca KL için yaklaşık 5.000 yeni olgu bildirilmektedir. Leishmaniasisin endemik olduğu komşu ülkelerden son yıllarda ortaya çıkan savaş nedeniyle insanların göç etmesi hastalığın giderek artmasına sebep olabilir. Hastalığın dünyada ve ülkemizde bu kadar yaygın olmasının en önemli sebepleri; hastalık etkenlerinde kullanılan ilaçlara, vektörlerinde ise insektisitlere karşı dirençliliğin gelişmesi, birçok memeli hayvanın hastalık etkenlerinin rezervuarı olması, tanıda yaşanan problemler, küresel iklim değişiklikleri gibi nedenlerdir. Tüm bunların yanı sıra günümüzde leishmaniasise karşı etkin bir aşı bulunmamakta ve hastalığı engelleyici etkin bir aşının geliştirilmesinin zorunlu hale geldiği son yıllarda DSÖ tarafından da özellikle vurgulanmaktadır.

1940'lı yıllardan günümüze kadar hastalığa karşı etkin bir aşı geliştirilmesi için çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlara uygun olarak aşı çalışmaları birinci, ikinci ve üçüncü nesil aşılar olarak gruplandırılmaktadır. Birinci nesil aşıların temelini öldürülmüş ya da canlılığı azaltılmış parazitler; ikinci nesil aşıların temelini tıp ve teknolojinin gelişmesiyle saflaştırılmış antijen aşıları, rekombinant protein aşıları; üçüncü nesil aşıların temelini ise DNA aşıları ve dendritik hücre aşıları oluşturmaktadır. Bütün bu yaklaşımlara rağmen etkin bir aşı geliştirilmesi halen mümkün olmamıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda özellikle saflaştırılmış doğal antijenlere dayalı aşılara önem verilmektedir. Bu gruptan özellikle *Leishmania*'nın yüzeyindeki baskın bir molekül olup, parazitin makrofajlarda hayatta kalmasını sağlayan ayrıca *Flebotomus*'lardaki yaşam döngüsü için de oldukça önemli olan LPG molekülünün aşı adayı olarak ümit verici olduğu belirtilmiştir.

LPG ile yapılan önceki çalışmalarda *L. mexicana* ve *L. major*'dan elde edilen LPG'nin tek başına veya farklı adjuvanlar ile farelerde kısmi koruma sağladığı gösterilmiştir. Böylece yapılan bu çalışmalar, leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde LPG'nin önemli bir immünojen molekül olduğunu gösterse de; tek başına veya kullanılmış mevcut adjuvanlarla korumanın yetersiz olduğu ortaya çıkmıştır. Yapılan son yayınlarda *Leishmania* parazitlerinin glikokonjugatlarının aşı olarak kullanılabileceği ancak daha etkin bir taşıyıcı ve adjuvana gereksinim olduğu ortaya konulmuştur.

Son yıllarda polielektrolit polimerlerin; protein, doğal mikrobiyal polisakkaritler ve onların sentetik analogları gibi antijenik yapılar ile karıştırılması sonucunda immün uyarıcı olarak görev yaptığı ve bağışıklık yanıtını birkaç kat güçlendirdiği bilinmektedir. Ayrıca *Leishmania* parazitlerinin LPG'sinin NH₂ grupları ile poliakrilik asitin COOH grupları arasında konjugat oluşturma teorik olarak mümkün olması bu moleküllerden elde edilen konjugatın aşı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Buna göre de; bu çalışmada ilk kez olarak *Leishmania* parazitlerinden LPG'nin izolasyonu, saflaştırılması ve aşı modeli olarak LPG-PAA konjugatının antileishmanial etkinliğinin *in vitro* ve *in vivo* incelenmesi amaçlanmıştır.

Hedefe ulaşmak için *Leishmania* parazitlerinin kültürü elde edilip büyük ölçekli kültür metotları geliştirildi. Daha sonra çoğaltılan kültürden biyomas elde edilip LPG izolasyonunda kullanıldı. Saflaştırılan LPG polimer ile konjugasyonu ve karakterizasyonları gerçekleştirip çeşitli hücre kültürlerinde MTT yöntemi ve flow sitometrik olarak toksisiteleri incelendi. Toksik olmadığı belirlenen farklı aşı formülasyonlarının BALB/c farelere enjeksiyonu yapıldı ve immün yanıtlar, ELISA, IFAT, sitokin ölçülmesi, Mikrokültür yöntemi, peritoneal makrofajların *in vitro* enfektifliğinin ölçülmesi, dalak ve karaciğer ağırlıklarının ölçülmesi, Leishman-Donovan Units (LDU) ile parazit yükünün belirlenmesi yöntemleri ile incelendi.

Elde edilen sonuçlar incelenen tüm parametrelere göre en yüksek aşı aracılı immün koruma yanıtının LPG-PAA konjugatı ile sağlandığını göstermiştir. Özellikle Leishman-Donovan ünite göre parazit yükündeki en yüksek düşüş %81,17 ile 35 µg LPG içeren LPG-PAA konjugat içeren grupta olmuştur. Sadece LPG ile immünize edilen kontrol grubunda ise bu değer %44,93'tür. Diğer gruplarda 10 µg LPG içeren LPG-PAA konjugatında %53,37, 35 µg LPG içeren LPG + PAA fiziksel karışımında % 55,2, sadece LPG ile immünize edilen grupta %44,93, LPG + Freund's adjuvanı içeren grupta ise

%65,8 olarak saptanmıştır. Böylece bu çalışmada *Leishmania* parazitlerinden LPG'nin izolasyonu, saflaştırılması ve aşı modeli olarak LPG-PAA konjugatının antileishmanial etkinliğinin *in vitro* ve *in vivo* incelenmesi sonucunda, hem fiziksel karışımın hem de konjugatın aşı olarak etkinliğinin yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. Elde edilen bu sonuçların leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde bundan sonraki çalışmalara ışık tutacak yeni bir yaklaşımın öncüsü olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Anti-leishmanial Aşı, *Leishmania*, Lipofosfoglikan, Polimer, Konjugat, BALB/c

ABSTRACT

PURIFICATION OF LYPOPHOSPHOGLICAN (LPG) FROM *LEISHMANIA* PARASITES AND INVESTIGATION OF ANTILEISHMANIAL EFFICIENCY OF LPG-POLYMER CONJUGATE AS VACCINE MODEL *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Rabia ÇAKIR KOÇ

Department of Bioengineering
PhD. Thesis

Advisor: Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV

Leishmaniasis is a group disease transmitted by the bite of the infected *Phlebotomus* while obtaining blood from mammalian host. According to the World Health Organization, leishmaniasis is one of the six major tropical diseases. 350 million people in the world are under the risk of the disease. It is endemic in 98 country and 21 million people is infected. Leishmaniasis is also important public health problem in Turkey and 20 million people is under the risk of disease. In our country, visceral and especially cutaneous form is endemic. According to Ministry of Health statistics, 5000 new cases are occurring every year. It is expected that this number will be on increase due to migration from endemic neighboring countries. The important reasons for spread of the disease are resistance to the drugs, global climate changes, difficulty of diagnosis. Also there is still no effective vaccine against to leishmaniasis.

Different studies for vaccine development have been conducted since 1940 as first, second and third generation vaccine studies. These studies are based on killed parasites, live-attenuated parasites, purified and recombinant antigen based vaccines, DNA vaccines and dendritic cell based vaccines. Although there have been studies on vaccine development for long years, there is still no effective vaccine against to leishmaniasis. Recent studies give much more importance to LPG, one of the most important surface antigens. LPG, with glycolipid structure, is dominant molecule in the

surface of parasites. LPG is responsible for pathogenesis and survival of parasites in mammalian host and vector.

LPG is being investigated as a vaccine candidate thanks to its important properties. In a study, purified LPG from *L. major* and *L. mexicana* alone or with adjuvant injected to the mice and this application provided a partial protection against the disease. These studies showed that LPG is important immunogenic molecule, however, LPG, alone or with the present adjuvant does not have enough efficiency. Recently, it was revealed that synthetic polyelectrolytes, when introduced in mixtures with typical antigens (proteins, natural microbial polysaccharides, and their synthetic analogs), serve as immunostimulants by enhancing immune response as several times. Also it is theoretically possible to conjugate LPG to PAA by using NH₂ groups of LPG and COOH groups of PAA.

Therefore, for the first time in this study, the aim is to prepare the conjugate of LPG with polyacrylic acid (PAA) which has adjuvant property, and to investigate the efficiency of the conjugate as a vaccine on mice models against to leishmaniasis.

To reach the goal of this study, firstly large-scale culture methods were developed. Then obtained cultures are used in isolation of LPG. Purified LPG was conjugated to polymer and MTT assay and flow cytometry were performed in order to determine the toxicity of the conjugates on various cell cultures. Different vaccine formulations were determined as non-toxic and injected to the BALB/c mice and immune responses were studied with ELISA, IFAT, cytokine measurement, microcultures method, in vitro infectivity of peritoneal macrophages, measurement of the spleen and liver weights, Leishman-Donovan Units (LDU) for determininig the parasite burden.

Efficiency of the conjugate has been researched by ELISA, IFAT, micro culture method, additionally in vitro infectivity of peritoneal macrophages, spleen and liver mass and parasite burden calculation by Leishman-Donovan Units (LDU) had been investigated by several methods. According to the obtained results, LPG-PAA conjugate possessed the most effective vaccine-Induced protective immune response comparing to the control group bound to all of studied parameters. Especially according to LDU, 35 µg LPG including LPG-PAA conjugate has a decrease of 81,17% for parasite burden but 53,37% decrease for 10 µg LPG including group. Especially, the highest decrease of parasite burden exists for 35 µg LPG including LPG-PAA conjugate with a rate of 81,17%. This rate is 44,93% for immunized of LPG control group. Other groups, 10 µg LPG including LPG-PAA conjugate has a decrease of 53,37%, 35 µg LPG including LPG-PAA physical mixture has a decrease of 55,2% , the immunization by just LPG group has a decrease of 44,93% and LPG-Freund's adjuvant group has a decrease of %65,8. Thereby, for the first time in the world and in our country, a new vaccine oriented to LPG-polymer has been developed against leishmaniasis.

Keywords: Anti-leishmanial Vaccine, *Leishmania*, Lipophosphoglycan, Polymer, Conjugate, BALB/c

1.1 Literatür Özeti

Leishmaniasis, enfekte *Flebotomus* cinsi sineklerin kan emme sırasında *Leishmania* protozoan parazitlerini memeli konaklara bulaştırması ile ortaya çıkan bir hastalık grubudur. Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) belirlediği en önemli tropikal hastalıklar listesindeki 6 hastalıktan biridir. Dünyada 350 milyon insan leishmaniasise yakalanma riski altında olup, hastalık 98 ülkede endemiktir ve enfekte kişilerin sayısı 12 milyondur [1]. Hastalık Türkiye'nin de ciddi halk sağlığı problemlerinden biri olup 20 milyon kişi bu hastalığın tehdidi altındadır. Ülkemizin çeşitli bölgelerinde hastalığın visseral ve özellikle de kutanöz formlarına rastlanmaktadır. Sağlık Bakanlığı istatistiklerine göre, yalnızca kutanöz leishmaniasis (KL) için, her yıl yeni olgu sayısı yaklaşık 5.000 kişidir [2], [3]. Son yıllarda ortaya çıkan savaş nedeniyle leishmaniasisin endemik olduğu komşu ülkelerdeki insanların ülkemize göç etmesi hastalığın giderek artacağını göstermektedir. Hastalığın dünyada ve ülkemizde bu kadar yaygın olmasının en önemli sebepleri; hastalık etkenlerinde kullanılan ilaçlara vektörlerinde ise insektisitlere karşı dirençliliğin gelişmesi, birçok memeli hayvanın hastalık etkenlerinin rezervuarı olması, tanıda yaşanan problemler, küresel iklim değişiklikleri gibi nedenlerdir. Tüm bunların yanı sıra günümüzde leishmaniasise karşı etkin bir aşı bulunmamakta ve hastalığı engelleyici etkin bir aşının geliştirilmesinin zorunlu hale geldiği son yıllarda DSÖ tarafından da özellikle vurgulanmaktadır [4], [5].

1940'lı yıllardan günümüze kadar hastalığa karşı etkin bir aşı geliştirilmesi için çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlara uygun olarak aşı çalışmaları birinci, ikinci ve

üçüncü nesil aşilar olarak gruplandırılmaktadır. Birinci grup aşiların temelini öldürölmüş ya da canlılığı azaltılmış parazitler; ikinci grup aşiların temelini tıp ve teknolojinin gelişmesiyle saflaştırılmış antijen aşiları, rekombinant protein aşiları; üçüncü grup aşiların temelini ise DNA aşiları ve dendritik hücre aşiları oluşturmaktadır [6]. Ölü parazit aşilarının kullanımı güvenli olurken etkinliğinin düşük olduğu saptanmıştır. Zayıflatılmış *Leishmania* aşiları (Leishmanizasyon) ise parazitlerin sonradan virölanslık kazanması ve hastalığın ortaya çıkması gibi güvenlik nedenleri ile kullanımı durdurulmuştur. Rekombinant antijenler ile DNA aşilarının birçoğunun etkinliğinin düşük olduğu ve yeterli koruma sağlayamadığı belirlenmiştir. Son zamanlarda yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda özellikle saflaştırılmış doğal antijenlere dayalı aşiların önemi vurgulanırken, parazitin yüzey antijenlerinden lipofosfoglikan (LPG) öne çıkmıştır. LPG molekülü *Leishmania*'nın yüzeyindeki baskın bir molekül olup glikolipid yapısındadır. LPG, memeli konaktaki patojenez etkenidir ve parazitin makrofajlarda hayatta kalmasını sağlar. Ayrıca parazitin *Flebotomus*'lardaki yaşam döngüsü için de oldukça önemlidir. LPG parazitlerin ön bağırsak epiteline yapışmasını sağlar ve parazitleri *Flebotomus*'ların ön bağırsağındaki enzimatik ortamdan korur. Promastigotların yüzeylerindeki LPG ve gp63 gibi yapılar parazitin makrofaj reseptörleri tarafından tanınmasını sağlar [6]. LPG, oksidatif metabolitlerin oluşumunu sağlayan anahtar molekül protein kinaz C'yi inhibe etmesi ile makrofajların sinyallerini engelleyerek parazitin makrofaj içerisinde hayatta kalmasını sağlar [7].

LPG'nin bu gibi özellikleri molekülün aşı adayı olarak incelenmesi açısından oldukça önemlidir. LPG'nin antileishmanial aşı özelliği ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada saflaştırılmış *L. major* LPG'si farelere verilmiş ve parazit enfeksiyonuna karşı koruma sağlandığı görölmüştür [8]. LPG'nin lipozomla oluşturduğu konjugatlar ile yapılan çalışmalarda ise *L. mexicana*'ya karşı aşıl原因an farelerde, hastalığın şiddetinde herhangi bir artış görölmemiştir. Bir başka çalışmada ise LPG, immün uyarıcı tripalmitoyil-S-gliserilsistein'e konjuge edilmiş hayvan modelleri üzerinde denenmiş ve potansiyel bir aşı adayı olduğu saptanmıştır. Böylece LPG ile kullanılan lipozom ve tripalmitoyil-S-gliserilsistein gibi adjuvanlar koruma özelliği gösterebilir de, incelenen az sayıdaki adjuvan ile yeterli sonuç alınamamıştır [6]. Bu çalışmalar sadece kutanöz leishmaniasise karşı yapılmıştır. Böylece yapılan çalışmalar

LPG'nin, aşı adayı olarak güncel olduğunu ancak şimdiye kadar denenmiş adjuvanlardan farklı olarak etkin bir adjuvan gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Son yıllarda polielektrolit polimerlerin; protein, doğal mikrobiyal polisakkaritler ve onların sentetik analogları gibi antijenik yapılar ile karıştırılması sonucunda immün uyarıcı olarak görev yaptığı ve bağışıklık yanıtını birkaç kat güçlendirdiği bilinmektedir. *Leishmania* parazitlerinin LPG'sinin NH₂ grupları ile poliakrilik asitin COOH grupları arasında konjugat oluşturma'nın mümkün olması, bu moleküller ile elde edilecek konjugatın aşı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Şimdiye kadar çeşitli viral etkenlere karşı polimerlere dayalı aşı çalışmaları yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Adjuvan etkisi gösteren polimerler leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde de önemli rol oynayabilir. Ancak şimdiye kadar dünyada leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde polimerlerin adjuvan özellikleri dikkate alınmamış ve bu konuda çalışma yapılmamıştır.

1.2 Tezin Amacı

Buna göre de bu çalışmada ilk kez olarak *Leishmania* parazitlerinden LPG'nin izolasyonu, saflaştırılması ve aşı modeli olarak LPG-PAA konjugatının antileishmanial etkinliğinin *in vitro* ve *in vivo* incelenmesi amaçlanmıştır.

Lipofosfoglikan ile poliakrilik asitin konjugatının hazırlanması ve etkin bir aşı olmasının esas hipotezini ise aşağıdakiler oluşturmaktadır.

1. *Leishmania* parazitlerinin kamçısı dahil tüm yüzeyinde yoğun şekilde bulunan, parazitin hayatta kalması ve patojenezinde oldukça büyük rolü olup en önemli immünojen bölgelerinden biri olan lipofosfoglikanın aşı adayı olarak öneminin bilinmesi ancak tek başına yetersiz olması
2. Polielektrolit polimerlerden poliakrilik asitin adjuvan özelliklerinin bildirilmesine rağmen şimdiye kadar leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde polimere dayalı bir yaklaşımın mevcut olmaması,

3. En önemlisi ise lipofosfoglikanın yapısında bulunan NH₂ grupları ile poliakrilik asitin COOH grupları arasında konjugat oluşturmaının mümkün olmasıdır.

Hedefe ulaşmak için aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir;

- *Leishmania* parazitlerinin kültürü elde edilip büyük ölçekli kültür metotlarının geliştirilmesi,
- Kültürden biyomas elde edilip LPG izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu,
- Saflaştırılan LPG'nin polimer ile konjugasyonu ve karakterizasyonları ,
- LPG, PAA ve LPG-PAA konjugatının çeşitli hücre kültürlerinde MTT yöntemi ve flow sitometrik olarak toksisitelerinin incelenmesi,
- Farklı aşı formülasyonlarının BALB/c farelere enjeksiyonu,
- Farelerde oluşan immün yanıtların serolojik yöntemler ile (ELISA, IFAT, sitokin ölçülmesi) ölçülmesi
- Enfekte olmuş farelerde parazit varlığının belirlenmesi için mikrokültür yönteminin etkinliğinin incelenmesi
- Farelerden izole edilen peritonel makrofajların *in vitro* enfekte edilmesi ve enfektifliğinin ölçülmesi,
- Visseral leishmaniasisin önemli bulgularından olan dalak ve karaciğer ağırlıklarının ölçülmesi,
- Aşı etkinliğinin ölçülmesinde önemli parametrelerden olan Leishman-Donovan Units (LDU) ile parazit yükünün belirlenmesi.

1.3 Bulgular

Bu çalışmada tezin amacına uygun olarak, şimdiye kadar aşı geliştirilmesi için kullanılan yaklaşımlardan farklı olarak polimere dayalı yeni bir yaklaşım geliştirilerek ilk kez LPG-PAA konjugatının antileishmanial aşı özelliği ortaya çıkartılmıştır. Bu amaçla *Leishmania* parazitlerinden LPG izolasyonu, saflaştırılması, karakterizasyonu, LPG-PAA konjugatının toksisite çalışmaları ve aşı etkinliğinin ELISA, IFAT, MKY yöntemlerinin yanı sıra aşı çalışmalarında kullanılan güncel yöntemler olan peritonel makrofajların *in vitro* enfektifliğinin ölçülmesi, dalak ağırlıklarının ölçülmesi, Leishman-Donovan Units (LDU)

ile parazit yükünün ölçülmesi ve dalak hücrelerinden sitokin üretiminin tespit edilmesi yöntemleri ile aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

1. Parazitlerden LPG elde etmek için büyük miktarda parazit biyomasi gerektiğinden büyük ölçekli kültür optimizasyonu sağlandı ve ölçek büyütme ile kültürün büyük miktarda çoğaltılması yöntemi geliştirildi.
2. Parazit biyomasi elde edildikten sonra LPG'nin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapıldı. Ticari olarak satılmayan ve dünyanın sayılı laboratuvarlarında üretimi olan LPG ülkemizde ise ilk kez olarak saf halde elde edildi.
3. Daha sonra elde edilen LPG, PAA ve konjugatların fare fibroblast (L929), insan meme kanser hücrelerinde (MCF-7) ve fare makrofaj hücrelerinde (J774) incelenen konsantrasyonlarda toksik etki göstermediği MTT yöntemi ve flow sitometrik olarak gösterildi.
4. Ticari olarak satılan ELISA kitleri, *Leishmania* parazitlerinin LPG'den farklı moleküllerine karşı olduğu için bu kitler kullanılarak LPG'ye karşı oluşan antikor ölçmek mümkün olmadığı için LPG'ye karşı farelerde oluşan antikor miktarlarını tayin etmeye imkan sağlayacak LPG-spesifik ELISA yöntemi geliştirildi. Elde edilen sonuçlara göre, LPG, konjugat ve fiziksel karışım enjekte edilen fare gruplarındaki antikor miktarının, kontrole göre daha yüksek olduğu, ayrıca LPG-polimer konjugatı içeren gruplarda diğer immünize gruplara göre, antileishmanial antikor seviyesinin daha yüksek olduğu saptandı.
5. IFA testinde ise kontrol grubunda incelenen 4 haftada da *Leishmania*'ya spesifik IgM antikor saptanmazken, LPG içeren çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmeye çalışılan BALB/c farelerinde *Leishmania*'ya spesifik IgM antikor yanıtı belirlendi. İncelenen gruplar arasında en fazla floresan ışıma yoğunluğu ise LPG-PAA (konjugat) grubunun 2, 3, 4. haftasında ve LPG-PAA (fiziksel) grubunun 4. haftasında gözlemlendi.
6. İmmünize ve kontrol grubundan alınan serum örneklerinin *L. donovani* promastigotları üzerine antileishmanial etkisinin *in vitro* incelenmesi sonucunda, LPG-PAA konjugatı içeren gruptan alınan serum örneklerinin, *L. donovani* promastigot canlılığına en fazla etkiyi gösterdiği tespit edildi.

7. Enfekte edilen farelerin Giemsa boyama ve MKY ile yapılan incelemelere göre, tüm immünize gruplarda ve tüm haftalarda alınan kan örneklerinde, Giemsa sonuçları negatif çıkmasına rağmen mikrokültür sonuçları pozitif çıkmıştır. Ancak örnekteki parazit sayıları incelendiğinde aşılana farelerin kanındaki parazit sayılarının kontrol grubuna göre daha düşük miktarda olduğu gösterildi. Ayrıca MKY'nin aşı deneylerinde mevcut yöntemlerden farklı olarak fareleri öldürmeden parazit yükünü tayin etmeye imkan sağladığı tespit edildi.
8. LPG+PAA konjugatı ile immünize edilen gruplarda dalak ağırlığının, kontrol grubunun yarısı kadar olduğu tespit edildi. Ayrıca tüm immünize gruplarda dalak ağırlığında kontrole göre düşüş olduğu belirlendi.
9. Periton makrofajlarında enfeksiyon indeksindeki en belirgin azalma LPG-PAA konjugatında (10 µg LPG için %87; 35 µg LPG için %89), sonrasında ise LPG-PAA fiziksel karışım (10 µg LPG için %65,36; 35 µg LPG için %67), LPG+ Freund's Adjuvan grubu (10 µg LPG için %46,22; 35 µg LPG için %43) ile immünize edilmiş farelerde belirlendi. Bu sonuçlar da aşı aracılı koruyucu immün yanıtın en iyi LPG-PAA konjugatı ile aşılana fare gruplarında olduğunu göstermektedir.
10. Leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde kullanılan ve önemli bir parametre olan Leishman-Donovan unite göre parazit yükünde en belirgin azalma % 81,17 ile 35 µg LPG içeren LPG + PAA konjugat grubunda gözlenmiştir. 10 µg LPG içeren grupta ise bu düşüş % 53,37'dir. Ayrıca 35 µg LPG içeren LPG + PAA fiziksel karışımında % 55,2, sadece LPG ile immünize edilen grupta % 44,93, son olarak ta LPG + Freund's adjuvanı içeren grupta % 65,8 oranında parazit yükünde düşüş belirlenmiştir. 10 µg LPG içeren gruplarda ise LPG + PAA fiziksel karışımındaki düşüş % 36,23, sadece LPG ile immünize edilen grupta % 34,40 olarak belirlenmiştir. Böylece aşı formülasyonlarının içerdiği LPG miktarı artırıldığı zaman, oluşan immün yanıtla ilgili olarak parazit yükünde anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir.
11. Sitokin incelenmesi ile konjugat grubunda IFN-γ seviyesinin yüksek olması, immün yanıtın Th1 yönünde olduğunu göstermektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Leishmaniasis

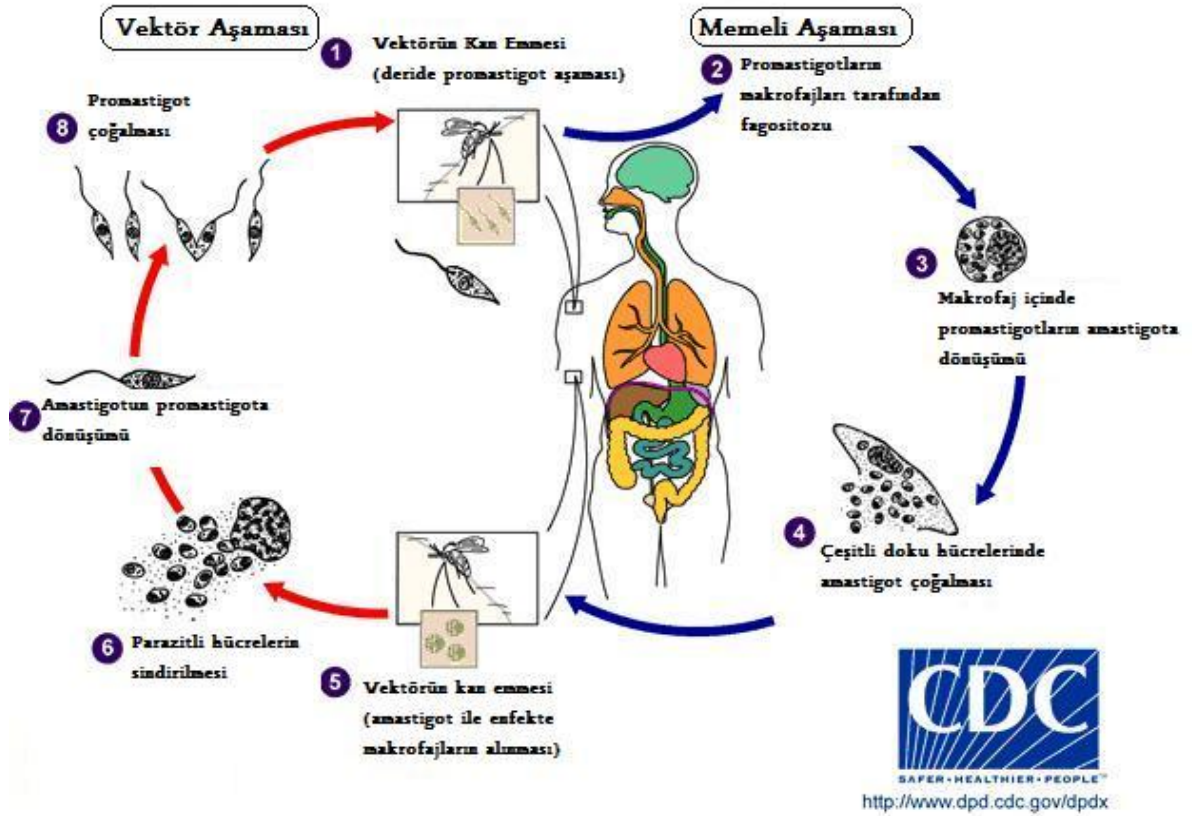
Leishmaniasis, enfekte *Flebotomus*'ların ısırması ile memelilere bulaştırılan protozoan parazitik bir hastalıktır. Hastalığın visseral (VL), kutanöz (KL) ve mukokutanöz (MKL) olmak üzere 3 farklı klinik tipi bulunmaktadır. Leishmaniasis ihmal edilmiş bir hastalık olarak belirtilmesine rağmen hastalığın taksonomisi, epidemiyolojisi, klinik bulguları, tanısı ve tedavisi üzerine birçok çalışma yapılmaktadır [10].

2.2 Parazitin Morfolojisi ve Yaşam Döngüsü

Leishmania parazitleri morfolojik ve biyokimyasal olarak farklılık gösteren 2 forma ayrılır. *Leishmania* parazitleri, memeli makrofajları içerisinde kamçısız amastigot formunda, vektör vücudunda kamçılı promastigot formunda bulunur [4]. Vektör formu promastigot olarak bilinir ve kan kamçılılarına oldukça benzerdir. Promastigotlar, kinetoplast olarak bilinen ve halka DNA'nın çok sayıda tekrarlanan zincirlerini içeren mitokondri benzeri organale tutunan tek bir kamçı gösterirler [11]. Ayrıca lizozom, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı, vakuoller ve zengin DNA içeriğine sahip nükleusu bulunur [12].

Promastigotların iğ şeklinde gövdesi 10-15 μm uzunluğunda ve 1.5-3.5 μm genişliğindedir. Kamçı boyları 20 μm 'ye kadar ulaşabilir ve yüksek oranda hareketliliğe izin verir. Amastigot formları ise küre şeklinde bir yapıda olup yaklaşık 2-3 μm çapındadır [13, 14]. *Flebotomus*'ların enfekte konaktan (köpekler, kemirgenler,

keseliler gibi) kan emmesi ile döngü başlar (Şekil 2. 1). *Leishmania* paraziti içeren az miktardaki kan, lenf ve makrofajlar sindirilmeye başladığında amastigotlar *Flebotomus*'ların ortabarsağına göç eder ve burada promastigot formlarına dönüşür. Promastigotlar, vektörün orta barsağında lateral ayrılma ile bölünürler ve kamçıları aracılığıyla buraya tutunurlar. Promastigotlar vektörün hortum kısmına göç etme yeteneğine sahiptir ve bu göç sırasında yuvarlak ve kısa formun çeşitli varyasyonlarını gösterdikleri birkaç aşamaya girer. Bu proses metasiklogenez olarak adlandırılır, bu evrede parazitler olgun ve bölünmeyen enfektif aşamadadırlar [15]. Yüzey glikokonjugatları bu evrede sentezlenir ve promastigotun konak serumuna direncini artırır. Bu evredeki parazit, metasiklik promastigot olarak adlandırılır [6]. Bu metasiklik promastigotlar epitelyal hücrelerden ayrılır ve hortum bölümüne doğru göç ederler. Dört veya beş günlük bir dönem sonrası promastigotlar özafagusa ve tükürük kanallarına ilerler. Enfekte kum sineği ikinci bir kan emme sırasında farinks bölgesindeki promastigotları konak memeliye bulaştırır. Metasiklik promastigotlar memeli derisinin içinde insekt vektörün hortumu boyunca enjekte olurlar. Hastalığın rezervuarının kan akımına geçen promastigotlar mononükleer fagositik hücreler tarafından fagoliz edilir. Fagolizden sonra bölünen amastigotlara dönüşüm 24 saat içinde başlar. Fagolizozomal vezikül içinde bulunan amastigotlar, anaerobik solunum yapar, metabolik enzimleri düşük pH'da aktivite gösterir ve eşeysiz üreme ile bölünürler [15]. *Leishmania* parazitleri lizozomlardan salınan asit hidrolazların mikrobisidal aktivitesine direnç sağlayabilmektedir. Fagolizozomal parazitler yüksek basınca, düşük pH'ya ve hidrolaz enzimlerine maruz kalırlar ve bu stres faktörleri parazitin hücresel farklılaşmasını tetikler [16]. Sonuç olarak çoğalan amastigotlar konak hücreyi parçalar, parazitler serbest hale gelir ve yeni hücrelerle farklı organların dokularına yayılarak lezyonlara ve doku tahribatına neden olur [17, 18].



Şekil 2. 1 *Leishmania* parazitlerinin hayat döngüsü

2.3 Taksonomi

Mikroskopik inceleme veya parazit kültürleri kullanıldığında, *Leishmania*'nın farklı türleri morfolojik olarak benzer olduğu bilinmektedir. Bu nedenle *Leishmania*'nın sınıflandırılması coğrafik dağılım, vektör, tropizm ve klinik bulgulara dayandırılmaktadır [19]. Bilinen iki alt cins *Leishmania* ve *Viannia* gelişimlerini tamamladıkları kum sineğine göre (*Suprasyllaria* ve *Peripsyllaria*) ayırt edilirler. Alt cinslerin içerisindeki türlerin tanımlanmasında standart çoklu lokus enzim elektroforezi (MLEE) altın standarttır [20]. Ancak, 20 tanesi insanda hastalık oluşturan toplam 30 türü tanımlayan şu anki sınıflandırma sisteminin doğruluğu sürekli sorgulanmaktadır [21]. *Leishmania* taksonomisinde birçok moleküler metotlar kullanılmasına rağmen bu konu hala tartışmalıdır [22]. Son zamanlarda Fraga ve ark. yüksek derecede korunmuş 70 kDa ısı şok proteinlerinin dizilerini kullanarak farklı coğrafik bölgelerin izolatlarını ve suşlarını analiz ettiklerinde 17 incelemeye karşın sadece 8 monofletik grup olduğunu göstermişlerdir. *L. donovani* kompleksinde sadece *L. donovani* durumunu korumuş ve sadece *L. donovani infantum* alt tür olarak belirtilmiştir. Benzer olarak sadece *L. tropica*

değil *L. aethiopica* türlerinin de durumu korunmuş, *L. major* ise bağımsız türler olarak karar verilmiştir [23]. Yenidünya *Leishmania* ve *Viannia* göz önüne alındığında sadece *L. (L) mexicana*, *L. (V) braziliensis*, *L. guyanensis* ve *L. (V) lainsoni* bireysel türler olarak tanımlanmış ve *L. naiffi*'nin durumu ileri araştırmalar için beklemededir [24].

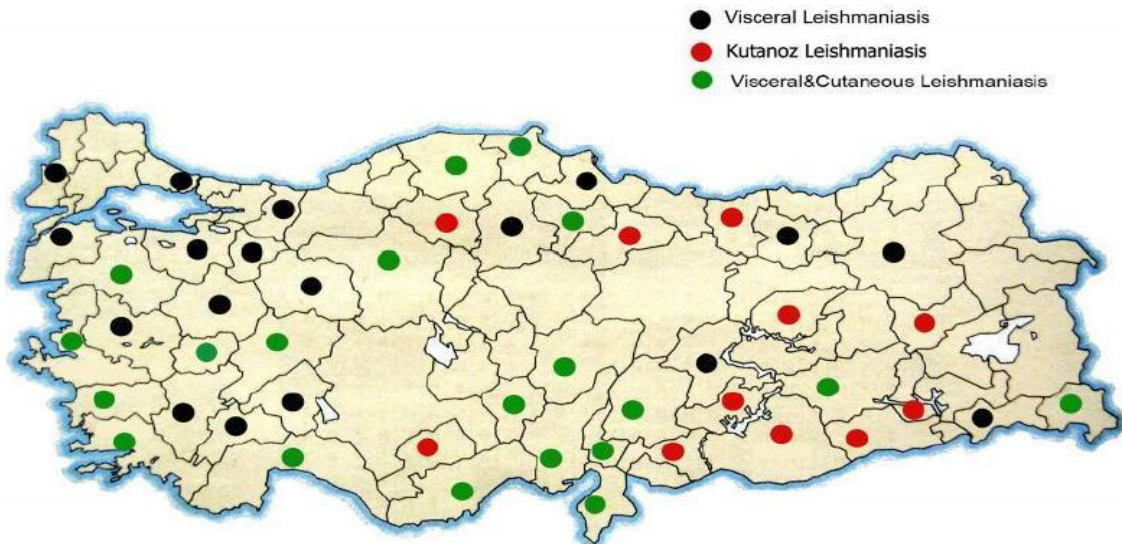
2.4 Epidemiyoloji

Leishmaniasisin küresel sağlık üzerindeki etkisi, hastalığın giderek yaygınlaşması, endemik alanların genişlemesi gibi çoklu faktörlere bağlı olduğu için oldukça hafife alınmaktadır. Bu açıdan hastalığın ortaya çıkışını hesaplamakta ikincil veriler oldukça faydalı olacaktır [25]. VL'in %90'ından fazlasının Hindistan ve Sudan'da olduğu ve Hindistan'ın Bihar eyaletinde tek başına tüm olguların %90'ını oluşturduğu bilinmektedir. Ancak 1977'den beri Bihar'dan resmi olarak açıklanan *L. donovani* enfeksiyonunun 200.000 vaka olduğu ve bu rakamın hastalığın gerçek insidansının altında olduğu düşünülmektedir [26]. Avrupa'da hem KL hem de VL'nin insidansı 0.02/100,000 ile 0.49/100,000 arasında olmaktadır [27]. Ancak çevresel değişimler, insan davranışları ve köpeklerin seyahatinde artışlar Kuzey Avrupa'da *L. infantum* görülmesini tetiklemiştir [28]. Birçok entomolojik araştırma iki VL vektörünün (*Phlebotomus perniciosus* ve *P. neglectus*) yoğunluğunun İtalya Alpler bölgesinde arttığını göstermiştir [29]. İnsan ve köpek VL'sinin onaylanan veya yerel vakaları sadece kuzey İtalya'da değil, kuzey Almanya'da da rapor edilmiştir [30]. DSÖ'nün açıklamalarına göre, hem KL hem de VL, Batı Akdeniz Bölgesinde 22 ülkenin 14'ünde (Afganistan, Mısır, İran, Irak, Libya, Fas, Pakistan, Suudi Arabistan, Somali, Sudan, Suriye, Tunus ve Yemen) ortaya çıkmıştır [31]. 2008'de, Afganistan'da 24.585, Suriye'de 29.140, İran'da 6.824 vaka olmak üzere 12 ülkede yaklaşık 100.000 yeni KL vakası rapor edilmiştir. Ancak son bir araştırmada Ürdün Nehri Vadisi'nde KL insidans oranının KL için, Suriye'de görülenden daha yüksek yani 75/100.000 olduğu bulunmuştur [32]. Sudan ve Somalide yaklaşık 5.000 VL vakasının yanı sıra diğer beş ülkede (İran, Fas, Suudi Arabistan, Suriye ve Tunus) 500 vaka belirlenmiş ancak bu sayı muhtemelen hastalığın gerçek miktarından daha düşüktür [31]. Latin Amerika'da Brezilya VL'nin en yüksek görüldüğü ülke olup 1980'lerde ortalama 1.500 vaka görülürken, 2000-2006 arasında bu rakamın 3.000'den fazla olduğu belirlenmiştir [5]. Bu ülkede hastalık

güneye ve batıya doğru yayılmakta ve Saõ Paulo ve Mato Grosso do Sul eyaletlerinde de gözlenmektedir.

Türkiye’de ise Sağlık Bakanlığı’nın (SB) 2005 yılı istatistiklerine göre ise hastalık son 12-15 yıl içinde artış göstermekte ve özellikle Şanlıurfa, Osmaniye, Adana, Hatay ve Mersin illerinden çok sayıda olgu bildirilmektedir [33]. Bu olguların illere göre dağılımı incelendiğinde Türkiye’nin pek çok bölgesinde hastalığın artma eğiliminde olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 2. 2).

Türkiye’de yaklaşık 20 milyon kişi leishmaniasis tehdidi altındadır. Ülkenin değişik bölgelerinde visseral ve özellikle de kutanoz formlarına rastlanmaktadır. Her yıl yeni olgu sayısı da yaklaşık 5.000 kişidir.



Şekil 2. 2 Türkiye’de Leishmaniasis Dağılımı

2.5 Leishmaniasisin Epidemiyolojisinde Rol Oynayan Faktörler

İnsan immün yetmezlik virüsünün (HIV) 1980’lerin ortasındaki ortaya çıkışı ve yayılması HIV/VL enfeksiyonun dört Akdeniz ülkesinde (İspanya, Fransa, İtalya, Portekiz) artışından sorumlu olup, vakaların çoğu damardan uyuşturucu kullanıcılarıdır [34]. HIV enfeksiyonu ayrıca leishmaniasisin pediatrikten yetişkin hastalığına kaymasında da rol oynamıştır. HIV/VL enfeksiyonunun en yüksek insidansı 1996 ile yüksek aktivite gösteren antiretroviral terapinin Avrupa’da yaygın hale geldiği 1998 yılı arasında görülmüştür [35]. Sonraki yıllarda Avrupa’nın güneyi boyunca (Portekiz hariç), HIV/VL

insidansındaki hızlı düşüş gözlenmiştir [36]. Buna karşın HIV/VL enfeksiyonu Afrika'nın Sahra altı bölgelerde, Hindistan'da ve Güney Amerika'da artmakta, bunun sebebi göçler, savaşlar, antimonallere direnç oluşumu ve retroviral terapi ile kombinasyonun ulaşılabilir olmaması olabilir. Örnek olarak Etiyopya'da Addis Ababa'da tüm VL vakalarının %35'i HIV enfeksiyonu ile ilişkili olup, pamuk ve susam tarımı için göçmenleri barındıran Batı Tigray'ın Humera bölgesinde bu rakam 2006'da %40'dır [37]. Sudan'da Médecins Sans Frontières'de HIV/VL enfeksiyonunun prevelans oranının %25 iken Khartoum'da %5-9,4 olduğu gösterilmiştir [38]. Brezilya'da 2001-2005 yılında rapor edilen VL vakalarının %2'si HIV ile enfektedir. Güney Avrupa'da HIV ile beraber görülen leishmaniasisin %37'si VL, %43'ü MKL'dir [34]. Ancak artan VL riski oldukça değişken olup Arnavutluk'ta VL'nin hala pediatrik olup toplam vakaların %90'ına yakınının 15 yaş altı hastalar olduğu ve en yüksek insidansın 0-6 yaş arasında görüldüğü belirlenmiştir [39]. KL ve VL organ ve kemik iliği nakil hastalarında, otoimmün hastalıkları olanlarda, immün baskılayıcı ve biyolojik ilaçlar (örn infliximab, etanercept, adalimumab) kullanan kişilerde fırsatçı olarak ilerlemektedir [40].

Diğer hasta kategorisi kanserden etkilenen kişilerdir. Son bir çalışmada 44 hastanın kanser ve leishmaniasis arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Leishmaniasis kanseri taklit etmekte ve kemoterapi alan hastalara enfeksiyonun tanısı zorlaşmakta ve sonuç olarak *Leishmania* türleri kutanöz veya mukozal bozukluklara neden olmaktadır [41]. Hastaların diğer bir grubu ise endemik bölgelere uluslararası seyahat edenler ve askeri personellerdir. 2004'de Irak, Kuveyt ve Afganistan'da görev alan Amerikan askerlerinde 600'den fazla KL vakası tespit edilmiştir. Ayrıca Afganistan'daki Hollandalı askerlerde %18.3 oranında KL tespit edilmiştir [42].

2.6 Leishmaniasisin Klinik Yönleri

Leishmaniasisin bulaştıktan sonra hastalık oluşturma süresi yaklaşık 2–4 ay arasında olup bir yıla kadar uzadığı görülmüştür. Hastalık genelde asemptomatik olarak başlamakla beraber, hastalığın aniden ortaya çıktığı vakalar da mevcuttur. Belirtiler başlangıçta halsizlik, baş ağrısı, zayıflama ve hafif ateş olup hastalığın ilerleyen evrelerinde dalak ve karaciğer büyümesi görülür. Günde iki kez 39–40°C'ye yükselen

aralıklı bir ateş, kilo kaybı, hepatosplenomegali ve pansitopeni VL'nin klasik özellikleridir [43].

Leishmaniasisin klinik bulguları hem enfekte eden parazitin türüne hem de konağın immün yanıtına bağlıdır [44]. HIV ile enfekte hastalarda VL'nin oluşumu HIV enfeksiyonu olmayan bireylerden farklıdır. HIV'li hastalarda tedaviye cevap oldukça düşük olmakta ve antiretroviral tedavi görmeyen kişilerde %90 oranında hastalık tekrar etmektedir [45]. Antiretroviral tedavi VL nüksetmesinin insidansını azaltmakla ilişkili olup hastalığın önlenmesinde genel etki sahibi değildir. Klasik AIDS ile ilişkili fırsatçı enfeksiyonlara karşı HIV/VL vakalarında enfeksiyonun kontrolü için antiretroviral tedavi ile CD4+ T hücre sayısında artış sağlanmıştır. HIV ile enfekte hastalarda paraziteminin kalitatif ve semikalitatif PCR ile belirlenmesi ile ilgili yapılan birçok çalışmada, spesifik tedaviye uygun cevap oluşturmaya rağmen *Leishmania* DNA'sının varlığının düşük seviyede devam ettiği gösterilmiştir [46]. Ek olarak, daha önce VL tedavisi yapılan kişilerde gözlenen KL (kala azar sonrası deri leishmaniasisi) genelde Hindistan ve Sudan ile sınırlı olmaktadır [47].

2.7 VL Hastalığının Gelişmesi

VL'nin inkübasyon periyodunun 2 ila 4 ay arasında olduğu bilinmektedir. Hastalık, akut, subakut veya kronik olarak gelişebilir veya konak tamamen asemptomatik olabilir. Asemptomatik kişiler genellikle serolojik yöntemler ile pozitif olarak belirlenir. Enfekte kişiler hastalığın subklinik formunda veya hastalığın açıkça görüldüğü şekilde olabilirler. VL'nin klasik belirtisi ateş, öksürük, kilo kaybı, halsizlik, ishal veya dizanteri ve karın şişliğidir. Hastalar ayrıca ciddi kaşeksi, pansitopeni (anemi, trombositopeni, lökopeni, nötropeni ve göreceli lenfositoz ve monositoz ile), ödem, kanama, hepatosplenomegali (splenomegali genellikle baskın) ve hypergammaglobulinemi (poliklonal B hücre aktivasyonu esas olarak IgG) ve hipoalbuminemi gösterebilirler [48]. VL ölümcül hastalık olma potansiyeline sahiptir ve enfeksiyona karşı uzun süreli immünite gelişir. *L. donovani* veya *L. infantum* tarafından oluşturulan insan VL'i, parazitlerin dalak, karaciğer ve kemik iliği gibi retiküloendotelyal sisteme yayılmaları ile genellenebilir. Enfeksiyona maruz toplumlarda yaşa bağımlı olarak güçlü hücresel immünite gelişir [49]. Birçok çalışma akut hastalık boyunca Th2 yanıtının baskın olduğunu ve leishmanial

antijenlere karşı Th1 yanıtının baskılandığını göstermiştir. Endojen interlökin 4 (IL-4), interferon gamaya göre (IFN- γ) baskındır ve poliklonal B hücre aktivasyonu sonucu hipergamaglobulinemi görülür [50]. Buna karşılık *L. major* fare modelinde hastalığın seyrinde hem Th1 hem de Th2 benzeri hücreler aktive olur ve IFN- γ ile IL-10'nun yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir [51]. IL-10'un IL-4'den daha fazla üretimi hastalığın klinik bir özelliği olarak görülmektedir. Bu sitokin immün sistemin baskılanması ile ilişkilidir ve genelde VL hastalarında görülür [52]. Ayrıca hastalığın ortaya çıkması Th1 ve Th2 hücre popülasyonu arasındaki denge tarafından düzenlenir ve belirlenir [53]. Bu nedenle insanlarda bile *L. donovani* ile koruyucu immünite veya VL'nin oluşumu ile ilgili cevabı ayırt etmek zordur. Çalışmalar doku sitokin mRNA ekspresyon çalışmaları *L. donovani* enfeksiyon patolojisinde hastalıkta IL-10 ile ilişkisini ve CD4+T hücre cevaplarının baskılanmasındaki rolünü göstermiştir [54]. Ancak aktif VL IFN- γ , IL-2, IL-10 ve IL-4 uyarılmasının artışı ile de ilişkili bulunmuştur. Hastalığın iyileşmesinden sonra IFN- γ , IL-4 ve IL-10 seviyeleri Th1 ve Th2 varlığıyla eş olarak kalıcıdır [55, 56, 57, 58, 59]. VL'li kişiler *Leishmania* antijenlerine karşı deri testinde negatif cevap verirler. Hatta bu kişilerin periferik kan mononükleer hücreleri *in vitro* olarak spesifik antijene maruz kaldıklarında proliferasyon veya IFN- γ üretiminde başarısız olmaktadır [60]. Farklı kişilerden elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinin sitokin üretimi hastalığı klasik VL'e doğru ilerlediğini gösterirken, IFN- γ üretimi hastalığın subklinik seviyede ilerlediğinin göstergesidir. Bu gözlemler enfeksiyonun ortaya çıkışında erken T hücre aktivasyon şekillerini incelemenin kritik önemini göstermektedir. Aktif hastalığı olan kişilerin *Leishmania* antijen karakteristiğinde zayıf T hücre aktivitesinin altında yatan neden IL-10'un dengesiz üretiminden kaynaklanabilir. IL-10'un kan seviyeleri bu sitokin lenf nodu hücreleri veya kala-azar hastalarının periferik kan mononükleer hücreleri tarafından salgılanan kadar yüksektir [52, 61, 62]. Anti IL-10 monoklonal antikorlarının akut enfekte hastaların periferik kan mononükleer hücrelerine eklenmesi ile *Leishmania* lizatına karşı proliferatif cevapta artış olduğu gözlenmiştir [52]. Bu bağlamda *L. infantum* antijeninin (pape22, 22-kDa protein) VL hastalarında mononükleer hücreleri tarafından IL-10 üretimini uyardığı tespit edilmiştir [63]. IL-10 major düzenleyici sitokin olup, üretimi hastalığın ortaya çıkmasında kritik kontrole sahiptir. IL-12 üretimindeki başarısızlık hastalığın aktif formu ile ilişkilidir [64]. Ayrıca

dengeşiz IL-10 üretimi hastalığın kutanöz forma doğru ilerleyişinde de rol oynayabilir [52].

2.8 Tanı

VL tanısı için kanda, kemik iliğı, dalak, karaciğer, lenf bezi ponksiyonu ile alınan materyalde *Leishmania* parazitlerinin varlığı incelenir. Direkt tanı ile yayma örnekleri Giemsa, Romanovski boyası ile incelenmektedir. Hasta örneğı Novy, Nicolle, Mac Neal (NNN) besiyerine ekilerek ya da deney hayvanlarına inoküle edilerek de tanı konulabilir. Ancak hayvan deneyleri zahmetli ve masraflıdır. NNN besiyeri ise tanıda duyarlılığı düşüktür ve uzun sürede sonuç verebilmektedir. Son yıllarda Allahverdiyev ve ark. [80] tarafından insan KL hastalarında kullanılan mikrokültür yöntemi, günümüzde VL tanısında da başarıyla uygulanmaktadır [65, 66, 67, 68, 69]. Klasik yöntemden farklı olarak bu yöntemle hastalığın tanısı 1-6 ay yerine 2-7 gün içinde konulabilmektedir. Türkiye’de ve dünyanın çeşitli bölgelerinde uygulanan bu yöntemle promastigotların deri, kemik iliğı, dalak aspirasyon materyallerinden ayrıca periferel kandan da izolasyonu mümkündür. Çünkü kapiler tüpte sıvı besiyeri kullanılarak, örnekte parazit sayısı az olsa bile sıvı kültürde çoğaltılmasının mümkün olduğu gösterilmiştir. Ayrıca mikroaerofilik bir ortam sağlanarak, kısa sürede amastigotların promastigotlara dönüştüğü ve bu promastigotların hızlı bir şekilde çoğaldığı da bilinmektedir. Mikrokültür yöntemi diğer yöntemlere göre daha hassas, daha spesifik, daha duyarlı, daha hızlı ve daha ekonomik olmasıyla öne çıkmaktadır [70].

Serolojik yöntemler ise ELISA, IFA, Western Blot, Formol-gel deneyi, DAT, FAT, immünokromotografik testlerdir. Serolojik yöntemler hızlı ve pratik olmaları ve invaziv olmayan örneklerde uygulanmaları nedeniyle önem kazanan testlerdir [71].

Afrika ve Hindistan’da, direk aglutinasyon (DAT) ve immünokromotografik test (ICT, k39 antijeni ile) sahada uygulaması pratik ve duyarlı popüler tanı yöntemleridir [72]. Ancak k39Ag testi Batı Afrika’da Hindistan’a göre daha az güvenilir olmaktadır [73]. K28 füzyon proteinine dayalı yeni geliştirilen tanı kitinin, Sudan ve Bangladeş’te duyarlılığı sırasıyla %96 ve %98 olmuştur. Bu ön çalışmalar geniş ölçekli uygulamalar ile onaylanırsa *Leishmania* enfeksiyonunun ilk tanısı ile ilgili yeni bir test olarak önem kazanabilir [74].

Leishmania tanısı için standart ve ticari bir PCR henüz olmasa da, PCR, KL ve VL tanısı için klasik parazitolojik metotlardan daha yüksek duyarlılık göstermektedir [75]. Real time PCR belirli miktar parazit DNA'sını her reaksiyon için 0.01 parazit civarında bir analitik duyarlılıkla ölçmektedir. Kala azar sonrası deri leishmaniasisinde *Leishmania* parazitlerinin deri lezyonlarında görmek oldukça zordur. Ancak real time PCR bu durumdaki 25 hasta ile yapılan incelemede hepsinde *Leishmania* DNA'sı tespit etmiştir [76]. Real time PCR ile 7SL RNA gen ekspresyon seviyesinin ölçülmesi çalışmasında dermal leishmaniasis hastalarının normal derisinde de canlı parazitlerin varlığı tespit edilmiştir [77].

2.9 Tedavi

Leishmaniasis için tedavi seçenekleri birinci hat ilaç olarak pentavalent antimonialler ve ikinci nesil ilaç olarak da pentamidin, amfoterisin B kullanımı ile sınırlanmıştır [78]. Soydum amonyum glukonat (SAG) veya sodyum stiboglukonat (SSG)'ın VL ve MKL tedavisi için gerekli dozu kalp için toksiktir. İkinci nesil ilaçlardan amfoterisin B de birçok yan etkiye sahiptir, pentamidin ise glukoz metabolizmasının bozulması ve diğer toksisite problemleri ile ilişkilidir. Hatta ilaç dirençlilik gelişmesi nedeniyle bu ilaçların da dünya çapında başarısız olduğu görüşü ortaya çıkmıştır [79].

VL'nin tedavisinde beş değerlikli antimon bileşikler 10–20 mg/kg/gün olacak şekilde uygulanır. Pentostam® sodyum stiboglukonat ticari preparatının 1 ml'sinde 100 mg'a eşdeğer sodyum stiboglukonat bulunurken, Glucantime® (meglumine antimonate) ticari preparatının 1 ml'sinde 85 mg'a eşdeğer sodyum stiboglukonat bulunmaktadır [80].

Gelir düzeyi yüksek olan ülkelerde VL'nin tedavisinde Lipozomal amfoterisin B (L-AMB) tercih edilmektedir ancak yüksek maliyetlerinden dolayı düşük gelirli ülkelerde ve genelde endemik olan bölgelerde ulaşılması zordur [81]. L-AMB dozu arttırıldığında yan etkilerinde artış olmadığı gösterilmektedir. Bir fosfotidilkolin analogu olan miltefosin, VL'nin oral tedavisi için sadece Hindistan ve Almanya'da onaylanmış, Kolombiya ve Bolivya'da KL'nin tedavisinde uygulanmaktadır. Faz 4 deneylerde Hindistanda VL'li 1,100 yetişkin ve çocuk hastada miltefosinin etki oranı %82 olarak bulunmuştur [82]. Bu ilaç iyi tolere edilmekte ve en yaygın yan etkisi (hastaların %8'inde) ishal ve kusma

olmaktadır. Birçok çalışmada Yenidünya ve Eskidünya leishmaniasisine karşı Miltefosinin etkinliği, plasebo veya Antimonaller ile kıyaslanmaktadır [83]. Paromomisin, Hindistandaki Faz 3 deneylerin ardından 21 gün için 15 mg/kg/gün dozunda, VL'nin tedavisinde güvenli ve etkin bulunmuştur [84]. Ancak Doğu Afrika'da Paromomisin kullanımına düşük etkinlik nedeniyle son verilmiştir [85]. Buna karşın bu bölgede Sodyum Stiboglukonat 45 yaş üstü hastalarda yüksek ölüm riski ile ilişkili olmasına rağmen hala etkili bir tedavi olarak kalmaktadır [86]. Doğu Afrika'da Miltefosin onaylanmamış ve ulaşılması zor olup, L-AMB hala bütçeyi aşan bir ilaç olduğu için paromomisin çalışmaları sürdürülmektedir.

2.10 Leishmania Parazitlerinin Kültürü

Parazitlerin *in vitro* kültürünün yapılması, konak-parazit ilişkilerinin anlaşılması, parazitlerin biyolojik ve immünolojik karakteristiklerinin belirlenmesi, hastalığın tanısının konulması ve aşı çalışmaları için saflaştırılmış antijen elde edilmesinde oldukça önemlidir. Memeli konaklarda hücre içinde yaşayan amastigotların kültürü, makrofaj benzeri hücreler içinde yapılmaktadır. Ancak amastigot kültürünün yapılmasının nispeten zor ve zahmetli olması nedeniyle, promastigot kültürü tercih edilmektedir. Yine de makrofaj hücrelerinde bulunan amastigotların pasajları yerine, aksenik amastigot kültürleri de başarıyla yapılabilmektedir [87].

Promastigot ve amastigot formdaki parazitlerin büyüme koşulları arasında, sıcaklık, pH, besin kaynağı ve serum komponentleri açısından önemli farklılıklar bulunur. Sıcaklık ve pH'nın, promastigotların amastigotlara dönüşümünü tetiklemede önemli rolü vardır. Bu şekilde ortam özelliklerini değiştirerek promastigotlar aksenik amastigotlara dönüştürülebilir [88].

Leishmaniasisli hayvanlardan alınan biyopsi örnekleri, uygun besiyerine ekilerek *Leishmania* kültürü yapılabilmektedir. Kültüre ekilen biyopsi örneklerindeki *Leishmania* parazitleri önce hareketli promastigotlara dönüşür, daha sonra çoğalmaya başlar [87].

Daha çok tanı amaçlı kullanılan beyin-kalp infüzyonu kan eriyiği (brain-heart infusion), NNN besiyerinden agarın çıkartılması ile hazırlanmakta ve kısa sürede bol miktarda *Leishmania* üretilmesini sağlamaktadır [89].

Leishmania türleri hazır besiyerlerinde üretildikleri gibi, deney hayvanlarına inoküle edilerek de üretilirler. Deney hayvanları kullanılarak; *Leishmania* parazitlerinin vektörlerdeki yapısı, biyolojisi ve patolojisi deneysel olarak araştırılabilmektedir [90].

Leishmania türlerinin devamlılığı, yapılan promastigot ve amastigot kültürleri ile hayvanlara inokülasyonla ya da diğer memeli hücreleri veya protozoonlarda olduğu gibi sıvı azotta dondurup uzun süre saklayarak (kriyoprezervasyon) sağlanabilir [91].

2.11 Leishmaniasis Karşı İmmün Yanıt Mekanizması

Makrofajlar, *Leishmania* parazitlerinin konak hücreleri, antijen-sunan hücreler (APC) ve efektör hücreler olarak leishmaniasiste oldukça önemli bir rol oynar [91].

Aktif hastalık esnasında, *Leishmania* antijenlerine karşı negatif gecikmiş tip aşırı duyarlılık ve non-proliferatif yanıtlar ile tanımlanan immün baskılama (*Leishmania* antijenlerine özgü), deneysel çalışmalarla gösterilmiştir [92]. Leishmaniasisin kontrolü hücre aracılı bağışıklık yanıtı ile makrofajların fagolizozomunda yaşayan ve humoral immün yanıtı kaçıran parazitler tarafından düzenlenir [93]. Leishmaniasis hastalığına karşı direncin T hücre aracılı immünite ile sağlandığı bilinmektedir. Bunu destekleyen bazı çalışmalar mevcuttur [50], [94], [95]. T hücre hasarı görmüş olan farelerde *Leishmania* ile enfeksiyon sonrası direnç oluşmazken, T hücrelerinin transferi ile bu hayvanlarda direnç oluştuğu gözlenmiştir. Ayrıca B lenfositleri eksik olan hayvanlarda enfeksiyonun gidişatının etkilenmediği görülürken, anti-IgM ile antikorların baskılanmasının herhangi bir etki yaratmadığı da belirlenmiştir. Yüksek düzeyde IgG ve IgM seviyelerinin enfeksiyona karşı koruyucu bir etki göstermemesi de bağışıklığın tamamen hücresel bağışıklığa bağlı olduğunun göstergesidir [50]. Yardımcı T hücreleri koruyucu ya da ilerleyici bağışıklık yanıtta önemli bir rol oynamaktadır. CD4+ taşıyan T hücreleri direnç için oldukça önemli iken CD8+ taşıyan T hücreleri daha çok bellek olaylarında görev alırlar. VL'de ise IL-4'ün artışı ile hastalığın seyri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Hastalığın aktif döneminde dalakta IFN- γ ve IL-4 üretim miktarının arttığı, iyileşme sonrası ise anlamlı ölçüde azaldığı belirlenmiştir [96, 97, 98]. Dendritik hücreler (DC) ve doğal katil (NK) hücreleri gibi diğer hücreler de IL-12 ve IFN- γ sitokin üretiminden sorumludur [78].

Leishmaniasise karşı koruyucu bir bağışıklık yanıtı oluşturmada önemli bir adım antijen sunan hücreler (APC) tarafından uygun antijenlerin sunumudur. Ancak, *Leishmania* parazitleri, antijenlerin (özellikle amastigote antijen) CD4⁺ T hücrelerine sunumunu inhibe eder [99]. *Leishmania*'nın, major histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II gen ekspresyonunu baskılayarak veya antijenlerin MHC sınıf II moleküllerine sunumunu engelleyerek inhibe ettiği düşünülmektedir [78]. MHC sınıf II antijen sunumu T hücre yanıtları uyarmak için tek başına yeterli değildir. Yardımcı-uyarıcı moleküllerin ligasyonu, sırasıyla APC'de B7-1/B7-2 ve CD40 ile T hücrelerinde CD28 ve CD40L moleküllerinin birleşmesi gerekmektedir [100]. CD40/CD40L ligasyonu APC tarafından IL-12 üretimini indükleyerek, T hücrelerinin IFN- γ gibi leishmaniasidal sitokinler üretmek için aktive olmasını sağlar [101].

Heterodimerik immün düzenleyici sitokin olan IL-12, T hücreleri, doğal öldürücü hücreler ve makrofajlar da dahil olmak üzere çeşitli efektör hücrelerin aktivitesini artırır ve IFN- γ gibi sitokinlerin üretimini indükleyerek, Th1 yanıtlarının indüksiyonunu uyarmaktadır [102]. Bazı çalışmalarda, IL-12'nin aynı zamanda Th2 immün cevap aktivasyonunu engellediğini rapor etmiştir [103]. Th1 hücre popülasyonu bakımından IL-12'nin rolü oldukça önemlidir ve IL-12 yokluğunda, Th1 hücrelerinin bir enfeksiyon sırasında elimine olduğu gözlenmektedir [104]. Hem dirençli hem de duyarlı *Leishmania* promastigotları konak makrofajların istilası sırasında IL-12 indüksiyonundan kaçarlar. *Leishmania*'ya yanıt olarak makrofajlar çok az IL-12 üretirler ve enfekte makrofajlar çeşitli uyaranlara yanıt olarak IL-12 üretiminde azalmaya neden olmaktadır [105]. Yapılan çalışmalarda enfeksiyonun erken safhasında, IL-12 kaynağının dendritik hücrelerin (DH) olduğunu göstermiştir [106]. Ayrıca, IL-12 üretiminin DH'ler tarafından uyarılması muhtemelen birden fazla sinyal gerektirir ve IL-12 yanıtına katkıda bulunabilen birkaç konak bileşeni vardır [107]. Örneğin, CD40-CD40L etkileşimleri IL-12 üretimini arttırır ve bu yoldan yoksun fareler KL'e duyarlıdır. Dirençli farelerden IL-12 geni çıkarılması ile farelerin enfeksiyona karşı duyarlı olduğu, duyarlı farelere ise IL-12 verildiğinde farelerin enfeksiyona dirençli hale geldiği gösterilmiştir [108]. Enfekte olmuş fareleri iyileştirmek için eksojen IL-12'nin kapasitesi ve IL-4'ün baskılanması, IL-12'nin güçlü etkisi ile ilişkilidir. Bu nedenle BALB/c farelerde koruyucu Th1 yanıtı eksikliği, IL-12 reseptöründe IL-4'nin inhibitör etkisi nedeniyle olabilir [109].

Th1 hücreleri tarafından salgılanan IFN- γ , makrofajlarda nitrik oksit (NO) sentaz enzimini indükleyerek NO-aracılı öldürme indüksiyonu yoluyla *Leishmania* enfeksiyona karşı direnç kazandırır [110]. Bu nedenle IFN- γ sentezleyemeyen farelerde enfeksiyonu tedavi etmek başarısızdır [111]. IFN- γ 'nın etkisi ile Th2 immün yanıt sitokini olan IL-4 miktarını büyük ölçüde azalır [112]. Ayrıca, anti-IFN- γ antikoru ile IFN- γ nötralizasyonun da dirençli farelerin duyarlı olmasına neden olmuştur [113]. Bir başka sitokin, TNF- α , çeşitli hastalık formlarına karşı korunmada önemli bir rol oynar [114] ve IFN- γ ile sinerji oluşturarak iNOS aracılı *Leishmania* öldürmeyi uyarmada [115] ve hücre içi patojen replikasyon kontrolünde görevlidir [116].

IL-10 başlangıçta Th2 immün yanıt sitokini olarak karakterize edilmesine rağmen daha sonra, makrofajlar da dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinden salgılanan bir pleiotropik sitokin olduğu kanıtlanmıştır [117]. IL-10, temel makrofaj-deaktive eden sitokin özelliği gösterir ve bu hücrelerin *Leishmania*'yı öldürme yeteneğini azaltır [118]. Bu nedenle, hastalığın ilerlemesinde önemli bir düzenleyici olarak rol oynar. IL-10, *Leishmania* ile enfekte kişilerden lenfositler aracılığı ile çeşitli immünolojik yanıtları sınırlandırır [52]. Th1 aktivasyonu ve sitotoksik yanıt sonucunda baskılanarak düzenlenen IL-12 ve IFN- γ üretiminin, IL-10 tarafından engellendiği gösterilmiştir [119]. IFN- γ 'nın makrofaj aracılı mikrobisidal aktivitesinin IL-10 tarafından baskılanabileceği aynı zamanda başka hastalıklar için de belirlenmiştir [120]. Yapılan çalışmalarda IL-10 ve IL-12'nin birbirine karşı bir mekanizma ile çalıştığı gösterilmiştir. IL-10; makrofaj, B hücreleri ve dendritik hücreler tarafından IL-12 sentezi baskılayarak, IFN- γ üretimini inhibe eder [121]. IL-10, yardımcı uyarıların aktivitelerinin ve B7 ekspresyonunun indirgenmesini sağlar [122]. *L. donovani* ile enfekte BALB/c farelerde T hücreleri tarafından IFN- γ üretimi için B7/CD28 etkileşiminin gerekli olduğu gösterilmiştir [123]. Ancak, IL-12 eklenmesi veya IL-10'nun monoklonal antikolar tarafından nötralizasyonu IFN- γ üretimi ve lenfosit proliferasyonunu tekrar sağlamaktadır [64].

2.11.1 Th1 Th2'ye Karşı

Leishmania türlerine karşı olan bağışıklığı anlamadaki en büyük avantajlardan biri fare modellerinin kullanılabilmesidir. Rutin olarak kullanılan farelerde iki genetik farklılık bulunmaktadır; C57BL/6 fare genel olarak dirençli olmaktadır, BALB/c fareler

hastalığa karşı duyarlıdır. Hastalığın meydana gelmesinde esas farklılık *Leishmania*'ya karşı farede gelişen immün cevabın tipi ile ilişkilidir. Dirençli C57BL/6 farede IFN- γ üretimine bağlı Th1 aracılı yanıt oluşurken, BALB/c farede Th2 tipi yanıt oluşmakta ve bu da hastalığa karşı duyarlılığa neden olmaktadır. Th1 tipi yanıt *Leishmania* aracılı lezyonların ve parazitin çoğalmasının önlenmesinde oldukça önemlidir. Enfeksiyon bölgesine ilk gelen hücreler nötrofiller olup *Leishmania* parazitlerini fagosite etmeye ve IL-8 gibi sitokinleri salgılamaya başlarlar. Bu monositler veya makrofajların enfeksiyon bölgesine göçünü uyarır. Ancak makrofaj göçü *Leishmania* promastigotlarının makrofajların yüzey moleküllerine bağlanıp içeri girişi için en önemli aşamadır. Parazit makrofaj içine girdikten sonra amastigot forma dönüşürler, ikiye bölünerek çoğalırlar ve sonuçta makrofajı patlatıp diğer hücrelere geçerler. Buna karşın enfekte hücreler ile makrofajların etkileşimi dirençli bir fenotip ve koruyucu immünitenin ilerlemesi için gerekli olan makrofaj aktivasyonunu ve Th1 sitokin üretimini (IL-12, TNF ve IFN- γ) uyarır. Ek olarak H₂O₂ ve NO gibi ROS ve RNS üretimi, çoğalmayı kontrol altına alarak parazitlerin öldürülmesini hedefler. Ancak olayların en önemli kısımları Th1 aracılı immün cevabın başlatılmasıdır [124].

Makrofajlar, dendritik hücrelerle (DH) birlikte yüzeylerinde MHC I ve MHC II molekülleri ile beraber parazitlerin peptitlerini sunarlar. CD4⁺ T hücreleri TCR:MHC II moleküllerinin eş uyarımıyla ilişkili T hücrelerinin üzerindeki CD8 ve APC üzerindeki CD80/CD86 birleşmesini takiben aktifleşir. Ölü amastigotları yutan makrofajların veya diğer enfekte makrofajların yüzeyindeki MHC II'nin tanınması parazit spesifik CD4⁺ T hücrelerin üretilmesindeki anahtar olaydır. Ek olarak makrofajlar veya DH'lerden IL-12 üretilmesinin sonucu olarak CD4⁺ T hücreleri Th1 hücrelerine farklılaşır. Th1 hücreleri IFN- γ üretimine başlar ki bu da tip I sitokin fenotipini destekler. Bu Th1 birikimi koruyucu immünite için gereklidir ve enfeksiyonun C57BL/6 fare modelindeki durumudur. Bunun tersi BALB/c farede oluşur, APC hücrelerinden çok düşük miktarda IL-12 eksprese edilir ve CD4⁺ T hücreleri Th2 hücrelerine dönüşerek IL-4 üretir ve koruyucu olmayan fenotip gözlenir. CD4⁺ Th1 hücreleri deneysel leishmaniasise direnç sağlanmasında baskın hücrelerdir. NK hücreleri ile birlikte CD8⁺ hücreleri enfeksiyon boyunca IFN- γ üreticileri olup hastalığa direnci destekler. Ancak CD8⁺ T hücrelerinin koruyucu immünitedeki kesin rolü tam olarak bilinmemektedir. CD8⁺ T hücreleri

parazite özgün hafıza hücre havuzunun sağlanması ile sekonder enfeksiyon boyunca daha önemli olabilir ve dermal *Leishmania* enfeksiyonuna karşı koruyucu immün yanıt ve hastalığın çözümü ile ilişkili olabilir.

Aktivasyon IL-12 üretimine, MHC II'nin ve eş uyarım moleküllerin arttırılmasına yönelir. Bu CD4+ T hücrelerini IFN- γ üretimini aktive eder ve Th1 tipi immünite başlar, böylece *Leishmania* fagositik öldürmeden kaçır [124].

2.11.2 *Leishmania* Parazitlerinin Fagositik Hücreleri İstila Etmesi

Leishmania türleri fagositik öldürme mekanizmasını engelleyerek makrofajları konak olarak kullanır ve böylelikle immün sistemin kendi hücreleri içerisine girerek immün sistemden kaçır. *Leishmania* parazitleri tarafından enfeksiyon sürecinde eksprese edilen en önemli molekül LPG olup aktif şekilde fagozomları ve lizozom birleşmesini engeller. Böylece parazit toksik lizozomal ürünler olmadan amastigota dönüşebilir. Ek olarak gp63 yüzey proteaz inhibitörü, lizozom füzyonunda yer alması gereken fagolizozomal enzimlerin aktivasyonunu engeller. Sonrasında amastigot makrofajın fagozomu içerisinde yaşama adapte olur. LPG ve gp63 ayrıca reaktif oksijen türlerinin aktivasyonunu önleyerek de promastigotların hayatta kalmasına yardımcı olur. Apoptozis ve MHC II molekülleri ile antijen sunumunun önlenmesi parazitin makrofajın içerisinde hayatta kalmasını sağlayan daha ileriki mekanizmalardır. *Leishmania* MHC II moleküllerini endositoz eder. Ek olarak peptit yüklemesini inhibe ederek T hücre aktivasyonu ve adaptif immüniteyi engeller [124].

2.11.3 Th1/Th2 Birikimi ve Aşı Geliştirilmesi

Leishmaniasise karşı başarılı bir aşı, uygun ve koruyucu immünite sağlamalıdır. Antikor izotipi oldukça kritiktir. Çünkü bazı antikorlar hücre dışı patojenlerin yok edilmesinde faydalıyken diğerleri hücre içi bakteri veya virüsleri elimine eder. Yardımcı T hücre cevabı üretilen sitokinlere bağlı olarak Th1 ve Th2'nin ikisine dönüşebilir. Aşının başarısını *Leishmania* fare modelinde doğru alt birimlerin üretilmesi belirler. T hücrelerin yanlış fenotipe farklılaşması patojenin devamlılığını, hastalığı ve hatta ölüme neden olur. T hücrelerinin Th1 veya Th2 ye farklılaşmasına etkileyen çok parametre vardır. İlk kritik parametre aşının ölü ya da canlı olmasıdır. Canlı aşılar kendi normal

çevrelerinde çoğalırlar ve uygun immün yanıt üretilir. İnaktive aşılar veya özel antijenler çoğalmazlar ve bu nedenle CD8+ T hücrelerini zayıf uyarırlar. Aşının dozu veya yarı ömrü de Th1/Th2 gelişimini etkileyebilir. Sitokin yanıtı da kritiktir. IL-12 ve IFN- γ açısından zengin ortamdaki aşılar T hücrelerini Th1 fenotipine dönüştürürken, IL-4 ve IL-5 Th2 fenotipini uyarır. Adaptif immün yanıtın ortaya çıkması, aşılamaı takiben başlangıç yolaklarına bağıdır. CD4+ T hücre fenotipi ayrıca daha sonraki antikor izotipini de belirler. Native ve IgM eksprese eden primer efektör B hücreleri yüksek etkinliğe ancak düşük afiniteye sahiptir. Primer efektör B hücreleri IgG'ye doğru değışen bir izotip gösterir. Mukozal bölgelerde izotip IgA veya IgE üretimi şeklinde meydana gelir. Birçok aşı iyi bir antikor üretimi sağlar ancak önemli olan uygun izotipin uyarılmasıdır. IgA'nın üretimi mukozal enfeksiyonlara karşı aşılamaı için önemli bir kriterken, bazı aşılar komplemana bağı antikor izotipi uyarır [124].

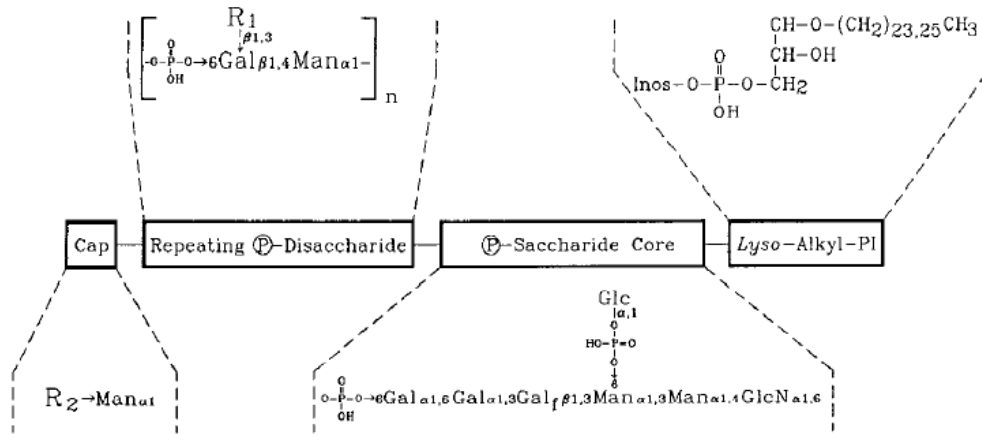
2.12 *Leishmania* Parazitlerinin Önemli Glikokonjugatları

Parazitler konak ve vektör ortamında hayatta kalabilmek ve çoğalabilmek için biyokimyasal ve morfolojik adaptasyon sağlaması gerekmektedir. Bu adaptasyon süreci çoğu glikozilfosfatidil inozitol (GPI) bağı glikokonjugatların ekspresyonunu içermektedir [6]. GPI molekülleri proteinler gibi yüzey molekülleri için tipik bağlanma bölgeleri olarak bilinmekte ancak tüm ökaryotlarda bulunmamaktadır [125, 126]. *Leishmania*'da GPI'ya bağı moleküller lipofosfoglikan (LPG), glikoinozitolfosfolipitler (GPILs), glikoprotein 63 (gp63) ve proteofosfoglikan (PPG) veya onların sekrete ettiğı protein içeren fosfoglikanları (PGs), proteofosfoglikanları ve sekrete edilen asit fosfatazları içerir [127]. Bu glikokonjugatlardan olan LPG glikokaliksi oluşturan önemli bir yapıdır. Promastigotların yüzeyinde bulunan LPG, konağın kompleman sistemi tarafından parazitin imha edilmesini önlediğı gibi aynı zamanda parazitin konak hücreye girmesini ve makrofaj içinde hayatta kalmasını sağlar. Bu yüzden LPG, parazitin yüzeyinde bulunan glikokonjugatların en önemlilerinden biridir [6].

2.12.1 Promastigotlardan Elde Edilen LPG' nin Yapısı

Leishmania promastigotlarının tüm türlerinde LPG sentezlenmektedir. LPG, parazitlerin kamçısı dahil tüm yüzeyinde bulunmaktadır. *Leishmania*'da temel LPG

yapısı 4 bölge içerir (1) alifatik C24 veya C26 içeren 1-O-alkil-2-lizo-fosfatidilinozitol ile karakterize lipit bağlanma bölgesi, (2) Gal(α 1,6)Gal(α 1,3)Galf (β 1,3)[Glc(α 1)-PO₄]Man(α 1,3)Man(α 1,4)-GlcN(α 1) yapısını içeren glikan merkez, (3) (Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄) tekrarlayan üniteleri içeren bir iskelet ve (4) oligosakkarit cap yapısı (Şekil 2. 3) [128].



Şekil 2. 3 LPG'nin yapısı [6]

Farklı *Leishmania* türlerinin LPG'leri ile yapılan yapısal analizler sonucunda lipit bölgenin bütün türler için aynı, fosfosakkarit merkezin ise çoğunlukla aynı olduğu ancak tekrarlayan fosforillenmiş sakkarit ünitelerinin ve uç yapısının farklı türlerde çeşitlilik gösterdiği belirlenmiştir.

Farklı türlerin LPG'sinin yapısal analizleri lipit bağlanma bölgesi ve glikan merkezin korunduğunu göstermiştir. *Leishmania* türleri arasındaki polimorfizm tekrarlayan ünitedeki şeker yapısında ve cap yapısındadır [12]. Öncül çalışmalar genellikle *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica* and *L. aethiopica* gibi Eskidünya türleri ile yürütülmüştür [129, 130, 131, 132, 133].

Buna karşılık Yenidünya *Leishmania*'sının glikobiyolojisi hala bilinmemektedir. LPG'nin metasiklogenez boyunca değiştiğine dair hala kesin bir kanıt yoktur. Ancak birçok çalışmada türler ve vektör arasındaki etkileşimler incelenmiştir. Hem cap bölgesinde hem de LPG'nin yan zincirlerinde bulunan β -Glc rezidülerinin ekspresyonu vektör orta barsağına bağlanma işlevinde gerçekleştiği savunulmaktadır.

Prosiklik ve metasiklik LPG'nin tekrarlayan üniteleri kapiller elektroforez kullanılarak belirlenmiştir. Tekrarlayan ünitelerin sayısı metasiklik LPG için 19 iken prosiklik LPG'de 34 olarak bildirilmiştir [134]. Sonuç olarak Eskidünya leishmaniasisine benzer olarak *L. infantum* LPG'si de metasiklogenez boyunca tekrarlayan ünitelerin sayısının yaklaşık ikiye katlanması nedeniyle de değişmektedir. *L. infantum* LPG'sinin belirlenmesini takiben ilk LPG yapısı *Vianni* suşları ile gösterilmiştir [135] *L. braziliensis* LPG'sinde LPG yan zincirlerindeki karbonhidrat düzenlemesinde farklı mekanizmalar göstermiştir. *L. braziliensis* promastigotlarının LPG'si *L. donovani* ile benzerlik göstermiştir ve Gal-Man-P disakkarit gövdeden yan zincirlerin dallanması yoktur [132]. Bu artırma yoluyla düzenleme *Leishmania* alt-türlerine ait bazı türlerde gözlenmektedir. Örneğin *L. donovani* ve *L. infantum*'da metasiklogenez sırasında β -Glc rezidüleri azalmaktadır [129], [136]. *L. braziliensis* cap bölgesi tam olarak belirlenememiş ancak kapiler kromatografi kullanılarak monosakkaritlerin kalitatif analizi mannoz, glukoz ve galaktoz varlığını (3:1:3) göstermiştir [135]. Son zamanlarda Brezilya, Afrika ve Avrupa'daki *L. infantum*'un tekrarlayan üniteleri incelenmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki *L. infantum* LPG'sinin türler arası polimorfizmi oldukça düşüktür ve suşların yaklaşık %90'ı yan zincirlerden yoksundur.

2.12.2 Amastigotlardan Elde Edilen LPG'nin Yapısı

LPG'nin yapısını ve fonksiyonunu anlamak için elde edilen bütün bilgiler *Leishmania* promastigotlarından sağlanmıştır. Son zamanlarda ise *L. donovani* ve *L. major* amastigotlarında bulunan LPG üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. *L. donovani* amastigotlarında yeni LPG sentezlenmediği ve var olan LPG'nin 10^4 kat azaldığı belirlenmiştir [137]. Ancak *L. donovani*'den farklı olarak *L. major* amastigotlarının, LPG'yi sentezlediği belirlenmiştir [138]. *L. major*'un amastigot ve promastigot formu için LPG'nin birçok ortak yanı olmasına rağmen amastigotlara spesifik olarak LPG karbonhidratlarında henüz bilinmeyen bazı farklılıklar olduğu belirlenmiştir [139]. Sonuç olarak LPG'nin amastigot formunun özellikleri promastigot formuna göre çok az bilinmektedir.

2.12.3 Vektör ile Etkileşimde LPG'nin Rolü

Flebotomus'lar *Leishmania* ile enfekte olmuş konaktan kan emerken parazitin amastigot formları ile enfekte olurlar. Kan ile alınan amastigotların bir kısmı da *Flebotomus*'un orta bağırsağında bölündükten sonra kamçı oluşturur ve metasiklik (enfektif) promastigot formuna dönüşür. Vektörün peritrofik membranı içinde çoğalarak membranı eriten promastigotlar, torasik mideye geçerek kemotaksis ile özafagus ve farinkse tutunurlar. Metasiklogenez sırasında LPG yapısal olarak modifiye olur. LPG'de oluşan bu modifikasyonların parazitin memeli konak içerisinde başarılı bir şekilde yaşamasındaki önemi kanıtlanmıştır. Bu yapısal değişikliklerin, promastigotun vektörün orta bağırsak epitelyum hücrelerine bağlanmasını, ayrılmasını ve aynı zamanda hortum kısmına göç etmesini kontrol ettiği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, *Phlebotomus papatasi*'nin barsağında *L. major*'un gelişimi sırasında ortamda hem LPG'nin hem de gp63'ün ekspresyonu incelenmiştir. gp63'ün promastigotlar üzerinde yüksek bir ekspresyona sahip olmasına rağmen, bağırsak hücreleri üzerinde ifadesi gözlenmemiştir. Metasiklik LPG'ye sahip promastigotların bağırsak duvarındaki epitelyum hücrelerine bağlanamadıkları ve *Flebotomus*'un ağız kısmına doğru göç ettikleri rapor edilmiştir. LPG' nin aynı zamanda promastigotları *Flebotomus*'un bağırsağındaki hidrolitik aktiviteye karşı koruduğu da belirlenmiştir [6].

Vektör ile etkileşiminde, LPG'nin fosfoglikan bölgesinde türler arası ve türler içi polimorfizm vektör özgünlüğünde önemli olabilir [140, 141, 142, 143]. Birçok çalışmada serbest ve özgün vektörlerin olduğu konusu tartışmalıdır. Buna rağmen bazı vektörler farklı *Leishmania* türleri tarafından enfekte edildiği ile ilgili sonuçlara rağmen bazı çalışmalar bu süreçteki LPG'nin ters etkisini göz önüne almıştır. Örneğin *L. major* sadece *Phlebotomus papatasi*'yi enfekte etmektedir [142]. Diğer taraftan birçok tür farklı vektör ortabarsağında etkileşime girebilmekte ve hatta *L. mexicana* LPG- hasarlı mutantları farklı vektörlerde enfeksiyonu devam etmiştir [144]. Daha önemlisi, *in vitro* modelden elde edilen sonuçlarda bazı tartışmalar vardır [145] ve birçok zorluk ve sorun hala çözümlenememiştir [146]. *L. longipalpis* ve *L. infantum in vitro* bağlama çalışmalarındaki ilk çalışma Eskidünya *L. donovani* ve *L. major*'u ile benzer sonuçlar göstermiştir. Fosfolipit C ile muamele edilerek lipit bağlantısı ortadan kaldırılan metasiklik LPG'lerden farklı olarak, prosiklik LPG'ler tutunma ve parazit adezyonunu

inhibe etme yeteneğindedir [136]. Orta barsak reseptörü olduğu ile ilgili güçlü kanıtlara rağmen, *L. longipalpis*'de bu reseptörün varlığı ile ilgili ulaşılabilen bir bulgu yoktur. Sadece *L. major* için *P. papatasi*'nin orta barsağında galektin reseptörü bulunmuştur [147]. Galektinler (A-D) *L. longipalpis* için transkriptom varlığı ve LPG için varsayılan ligandı rapor edilmiştir [148]. Bu türler oldukça serbest oldukları için [149], *P. papatasi* için gözlemlenenlere benzer bir reseptör varlığı bilinmemektedir.

LPG'den bağımsız mekanizma vektörlerde, glikoprotein kaplanmış N-acetilgalaktozamin (GalNAc) rezidüleri gibi bulunabilir [150]. LPG1- mutant *L. major* vektörde enfeksiyona devam edebilmektedir. Ancak bu kombinasyonlar doğada meydana gelmemektedir. Diğer ilginç örnek ise *L. major*/*L. infantum* hibritleridir. Bu hibritler çoğunlukla *L. major* LPG'si eksprese ederler ve *P. papatasi*'yi enfekte edebilirler. İki türün de *L. longipalpis* hayatta kalma özelliği olmasına rağmen *L. infantum* tek başına *L. papatasi*'de hayatta kalamaz [151]. 3 tip LPG'nin (I, II, III) *L. longipalpis* vektörü ile etkileşimi incelenmiştir. Tüm suşlar vektörü başarılı şekilde enfekte etmiş ve bu süreçte LPG polimorfizmi etki göstermemiştir [150]. Sadece iki çalışma *L. braziliensis* için vektörün orta barsağında bağlanma bölgesinin varlığını göstermiştir. Bu türler *Viannia* alt türlerinden olup [152], pilorik üçgenin önünden ağız kısmına göçü ile gelişimi başladığı bilinmektedir. *L. braziliensis* promastigotlarından elde edilen Heparin bağlama proteinleri *Lutzomia intermedia* ve *Lutzomia whitmani* orta barsağından elde edilen proteinleri tanıma özelliğindedir. Bu sınıf proteinler omurgasız konaklar ile etkileşimde öneme sahip olmalarına rağmen bu fikri desteklemek amacıyla inhibisyon testleri gerçekleştirilmemiştir [153]. Diğer taraftan *in vitro* bağlanma modeli kullanılarak sadece prosiklik formun LPG'leri değil ayrıca metasiklik parazitler de *L. intermedia* ve *L. whitmani* orta barsağında parazit bağlanmasını inhibe etme özelliğine sahiptir. Bu LPG'lerin sadece tutunma için değil vektörün ağız kısmına göç için de gerekli olduğunu göstermektedir [154]. Bu türlerde metasiklik LPG'ler tarafından tutunmanın sıra dışı modeli peripilariam davranışının sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir. Bu etkileşimin bilinmeyen adımı metasiklik parazitlerin nasıl tutundukları yerden ayrıldıklarıdır [143], [154].

2.12.4 Omurgalı Konak–*Leishmania* Etkileşimlerinde LPG

Leishmaniasis türlerine bağlı olarak geniş bir klinik spektrum gösterir. Ancak yüzey glikokonjugatlarının hangi farklılığı Th1/Th2 cevabını yönlendirmekte olduğu ve hastalığın immünopatolojisinin ortaya çıkmasında belirleyici olduğu bilinmemektedir.

Metasiklik (enfektif) promastigotların makrofajlar tarafından fagosite edilmesi ve makrofaj içinde yaşamını devam ettirmesi parazitin sitotoksik serum komponentlerinden kaçması ve T hücre immün cevabının oluşmaması durumunda mümkün olabilir. Promastigotların LPG ve gp63 gibi yüzey proteinleri, makrofajlar tarafından parazitin yutulmasında ve istilasında önemli rol oynarlar. *Leishmania* parazitleri fagosite edildikleri makrofajda hayatta kalmak için önce bu ortamda oluşan oksidatif etki mekanizmasını indirger, LPG bunu oksidatif metabolitlerin oluşumunu sağlayan anahtar molekül olan Protein Kinaz C'yi inhibe ederek gerçekleştirir. Amastigotlar promastigotlardan farklı olarak peroksidaz, superoksit dismutaz ve katalaz gibi oksidatif stres metabolitlerini etkisizleştirecek enzimlere sahiptir. Parazitte bulunan önemli yüzey antijenlerinden olan gp63'ün proteaz aktivitesinin pH:4'te gerçekleştiği ve proteolitik lizozomal enzimlerin inaktivasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Buna ek olarak *Leishmania*'nın, makrofajların aktivasyonu için gerekli sinyallerden biri olan MHC II ekspresyonunu ve IL-1 salgısını engelleyerek immün cevaptan kaçtığı gösterilmiştir [6].

LPG sadece omurgasız konaklardaki etkileşimlerde değil enfeksiyonun erken adımlarında da oldukça önemlidir. *L. major*'da makrofajların içindeki parazitoforlu vakuollerde amastigotlara farklılaşmadan sonra LPG ekspresyonu anlamlı ölçüde azalmakta, LPG ile benzer glikan özelliklerine sahip proteofosfoglikanların ekspresyonu artmaktadır [155]. Glikokonjugatların diğer sınıfı olan gliko inozitol fosfolipitler (GPIL) promastigot ve amastigotlarda gösterilmiş ve konakta enfeksiyon boyunca replike olmuştur. Genel olarak LPG, Yeni veya Eskidünya *Leishmania* türlerinde gösterilmiştir ve konakta enfeksiyonun oluşumu boyunca farklı proseslere katılımı olduğu gösterilmiştir. Bu prosesler; kompleman sisteminin litik etkisine karşı direnç, makrofajlara tutunma ve giriş, asidik vakuoller içinde proteolitik hasardan koruma [91], fagozomal olgunlaşmanın inhibisyonu [156], nitrik oksitin ve IL-12 üretimi azaltılması

[157, 158], Protein Kinaz C'nin inhibisyonu [159], nötrofillerin hücre dışı tuzağının (NET) [160] ve Protein Kinaz R'nin (PKR) indüksiyonudur [161]. Konak derisinde vektör tarafından inokülasyondan sonra, ısırık bölgesinde birçok hücrel ve moleküler olaylar yer alır. Doğal immünitenin hücrel komponentleri sadece *Leishmania* için değil diğer protozoalar için de enfeksiyonun erken adımlarında belirleyicidir. Dendritik hücreler, doğal öldürücüler, nötrofiller ve makrofajlar anahtar elementlerden bazılarıdır ve parazitlere cevapta dikkat çekmektedir. Bu hücrelerin aktivasyonu TH1 lenfositlerinin birikiminin geliştirilmesinde ve hücre aracılı bağışıklığın gelişiminde önemlidir. Hücrel doğal immünitenin sağladığı başlangıçta etkili olan immün cevap, kronik enfeksiyon, tekrar eden enfeksiyon ve immünopataloji adımları boyunca oldukça önemlidir [162]. *Leishmania*'nın konak immünitesini geçme ve hücre içinde çoğalma yeteneğinin altında yatan mekanizma oldukça kompleks ve farklıdır. Enfeksiyonun ortaya çıkması sadece türlere ve parazitin virülensliğine değil, makrofaj altpopülasyonu ve aktivasyon evresine de bağlıdır. *Leishmania* parazitleri, mannoz-fukoz reseptörlerini (MFR) [163, 164, 165], kompleman reseptör CR1, CR3 [166], [167] ve Fc reseptörlerini [168, 169] de içeren birçok fagolitik reseptör aracılığıyla makrofajları tanır ve içerisine girebilir. *Leishmania*'da patojen ilişkili moleküler patternlerin (PAMP) en geneli LPG ve GIPL'dir. Farklı hücre tipleri tarafından Toll-Like reseptörler (TLR) tarafından tanınırlar ve sinyal iletim yollarını kullanırlar [170, 171, 172, 173].

2.12.4.1 LPG' nin Hücrel Komponentler ile Etkileşimi

LPG çoklu virülens faktörü olduğu saflaştırılmış molekülün kullanılması ile gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir. Bazı çalışmalar *Leishmania* türlerine konak cevabı boyunca farklılığı ve önemini göstermiştir. LPG mutant *L. major* gibi Eskidünya türleri makrofajları enfekte etmek ve enfeksiyona devam etmekte başarısız olurken, *L. mexicana* parazitleri normal şekilde gelişmişlerdir [174, 175, 176]. Enflamatuvar makrofajlar parazit çoğalmasını hedef almadan önce ilk olarak nötrofillerin enfeksiyon alanına ulaştığı *L. major* modelinde gösterilmiştir [177]. *Leishmania* LPG'si ile nötrofillerin etkileşiminin önemli LPG1 (-/-) ve LPG2 (-/-) gen mutasyonu olan *L. donovani*'de de gösterilmiştir. LPG, parazitin sağlam, litik olmadan, nötrofil içinde devamlılığını sağlarken, LPG eksikliği olan mutant parazitler fagozom ve lizozom

füzyonunu önlemede başarısız kalmış, litik çevre oluşumu parazitin ölümü ile takip etmiştir [178]. *L. amazonensis*'de enfeksiyonun başlangıç adımlarında nötrofillerin rolü, nötrofil hücre dışı tıplar (NET) aracılığıyla fagositoz bağımlı olmayan öldürme mekanizması kullanılarak gösterilmiştir. Kromatin ve granüler proteinlerden oluşan bu yapıların fungus ve bakteriler gibi patojenlere karşı antimikrobiyal etkisi vardır [179]. Sadece parazitler değil, saflaştırılmış *L. amazonensis* LPG'si de hücre ve doz bağımlı şekilde nötrofil hücre dışı tıpları uyarabilir [160]. Diğer taraftan Eskidünya türlerinden *L. donovani* LPG ve gp63 varlığından bağımsız olarak nötrofil hücre dışı tıpları uyarabilir, ayrıca LPG bulunmayan mutantlar nötrofil dışı tıplara bağımlı öldürmede duyarlılığı arttırır ve bu da LPG'nin bu türlerde koruyucu rolünü gösterir [180].

2.12.4.2 Fagozom-endozom Füzyonunun ve Oksidatif Patlamanın LPG Tarafından Engellenmesi

Fagozom olgunlaşması ile ilgili çalışmaların çoğu Eskidünya *Leishmania* türleri ile sınırlı kalmıştır. Genelde enfeksiyonun başlangıcında *Leishmania* promastigotları, parazitofor vakuolleri olarak da adlandırılan makrofajların fagozomlarının içerisine alınırlar. Bu yapılar endositik organeller ile füzyon geçirirler ve lizozomlar potensiyel mikrobisidal bölümler üretirler. *Leishmania* promastigotları fagolizozomlar içerisindeki litik çevreden kurtulmak için stratejiler geliştirirler [156, 181]. LPG'nin fagolizozomal oluşumu inhibe eder ve böylece promastigotları hidrolitik yıkımdan korur ve amastigotlara farklılaşmaları için elverişli ortam sağlar [181]. Böylece *Leishmania* promastigotlarını içeren fagozomlar endositik organellere karşı düşük füzyon özellikleri gösterir. Ayrıca, makrofaj enfekte etmenin erken safhaları boyunca, LPG'si hasarlı *L. donovani* mutantların çevresinde vakuoller oluşmuş ve endozomlar ve lizozom füzyonu sonucunda parazitler tamamen yok edilmişlerdir [156]. LPG'nin fagozom-endozom füzyonunu inhibe ettiği bu mekanizma Yenidünya türlerinde çok az anlaşılabilmiştir. Birçok çalışma, *L. donovani* enfeksiyonlarının proseslerini içeren komponentlerden biri olan Protein Kinaz C α (PKC α)'nın rolünü açıklamıştır. PKC α , fagozomal membran ve aktin bazlı hareket ve membran trafiğini ile ilişkili membran proteini olan fosforile miristoile edilmiş alaninden zengin C kinaz substratı (MARCKS) ile ilişkilidir. Bu ara yolak hem lizozomların hem de fagozomların mikrotübüller üzerinden hareketini yönlendirir

[183], [184]. Makrofajlarda, *L. donovani* LPG'si tarafından PKC α inhibisyonu fagozomal membranda F-actin depolimerizasyonunun inhibisyonuna yol açar ve parazitofor vakuoller içerisindeki endozomal içeriğin füzyon ile dağıtımını engeller [185, 186]. PKC α 'nın LPG tarafından inhibe edilmesi *L. mexicana*'da da gözlenmiştir. İlginç olanı *L. mexicana* LPG'si duyarlı BALB/c farelerde PKC α aktivasyonunu inhibe ederken, dirençli C57BL/6 farelerde inhibisyon oluşmamıştır. Buna ayrıca C57BL/6 farelerden farklı olarak, BALB/c farelerde oksidatif patlama eşlik etmiştir [187]. Fagozom-endozom füzyonunun inhibisyonuna ek olarak, LPG'nin promastigotların içeri girişini takiben lipit çift tabakasının yüzeyine girmeyi de sağladığı gösterilmiştir [188, 189]. LPG, membran çift tabakasına girerek fiziksel organizasyonu modifiye etmekte ve membran mikro domainleri ve normal füzogenik özellikleri bozmaktadır. Hücresel membran ile bu yakın etkileşim promastigotların fagositozunu azaltmaya, NADPH oksidaz kompleksinin oluşumunu, normal hücresel sinyallerini ve fagozom asidifikasyonu engelleyerek oksidatif patlamanın inhibisyonuna neden olmaktadır [190, 191, 192, 193, 194, 195].

2.12.4.3 Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentazın (iNOS) Düzenlenmesi

Patojenler tarafından konağın işgali, kemokinler, sitokinler, adezyon molekülleri ve enzimler gibi sekonder enflamatuvar araçları (NO gibi) üreten, birçok immün araçların aktivasyonunu uyarır. Makrofajlarda iNOS ekspresyonu, IFN- γ , TNF- α ve lipopolisakkaritler (LPS) gibi birçok faktör ile uyarılırlar ve NO'nin yüksek konsantrasyonlarda üretilmesine neden olurlar [196, 197]. *Leishmania* NO üretimini bozacak bir mekanizmaya sahip olduğundan hücre içerisinde hayatta kalabilmektedir. Ayrıca birçok etkili bir immün cevabın gelişmesi için gerekli olan sitokin aracılı makrofaj fonksiyonlarının çoğunu da inhibe etmektedir [198]. Fare modellerinde yapılan çalışmalar, *L. major* LPG'sinin IFN- γ üretimini, iNOS ekspresyonunu uyararak parazit direncini ve konak korumasını sağladığını göstermiştir [199, 200]. iNOS eksik farelerde promastigotların ortadan kaldıramadığı gösterilmesi bu enzimin önemini gösteren başka bir bulgudur [201]. Tümör nekroz faktör- α (TNF- α) Th1 tipi proinflamatuvar sitokin olup, NO üretimi için çok önemlidir [202]. *L. major* ile enfekte olup TNF- α sitokini mutant olan farede enfeksiyona karşı direnç olmaması, TNF- α ve NO üretiminin önemini gösterilmiştir [203]. Diğer bir çalışmada, *L. major* LPG'leri makrofajlarda IFN- γ

üretimini uyarmış ve yüksek miktarda iNOS üretimine neden olmuş, bu da LPG yapılarının kompleksliği ile orantı göstermiştir [158]. Diğer taraftan *L. amazonensis* promastigotları, J774 makrofajlarında LPS kullanarak NO üretimini inhibe etmiştir [204]. *L. mexicana* LPG'si TLR2 aracılığıyla TNF- α 'yı uyarmakta ve bu üretim lipid bölgesinin bütünlüğüne bağlı olmaktadır [170]. Böylece Eski ve Yenidünya türlerinde LPG, uyarılmamış makrofajlarda NO üretimini uyarmamaktadır.

2.12.4.4 Hücresel Sinyal İletimi ve Sitokin Üretimi

Leishmania gibi hücre içi patojenlerin hayatta kalmak ve çoğalmak için konak hücre mekanizmalarından çıkar sağladığı birçok yol vardır. Konak makrofaj sinyal üretim yollarının bozulması, parazitlerin kullandığı hayatta kalma stratejilerinden biridir [173]. Bu mekanizmalar, kinaz ve fosfotazların kaskadlarında fosforilasyon ve defosforilasyon olayları ile gerçekleşir. *Leishmania* enfeksiyonuna, mitojen aktive protein kinazlar (MAPKs), TLR ve CD40'lar ile tetiklenen NF-kB yolları katılmaktadır [205]. *Leishmania* LPG'si makrofajlarda doğal immün sinyal ara-yollarını ve TLR2 aracılığıyla NK hücrelerini aktive ettiği gösterilmiştir [170, 171]. Belli genleri çıkartılmış farelerle yapılan *in vivo* çalışmalarda *Leishmania* enfeksiyonu sırasında diğer TLR'lerin önemini göstermiştir [206]. MyD88, TLR2, TLR3, TLR4 ve TLR9'un rolleri *L. donovani* ve *L. major*'da gösterilmiştir [170, 172, 207, 208]. *L. infantum*'da TLR9, IL-12 ve miyeloid DH'ler NK hücrelerinin aktivasyonu ile parazitin kontrolünde önemlidir [209]. Diğer taraftan fare modelinde *L. mexicana*'ya koruyucu immün yanıtın gelişimi IL-12 üretimini gerektirmemektedir [210]. Buna karşılık *in vitro* çalışmalar, *L. mexicana*'ya karşı LPG bağımlı proinflamatuvar transkripsiyonel yanıt dendritik hücrelere dayandırmaktadır [211]. Diğer bir çalışmada, *L. mexicana* LPG'si, monositlerde IL-12 üretiminde azalmaya yol açarak, NF-kB'un nüklear translokasyonunu bozmuştur [212]. *L. braziliensis* ile enfekte fare modellerinde IL-12, TNF- α ve iNOS hastalığın ortaya çıkmasında oldukça önemlidir [213]. Hatta bu türlerde, TLR2 enfeksiyon sırasında düzenleyici etkiye sahipken, MyD88 koruyucu immünitelerin oluşumunda zorunludur [214]. *L. amazonensis*'de CD40/CD40L etkileşimlerinin bozulması IFN- γ , lenfotoksin-TNF ve NO üretimini azaltarak parazitin enfeksiyonunu arttırmıştır [215]. Kemik iliği kaynaklı mast hücrelerinde (BMMCs), TLR2 ekspresyonu C57BL/6 farelerinde BALB/c

farelerinden daha yüksektir. Bu durum, *L. mexicana* LPG'si ile *in vitro* uyarım sonrasında, TNF- α , IL-10 ve MIP-1 α seviyelerinin artırılmasına neden olmuştur [216]. Sonuç olarak bu çalışmalar, koruyucu immün cevabın esas komponentlerinin *Leishmania* türlerine göre değiştiğini göstermektedir.

MAP kinazlar serin/treonin sinyal kinazlarının önemli bir grubu olup, farklı hücre dışı uyarıya cevaben nükleusta gen uyarılması ile transmembran sinyal bağlayarak çift fosforilasyonu aktive eder [217, 218]. *L. major* metasiklik promastigotları ve sentetik LPG'ler kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmada, LPG'nin makrofajlarda IL-12 ve NO üretimini düzenlediği gösterilmiştir. Bu NF- κ B aktivasyonundan bağımsız olarak meydana gelir ve IL-12'de gözlemlenen baskılayıcı etki ERK1/2 MAPKs aktivasyonu ile sonuçlanır [219]. Başka bir çalışmada *Leishmania* LPG'si ERK, p38 ve NK'lerin aktivasyonunu uyarmış ve bunun AP-1 aktivasyonu, IL-12 ve NO üretimi için önemli olduğu görülmüştür [220]. Hücre sinyallerini içeren diğer önemli grup Protein Kinaz C'dir (PKC). Bunlar membran fosfolipitleri tarafından aktive olan en az 12 serin treonin kinaz ailesi olup, efektör genlerin aktivasyonu için anahtar kinazlardır ve patojenlere karşı koruyucu cevapta önemlidir [221]. NO üretimi PKC tarafından aracılık edilen fosforilasyon olayları tarafından düzenlenmektedir. Sadece *L. donovani* parazitleri için değil, saflaştırılmış LPG de makrofajlardaki PKC aracılığı ile oksidatif patlamayı inhibe etmekte ve parazitlerin hücre içi hayatta kalmalarını sağlamaktadır. LPG'nin PKC'yi inhibe etme mekanizması, yarışmalı inhibitörü olabileceği veya PKC aktivitesi için gerekli olan Ca²⁺ için şelasyon yapabileceği şeklinde iki mekanizma ile açıklanabilir [222, 223, 224, 225]. Yenidünya *Leishmania* türlerini göz önüne alındığında, *L. mexicana*'dan saflaştırılmış LPG, BALB/c makrofajlarındaki PKC α aktivitesini inhibe etmiş, oksidatif patlamayı azaltmış ve parazitin hayatta kalmasını sağlamıştır [187]. Diğer sinyal grubu Protein Kinaz R (PKR)'dir. dsRNA, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ ve LPS gibi birçok uyarı ile aktive olur [226, 227, 228]. *L. amazonensis* enfeksiyonunda, RAW hücrelerinde çift sarmal RNA bağımlı aktivasyon görülmüştür. Parazit, baskılayıcı IL-10 üretimi ile ilişkili olarak önce NF- κ B aktivasyonunu ve sonra NO üretimini negatif yönlendirir [229]. Son zamanlarda bu türlerin LPG'si PKR transkript seviyelerini TLR2 aracılığıyla arttırdığı bulunmuştur [161]. Sonuç olarak LPG'nin etkilediği sinyal olaylarının mekanizması Yenidünya *Leishmania* türleri için hala çalışılması gerekli bir alandır.

2.12.4.5 Parazitofor Vakuoller içinde *Leishmania* Parazitlerinin Hayatını Sürdürmesi

Enfeksiyonun ilk aşamasında, parazitler makrofajın membran-bağlı fagozomu içine alınırlar. Fagozom makrofajın plazma membranının dış tabakasından oluşur. Bu yüzden parazitler başlangıçta hücre içinde olmalarına rağmen ekstraselüler vakuol içinde bulunurlar. Daha sonra fagozom sekonder lizozomun füzyonuyla modifiye olur, bu yapıya parazitofor vakuol (PV) ya da fagolizozom denir. PV yüksek miktarda mikrobisidal peptidler ve hidrolitik enzimler içeren asidik bir ortama sahiptir. *Leishmania* ile enfekte olmuş makrofajlarda mikrobisidal fonksiyon değişir. Makrofajlarda parazitlerin bulunmasına rağmen, PV içinde pH korunur ve PV aktiviteleri normaldir. Fakat enfekte makrofajda PV içinde süperoksit üretimi parazitler tarafından inhibe olur. Bu, *Leishmania* parazitlerinin makrofajlar tarafından salgılanan litik enzimler ve toksik oksidatif ürünler ile karşılaştıkları fagolizozomların tahrip edici ortamına karşı yüksek savunma mekanizmasına sahip olduğunu gösterir [230, 231].

Yapılan çalışmalarda *Leishmania* türlerinin hücre içi devamlılığı için LPG'ye ihtiyaç duydukları gösterilmiştir. *L. major*'ün LPG salgılayamayan avirülen bir klonu, makrofajlar tarafından fagosite edildiğinde 18 saat içinde öldüğü gösterilmiştir. Safılaştırılmış LPG'nin virülen bir *L. major* türünden avirülen bir promastigota pasif transferi ile parazitin makrofaj içinde yaşamaya devam ettiği görülmüştür [6].

2.12.4.6 Hidrolitik Enzimlerin İnhibisyonu

Leishmania parazitleri, konak hücre içinde yaşayabilmek için, konak hücrenin fagolizozomunda bulunan hidrolitik enzimleri (lizozomal enzimleri) inhibe etmek zorundadır. Lizozomal enzimlere karşı direnç, parazitin yüzey özelliklerine bağlıdır.

Yapılan bir çalışmada, LPG'nin fare peritoneal makrofajlarında bulunan 4 adet hidrolitik enzim üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar LPG'nin asit fosfataz, β -glukoronidaz ve N-asetil- β -glukozaminidaz üzerinde inhibisyon etkisinin olmadığını göstermiştir. Ancak inkübasyondan 3 saat sonra β -galaktosidaz aktivitesi önemli ölçüde inhibe olmuştur. Bu inhibisyonun nedeni, LPG moleküllerinin yüksek negatif yükü veya LPG'de yüksek miktarda bulunan fosforillenmiş disakkarit Gal(β 1,4)Man yapısı olabilir.

Ancak *in vitro* olarak elde edilen bu sonuçlar, *in vivo* ortamda çalışıldığında daha iyi anlaşılabilir [232].

Parazitin fagolizozom içinde hayatta kalmasında LPG'nin rolünü açıklamak amacıyla, yüzeyi LPG ile kaplanmış eritrositlerin makrofajlar tarafından sitolizi incelenmiştir. Yüzeyi LPG ile kaplanmış eritrositlerin makrofajlar tarafından sitoliz oranlarının LPG'siz eritrositlere göre oldukça düşük olduğu görülmüştür [233]. Bu sonuçlar gerçekten de *Leishmania* parazitlerinde bulunan LPG'nin hidrolitik enzimleri inhibe ederek, parazitin fagolizozom içinde hayatta kalabileceğini göstermektedir.

2.12.4.7 Kalsiyum Bağlanması

Kalsiyum hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde hücre içi ikincil haberci ve enzim kofaktörü olarak önemli görevlere sahiptir. *L. major* ile enfekte edilen makrofajların enfekte edilmemiş makrofajlara göre yaklaşık %40 daha fazla kalsiyum değişimi içerdiği görülmüştür [233].

2.12.4.8 C-Fos Gen Ekspresyonunun İnhibitörü

c-fos geni gibi protoonkogenleri de içeren çeşitli genlerin ekspresyonu PKC'nin aktivasyonu ile sonuçlanır [234]. Yaygın bir hipoteze göre Fos, nükleer üçüncül mesajcı molekül gibi çevresel sinyallere göre gen ekspresyonunu düzenler. Makrofajlarda *c-fos* gen ekspresyonu bir PKC veya bir cAMP-bağlı yolla indüklenebilir. PKC'nin aktivasyonu, *c-fos* mRNA'sının hızlı ve geçici artışı ile sonuçlanır [235]. Buna karşın cAMP'nin artışı *c-fos* geninin stabil ve dayanıklı ekspresyonunu uyarır [236].

Makrofajların LPG ile inkübasyonu, PKC bağlı *c-fos* geninin inhibisyonuyla sonuçlanır. Buna zıt olarak makrofajın cAMP'ye yanıt olarak *c-fos* genini eksprese etme yeteneği, LPG'de azalmaya neden olmaz [237].

IFN- γ ve TNF α gibi makrofaj aktive eden sitokinler PKC bağımlı sinyal üretim yolları gibi hareket ederler. PKC bağımlı gen ekspresyonunun zayıflaması, aktivasyon sinyallerini azaltır ve sonuçta hücre içi *Leishmania* parazitlerine faydalı olur [237].

2.12.4.9 Kemotaksisin İnhibisyonu

İnflamasyonda kan monositlerinin hızlı birikimi inflamatuvar yanıtın önemli bir adımıdır. *L. donovani* LPG'si monosit ve nötrofillerin kemotaktik hareketlerini inhibe edebilir. Böylece lezyon bölgesinde inflamatuvar reaksiyonların inhibisyonu, hastalığın kronikleşmesini destekler [238].

2.12.4.10 Toksik Oksijen Metabolitlerinin Temizlenmesi

Oksidatif patlamada LPG, PKC aracılı enzimatik inhibisyonun yanı sıra patlama sırasında ortaya çıkan toksik oksijen metabolitlerini de temizleyebilir [239]. LPG'nin hidroksil ve süperoksit anyonlarını yüksek etkinlikle temizlediği, elektron spin rezonans spektroskopisi ile belirlenmiştir. Bu özellik geniş şekilde tekrar eden fosforillenmiş disakkarit üniteleri ile gerçekleşmektedir ve şekerlerin hidroksil gruplarının oksidasyonu ile açıklanabilir [240].

2.12.4.11 IL-1 Üretiminin İnhibisyonu

Makrofaj ve diğer antijen sunan hücrelerin, T lenfositlerin aktivasyonunu sağlayarak etkili bir immün yanıt gösterme konusunda önemli rolleri bulunmaktadır. Makrofajın yardımcı T lenfositlerinin aktivasyonunu düzenlemede iki fonksiyonu vardır; (1) MHC II moleküllerinin ekspresyonu (2) IL-1 üretimidir. *L. donovani* ile enfekte makrofajlarda bu iki fonksiyon da inhibe olmuştur. Ayrıca monositlerin saf *L. donovani* LPG'si ile inkübasyonu LPS uyarımlı IL-1 sekresyonunu inhibe etmiştir [241].

2.12.4.12 TNF- α Reseptörlerinin Değiştirilmesi

TNF- α immün cevabı etkileyen bir sitokindir. Makrofajlar birçok mikroorganizma ve bunlardan köken alan moleküllere karşı, TNF- α cevabı üretirler. TNF- α ise makrofajın sitotoksik fonksiyonlarını aktive eder. Diğer LPS'lerin aksine LPG, makrofajın bu fonksiyonlarında büyük bir azalmaya sebep olur. *Leishmania* parazitleri makrofajlarda TNF- α sekresyonunu arttırsa da, TNF- α reseptörlerinin azaltılması özellikle enfeksiyonun başlangıcında *Leishmania*'nın hayatta kalmasında önemli rol oynayabilir [242].

2.12.5 Aşı Adayı Olarak Lipofosfoglikanın Önemi

LPG, *Leishmania* promastigotlarının membran yüzeyinde en fazla bulunan moleküldür. Saflaştırılmış *L. major* LPG'si farelere verildiğinde, parazit enfeksiyonuna karşı tam koruma sağlandığı görülmüştür [6]. Bu sonuçlar antijenik özelliği olan LPG'nin leishmaniasise karşı bir aşı adayı olabileceğini desteklemektedir.

LPG'nin suda çözünür karbonhidrat bölgesi (fosfoglikan) hastada bağışıklık oluşturmuş fakat lezyon gelişimi üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır [243]. LPG'nin lipozomla oluşturduğu konjugatlar ile *L. mexicana*'ya karşı aşılama farelerde, hastalığın şiddetinde herhangi bir artış görülmemiştir. Böylece LPG'nin aşılama etkin bir rol oynayacağı ispatlanmıştır [244]. Aşılanmış fareden izole edilen T hücreleri genetik olarak aynı özelliklere sahip başka bir fareye verildiğinde, bu farede de *L. mexicana* promastigotlarına karşı immün koruma gözlenmiştir. Bu korumanın antijen-spesifik T hücreleri tarafından gerçekleştirildiği görülmüştür.

Önceki çalışmalarda, saflaştırılmış LPG'nin farede *L. major*'a karşı koruyucu rolü olduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada LPG, tetrasakkarit bir aracıya bağlanmış ve immün uyarıcı tripalmitoyil-S-gliserilsistein ile konjuge edilmiş ve bu potansiyel aşı hayvan modelleri üzerinde denenmiştir.

Leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde güncel yaklaşımlar glikokonjugatlara, bunlardan da özellikle parazit için oldukça önemli olan ve aynı zamanda immünojen özellikleri bulunan LPG'ye dikkat çekmektedir. Ancak başlıca problem LPG'nin tek başına yeterli olmaması, immünojenliğinin artırılması için uygun bir adjuvan gerekmesidir [6].

2.13 Leishmaniasise Karşı Aşı Geliştirilmesi

Aşı; konağa verildiğinde hümmoral veya hüccresel yanıt oluşturarak, konağın belli bir enfeksiyona karşı korunmasını sağlayabilen aktif immünojenik bileşiktir. Parazitlerin biyolojik ve immünojenetik yapılarının diğcr mikroorganizmalara göre daha karmaşık olması, bunların oluşturduğu enfeksiyonlara karşı aşı geliştirilmesinde zorluklara neden olmuştur. Buna rağmen, paraziter hastalıklara ve özellikle leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde uzun yıllardan beri yoğun şekilde çalışmalar yapılmaktadır [245].

Leishmaniasise karşı aşı şimdiye kadar yapılan çok sayıdaki çalışmaya rağmen çok az aşama kaydedilmiştir ve hastalıkla mücadelede tek umut 40 yıldan uzun süredir kullanılan ilaçlardır [246]. Kemoterapi, direnç ve toksisite problemleri nedeniyle hastalıkla mücadele için verimli değildir. Bu nedenle tedavi yaklaşımlarına ek olarak aşı geliştirilmesi de göz önünde bulundurulması gereken bir noktadır [246].

Uzun süreli çalışmalar bu hastalık grubunun kontrolü için aşının en önemli işlemlerden biri olduğunu göstermiştir. Maalesef aşılarda geliştirilmesi, büyük antijenik farklılık ve 2 farklı konaktaki farklı hayat siklusu özellikleri nedeniyle oldukça güçtür. Geçen 10 yılda çeşitli subünit ve DNA antijenleri hayvanlarda potansiyel aşı adayları olarak belirlenmiş ancak insan çalışması yoktur. Ölü parazitler ile aşılama maliyetten dolayı hala cazip bir yaklaşımdır. Şu ana kadar dünyanın herhangi bir yerinde rutinde kullanılacak VL aşısı bulunmamaktadır [246].

Aşıların kemoterapiye göre belirli avantajları bulunmaktadır. Bunlar uzun süreli etkiyi tetiklemeleri, hem profilaktik hem de terapötik olarak kullanılabilmesidir. Ayrıca kemoterapiden farklı olarak aşılar karşı direnç gelişmemektedir [78]. Leishmaniasise karşı immünizasyon geçmişte canlı parazitleri insanlara enjekte ederek kendiliğinden iyileşen lezyonlar oluşturulması (leishmanization) ile başarılmıştır. Bundan sonra ilk nesil aşılar ölü parazitler ile oluşturulmuş ve VL'e karşı olmasa da, KL'e karşı geliştirilmiş ve endemik bölgelerde insan popülasyonlarında geniş klinik testlerde denenmiştir [247, 248, 249, 250]. İkinci nesil aşılar oluşumlarına göre 3 kategoriye ayrılır; canlı mutant aşılar, belirli subunit aşılar ve doğal antijen fraksiyonlarıdır. Son olarak üçüncü nesil aşılar cDNA kodlayan leishmanial antijenlerden oluşturulmuş ve hala başlangıç aşamasındadır [247]. Buna rağmen çok sayıdaki antijenler *in vitro* hücre veya fare modellerinde KL'e karşı incelenmiş ve hala insan kala-azara karşı etkili bir aşı elde edilememiştir [246].

2.13.1 Leishmaniasise Karşı Aşı Geliştirilmesinde Kullanılan Deney Hayvan Modelleri

Hayvan modellerinin, *Leishmania* türlerine maruz kaldıklarında, insanda görülen patolojik özellikleri ve immünolojik cevapları taklit etmesi beklenir. Birçok deneysel hayvan modeli geliştirilmiş ancak insanda oluşanları tam olarak gösteren bir model oluşturulamamıştır. VL'nin deneysel modelinin oluşturulduğu birçok hayvan türü

bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri BALB/c fareleri ve Suriye golden hamsterlarıdır. Ayrıca sekonder olarak köpekler ve farklı maymun türleri de kullanılabilirler. Doğal koşullarda enfekte kum sineği birkaç yüz metasiklik promastigotu konağın derisinden içeri verirken, deneysel enfeksiyonlarda *in vitro* koşullarda deri içine veya damar içine milyonlarca promastigot veya kutanöz lezyondan veya enfekte dalaktan elde edilen amastigot enjekte edilir. Her bir laboratuvar hayvanında enfeksiyonun gelişimi, enjekte edilen *Leishmania* türlerine, parazitin virulanslığına enjeksiyon şekline ve yoluna bağlıdır. *L. donovani* için uygun bir laboratuvar hayvanı, konak parazit ilişkileri, patojenez, biyokimyasal değişimler, profilaksi ve parazitin vücutta kalması noktalarda önemli olup, yeni bileşiklerin antileishmanial aktivitesinin gösterilmesi için kritiktir. Hayvanlarda enfeksiyonun belirlenmesinde birkaç kriter vardır; bunlar (1) inoküle edilen hayvanın duyarlılığı, (2) parazit kültürünün yaşı ve morfolojik olarak hangi fazda olduğu, (3) enfeksiyonun türüdür [246].

Enfeksiyonun veriliş şekli oldukça önemli bir aşamadır. Genellikle deri içi, derialtı, venöz damar içi ve periton içi yollar kullanılır ancak bazı çalışmalar farklı yollarla enfeksiyonun da başarılı sonuçlar verdiğini göstermiştir. Son yıllarda, doğal şekline uygun olarak düşük miktarda enfektif parazitin deri içine verildiği çalışmalar yapılmıştır. Bu açıdan laboratuvar izolatlarının enfektifliğini geliştirmek amacı ile kum sineklerinin salgı bezi ekstraktlarını kullanılması ilginç bir yaklaşımdır [251].

Primer test modelleri: Kemirgenler: *L. donovani* enfeksiyonu için küçük kemirgenlerin kullanılması ile ilgili geçmişte birçok girişimde bulunulmuştur. Bunlar hamsterlar, fareler, sıçanlar, sincaplar, çöl sıçanları şeklindedir [252]. VL'ye karşı aşı ve ilaç testlerinde çeşitli hayvan modellerinden en yaygın kullanılanı BALB/c fare ve Suriye golden hamsterlarıdır [246]

Fareler; outbreed fareler genellikle *L. donovani* enfeksiyonuna dirençli olması ancak inbred türlerin duyarlılıkta farklılıklar göstermesi, 1970'lerde Lsh duyarlılık geninin izolasyonuna neden olmuştur (NRAMP1 olarak dizayn edilmiştir) [253]. NRAMP 1 parazitlerin karaciğer ve dalaklarının erken genişleme derecesini belirler [254]. Fare modelleri ile yapılan çalışmalar, dalakta olmasa da karaciğerden parazitlerin

temizlenmesine neden olan organ spesifik immün cevaplarda önemli olan immün mekanizmaların karakterizasyonuna da neden olmuştur. Fare modellerinin diğer önemli katkısı ise T hücre aracılı cevapların yokluğunda kemoterapinin etkisiz olduğunun keşfi olmuştur [255]. Bu deneysel çalışmalar başarılı bir kemoterapi için immün sistemi aktive etmek gerektiğini göstermiş ve Hindistan'da başarılı denemeler gerçekleştirilmiştir.

Fare modelleri VL'ye karşı aşı geliştirilmesinde de geniş olarak kullanılmaktadır [256, 257, 258]. C57BL/6, CBA/J, C3H veya BIOD2 gibi fare modelleri hastalığa dirençli olup, birkaç ay içerisinde iyileşirken, BALB/c farelerde ve tüm T hücre immün yetmezliği olan türlerde sistemik VL görülmektedir [259]. C57BL/6 fareleri erken Th1 yanıtı oluşturarak parazitin daha fazla gelişmesini önler ve kendiliğinden iyileşen fenotipe neden olurken, duyarlı BABL/c farelerde erken Th2 yanıtı iyileşmeyen lezyonlar ve hastalığın ilerlemesi görülür [260]. C57BL/6 ve BALB/c farelerin dirençlilik ve duyarlılıkları sadece Th1 ve Th2 tip immün cevaba değil, ayrıca konağın genetik geçmişine de bağlıdır.

İlk aşı girişimlerinde ölü parazitler adjuvan olarak glukon veya IL-12 ile derialtı veya ven içinden verilmiştir. Bu çabalar CF1 farede enfeksiyona karşı mücadelede kısmi direnç sağlamıştır [261]. Canlılığı azaltılmış veya genetik olarak modifiye edilmiş parazitler de BALB/c ve C57BL/6 farelerinde incelenmiştir [262], [263]. Rekombinant *L. donovani* proteinleri ile immünizasyon yapılarak *L. donovani* paraziti ile enfeksiyona karşı oluşan immün yanıtın incelendiği birçok çalışmada BALB/c fareleri kullanılmıştır [246].

İnsan VL'i kendiliğinden kontrol altına alınan hastalıktan, ilerleyici forma kadar birçok klinik spektrum gösterir. Fare modelleri kendiliğinden kontrollü oligosemptomatik vakalar ile kıyaslanabilir ve bu koruyucu immün cevabın çalışılması için faydalıdır. Diğer taraftan *L. donovani* ile enfekte hamsterlarda ilerleyici VL oluşur ve bu da immünbaskılama çalışmaları için faydalı bir modeldir [246].

2.13.2 Birinci Nesil Aşılar

Leishmaniasise karşı ilk aşı, popüler ismi ile Leishmanizasyon, 1940'lı yılların başında geliştirilmiştir ve yaklaşık 60 senedir birçok ülkede kullanılmaktadır [264]. Ancak daha sonra Leishmanizasyon işlemi güvenlik sebebiyle devam etmemiş ve günümüzde ise

Özbekistan'da kaydedilen bir aşı ve İran'da etkinliği insanlar üzerinde denenilen bir başka aşı olarak hala kullanılmaktadır [265]. Birinci jenerasyon *Leishmania* aşıları (Leishmanizasyon) ölü parazitlerden ve zayıflatılmış *Leishmania* parazitlerinden oluşmaktadır [266].

2.13.2.1 Zayıflatılmış *Leishmania* Aşıları

Zayıflatılmış aşılar hücre içi patojenlere karşı korumada altın standart olarak değerlendirilir. Leishmanizasyonla ve ölü parazitlerle aşılama ile kıyaslandığında zayıflatılmış parazitler (patojen olmayan parazitler) ile aşılamının bazı avantajları olduğu bilinmektedir [267]. Uzun süreli *in vitro* kültürden elde edilen zayıflatılmış *Leishmania* aşılarının geliştirilmesi sırasında sıcaklığın etkisi, gama ışınlama, kimyasal mutajenez veya gentamisinli ortamda kültürün devam ettirilmesi gibi işlemlerin yapılması, parazitlerde genetik mutasyonların oluşmasına ve bu nedenle etkinliklerinin azalmasına neden olmaktadır [268]. Ayrıca son zamanlarda *Leishmania* genomuna yeni genlerin ilave edilmesi veya bazı genlerin çıkarılması sonucu genetik olarak modifiye edilmiş parazitlerin geliştirilmesi zayıflatılmış canlı aşı potansiyelini arttırmakta ve bu durum leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesi konusunda güçlü bir alternatif olarak değerlendirilmektedir.

L. major dihidrofolat redüktaz-timidilat sentaz (DHFR-TS) knock-out genlerin değiştirilmesi ile oluşturulan ilk üründür ve potansiyel bir aşı olarak test edilmiştir. Buna rağmen, DHFR-TS immünizasyonu primat modelinde immünite sağlayamamıştır [269]. Ancak bu aşılama antijene özgü pozitif proliferatif cevap oluşturmaya rağmen, koruyucu IFN- γ cevabı veya gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturmamıştır. GDP-mannozun golgiye taşınmasında görevli *lpg2* geni eksik olan *L. major* parazitleri ile aşılama ise *L. major*'e karşı duyarlı farelerde koruma sağlamış [270] ancak C57BL/6 farelerine karşı CPG oligonükleotid adjuvanı kullanılmadan immünite oluşturmada başarısız olmuştur [271]. Ayrıca bazı deneylerde bu mutantlar bir mekanizma ile enfeksiyona neden olma kabiliyetlerini tekrardan kazanmışlardır [272]. SIR2 geninin allellerinden birisi eksik olan *L. infantum* ile immünizasyon ise virulent suşlara karşı yüksek derecede koruma sağlamıştır [273]. Ancak SIR2 geninin seçici olarak zarar gördüğünde hücre içi amastigot formların büyüme ve gelişmesini etkilemiştir. *L.*

donovani sentrin gen hasarı parazitlerin amastigotlarının *in vitro* ve makrofaj içerisinde çoğalmasını engeller [274].

Zayıflatılmış aşılardan kullanılması enfeksiyonun doğal ilerlemesini taklit eden önemli bir aşılama şeklidir. Ancak en önemli güvenlik kısıtlaması virülensliğin tekrar kazanılması ve immün sistemi baskılanmış kişilerde parazitlerin aktifleşmesi olup, zayıflatılmış aşılardan büyük ölçekli kullanımlarını kısıtlamaktadır [275].

2.13.2.2 İntihar Kasetleri

Leishmania genomuna, hastalığın kontrolü amacı ile ilaç duyarlılık genleri eklenmesi şeklindeki yeni bir yaklaşımdır. Bu açıdan intihar sistemleri Muyombwe ve ark. tarafından virulent *L. major* enfeksiyonuna karşı timidin kinaz-gansiklovir kombinasyonuna dayalı olarak geliştirilmiştir [276] ve bu sistem ile gansiklovir tedavisinin süresine bağlı olarak farklı derecelerde koruma sağlamıştır. Daha sonraki denemelerde *Saccharomyces cerevisiae*'ya ait 5-florositozine duyarlı sitozin deaminaz geni gibi ilaç duyarlılık genlerinin *Leishmania* genomuna eklenmesi (knock in) ile çalışmalar yapılmıştır [277, 278].

2.13.2.3 Ölü *Leishmania* Aşıları

Ölü parazitler ile aşılamanın geçmişi 1940'lı yılların başında Brezilya'da 5 farklı *Leishmania* izolatından oluşan bir ölü aşı geliştirmesine dayanmaktadır [279]. Elde edilen aşının güvenli olduğu ve *Leishmania* deri testi ile yapılan ölçümlerde immünojenik olduğu gösterilmişse de, sadece %50 oranında koruma sağlamıştır. Leishvacin olarak bilinen ve yalnızca *L. amazonensis*'ten oluşan basit bir aşı da profilaktik etkisi Kolombiya ve Ekvator'da Faz III klinik denemelerde test edilmiş ve sonuç olarak aşının güvenli olmasına rağmen, etkili olmadığı ortaya çıkmıştır [280]. BCG ile birlikte otoklavlanmış *L. major*'ü içeren aşılardan güvenli olduğu ancak sağlıklı gönüllülere uygulandığında İran'da KL'e, Sudan'da ise VL'e karşı kayda değer bir immün yanıtın oluşumunu indüklemediği gösterilmiştir. Ancak otoklavlanmış *L. major*'un BCG ile kombinasyonunun daha immünojenik, koruyucu olduğu ve VL'e karşı köpeklerde, maymunlarda ve farelerde güçlü ve uzun süreli Th1 yanıtı ürettiği, ancak insanlarda kesin ve inandırıcı sonuçlar oluşturamadığı gösterilmiştir [281].

Yapılan çalışmalarda ölü parazit aşılarının güvenliliğine rağmen, ölü parazitlere dayalı etkili profilaktik aşı halen geliştirilememiştir [78].

2.13.3 İkinci Nesil Aşılar

İkinci nesil aşılar, sentetik veya rekombinant alt ürünlere, genetik olarak modifiye edilmiş *Leishmania* türlerine, *Leishmania* antijenlerine taşıyan rekombinant bakteri, virüsler ve parazitlerden saflaştırılmış doğal fraksiyonlara dayanır. Pek çok *Leishmania* proteini, yüzey lokalizasyonuna, T hücre klonlarına, antijen havuzlarının görüntülenmesine, enfekte hayvan ve insanlardan alınan serumlar ile gen ekspresyon kütüphanelerinin görüntülenmesine dayanılarak identifiye edilmiştir. Bu proteinler, glikoprotein 63 (gp63), membran glikoprotein 46 (gp46, M-2 olarak da bilinir), fuktoz-mannoz ligandı, aktive edilmiş C kinaz için homolog *Leishmania* reseptörleri (p36/LACK), NH36, Protein Q kimera, sistein proteinaz (CPB ve CPA), GRP78, *Leishmania* DNA 1 (LD1) antijenleri, açillenmiş hidrofilik yüzey proteini B1 (HASPB1), LCR1, tükrük proteini 15 (SP15), promastigot yüzey antijeni 2 (PSA-2), A-2, histone H1, MML, *Leishmania* başlangıç faktörü (LeIF), ökaryotik stres indükleyici protein 1'in (LmST11) *L. major* homologu, ökaryotik tiyole özgü antioksidanın (TSA) *L. major* homologudur.

2.13.3.1 gp63

Şu ana kadar en kapsamlı araştırılan antileishmanial aşı adayı parazitin yüzeyinde eksprese edilen glikoprotein 63 (gp63) veya diğer adıyla leishmanolisindir. gp63, çinko metalloproteazı olup, LPG gibi promastigotların yüzeylerinde eksprese edilir. 63 kD boyutunda olan gp63, parazitin konaktaki immün cevabına karşı konakta hayatta kalmada oldukça önemlidir. Parazit, bu antijen aracılığı ile makrofaj yüzeyinde bulunan reseptör 3 (CR3)'e bağlanarak hücreye girişini sağlar [251] Saflaştırılmış gp63'ün koruyucu etkisi pek çok deneysel modelde farklı suşlar, adjuvanlar kullanılarak (S. Thyphimurium BCG pCMV pCMV3ISS gibi) veya farklı diğer antijenlerle (KMPII, TRYP, LACK gibi) kombinasyon halinde araştırılmış ve çelişkili sonuçlar ortaya çıkmıştır [282]. *E.coli*'de eksprese edilen gp63'ün rekombinant formu *L. major* enfeksiyonuna karşı fareleri korumada başarısız olurken [283], maymunlarda yalnızca kısmi bir koruma

sağlamıştır [284]. Buna karşın, *L. major*'den saflaştırılan doğal bir protein, BCG veya bir lipozom ile bir arada verildiğinde farelerde sırasıyla *L. major* ve *L. mexicana* enfeksiyonlarına karşı koruma sağlamıştır [282, 285]. Farelerin gp63'ün transforme edildiği *Salmonella typhimurum* veya BCG'de eksprese edilen gp63 ile aşılması, *L. major* ve *L. donovani* enfeksiyonlarına karşı anlamlı bir direnç oluşturmuştur [286]. İmmünize farelerdeki dalak ve lenf düğümü hücreleri artırılmış IFN- γ ve IL-2 üretimi ile bağlantılı olarak güçlü bir proliferatif T hücre cevabını indüklemiştir [287]. Ancak bu hücreler, gecikmiş tip aşırı duyarlılık cevabını oluşturamamıştır [288]. İnsanlar üzerindeki çalışmalarda değişken sonuçların ortaya çıkması ve gp63 ile aşılanan fare makrofajlarındaki T hücrelerin koruyucu bir yanıt oluşturmaması, araştırmacıların gp63 ve DNA temelli aşılar ve gp63'den elde edilen sentetik peptidlere odaklanmasına neden olmuştur [78]. Dendritik hücrelerin immün yanıtta önemli rolleri, bu hücrelerin bir antijen ile birlikte doğal bir adjuvan olarak görev yapabileceklerine dair umutları arttırmıştır [289].

2.13.3.2 PSA-2/gp46/M-2

Diğer bir aşı adayı olan GPI bağlı membran proteini gp46/M-2, Lohman ve ark. [290] tarafından karakterize edilmiş ve *L. amazonensis*'e özgü promastigot polipeptidi olarak tanımlanmıştır [291]. Glikoprotein gp46/M-2 çoğu *Leishmania* türünde eksprese edilen gen ailesine aittir. Membran glikoprotein gp46/M-2 ile immünize edilen farelerde *L. amazonensis*'e karşı önemli derecede bir koruma sağlandığı gösterilmiştir [292]. *L. amazonensis*'e karşı korumanın seviyesini özellikle IgG1 ve IgG2'ye bağlı olarak artan antikor cevabı yansıtmaktadır. Bu korumanın, antijen uyarılmış dalak hücrelerindeki IFN- γ , IL-2, IL-4 ve TNF- α 'ya bağlı Th1 ve Th2 immün yanıt tiplerinin birlikte çalışmasına bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir [292].

L. infantum PSA-2 bir yüzey antijeni olan proteofosfoglikan ile ortak olarak 15 bazlık lósinden zengin tekrarları içeren (LRR) bölgeleri içerir [293]. PSA-2 proteininin farklı türler arasında çok benzerlikleri bulunmasına rağmen ailenin değişik üyeleri arasında yüksek derecede heterojenlik bulunmaktadır [294]. Doğal parazit yüzey antijeni (PSA-2) ve *Corynebacterium parvum* ile birlikte immünize edilen farelerde Th1 hücre bağımlı immün cevapta önemli bir artış gözlenmiştir [295]. Fakat *E. coli*'de rekombinant olarak

üretilen PSA-2'nin *C.parvum* ile immünize edilen farelerde Th1 cevap oluşumu diğer farelere göre başarısız olmuştur [296].

2.13.3.3 LACK

LACK (*Leishmania* aktive C kinaz için homolog reseptör) (36kDa) *Leishmania* türleri arasında yüksek derecede korunan ve hem promastigotlarda hem de amastigotlarda eksprese edilen bir antijendir [297]. *L. major* enfeksiyonlarında farelerdeki immünopatojenik rolü nedeniyle leishmaniasise karşı potansiyel aşı adayı olarak LACK antijenine önem verilmiştir. Fakat LACK ile *L. amazonensis*'e karşı aşılama farelerde başarılı olamazken, *L. donovani* enfeksiyonları ile yapılan çalışmalarda IFN- γ seviyesinde azalma ve yüksek seviyede anti-LACK ve parazite özgün antijen varlığı görülmüştür [298]. Ayrıca LACK antijeninin SLA antijeni ile birlikte periferik kan mononükleer hücrelerine uygulanması sonucu KL ve MKL hastalarında artan IL-10 ve azalan IFN- γ üretimi gözlenmiştir [299]. Fakat LACK proteininin bu sonuçları ile geniş kapsamlı bir sonuca varılamadığından, araştırmacılar LACK antijeninin protein formu yerine DNA'sına odaklanmış durumdadılar.

2.13.3.4 FML

En çok çalışılmış ikinci nesil aşı adayı Fukoz-mannoz ligandı (FML) ilk olarak *L. donovani*'den izole edilmiş ve kimyasal olarak Palatnik de souza ve ark. tarafından karakterize edilmiştir. Şu anda Leishmune® (patent INPI no: PI1100173-9, federal University of Rio de Janeiro, Brezilya) adı altında ticari olarak bulunabilmektedir [300]. Antijen parazitin bütün yaşam siklusları boyunca yüzeyinde bulunmakta ve makrofajların *Leishmania*'nın birçok türünün promastigot ve amastigotlarının fagosite edilmesini inhibe etmektedir [301].

Saponin gibi bir adjuvan ile birlikte FML antijeni kullanılarak köpeklerde çeşitli çalışmalar yapılmış ve umut verici sonuçlar gözlenmiştir [302]. FML antijeni ile aşılama IgG2a artış seviyesi ile birlikte etkili koruma sağlamış ve deneysel olarak enfekte edilmiş ve doğal olarak maruz kalan köpeklerde %79-100 gecikmiş tip aşırı duyarlılık (DTH) tepkisi görülmüştür [303]. Quil-A saponin formülasyonu ile kullanılan FML antijeni, kala-azar enfeksiyonuna karşı köpeklerde %95 koruma sağlamıştır. Aşılanan

köpeklerde yüksek seropozitiflik (%100), hiçbir Leishmanial DNA ve intradermal reaksiyonlar tespit edilemedi. FML-QuilA aşısı köpeklerde kala-azara karşı önemli, uzun ömürlü ve güçlü bir koruyucu etki sağlamıştır [304]. Ancak, Leishmune® (1mg) lisanslı bir FML-saponin formülasyonu, daha fazla oranda gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonları göstermiş ve önemli derecede anti-FML IgG antikoru, belirgin olarak yüksek seviyelerde ve istikrarlı IgG2 ve azalan bir IgG1 yanıtına yol açmış ve Th1 tip hücre aracılı yanıtında bozmuştur. Leishmune® aşısı köpek VL immünoterapisi için iyi bir seçenek olabilir, ancak, bir immünoterapi ajanı olarak kullanımı ile ilgili bir bildirim yoktur.

2.13.3.5 LiESA-MDP

Diğer ikinci-nesil köpek aşısı Faz 3 çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilen LiESA-MDP 54 kDa *L. infantum* protein promastigot protein ile Muramil dipeptid'in (MDP) bir kompozisyonudur [305]. LiESAp ile aşılanan köpeklerden elde edilen periferik lenfositlerin *Leishmania* enfekte makrofajlar ile inkübasyonu IFN- γ ile makrofaj aktivasyonu sonucu önemli derecede NO bağımlı leishmanisidal etki göstermiştir [306].

2.13.3.6 Sistein Proteinaz (CP)

Katepsin L-sistein proteinazı (CPs), papain süper ailesinin önemli bir aşı adayı olup ağırlıklı olarak amastigot lizozomlarında ifade edilir [307]. Sistein proteinaz parazitin yaşam, çoğalma ve hastalığın başlamasında önemli bir rolü bulunan ilaç veya aşı hedefidir [308]. *Leishmania*'da üç sınıf CP tespit edilmiştir: Tip I (CPB), Tip II (CPA) ve Tip III (CPC) [309]. CPB, özellikle C-terminal uzantısı bulunan ve multikopyalı genlerden oluşmasıyla karakterize edilir, CPA ve CPC ise tek bir kopya gen tarafından kodlanmıştır. Farelerde CPA/B füzyon proteini ile yapılan deneysel KL çalışmalarında, IgG2a ve IFN- γ artan seviyesi ile farelerde Th1 immün yanıtı oluşumu sonucu kısmi bir koruma elde edilmiştir [310]. CP proteini kullanarak bir aşı geliştirmek için çabalar şimdi protein formundan DNA formuna kaymıştır.

2.13.3.7 Glukoz-düzenleyici protein 78 (GRP78)

L. donovani'nin GRP78'i 70 kDa stress protein ailesinin en korunmuş üyesidir. GRP78 kodlayan genler mayalar, *Trypanosoma*, sıçan [311] diğer *Leishmania* türleri dahil olmak üzere birçok türde karakterize edilmiştir. *L. donovani* GRP'si sırasıyla, *L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis* ve *Trypanosoma cruzi* GRP'lerine %98, %97, %89 ve %82 oranlarında homoloji göstermektedir. Son zamanlarda, 78 kDa antijeni çeşitli adjuvanlar (MPL-A, RIL-12 ve lipozomal kapsülleme) ile birlikte formüle edildiğinde artan Th1 immün yanıt gösterdiği ve koruma sağladığı gösterilmiştir [311].

2.13.3.8 Amastigot Antijenleri (P4, P8,A2)

Amastigotlara özgü olan ve potansiyel aşı modelleri için kullanılan antijenler P4, P8 ve A2 antijenleridir. Farelerin *L. pifanoi*'den elde edilen P4 ve P8 antijenleri ile immünizasyonu oldukça büyük proliferatif cevaplara ve artmış IFN- γ üretimi ile kısmen koruma sağlamıştır [312]. Son zamanlarda, farelerde, makrofaja bağlı sitokin ve kemokinlerce üretilen Toll-benzeri reseptör 4 üretiminin P8 proteoglikolipid kompleksi (PGLC) tarafından indüklendiği bildirilmiştir [313]. IFN- γ makrofaj göç inhibitör faktörü (MIF) ve tümör nekroz faktörü/limfotoksin (TNF/LT) üreterek baskın bir CD4⁺ T-hücre cevabı oluşturan P4 antijeninin immünize edici bir ajan olduğunu ortaya çıkarmıştır [314]. P8 ve P4 antijenlerine karşı cevap veren KL'li hastalardan elde edilen PBMC'ler deneysel olarak *L. chagasi*/*L. infantum* ile enfekte edilmiş ve Th1 benzeri immün cevap oluşturarak artan düzende IFN- γ ve TNF- α ürettikleri ve düşük IL-4 mRNA ekspresyonu sağlandığı ortaya çıkmıştır [315]. A2 proteininin sadece *Leishmania*'nın amastigot formunda hücre içi olarak en az 11 genden oluşan bir multigen ailesinden üretilen bir protein olduğu ve *Leishmania* parazitlerinin memeli konak içerisinde hayatını sürdürmesinde gerekli olan virulent bir faktör olduğu kesin olarak bilinmektedir. Son zamanlarda, adenovirüs A2 eksprese eden (AdA2) BALB/c farelerinin A2'ye özgü CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri yüksek seviyede IFN- γ üretirken düşük antikor cevabı verdikleri belirlenmiştir [316].

2.13.3.9 HASPB1

Asidik yüzey moleküllerinden heterojen bir aileye ait yüzey molekülü olan ve *Leishmania*'nın hayat döngüsünde sadece amastigot fazda ve metasiklik fazda eksprese edilen rekombinant hidrofilik açillenmiş yüzey proteini B1, VL'li fare modelinde adjuvanın yokluğunda koruyucu etkiye sahiptir. Ancak, köpeklerde, adjuvan olarak Montanide kullanıldığında, rekombinant HASPB1 sadece kısmi koruma sağlamıştır [317].

2.13.3.10 LCR1

T. cruzi flajellar polipeptidi ile homolojik şekilde tekrarlayan 67-aminoasit zinciri içeren bir diğer rekombinant protein ise LCR1'dir. BCG'de *L. chagasi* [318] enfeksiyonuna karşı kısmi koruyucu etkisi olduğu ve aşı olarak yönlendirilen ve enfekte fare dalak hücrelerinde T hücre proliferasyonunu ve IFN- γ üretimini uyardığı belirtilmiştir [319]. BCG-LCR1 ile immünizasyon duyarlı farelerde LCR1 proteininin yalnız kullanılması ile kıyaslandığında daha iyi bir koruma sağlamaktadır ancak bu koruma aşının verilmiş yoluna bağlı olmaktadır [320].

2.13.3.11 Histon 1 (H1)

Leishmania histonları, hem *Leishmania* enfeksiyonu ve hem de hastalığı boyunca konağın immün cevap oluşturmaya neden olan potansiyel immünojenlerdir. Rekombinant histon 1'in koruyucu etkisi av köpekleri üzerinde *L. infantum*'a karşı ve yeşil Afrika maymunları üzerinde de *L. major*'a karşı belirlenmiştir [78]. Her iki durumda da immünizasyon kısmi olarak indüklenmiştir. Doğal H1 ve sentetik peptidleri immünizasyon sonrasında farelerdeki KL lezyon boyutunda küçülmeye neden olmuştur [321]. Son zamanlarda, köpeklerin immünizasyonu, Montanide ile formüle edilmiş H1 ile kıyaslı deneysel çalışmalar yapıldığında kısmi koruma sağladığı belirtilmiştir [317].

2.13.3.12 Open Reading Frame Fragment (ORFF)

ORFF tek bir kopya halinde 35. kromozom üzerinde yer alan multigen LD1 lokusuna aittir ve parazit gelişimi için önemli bir gendir [322]. ORFF proteini ile ilgili aşılama çalışmaları VL'li fare çalışmaları ile sınırlandırılmıştır. Rekombinant ORFF proteininin

CpG-ODN kombinasyonu ile farelerin immünizasyonu *L. donovani* enfeksiyonuna karşı belirgin bir koruma sağladığı ve bunu da zengin IgG2a and IFN- γ üretimi ile gerçekleştirdiği ancak proteinin tek başına sadece kısmi bir koruma sağladığı belirlenmiştir [323].

2.13.3.13 dp72

VL hastası insanların serumlarından alınarak tanımlanan [324], *L. donovani*'den elde edilen dp72 proteini *C. parvum* ile desteklenmiş kombinasyonunun aşı adayı olarak kullanılması ile BALB/c farelerinde *L. donovani*'ye karşı kısmi koruma sağlar [325].

2.13.3.14 P0

P0 ribozomal proteini, VL tanısı konulmuş köpeklerin serumlarındaki *L. infantum*'dan tanımlanmıştır [326]. Artan IFN- γ ve IgG2a üretimi ile Th1 tipi immün cevabı aracılı rekombinant P0 ribozomal proteini (rLiP0) kullanılarak immünize edilen farelerde koruma sağlandığı gösterilmiştir [327]. Ancak, BALB/c farelerinin *L. major* enfeksiyonu ile indüklenmesinde Th2 cevabı yeterli koruma sağlayamamaktadır. Son zamanlarda *L. major* ribozomal protein (LRP)'nin CpG-ODN ile kombinasyonunun BALB/c farelerini aşılama kullanımı dermal patolojilerde iyileşme olduğunu ve *L. major* ile kıyaslandığında parazit yükünde azalma olduğunu göstermiştir [328].

2.13.3.15 Kinetoplastid Membran Proteini-11 (KMP-11)

Hücre yüzey membranına bağlı KMP-11, *Leishmania* türlerine karşı koruma sağlar ve bunu T lenfositlerinin proliferasyonunu ve antikor cevaplarını uyarak yapar [329]. Periferik kan mononükleer hücrelerinin uyarılması ile VL ve KL hastalarından doğal KMP-11 ve sentetik peptidleri ile T hücre proliferasyonunun engellendiği IFN- γ 'nın üretiminin belirgin şekilde düşük olduğu belirlenmiştir [330]. Ancak, deneysel olarak enfekte edilen köpeklerden elde edilen PBMC'ler KMP-11 antijenine karşı cevap oluşturmuş ve IFN- γ 'nın artışını düzenlemiştir [331].

2.13.3.16 Flajellar rod proteini-2 (PFR-2)

PFR-2 ile immünizasyonda dişi hamsterlerde bulunan yaralardaki büyüme *L. panamensis*'e karşı olan enfeksiyonlarda engellenirken, *L. mexicana*'ya karşı olan enfeksiyonlarda etkili olmamıştır [332].

2.13.3.17 Poliprotein aşıları

Protein Q

Aşı gelişimindeki son yaklaşım poliprotein kompozitlerinin farklı proteinler ile kullanımıdır. Asidik ribozomal protein Lip2a, Lip2b, P0 ve histon 2A (H2A) gibi 4 fragmentlerinin genetik füzyonlarını içeren antijen kompoziti olan rekombinant protein Q VL hastası köpeklerde % 90 koruma sağlamış ve parazit yükünü düşürmüştür [333]. Protein Q aynı zamanda farklı adjuvanlar (hsp70, BCG, CpG-ODN, pUC18, pcDNA3, alum ve Freund's adjuvan) ile kombinasyonunda immün cevap için aktivatör potansiyele sahiptir [334].

Leish-111f

Umut veren bir diğer ikinci-nesil aşı örneği de Leish-111f'dir. Leish-111f leishmaniasis için tanımlanan ilk aşı olmuştur ve klinik Faz 1 ve 2 denemelerinde kullanılmıştır. Leish-111f, *L. major* homolog ökaryotik tiyol-spesifik antioksidan (TSA) , *L. major* stress-inducible protein 1 (LmSTI1) ve *L. braziliensis* uzama ve başlangıç faktörü (LeIF) gibi üç molekülün kompozisyonu olan bir poliproteindir. *Leishmania*'nın hayat döngülerinde bulunan proteinler aşı olma potansiyeli taşıyan proteinlerdir. Rekombinant LeIF ile immünize edilen SCID farelerinde IFN- γ , IL-12 ve IL-18 üretimin arttığı Th1 tipi immün cevap oluşumu gözlenmiştir [78]. Leish-111f proteinin diğer bileşenleri TSA ve LmSTI1'dir. Tek başına antijen ile (TSA veya LmSTI1) immünize edilen farelerde koruma gözlenmemiştir ve IgG2a antikoruna karşılık IgG1 üretimi olmamıştır. Buna karşılık, IL-12 kullanımı adjuvan olarak güçlü bir koruma sağlarken LmSTI1 ve TSA adjuvanlarının sırası ile artan IFN- γ ve IgG2a konsantrasyonları ile kısmi koruma sağlamaktadır [335].

Ancak *L. braziliensis*'ten tek başına ya da kombinasyonlar şeklinde elde edilen LmSTI1 ve TSA kullanılarak hazırlanan rekombinant izolatlar ile immünizasyonda *L.*

braziliensis'e karşı farelerde antikor ve hücre temelli cevaplar oluşmasına rağmen koruma görülmemiştir [336]. Liesh-111f'nin rekombinant bileşimlerinin karışımının köpeklerde oldukça yüksek bağışıklık oluşturmuş [337] ancak *L. infantum*'a karşı korumada işe yaramamıştır. Köpeklerde Faz 3 çalışmalarda ise hastalık gelişimini durduramamıştır [338].

LPG

Glikokonjugatlar parazitlerin en önemli yüzey molekülleri olup, parazitleri memeli konak tarafından salgılanan çeşitli faktörlerden korumada ve mevcut ortama adapte olmada önemlidir [12]. Lipofosfoglikan (LPG), *Leishmania* promastigotlarının hücre yüzey glikokonjugatlarından elde edilir. Parazitlerin kamçısı da dahil olmak üzere bütün yüzeyinde bulunur [339]. Parazitin makrofajlar tarafından reseptör aracılığıyla alınmasında bu antijenlerin önemli rolü vardır [340]. *L. major* ve *L. donovani*'den izole edilen LPG ile yapılan çalışmalarda, LPG'nin ümit verici bir aşı adayı olabileceği belirtilmiştir [341].

2.13.4 Üçüncü Nesil *Leishmania* Aşıları: DNA Aşıları

Yabancı protein kodlayan plazmid DNA'sının direk enjeksiyonunun keşfi, endojen protein biyosentezi ve buna karşı spesifik bir immün cevap oluşması, aşı geliştirmede yeni bakış açısı sağlamıştır. DNA aşıları nispeten kolay üretilibilmeleri, stabil, yönlendirilmesi kolay, immünojen olmaları taşınmasında soğuk bir ortama ihtiyaç duymaması ve en önemlisi birçok geni bir araya getirebilme olanağı sağlaması nedeniyle avantajlıdır [342], [343]. Böyle aşılar sitokinler ve/veya CpG oligonükleotidleri ile daha da modüle edilebilir CD4⁺ ve CD8⁺ T cell humoral cevabı ortaya çıkarabilirler [344]. Genelde rekombinant aşı adayı olarak kullanılan antijen dizileri DNA aşıları için de kullanılmaktadır. DNA aşıları, tekli aşı, genlerin kombinasyonu olarak, rekombinat proteinin enjeksiyonunu takiben veya rekombinant proteini eksprese eden Vaccinia virüsü olarak denenmiştir. Yapılan çalışmalardan sadece ikisinde adjuvan kullanılmıştır [345].

En çok çalışılan ve uzun zamandır kullanılan DNA aşıları rekombinant proteinler halindedir [346]. Çoğu tek başına bazıları ise multigenik aşılar olarak denenmiştir. DNA ile heterolog prime-boost stratejisinde protein ile immün cevabın daha da arttırılmasının sağlanması yoğun çalışmalar gerektirir. Heterolog prime boost stratejisi, DNA ve protein aşılama ile immün cevabın arttırılmasına yönelik bir stratejidir [347]. Birçok çalışma farede KL'ye ve VL'ye karşı, bazı hamsterlarda ve köpeklerde VL'ye karşı kullanılmıştır [78]. gp63 kodlayan gen DNA aşısı olarak ilk kullanılandır ve fareye oral yolla gp63 eksprese eden *S. typhimurium'* un CD4⁺ Th1 uyaran ancak DTH cevabı vermeyen [348] alt kümesi verilerek immünize edilmiş, pCMV-gp63 kas içi yolla verildiğinde hem güçlü Th1 cevabı gelişmiş hem de *L. major* enfeksiyonuna karşı belirgin bir direnç oluşmuştur [349]. Diğer çalışmalar tüm farelerin Th1 yanıtıyla indüklenmesine [350] rağmen farelerin %30'unda *L. major'* e karşı koruma sağlandığını ve *L. mexicana* enfeksiyonuna karşı gp63 DNA'sıyla immünizasyonda ancak kısmi bir koruma sağlandığını ortaya koymuştur. Buna rağmen gp46 ve Sistein Proteinaz B karışımı gp63 ile birlikte verildiğinde koruma derecesini arttırmıştır [351]. Alüminyum fosfat [352] ve plazmid kodlayan CD40L'nin kullanımı adjuvan olarak gp63'ün etkisini daha da arttırmıştır ve deneysel enfeksiyon sonrası inflamatuvar reaksiyonu kısmen baskılamıştır [340]. Tüm bunlara rağmen gp63 içeren multigenik DNA aşısı köpeklerde *L. infantum'a* karşı koruma sağlayamamıştır [353].

Karşılaştırmalı bir çalışma gp63 içeren farklı DNA aşı adaylarının geçici koruma sağladığını ve neticede aşılanmış farede de kontroldekine benzer lezyonların geliştiğini göstermiştir [346]. Aynı çalışma ayrıca koruma sağlamayan yüzey antijen 2'yi de (PSA-2) içermektedir. LACK şimdiye kadar hem KL hem de VL'ye karşı kullanılan en yaygın DNA aşısıdır. Farelerin LACK DNA'sı ile IL-12'li ve IL-12'siz immünizasyonu *L. major* enfeksiyonuna karşı uzun süreli koruma sağlamasına rağmen CD4⁺ and CD8⁺ T hücrelerinin azalması koruyucu immüniteyi ortadan kaldırmıştır. Benzer olarak intranazal verilen LACK DNA'sı aynı zamanda fareyi *L. amazonensis* ve *L. chagasi* enfeksiyonuna karşı korumuş ancak kas içi olarak verildiğinde IFN- γ artmasına rağmen *L. chagasi* enfeksiyonuna karşı korumada yetersiz kalmıştır [78]. Melby ve arkadaşlarının önceki çalışmaları [354] da LACK DNA'sının farede *L. donovani* enfeksiyonuna karşı güçlü bir Th1 cevabı tetiklenmesine rağmen korumayı

arttıramadığını desteklemiştir [355]. LACK içeren diğer multigenik plazmid DNA'sı köpeklerde deneysel *L. infantum* enfeksiyonuna karşı koruma sağlayamamıştır [353].

Dört histon plazmitinin (H2A, H2B, H3, H4) karışımı BALB/c farede *L. major*'a karşı Th-1 aracılı koruma sağlamıştır. CPa ve CPb plazmitleri tek başlarına etki göstermezken birlikte kullanıldıklarında farede *L. major*'a karşı koruma sağlanmıştır. KMP-11 ile aşılanan farelerde immün yanıt oluşurken KMP-11, TRYP, LACK ve gp63'ten oluşan karışım haldeki DNA ile aşılanan köpeklerde *L. infantum*'a karşı koruma sağlanamamıştır [267].

NH36 DNA aşısı ise farelerde Th-1 yanıtı oluşturarak *L. chagasi*, *L. mexicana* ve *L. amazonensis*'e karşı rekombinant NH36 veya FML antijenleri ve saponinden daha yüksek koruma sağlamıştır [278].

DNA kodlayan P4 nükleazı ve IL-12 ile immüninasyon farede Th1 cevabını geliştirmiş ve *L. amazonensis* enfeksiyonuna karşı koruma sağlamasına rağmen *L. major* enfeksiyonuna karşı yetersiz kalmıştır [356]. Farelerin A2 DNA ile immünizasyonu Th1 cevabı ile *L. amazonensis* ve *L. chagasi* enfeksiyonunun her ikisine karşı da korumuştur ancak A2'nin HSP70 DNA aşısı ile kombinasyonu karışık Th1/Th2 cevabını indüklemiş ve fareyi *L. amazonensis* enfeksiyonuna karşı koruyamamıştır [357].

Denenen aşı adaylarının henüz Faz IIa aşamasında olduğu ve koruyucu özellikler gösterdiği bilinse de şimdiye kadar Faz III aşamasında bulunan bir çalışma yoktur.

2.13.4.1 Heterolog prime-boost aşısı

DNA prime-protein boost rejiminin hümmoral ve hüccresel kaynaklı cevapların her ikisini uyardığı primatlarda gözlenmiştir [358]. Bu aynı zamanda aşısı varlığında uzun ömürlü antikör cevabının artmasıyla oluşan etkinliği ve IL-12 ve IFN- γ salgılanmasını artırır [359]. Prime-boost stratejisinde *L. infantum* LACK ile birinci aşılamaıı takiben vaccinia virusde eksprese edilen LACK ile immünojeniteıı artırmak (boosting) farede koruma sağlar ve *L. major* enfeksiyonuna karşı Th1 cevabını indükler [360] ve koruma IL-12 and IL-18 eksprese eden DNA'nın birlikteliğıyle daha da kuvvetlenir [361]. Ancak sistein proteinaz tip I' in C-terminal ile birincil aşılamaıı sonra booster, immünojenik

olmasına rağmen fareleri *L. infantum* enfeksiyonuna karşı koruma sağlayamamıştır [362]. Ancak prime-boost rejimi ile indüklenen koruyucu cevap sadece DNA aşısıyla oluşandan daha fazla değildir [363].

2.13.5 Kum Sineği Tükürük Antijenlerini İçeren Aşılar

Leishmania parazitleri, bir konaktan diğerine, kum sineğinin ısırması sırasında tükürüğündeki süspansiyonla beraber bulaşır. Yaklaşık 30 farklı kum sineği türü *Leishmania* parazitlerini taşır ve bulaştırır. Eskidünya *Leishmania* parazitleri *Flebotomus* cinsi kum sinekleri tarafından bulaşırken, Yenidünyadakiler *Lutzomyia* cinsi sinekler ile bulaşır. Endemik alanlardaki hayvan ve insanlar enfekte olmamış kum sinekleri tarafından daha sık ısırılır ve bundan dolayı hücre aracılı anti tükürük antikorları ısırılan kısımda gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu gösterir [364].

Kum sineği tükürüğü ve onun vazodilatör peptidi olan maxadılan enfeksiyonun ilk aşamasında *Leishmania* enfeksiyonunu desteklemiş ve birkaç fare türünde KL'in daha da ilerlemesine neden olmuştur [365]. İlginç olarak, *Lutzomyia longipalpis maxadılan* veya *Flebotomus papatasi* SP-15 protein gibi bileşenlere önceden bağışıklı farelerin *L. major* enfeksiyonuna karşı korunmalı oldukları görülmüştür [366]. Bu sonuçlar, kum sineğine spesifik bileşenlere hedefli bir aşı ile farelerde, ciltte kum sineği ısırıkları gibi yerel yanıtların değişmesine ve mikro ortamda parazit için koloni oluşmayı zorlaştırmasına neden olabileceğini göstermiştir. Bu tip aşılar parazite spesifik hedeflenen aşılarla göre daha avantajlıdır çünkü doğada kum sineği tekrarlanan ısırıkları korumayı artırır. Eğer insan denemelerinde etkinliği kanıtlanırsa, bu leishmaniasisin ve diğer vektörle bulaşan hastalıkların kontrol stratejisi için oldukça önemli olacaktır. Bu tür aşılar için esas problem farklı kum sineği türleri ve *L. major* dışındaki farklı *Leishmania* türleri için ortak koruyucu antijenleri tanımlamaktır [367].

Gözlemlere dayanarak kum sineği ve tükürük bileşenlerinin patojenlerin enfektifliğini arttırdığı ve aşıların tükürük bileşenleri veya vektör barsak antijenlerinin enfeksiyona karşı korumayı arttırdığı söylenebilir. Max veya Maxadılan proteinleri ve *Phlebotomus*

papatasi'den elde edilen SP15 antijeni farede *L. major* enfeksiyonuna karşı direnç oluşumunu sağlamıştır [6].

2.13.6 Dendritik Hücre Temelli Aşılar

Dendritik hücreler vücudun tüm dokularında bulunurlar ve birçok *Leishmania* parazit türleri için konak hücre görevi yaparlar. Vücutta bulunan parazitler DH'lere direk olarak veya kan hücrelerini enfekte ettikten sonra girerler [368]. Parazitler DH üzerinde bulunan amastigotlara uygun DC-SIGN reseptörlerini kullanırlar. Daha sonra enfekte olmuş DH yüzey fenotipleri olgunlaşarak değişime uğrar. Enfekte DH'ler, Th-1 tipi immün hücrelerini indükleyerek *Leishmania*'nın ortadan kaldırılmasında önemli rolü olan IL-12'yi üretirler.

Son yıllarda doğal bağışıklık sisteminin rolünün anlaşılması, anti-leishmanial bağışıklığın başlaması ve gelişmesi için, aşı antijenlerinin taşınmasında DH'lerin kullanımı sağlanmıştır [369]. DH'ler, özel antijenlerle inkübe edilip bu antijenleri fagosite ettikten sonra, antijene spesifik immün yanıt oluşturmaktadırlar. BALB/c fare modelinde yapılan bir çalışmada, Langerhans hücrelerinin doğal bir adjuvan gibi davrandığı ve bir *L. major* parçasıyla uyarılmış Langerhans hücrelerinin, IL-12 aracılı korumaya benzer şekilde, enfeksiyondan korumayı da desteklediğini göstermiştir [370].

Ex vivo antijen-sinyalli Langerhans hücrelerinin (LCs), myeloid DH'ler (mDH) ya da plazmasitoid DH'lerinin BALB/c farelerde *L. major* enfeksiyonuna karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Farklı Gp63 kaynaklı peptidlerle yüklenmiş DH; kullanılan peptide bağlı olarak çok güçlü korumadan hastalığın şiddetlenmesine kadar farklı sonuçlara yol açmıştır [371].

2.13.7 Leishmaniasise Karşı Non-Patojenik Aşı Adayı olan *L. tarentolae*

İnsanlar için patojen olmayan etkenlerin aynı türden olan enfeksiyonlara karşı aşı geliştirilmesinde önemli olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda parazitik ancak patojen olmayan protozoon olan *L. tarentolae*'nin da *Leishmania*'ya karşı aşı geliştirilmesinde umut verici olduğu ortaya çıkmıştır. Bu türden olan etkenler

enfeksiyonu en iyi şekilde taklit eder ve immün sistem aktivasyonunu artırır. Yapılan bir çalışmada *L. tarentolae* canlı aşı adayı olarak kullanıldığında aşı adayının dendritik hücreler ve lenfoid organlar tarafından etkili şekilde tanındığı, antijen sunumunu gerçekleştirdiği ve sonuç olarak T hücre yanıtını sağladığı tespit edilmiştir. Böylece *L. tarentolae*'nin antijen sunumundaki artış sonucunda T-hücrelerin immün yanıtındaki etkisinin oldukça büyük ve kaliteli olduğu ortaya çıkmıştır [245]. *L. tarentolae* DH olgunlaşmasını aktive etmekle T-hücre proliferasyonunu artırır ve IFN- γ üretimini indüklemiş olur. *L. tarentolae* parazitleri ile enfekte olan BALB/c farelerinde *L. donovani*'ye karşı koruyucu bir immün yanıtın oluştuğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar canlı aşı adayı olarak *L. tarentolae* vektörlerinin kullanılmasının ümit verici bir yaklaşım olduğunu göstermektedir [372].

2.13.8 Leishmania Aşı Adaylarında Test Edilen Adjuvanlar

Adjuvan terimi antijenlere karşı oluşan humoral veya hücreyel immün yanıtı arttırabilen materyaller için kullanılmaktadır. Geleneksel aşılar ve adjuvanlar erken, yüksek ve uzun süreli immün yanıtı ortaya çıkartmak için kullanılırlar. Adjuvanların etkinlikleri; aşı yapılan bölgede antijenlerin depo şeklinde kalıp yavaş salınımını, antijenlerin immün hücrelere sunumunu ve farklı lenfositlerin üretimini sağlamak şeklindedir [373].

Birçok yeni aşı adayı antijenlere dayalı yaklaşımlar olup geçmişte kullanılan inaktive veya canlılığı azaltılmış aşılara göre immünojenlikleri düşüktür. Şimdiye kadar tanımlanan aşı adayı antijenler leishmaniasise karşı korumada henüz yeterli değildir. Sadece antijenin verilmesi ile her zaman etkili bir yanıt oluşmadığından çeşitli adjuvanlar kullanılır. Bu nedenle de günümüzde adjuvanlar yeni aşı geliştirilmesi için önemi giderek artan bileşiklerdir. Aşılanan antijene karşı uzun süreli güçlü bir immün yanıt oluşturmak aşı çalışmalarının en önemli amacıdır. Bunu sağlamak ve antijenlerin immünojenliğini arttırmak için adjuvan eklemek gerekmektedir.

Adjuvanların aşı geliştirilmesindeki önemi;

- Toplam veya fonksiyonel antikor titresini arttırmak,
- Antijen dozunu azaltmak,

- Kesin immünizasyon için gerekli total aşı dozunu azaltmak,
- Genç veya yaşlı kişilerde immün yanıtı arttırmak,
- Aşı spesifik koruyucu cevabın hızını ve kalıcılığını arttırmak,
- Hücre aracılı immüniteyi arttırmak,
- Mukozal immüniteyi sağlamak,
- Çapraz koruma gibi daha geniş bir immün cevap sağlamak şeklindedir [277].

2.13.8.1 İnterlökin-12 (IL-12)

IL-12, makrofajlar, dendritik hücreler, B lenfositler ve diğer yardımcı hücreler tarafından üretilir ve hücre aracılı immünitenin gelişmesinde ve proliferasyon ve leishmaniasisin koruyucu immünitesinde önemli olan [374] T hücreleri ile doğal NK hücreleri tarafından [375, 376] INF- γ üretiminin uyarılmasında kritik bir komponentdir. Ayrıca bu sitokin, leishmaniasisin immünitesinde koruyucu olmaktadır [102, 376, 377, 378]. Deney hayvanlarında, baskın Th1 lenfosit yanıtı (IL-2, INF- γ) ile hastalığın kendi kendini sınırladığı; baskın Th2 cevabının ise hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [379]. IL-12'nin kullanılmasının en sınırlayıcı faktörü, yüksek maliyetli olması olabilir. IL-12 pahalı ve üretimi zor olmakla beraber insanda adjuvan olarak kullanılması tartışmalıdır [380]. Ayrıca daha önceleri sadece IL-12' nin KL hayvan modellerinde önleyici etkinliği gösterilmiştir. IL-12'nin uzun süreli immünite sağlamadığı belirlendiğinden beri yeni bir adjuvan geliştirilememiştir [277].

2.13.8.2 Granülüsit makrofaj-koloni stimulating faktör (GM-CSF)

Rekombinant GM-CSF; dendritik hücrelerin göçünü, olgunlaşmasını ve aktivasyonunu uyararak etki etmektedir [381]. Bu sitokin Th1 hücre cevabında baskındır [382]. Adjuvan olarak etkili dozunun 25-50 mg olduğu ve VL hastalarında kullanıldığında iyi tolere edildiği gösterilmiştir [383]. Bu sitokin ile aşılanan MKL hastalarının iyileşmesinin arttığı gösterilmiştir [382]. Lezyon bölgesine pentevalan antimoneller ile birlikte enjekte edildiğinde, GM-CSF iyileşme süresini azaltmıştır [384].

2.13.8.3 Bacille Calmette Guerin (BCG)

BCG, tüberkülozun etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* ile yakın ilişkili olan *Mycobacterium bovis*'in zayıflatılmış halidir. BCG, Th1 tip immün yanıtı uyarak etki eder ve insanda kullanımı için Th1 yanıtını uyaran en kabul edilebilir adjuvandır. BCG'nin aşılar da adjuvan olarak uygulaması bazı sorunlara neden olmaktadır. BCG'nin enflamatuvar artrit is ve otoimmün reaksiyonlar gibi yan etkileri ve komplikasyonları rapor edilmiştir [385, 386, 387]. Bu nedenle, BCG'nin bu etkileri güvenli bir aşı için dezavantajdır.

2.13.8.4 Montanide ISA 720

Montanide Incomplete Seppic adjuvanları, (Montanide ISA) metabolize edilmeyen mineral yağları, metabolize mineral yağları veya iki yağın karışımı ile kombine edilen farklı sürfaktanları içeren bir gruptur. (<http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/overview.htm>). Montanide ISA 720 alüminyum hidroksite alternatif adjuvan olarak insanda deneysel kullanımı onaylanmıştır [388]. İnsanda Th1 tipi hücresel ve humoral immün cevap için uyarıcı olduğu gösterilmiştir. Montanide ISA 720 ayrıca primatlarla yapılan aşılama çalışmalarında da iyi sonuçlar göstermiştir [389].

2.13.8.5 Alüminyum Tuzları

Alüminyum tuzlarına dayalı adjuvanlar genellikle Alum olarak isimlendirilirler ve alüminyum oksihidroksid, alüminyum hidroksifosfat veya alüminyum hidroksil sülfat gibi çeşitli tuzları içeren kristal olmayan jellerdir [390]. Adjuvanlar arasında insanda kullanımı onaylanmış olan alum göreceli olarak reaktif değildir [391]. Alüminyum fosfat ve alüminyum hidroksit (alum) insan aşılarında kullanılan en yaygın bileşiklerdir [392]. Alumun kullanılması 70 yıl önce Glenny ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır [393]. Glenny ve ark. Alum-çöktürülmüş difteri toksoidlerinin sıvı toksoidlerden çok daha immünojenik olduğunu keşfetmişlerdir. Alüminyum adjuvanları dokulardaki antijenlerin depo formunda olup immün hücrelere sunmak üzere antijen üretir ve belli komplement ve diğer immün arttırıcıları aktive eder. Bazı immün yanıtlarda, protein antijenleri alüminyum tuzlarla arttırılmış ancak bu tuzlar peptit ve polisakkarit antijenlerde düşük etkiye sahiptir. Alüminyum adjuvanlar birincil immünizasyon

serilerini arttırırken, antijen miktarını ve doz sayısını azaltır [394]. Alüminyum içeren aşılarda lokal reaksiyonlar, steril abseler, eritema, deri altı nodüller, granulomatoz enflamasyon ve aşırı duyarlılık gibi yan etkiler rapor edilmiştir [395].

2.13.8.6 Monofosforil Lipid A

Rekombinant leishmanial antijeninin squalen yağ adjuvanı içeren monofosforil lipit A ile kombine edilmesiyle kullanılmaktadır [345].

2.13.8.7 CPG Oligodeoksinükleotit (CpG ODN)

Metillenmemiş CpG dinükleotit motifleri bakteriyel genomda veya sentetik oligodeoksinükleotitlerde sunulmuş ve farede verilen antijene karşı hümmoral ve hüccresel cevabı uyararak güçlü immün uyarıcı etki sergilemiştir [396], [397]. İmmun uyarıcı CpG motiflerini içeren ODN'ler Th1 yanıtını, leishmaniasis'e karşı aşılama için istenen adjuvan aktivitesini uyarabilirler.

2.13.8.8 Lipozomlar

Lipozomlar, belli lipitler veya sulu ortamlarda kendiğinden oluşabilen mikropartikül veya kolloid taşıyıcılardır [398].

2.13.8.9 Glukan

Glukan ekmek mayasının β 1,3 poliglukoz türevidir [399].

2.13.8.10 *Corynebacterium parvum* (C. parvum)

Bakteriyel enfeksiyonlardaki mikroorganizmalar ve ölü bakterileri, bazı bakterilerin metabolik ürünleri ve bileşiklerini içeren aşıların verilmesinin antikor yanıtını uyardığı ve immün uyarıcı olarak görev aldığı bilinmektedir. Böyle mikroorganizmaların ve bileşiklerin aşıların içine eklenmesi immün yanıtı arttırır. Mikroorganizmaların tamamen veya belli parçaları kullanıldığı en genel yapılar *Bordetella pertussis* komponentleri, kolera toksini, *Mycobacteria* ve *Corynebacteria*'dır [400].

2.13.8.11 Saponinler (Quil-A, ISCOM and QS-21)

Saponinler, bitkilerden izole edilen triterpen glikozidlerdir [401]. Adjuvan araştırmalarında en fazla kullanılan saponin Quil-A ve onun türevleri olup Quillaja saponaria ağacının kabuğundan ekstrakte edilirler [402]. Quil-A, adjuvan aktivitesi ve toksisitesini değiştiren triterpen glikozidlerinin heterojen bir karışımıdır. Saponinler veteriner aşılarında adjuvan olarak geniş şekilde kullanılırlar. Özellikle Quil-A'nın saflaştırılmış fraksiyonları antijen, fosfolipit, kolesterol ve Quil-A fraksiyonlarından oluşan immü uyarıcı komplekslerde kullanılırlar [390]. ISCOM'lar, hemolitik aktiviteleri ve bazı lokal etkileri nedeniyle sadece veteriner aşılamada kullanılmaktadır [392].

2.13.8.12 Freund's Adjuvans

Tam ve tam olmayan olmak üzere 2 tür Freund's adjuvanı bulunmaktadır [392]. Freund's tam adjuvanı (FCA) metabolize olmayan yağlar, bir sürfaktan (Arlacel A) ve mikobakteri (*M. tuberculosis* or *M. butyricum*) karışımıdır. Bir hacim FCA ile bir hacim sulu antijen solüsyonunun kombine edilmesi ile hazırlanır. Emülsiyonda antijen geniş yüzey alanına yayılır ve ilişkili hücrelerle etkileşim potansiyelini arttırır [403]. Mikobakteri ve sürfaktan tarafından makrofajların immün spesifik olmayan potansiyelleri ve depo etkileri sayesinde FCA tarafından antikor üretimi arttırılır [404].

Sonuç olarak *Leishmania* aşı biliminde adjuvanların öneminin giderek daha da artacağı muhtemeldir. İlk nesil ölü aşılar göreceli olarak güvenli olmakla beraber, daha az inokülasyon ile daha uzun süreli korumayı sağlaması için uygun adjuvanların eklenmesi gerekmektedir. Verilecek aşı formülasyonun sečilmesi için önemli kriterler; antijenik komponentlerin doğası, istenen immün cevabın tipi, tercih edilen veriliş yolu, yan etkilerden kaçınma ve aşının stabilliğidir. Optimum formüle edilen adjuvanlar; güvenli, veriliş sonrası stabil, biyoyıkılımı ve eliminasyonu mümkün olmalı, antijen spesifik immün yanıtı uyarabilmeli ve üretimi pahalı olmamalıdır. HIV, leishmaniasis, malaria ve tüberkülozu içeren hücre içi enfeksiyonlar tarafından ortaya çıkan birçoğ hastalık için acil yeni aşılara ihtiyaç vardır. Bunlar oldukça karmaşık yaklaşımları gerektirmektedir. Bu hücre içi patojenler olan iyi adapte olmuş parazitler; immün cevaptan kaçmak için oldukça karmaşık mekanizmalara sahiptir. Leishmaniasis için geliştirilen aşılarda, immün yanıtın spesifikliği, tipi, yoğunluğu, süresi ve genetik çeşitliliği gibi

parametrelerini etkileyen adjuvanlara karar vermek gerekmektedir. Adjuvan çalışması farklı tip immün yanıtların ekspresyonunun kontrolünü sağlayan faktörlerin de çalışılmasıdır. Adjuvan araştırmalarında uygun bir antijenle kombine edildiği zaman erken, güçlü ve uzun süreli *Leishmania*-spesifik hücresel immün yanıtın elde edilmesi heyecan verici olacaktır [405].

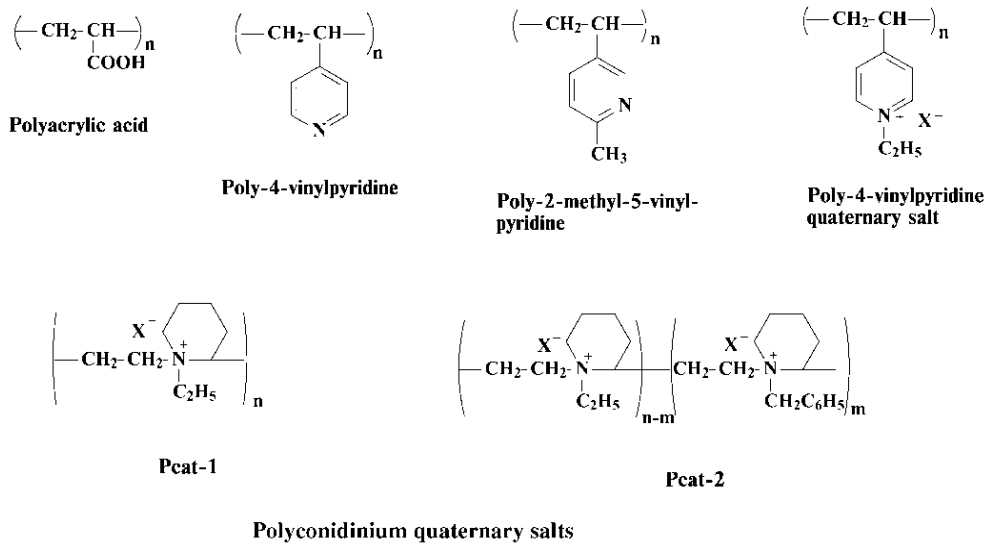
2.13.9 Adjuvan Özellikli Polimerler

Son yıllarda adjuvan özellikli polimerlerin aşı çalışmalarında oldukça önemli olduğu gösterilmiştir. Bunun nedeni polimere bağlanmış antijenlerden oluşan konjugatların immünojenliğinin, antijenlerin tek başına kullanılmasına göre daha yüksek olmasıdır.

Polimerlerden özellikle polielektrolit özelliği olanlar, tipik antijenler (protein, doğal mikrobiyal polisakkaritler ve onların sentetik analogları) ile karıştırıldıkları zaman, immün uyarıcı olarak görev yapmakta ve bağışıklık yanıtını birkaç kat güçlendirmektedir. Kendileri yeterince aktif olmayan bireysel bakteriyel veya viral antijenler, kimyasal sentetik polielektrolitlere bağlandığında güçlendirilmiş spesifik immün yanıtı uyarırlar [406].

Sentetik polimerlerden, poliakrilik asid (PAA) sulu ortamda polianyonlara ayrılmakta, poli-4-vinilprimidin (PVP) ise ilgili polikasyon formuna proton ekleyerek çözünmektedir. Bu polimerlerin kan içerisindeki sulu çözeltileri kemik iliğindeki kök hücrelerin (immün sistemin tüm fonksiyonel hücrelerinin öncül hücreleri) biçimlerini ve organizmadaki göç ve yayılımlarını fark edilir şekilde güçlendirmektedir [407]. Antijen olmayan PAA ve PVP, koyun eritrositleri ile beraber verildiğinde immün yanıtı (antikor formu hücrelerin üretimi, AFCs) birkaç kat arttırmış ve bu maddelerin immün uyarıcı olarak görev aldıkları ortaya çıkarılmıştır. PAA'nın adjuvan etkisi önceden Diamanstein ve ekibi tarafından PAA'yı belli başlı doğal polianyonlarla test edilerek *in vivo* olarak bulunmuştur [408]. Diğer çalışmacıların verilerin incelediğinde, PAA'nın ve PVP anyonlarının farklı kimyasal yapılarla monometrik forma sahip zincirlere sahip olduğu fark edilmiştir [407]. Yapıları farklı olsa da immün cevabı neredeyse eşit ölçüde uyarmaktadırlar. SPE alanının genişlemesi diğer birçok kimyasal yapının PAA ve PVP'ye

benzer şekilde immün uyarıcı olarak rol aldıklarını göstermiştir. Bunlardan bazılarının formülleri Şekil 2. 4’de görülmektedir.



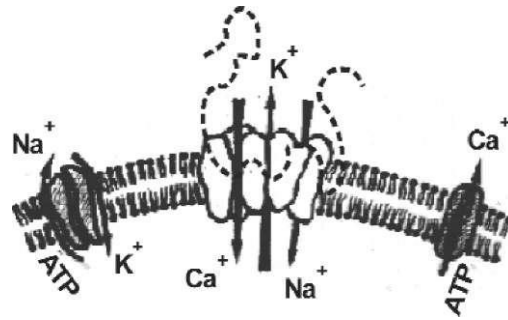
Şekil 2. 4 Adjuvan özellikli polimerler

Bu sonuçlar farklı SPE'lerin polimerik doğalarıyla ilgili genel bir mekanizmaya göre immün sistemi etkilediğini akla getirmiştir. Diğer taraftan immün uyarıcı olan bu SPE'lerin düşük molekül ağırlıklı analoglarının *in vivo* testlerde hiçbir aktivite göstermediği gösterilmiştir. Etki sadece yüksek dereceli polimerizasyon sağlandığında görülmektedir [409].

Organizmada antikor üretiminin doğal prosesini başlatmada çeşitli immün hücrelerin spesifik etkileşimlerine ihtiyaç duyulmaktadır [410, 411]. Bu işleve katılan esas hücreler T lenfositleri (yardımcı T hücreleri), antijen sunucu hücreler (ASH, makrofajlar onların çeşitli varyasyonlarından biridir) ve B lenfositlerdir (antikor üreten hücreler). Fakat B ve T hücrelerinin reseptörleri farklılık göstermektedirler. İlk reseptör şekil itibariyle komplemanter olduğu antijenik yapıyı kendiliğinden tanımlayabilmektedir. İkinci reseptör ise tanımlama için bir yardımcıya (rijit yapıya sahip bir peptid, çift tanımlama) ihtiyaç duymaktadır. Bu yapı, histokompatibilitenin ana kompleksinin kompozisyonunda bulunan immün cevap geninde (Ir-genleri) programlanmaktadır.

Yapılan *in vitro* çalışmalarda, izole B lenfositlerinin, SPE eklenmiş süspansiyonunun minör kısmı DNA sentezini ve hücre füzyonunu aktive ettiği ve antijen sunumunda, antijen bağımlı hücre farklılaşmasında, immün yanıt, immün sistemin diğer hücrelerinin

yardımı olmaksızın bir tüp içinde doğrudan başlatılmıştır [412]. Bu mekanizma SPE ile B lenfositlerinin davranışlarının fizikokimyasal ve biyokimyasal sonuçlarının çalışılmasıyla bulunmuştur. B lenfositlerinin süspansiyonuna PAA'nın sulu çözeltisinin eklenmesinin hücre dışı membranın iyon geçirgenliğini kesin bir şekilde arttırmasıyla açıklanabilir. Özellikle, potasyum iyonları hücrelerden, potasyum iyonu konsantrasyonu düşük olan çözeltiye hücum eder (Şekil 2. 5). Diğer çözünebilir SPE'ler de aynı şekilde rol oynamaktadırlar. Buna karşın, suda çözünebilir elektronötral polimerler hiçbir aktivite göstermezler. Çözeltideki kalsiyum iyon konsantrasyonu hücre içindekinden yüksek olduğunda hücre içine hücum ederler. Sonuç olarak, SPE'ler hücre membran içerisindeki nanopor oluşumunu indüklemekte ve konsantrasyon gradyentine göre iyonlar porlardan diffüze olmaktadır. Membranın uzunlamasına çatlaklarının elektronik mikrofotografı, SPE ve B hücrelerinin bir araya gelmelerinin membran proteinlerinin agregasyonu ile sonuçlandığını göstermektedir [412]. Sulu çözeltilerdeki lineer polielektrolitlerle bağ yapan protein globüllerinin agregasyonunun fenomeni iyi bilinmektedir ve sıklıkla çalışılmaktadır [413]. Bağlanma bölgeleri, her şeyden önce, SPE yüklenmesinin aksine yüklenen globül yüzeydeki iyon gruplarıdır. Ek olarak, poliyon ve proteinlerin kimyasal yapılarına bağlı olarak, bağlanma verici-alıcı veya hidrofobik etkileşimlere dayalı olarak gerçekleşmektedir. Bundan dolayı, hücre membranının dışında SPE tutunması ve membran proteinlerinin poliyonlar ile sulu çözeltilerde meydana gelen mekanizmalara benzer olarak 2 boyutlu küme formuna dönüştürecek şekilde etki etmesi doğal görünmektedir. Sonra boşluklar arası biriken protein globülleri muhtemelen por olarak işlev görmektedirler.



Şekil 2. 5 Hücre membranında bulunan ve iyon pompası olarak görev alan protein yapılar

Sulu çözeltide bulunan PAA'nın B-lenfositleri ile etkileşimi, hücreler tarafından ATP'nin harcanmasını keskin bir şekilde arttırmış ve bu inhibitör analizleri her iki çeşit ATPazın ek aktivasyon göstermesine neden olduğunu göstermiştir [414], [415]. Yani, potasyum iyonunun akımından dolayı hücrenin doğal durumunun bozulması ve kalsiyum iyonlarının girişi neticesiyle, moleküler pompaların değişimine neden olmaktadır. Ve bu diğer hücre içi sistemlerin çalışması için tetikleyici olarak görev yapmaktadır. B-lenfositleri farklılaşmaya ve bölünmeye, antijen tanımlama için reseptörler sentezlemeye başlamaktadır ve bu böylece komplementar antikorları üretmeye başlamaktadırlar.

İmmün hücrelerin tepkileri başlatması için gerekli siklaz enzimleri immün sistem aktifleşmesinin standart mekanizması boyunca bu işlemde aktive değildir.

İmmün hücreyle temasta, SPE bu hücreye bilinmeyen bir tetikleyici faktör olarak görev yapmaktadır ve bu etki immün yanıtın kuvvetinin genetik kontrolüne karşıdır. Aslında, T lenfositler yukarıda belirtilen *in vitro* sistemlerde bulunmayan Ir-genlerinin ekspresyonundan sorumludurlar. Bu sonuç T hücrelerinden yoksun fare kullanılarak yapılmış *in vivo* deneylerde elde edilen sonuçlara tamamiyle uygun gelmektedir. Normal fareler ise antijenlerin yönetimine yanıt vermemektedirler. Aynı zamanda, bu fareler içinde B lenfositleri, olgunlaştırılmaya ve farklılaştırılmaya hala potansiyel olarak sürdürülebilmektedir. Benzer antijenler SPE ile karışım halinde verildiğinde, B lenfositleri aktifleşmekte ve sonra dalakta normal bir farenin karakteristiğinde benzer immün güçte antikorlar üretmektedirler.

Böylece SPE'ler immün reaksiyonlarının geliştirilmesini *in vitro* ve *in vivo* olarak Ir genlerini dışında alternatif bir mekanizmayla uyarırlar.

2.13.9.1 İnsanlar İçin Polielektrolit İmmün Uyarıcılar

İmmün uyarıcı olarak SPE'lerin pratik uygulamaları oldukça önemlidir çünkü SPE'ler tek başlarına immünojenik değildir. Ek olarak, T hücreleri olmadan immün sistemin aktifleşmesiyle ilgili bulgular, mikroplara karşı oldukça zayıf korumaya sahip kişiler için immünyetmezliğin telafi edilmesini sağlamaktadır. Doğal olarak, asıl amaç insanda verimli bir şekilde kullanılabilecek, yan etki yaratmayacak SPE'lerin sentezlenmesidir.

SPE etkisi altındaki hücre aktivasyonunun moleküler mekanizması izole edilmiş B lenfositlerinin spesifik olmayan *in vitro* deneyler için kanıtlanmıştır. SPE'ler diğer membranlarla aynı davranışlarla farklı türdeki immün hücreleri aktive etmek için birbirlerini etkileyebilirler. İmmün uyarıcı polimerler için yüzey genişliği şüphesiz bir avantajdır.

Güçlü hedeflemeli immün yanıtı elde etmek için, SPE'lerin hedefe ulaşması sağlanmalı ve B lenfositlerinin üzerindeki reseptörlere seçici bağlanmalıdır. Gerekli antijen veya antijenik faktör polimerik zincire kimyasal olarak kolayca bağlanabilmelidir. Sonra, konjugat oluşursa, organizma içinde farklı hücreler arasında yol almalı, ilgili antijene tamamlayıcı reseptör bulunan hücreye tesadüfen ulaşmalıdır. Bu şekilde bu etken reseptöre bağlanabilir niteliğe kavuşmuş olur.

Antijen-SPE konjugatının serbest dolaşımının mümkünlüğü ve organizma içinde adres hücreyi arama yolu açıklanamamıştır. Uzun zincirli polimerlerin genellikle yüzeye geri dönüşümlü bağlandıkları bilinmektedir. Hücre membranı özellikle polikasyonlar gibi çoğu polielektrolit için iyi bir çözücü ortamdır. Bu yüzden, doğal olarak, B lenfositinin spesifik bir klonuna adreslenmiş konjugat diğer hücrelere bağlanmakta ve bu nedenle asıl hedefe ulaşamamaktadır.

Aynı zamanda, bu problem belirtildiğinde, konjugat tarafından gerekli hücreleri araştırmasının mekanizmasının var olduğunu dolaylı kaynaklardan tarafından bilinmektedir.

Antijen-SPE konjugatlarının immün koruyucu özelliğinin anlaşılması için SPE zincirlerine bağlı saflaştırılmış mikrobiyal proteinler kullanılmıştır. Salmonellosis incelenen ilk enfeksiyon olup yapılan çalışmada iki çeşit konjugat hazırlanıp farelerde incelenmiştir. Konjugat 1'de bakteriden izole edilen polisakkarit antijeni (PS) AA-VP kopolimerine bağlanırken konjugat 2'de PS ve flagellin proteini AA-VP kopolimerine birlikte bağlanmıştır. 14 ila 30 günlük bir dönemin ardından bu konjugatlar ile immünize edilen fareler bakterin ölümcül dozu ile enfekte edilmiştir. Kontrol grubundaki fareler ölürken, aşılanan gruptakiler iyileşme göstermiş ve %100 koruma sağlanması için konjugat 1'deki gruba, konjugat 2'deki gruba göre 10 kat yüksek doz gerekmiştir. Serbest

polisakkarit atijeni kabul edilebilir dozlarda yeterli bir koruma sağlayamamıştır. Böylece antijen-SPE konjugatının antibakteriyel aşı olarak etkisi gösterilmiştir.

Viral enfeksiyonlarda ise koruma sağlamanın bakteriyel enfeksiyonlara göre çok daha karmaşık olduğu bilinmektedir. Viral enfeksiyonlara karşı yapılan çalışmada ise influenza virus antijenini içeren AA-VP kopolimeri kullanılarak virusun ölümcül dozunda fareler hayatta kalabilmişlerdir [412].

Polioksidonyumun hemaglutinin ve nöraminidaz ile konjugatı, grip virüslerinin protein alt birimleri, Rusya'da başarılı bir şekilde de kullanılan Pasteurian olmayan ilk aşı olarak ortaya çıkmıştır (son 7 yıl için yaklaşık 50 milyon bağışıklı kişi). Böylece dünyada ilk kez olarak polimer-alt birimi ile insanda kullanılabilen aşının yapılabirliği gösterilmiştir [407].

Sonuç olarak SPE'ler ile immün cevabın uyarılmasının mekanizmasının yardımcı T hücrelerinin fonksiyonunun ayarlanması ile olduğu bulunmuştur. SPE'lerin membran aktivitesi ve immün uyarıcı özellikleri, tekrarlayan ünitelerinin farklı kimyasal yapılarına ve polimerizasyon derecesine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

Polimer bağlı subunit immünojen konjugatlarının ve aşılarda oluşturulmasının prensibi, immün uyarıcı SPE'lere antijenlerin eklenmesine ve deneysel olarak onaylanmasına dayanır. SPE'lere kovalent bağlı antijenlerin koruyucu özellikleri ve immünojenlikleri 10-100 kat artmaktadır. Bu da immünojenlerin ve aşılarda oluşturulmasında oldukça önemlidir. Grippol aşısı ile dünyada diğer tehlikeli enfeksiyonlara karşı yeni nesil aşılarda aşılarda geliştirilmesi için yeni bir yol açılmıştır.

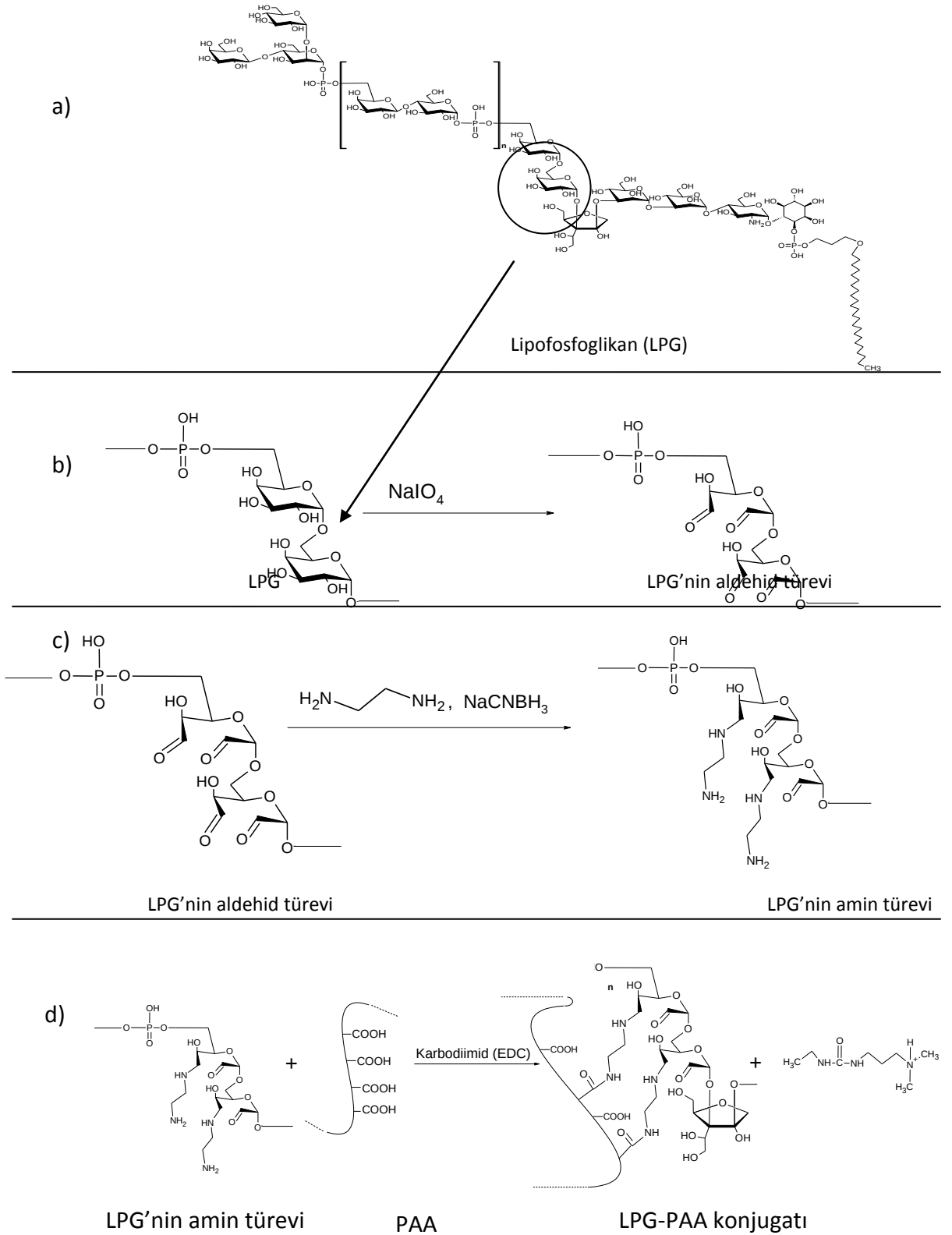
2.13.9.2 Poliakrilik Asit

Poliakrilik asit, akrilik asit monomerlerinden oluşan bir polimerdir. Akrilik asit oda sıcaklığında renksiz ve kokulu bir sıvıdır. Su, alkol, eter ve birçok organik çözücü ile çözünebilen bir maddedir. Akrilik asit ısıya, ışığa veya metallerle maruz bırakıldığında çok kolay polimerleşir. Akrilik asitin kimyasal yapısı $CH_2=CH-COOH$ 'dır. Molekül ağırlığı 72,0 g/mol, kaynama noktası 140,9°C, erime noktası 12,1°C, yoğunluğu ise 20°C'de 1,052 g/cm³tür [416].

Biyo-adeziv hidrojel olarak, hem mukozaya yapışan hem de viskozite artıran PAA jelleri, gözde merhemler gibi bulanıklık yapmadan rahat şekilde kullanılmaktadır [417]. Göz için yapılan ilaçların, göz içine iyi bir şekilde absorplanabilmeleri ve tedavide aktif rol oynayan maddelerin daha uzun süreli göz tabakasında bulunabilmeleri için PAA ile deneyler yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada PAA gibi ayrı ayrı kullanılan polimerler mukoz tabakayla bağ kurarak göz yüzeyinde çözünür, kolloidal ve partikül halde bulunan materyali yakalayabilmektedir [418].

Vajinal lezyonların tedavisi amacıyla poliakrilik asit, metilselüloz, karboksi metilselüloz, hidroksi propil selüloz ve hidroksipropil metil selüloz kullanılarak asiklovir içeren biyo-adeziv tabletler hazırlanmıştır. Biyo-adeziv polimer olarak poliakrilik asit ve hidroksipropil metil selüloz kullanılan tabletlerin laktik çözeltisi veya distile suda 6 saat boyunca şiştiği ve etkin madde salımının 8 saatten daha fazla olduğu görülmüştür. Poliakrilik asit, sodyum karboksimetil selüloz ve çinko sülfat içeren vajinal tabletler bu konuda önemli örneklerdir [419, 420, 421].

Yapılan bazı çalışmalarda poliakrilik asitin adjuvan özelliklerinin olduğu gösterilmiştir. Ancak literatür analizine göre leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde sentetik polielektrolitlere dayalı bir yaklaşım bulunmamaktadır. *Leishmania* promastigotlarının yüzey antijeni olan LPG moleküllerinin kimyasal yapılarının çeşitli polimerler ile konjugasyon oluşturma yetenekleri, LPG polimer konjugasyonunun leishmaniasise karşı aşı adayı olarak ümit verici olmasının nedenidir (Şekil 2. 6).



Şekil 2. 6 a) LPG molekülünün yapısı, b) LPG'nin NaIO₄ ile aldehid türevine yükseltgenmesi, c) LPG'nin etilen daimin ve sodyumsiyano borohidür ile aminlendirilmesi, d) LPG ve PAA'nın karbodiimid kullanılarak konjugasyonu

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Çözeltiler

3.1.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Deneyisel çalışmalarımızda aşağıdaki cihazlar kullanıldı.

- Laminar-Hava Akışlı Kabin (Heraeus, KS12)
- Soğutmalı Etüv (Friocell)
- CO₂ İnkübatörü (New Brunswick Innova CO-150)
- Ters mikroskop (Olympus, CKX 41)
- Magnetik Karıştırıcı (Heidolp MR 3001)
- pH Metre (Hanna, pH 211)
- Hassas Terazı (Precisa XR 305A)
- Hassas Terazı (Sartorius, CP 225D)
- Santrifüj (Thermo IEC, Micromase RF)
- Santrifüj (Sigma, Benctop 1-15)
- Soğutmalı Santrifüj (Ependorf, 5810R)
- Vorteks (Heidolp Reax top)
- Bidistile Su Cihazı (GFL, 2104)
- Buzdolabı No-Frost (Arçelik, 5007 NF)
- -40°C Derin Dondurucu (GFL, 6341)
- Sıvı Azot Tankı (Air liquide, ARPEGE S5)
- Otoklav (Hirayama, Hiclave HVE-50)

- ELISA Okuyucu (ThermoLabsystem, Multiscan Ascent)
- ELISA Yıkayıcı (ThermoLabsystem, Wellwash 4Mk 2)
- Isıtıcıli Manyetik Karıştırıcı (Heidolp MR 3001)
- Sonikatör (Bondelin, Sonopuls)
- Su Banyosu (GFL, 2104)
- Su Saflaştırma Sistemi (Millipore MilliQ Elix 5)
- Rotary Evaporatör ve Vakum Hattı (Büchi Rotavapor, R-200)
- Liyafilizatör (Telstar, Cryodos)
- Trioküler Fluoresan ve Yansıma-Kontrast Mikroskobu (Leica, DMR HC)
- Flow Sitometri (Beckman Coulter, Cell Lab Quanta)
- UV/VIS Spektrofotometre (Jasco V-530)
- Fraksiyon Toplayıcı (Bio-rad, 2110)
- GPC (Viscotek)
- Vakumlu Kurutucu (MMM, Medcenter Vacucell, 111)

3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

Çizelge 3. 1 Deneylerde kullanılan maddeler

MADDE ADI	ÜRETİCİ FİRMA	KATALOG NO
Hidroklorik asit	Merck	100314
Gliserin	Sigma	G2289
Giemsa Çözeltisi	Merck	109204
Etanol	Riedel De Haen	32221
Sodyum hidroksit	Riedel De Haen	62303
Hidroklorik asit	Merck	100314
DMEM-F12	Sigma	D5546
RPMI 1640 with L glutamin	Biochrom AG	F1215
L-glutamin	Biological Industries	03-020-IC
Penisilin Streptomisin	Biochrom AG	A2213
Gentamisin	Sigma	G1397
Fetal bovin serumu	Biochrom AG	S0113
Tripsin EDTA	Biological Industries	03-051-5B
DMSO	Applichem	A7248
Tripsin	Biochrom	L2103
EDTA	Applichem	A5097
Thiazoly blue tetrazolium bromide (MTT)	Sigma	M5655-1G
Formaldehit (%37)	Applichem	A0877
2-propanol	Applichem	A03928
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck	S95310-811

Çizelge 3. 1 Deneylerde kullanılan maddeler (devam)

Poliakrilik Asit (MA:100,000 Da)	Aldrich	523925
Formalin Çözeltisi	Sigma	P4557
İmmersiyon Yağı	Sigma-Aldrich	56822
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	4243
Kloroform	Carlo Erba	438603
Metanol	Merck	106009
MgCl ₂	Merck	105833
Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich	13423
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Merck	106329
NaCl	Sigma-Aldrich	13423
NaHCO ₃	Merck	106329
NaN ₃	Merck	106688
Parafin	J.T.Baker	3925
PNFF	Sigma-Aldrich	N4645
KCl ₂	Riedel De Haen	12636
Schneider Insect Medium	Sigma	S0146
NaOH	Riedel De Haen	62303
Süt tozu	Fluka	70166
Tris Base	Applchem	A2264
Tween 20	MP	194841
ZnCl ₂	Merck	108815
Anti-Mouse IgM–FITC	Sigma-Aldrich	F9259
Anti-Mouse IgG (H+L)-Alkalın Fosfataz	Millipore	AP160A
Anti-Mouse Polyvalen Ig (IgG, IgM, AgA)	Sigma	A0162
Brain Heart Infusion	BioLab	BHI20500
Annexin V FITC	Invitrogen	IM3546
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	Invitrogen	A07704
Freund's Adjuvan	Sigma-Aldrich	F5881
Mouse IFN-γ	R&D Systems, Inc.	DY485

Çizelge 3. 1 Deneylerde kullanılan maddeler (devam)

Mouse IL-2	R&D Systems, Inc.	DY402
Mouse IL-4	R&D Systems, Inc.	DY404
Mouse IL-10	R&D Systems, Inc.	DY417

3.1.3 Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.3.1 1x PBS Tampon Hazırlanması

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 gr Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ tartılıp 900 mL deiyonize suda çözdürüldü. pH 7,4'e ayarlandı ve son hacim deiyonize suyla 1 lt'ye tamamlandı. 1 atm basınç ve 121°C sıcaklığa ayarlanmış otoklavda cam şişeler içerisinde 20 dakika steril edildi.

3.1.3.2 1x Tripsin solusyonu

Tripsin 62,5 mg tartıldı. Steril edilmiş 50 mL'lik 1xPBS içinde çözüldürüldü. Önce 0,45 µm'lik sonra 0,22 µm'lik filtreden süzülerek steril edildi.

3.1.3.3 DMEM-F12 Besiyerinin Hazırlanması

500 mL DMEM-F12 besiyeri içersine 5 mL 200 mM L-glutamin, 2,5 mL penisilin-streptomisin ilave edilerek stok besiyeri hazırlandı. Hücre pasajında kullanılmak üzere %10 FBS içeren besiyeri için 45 mL stoktan alınıp 5 mL FBS eklendi, tüm besiyerleri +4°C'de saklandı.

3.1.3.4 RPMI-1640 Besiyerinin Hazırlanması

100 mL RPMI-1640 (L-glutamin içeren) içerisine 0,5 mL gentamisin (10 mg/mL'lik) eklenerek stok hazırlandı. Kültürde kullanılmak üzere buradan 45 mL alınıp 5 mL FBS eklendi.

3.1.3.5 Hücre Dondurma Çözeltilisinin Hazırlanması

%80 FBS ve %20 DMSO'nun karıştırılması ile steril bir biçimde hazırlandı.

3.1.3.6 Beyin Kalp İnfüzyon Besiyerinin Hazırlanması

Toz halinde bulunan beyin kalp infüzyon besiyerinden 1 L besiyeri hazırlamak amacı ile toz haldeki besiyerinden 37 g tartıldı ve üzerine distile su ilave edildi. Isıtmalı manyetik karıştırıcıda 100°C sıcaklıkta 1000 rpm'de karıştırılarak homojen hale getirildi ve 15 dakika 121°C'de otoklavda sterilizasyonu yapıldı.

Diğer taraftan besiyeri katkı maddesi olan hemin ve adenozin stok çözeltileri hazırlandı. Hemin 25 mg tartılarak, 500 µL 1,0 N NaOH içinde çözüldü ve distile su ile 50 mL'ye tamamlanıp otoklavlandı. Adenozin ise 0,1 g tartılarak 37,5 mL distile suda çözüldü ve filtre edilerek steril edildi. Kültürde kullanılmadan önce 1 L beyin kalp infüzyonu için 10 mL adenozin ve 10 mL hemin ilave edildi.

3.1.3.7 Coomassie Brilliant Blue Reaktifinin Hazırlanması

0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etil alkol, 100 mL %85 fosforik asit ve distile su bir beherde karıştırılıp 1000 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Son olarak saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Karanlıkta 1 gece karıştırılarak bekletildi ve filtre kağıdından süzüldü.

3.1.3.8 MTT Solüsyonunun Hazırlanması

MTT (Sigma M5655) 1 x PBS içerisinde çözüldürüldü. Kullanılacak MTT prosedürüne uygun olarak 0,6 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda 5 mL hazırlandı. Önce hassas terazide 0,6 mg/mL için 3 mg, 10 mg/mL için 50 mg MTT tartılıp PBS ile 5 mL'ye tamamlandı. Vortekste çalkalanarak iyice çözüldükten sonra steril edilmek üzere önce

0,45 µm daha sonra 0,22 µm'lik (CS) filtreden geçirilerek steril edildi. MTT ışığa duyarlı olduğu için, bu işlemler karanlık ortamda yapıldı.

3.1.3.9 50 mg/mL ve 0,5 mg/mL PAA (MA: 100,000 Da) Çözeltisinin Hazırlanması

Deneylerde MA:100.000 Da olan ve ticari olarak satın alınan %35 g/mL sıvı PAA kullanıldı. PAA %35'lik olduğu için 100 mL'de 35 g PAA bulunur. 50 mg'dan 5 mL hazırlamak için 2500 mg PAA gereklidir. Aşağıdaki formül ile doğru orantı kurarak hesaplamalar elde edildi.

100 mL'de 35 g varsa

$$\frac{X}{2500 \text{ mg}}$$

$$X=7,142 \text{ mL PAA}$$

35 mL PBS eklendi 48–72 saat manyetik karıştırıcıda karışması beklendi. pH 7'ye ayarlandı. Son hacim 50 mL olacak şekilde PBS ile tamamlandı, 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril edildi ve 4°C'de saklandı. Steril edilmiş 50 mg/mL hazırlanan PAA çözeltisinden 0,5 mL alınıp, steril PBS ile 50 mL'ye tamamlanarak 0,5 mg/mL konsantrasyonu hazırlandı.

3.1.3.10 Sitokin Çözeltilerinin Hazırlanması

PBS - 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2 - 7.4, 0.2 µm filtreden geçirildi.

Yıkama Tamponu – PBS'de %0.05 Tween-20, pH 7.2 - 7.4 hazırlandı.

Bloklama tamponu - PBS'de %1 BSA ve %0.05 NaN₃ hazırlandı.

Reaksiyon Çözeltisi - 20 mM Trizma base, 150 mM NaCl içerisinde hazırlanan %0.1 BSA, %0.05 Tween 20, pH 7.2 - 7.4, 0.2 µm filtreden geçirildi..

Reagent Diluent2 - PBS'de hazırlanan % 1 BSA, pH 7.2 - 7.4, 0.2 µm filtreden geçirildi.

Substrate Çözeltisi - 1:1 oranında H₂O₂ ve Tetrametilbenzidin karıştırıldı.

Durdurucu Çözelti- 2N H₂SO₄ hazırlandı

3.1.3.11 Bağlama Tamponu Hazırlanması

10 mM HEPES (pH:7,4), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ ve 1,8 mM CaCl₂ içerecek şekilde hazırlandı.

3.2 Hücre Kültür Çalışmaları

3.2.1 *L. donovani* Promastigot Formlarının *in vitro* Devamlı Kültürünün Yapılması

L. donovani parazitlerinin kültürü 27°C soğutmalı etüvde yapıldı. Parazitlerin gelişimi ve morfolojik durumu ters mikroskopta günlük olarak incelendi. Kültür haftada bir kez pasajlandı. Pasaj öncesi kültürden örnek alındı, ortamın pH'ı, parazitlerin morfolojileri, hareketlilikleri incelendi ve sayımları yapıldı. Kültür flaskı içine 7,5 mL besiyeri eklendi ve üzerine 3x10⁵ parazit/mL olacak şekilde kültürden parazit ekimi yapıldı.

3.2.1.1 Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı

Kültür ortamındaki promastigotlar hareketli oldukları için öncelikle fikse etmek gerekmektedir. Bu nedenle homojenliği sağlanmış kültürden 100 µL alındı ve 1:1 oranında %2'lik formalinle karıştırılarak 5–10 dakika bekletildi. Daha sonra Thoma lamında aşağıdaki formül kullanılarak sayım yapıldı:

1 mL'deki Parazit sayısı = Ortalama hücre sayısı* x Sulandırma katsayısı** x Thoma lamı*** sabiti

*Ortalama hücre sayısı: Thoma laminın alt ve üst kısmında bulunan 16 karedeki hücrelerin aritmetik ortalaması

**Sulandırma katsayısı: Sayım için yapılan sulandırma katsayısı

***Thoma lamı sabiti: 10.000

3.2.1.2 Kültürün ve Kullanılan Besiyerlerinin Sterillik Kontrolü

Her bir pasaj esnasında kültür ve besiyerleri kontaminasyon ve pH açısından incelendi. Sterillliği tayin edilecek besiyeri veya kültür ortamından alınmış örnekler kanlı agara, sabouraud agara ve %10 FBS içeren sıvı besiyerlerine inoküle edildi ve 37°C'de inkübe edilerek kontrolleri yapıldı. Ayrıca kültürden örnekler alınarak yayma hazırlandı ve Giemsa boyama ile incelendi.

3.2.1.3 *Leishmania* Promastigotlarının Büyümesini Destekleyen Farklı Kültür Koşullarının İncelenmesi

MCF-7 hücre metabolitlerinin alınması

MCF-7 hücre kültürünün 3. gününde %10 FBS içeren ve içermeyen kültürdeki hücrelerin pasajı esnasında (tripsin/EDTA uygulanmadan önce) flasklardaki süpernatant steril şekilde alındı. Hücrelerin 3 gün boyunca ürettikleri metabolitlerini ve kullandıkları besiyerini içeren bu süpernatant deneylerde kullanılmak üzere pH'ı kontrol edilerek, 4°C'de bekletildi.

MCF-7 hücre metabolitlerinin *Leishmania* promastigotlarının gelişimine etkisi

Birinci grup deneylerde, *Leishmania* promastigot kültürü, %25, %50 ve %100 oranında MCF-7 hücre metaboliti içerisinde yapıldı. Metabolitlerin %25 ve %50'lik dilusyonları FBS bulunmayan DMEM/F12 besiyeri ile sağlandı.

İkinci grup deneylerde ise FBS içeren ve içermeyen ortamlarda elde edilen MCF-7 metabolitlerinin parazitlerin gelişimine olan etkisi incelendi. Kontrol grubu olarak *Leishmania* promastigotlarının kültürü DMEM/F12 (%10 FBS) ve DMEM/F12 (FBS bulunmayan) besiyerinde yapıldı.

3.2.2 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (MCF-7)

İnsan adenokarsinomu kaynaklı meme kanser hücre serisi olup, 5 yıllık bir sürede iki göğsü alınan 69 yaşında Kafkasya'lı bir kadından 1970'te izole edilmiş ve günümüzde kültür çalışmalarında standart bir hat olarak kullanılmaktadır. Hastanın göğüs duvarından nodüllerin kaldırılmasından sonra plevral sızıntı tespit edilmiştir ve MCF-7 hücre serisi, bu plevral sızıntısından izole edilerek, kültürü yapılmıştır [422].

3.2.2.1 MCF-7 Hücre Serisinin Kültür ve Kriyoprezervasyonunun Yapılması

Kültürü yapılmak üzere sıvı nitrojen tankından çıkarılan MCF-7 hücre hattı (Prof. Dr. Nedret ALTIOK tarafından temin edilmiştir) 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda hızlıca çözöldükten sonra, içinde 5 mL %10 FBS'li DMEM/F12 besiyeri bulunan santrifüj tüpleri içine alınarak, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı

ve pellet 7,5 mL %10 FBS'li DMEM/F12 ile süspanse edilip 25 cm²'lik flaska aktarıldı. Flask, kapağı hafifçe gevşetilerek 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre (Innova CO-170) konuldu. Kültürün 48. saatinde flaskın içindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve 7,5 mL taze hazırlanmış %10 FBS'li DMEM/F12 eklendi. Aynı işlem kültürün 7. gününde de tekrar edildi. Kültürün 9. gününde ters mikroskop altında gözlenen hücrelerin yüzeyi tamamen kapladığı görüldü.

Tek tabaka hücre ile kaplanmış olan flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. EDTA'lı tripsinden 1 mL flaska eklendi. Flask, 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre bırakıldı ve 5-10 dakika enzimin aktivasyonu için beklendi. Kapakları tekrar kapatılarak inkübatörden alınan flask, ters mikroskop ile gözlemlendi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı görüldü ve flaska hafifçe vurularak mekanik etki ile hücrelerin tamamen flaskın yüzeyinden ayrılması sağlandı. Ters mikroskop altında hücrelerin tamamen ayrıldığı gözlemlendikten sonra flask içine 5 mL %10 FBS içeren DMEM/F12 eklenerek hücre süspansiyonunun tamamı, 15 mL'lik santrifüj tüpüne alındı ve 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi.

Total hücre sayısının hesaplanmasının ardından steril 25 cm²'lik flask içine %10 FBS içeren DMEM/F12 besiyeri eklendi. Santrifüj tüpünün içindeki süspanse edilmiş hücrelerden 1-2×10⁵ hücre/mL olacak şekilde otomatik mikropipet ile çekilerek taze besiyeri içeren flaska eklendi. Ağzı sıkıca kapatılarak ters mikroskop altında incelendi ve %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüve kapakları hafifçe gevşetilerek konuldu. Hücrelerin flaskın yüzeyine tutunmaları ve çoğalmaları hergün ters mikroskop altında izlendi. Hücreler ayrıca kriyoprezerve edilerek ileri kullanımlar için sıvı nitrojen tankında saklandı. Kriyoprezervasyonda kısaca hücre süspansiyonu dondurma çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılarak 2 mL'lik kriyo tüplere konuldu. Buzdolabında +4°C'de bir saat bekletildikten sonra -20°C'de 2 saat, ardından -40°C'de 1 gece bekletip sıvı nitrojen tankına konuldu.

3.2.3 Fare Fibroblast Hücre Hattı (L929)

100 günlük C3H/An erkek farenin bağ dokusunun normal subkutanöz ve yağ dokusundan elde edilmiştir. 1940 yılında W.R. Earle tarafından oluşturulan esas L

serisinin alt klonudur ve morfolojik yapısı fibroblast benzeridir. Tek tabakalı olarak büyür [423].

3.2.3.1 L929 Kültürünün Kültür ve Kriyoprezervasyonunun Yapılması

Kültürü yapılmak üzere sıvı nitrojen tankından çıkarılan L929 hücreleri (Prof. Dr. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN tarafından temin edilmiştir) 37°C' ye ayarlanmış su banyosunda hızlıca çözöldükten sonra içinde 5 mL %10 FBS' li DMEM/F12 besiyeri bulunan santrifüj tüpleri içine alınarak, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti 7,5 mL %10 FBS'li DMEM/F12 ile süspanse edilip 25 cm²'lik flaska aktarıldı. Flask, kapağı hafifçe gevşetilerek 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu.

Kültürde flaskın yüzeyini yeteri kadar kaplamış olan L929 hücreleri üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. PBS ile seyreltilmiş 1X konsantrasyondaki tripsinden 1,5 mL flaska eklendi. Flask, tripsinin aktivitesini göstermesi için kapağı hafif gevşetilerek 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre bırakıldı ve 5–10 dakika beklendi. Flaskın yüzeyinden tamamen ayrılan hücrelere 5 mL %10 FBS' li DMEM-F12 eklendi ve 15 mL'lik santrifüj tüpüne alındı. Oda sıcaklığında 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi.

Pelletteki total hücre sayısının hesaplanmasının ardından steril 25 cm²'lik flask içine taze hazırlanmış %10 FBS içeren DMEM/F12 besiyeri eklendi. Santrifüj tüpünün içindeki süspanse edilmiş hücrelerden 1-2x10⁵ hücre/mL olacak şekilde otomatik mikropipet ile çekildi ve taze besiyeri içeren flaska eklendi ve %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edildi.

Tripsinizasyon sonrası santrifüj tüpünün dibinde kalan hücrelerden sayım yapıldıktan sonra kültürden geriye kalan hücre pelleti, kriyobank oluşturmak üzere sıvı nitrojen tankına konulmadan önce dondurma çözeltisiyle 1:1 oranında yavaşça karıştırılarak 2 mL'lik kriyo tüpüne aktarıldı. Buzdolabında +4°C'de bir saat bekletildikten sonra -20°C'de 2 saat ardından -40°C'de bir gece bekletip sıvı nitrojen tankına konuldu.

3.2.4 Fare Makrofaj Hücre Hattı (J774)

J774 fare makrofaj hücre hattı dişi bir BALB/c farede ortaya çıkan tümörden elde edilmiştir. Bu hücre hattı yüksek miktarda lizozim sentezler ve çok az sitoliz görülür.

Fakat genellikle antikor bağımlı fagositoz meydana gelir. J774 hücreleri, çok düşük konsantrasyonlarında bakteriyel lipopolisakkarit (10 ng/mL) ile aktive olduğu zaman nitrik oksit sentaz enzimi yüksek seviyede aktive olduğu için büyük miktarlarda nitrik oksit üretir. IFN- γ , J774 hücrelerinde IL-12'nin sentezlenmesini indükler. J774 hücre hattı hücre kültür ortamlarına sürekli olarak IL-1 salgılar [424].

3.2.4.1 J774 Hücre Serisinin Kültür ve Kriyoprezervasyonunun Yapılması

J774 hücreleri (Prof. Dr. Ayhan BİLİR tarafından temin edilmiştir) kültürü yapılmak üzere sıvı nitrojen tankından çıkarıldıktan sonra 37°C' ye ayarlanmış su banyosunda hızlıca çözöldürölüp 5 mL %10 FBS' li RPMI-1640 besiyeri bulunan santrifüj tüpleri içine alınarak, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti 5 mL %10 FBS' li RPMI-1640 ile süspanse edilip 25 cm²'lik flaska aktarıldı. Flask, 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu ve yüzey kaplamasını tamamladığı tespit edilen makrofajlar tripsinizasyon ile kaldırıldı.

Tripsinizasyonla yüzeyden tamamen ayrılan hücrelere 5 mL %10 FBS' li RPMI-1640 eklenerek, 15 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Tüpün dibinde kalan hücre pelletinde total hücre sayısının hesaplanmasının ardından, 1-2x10⁵ hücre %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyeri bulunan 25 cm²'lik flask içine eklendi.

Geriye kalan hücre pelleti dondurma çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılarak 2 mL'lik kriyo tüplere konuldu. Buzdolabında +4°C'de bir saat bekletildikten sonra -20°C'de 2 saat, ardından -40°C'de 1 gece bekletilip sıvı nitrojen tankına konuldu.

3.2.5 L. donovani Parazitlerinin Amastigot Formlarının *in vitro* Kültürünün Yapılması

Promastigot kültüründen farklı olarak amastigot kültürünü elde etmek için mutlaka konak hücreye ihtiyaç vardır. Bu amaçla kullanılan makrofaj kültürünü promastigot ile enfekte etmek için 24 kuyucuklu kültür plağı kullanıldı. Steril 12 mm çapındaki yuvarlak lameller tek tek kuyucuklara yerleştirildi. Lamel yerleştirilen kuyucuklara 25x10⁴ J774 hücresi eklendi ve 1 gün 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyonu sağlandı. Daha sonra hücre:parazit oranı 1:10 olacak şekilde logaritmik fazdaki *L. donovani*

promastigotlarından 25×10^5 parazit makrofajların bulunduğu kuyucuklara inoküle edildi. Hazırladığımız plate %5 CO₂ içeren etüvde 37°C'de 2 saat süreyle inkübe edilerek makrofajların enfekte olması sağlandı. Daha sonra fagosite edilmeyen ekstrasellüler promastigotları uzaklaştırmak için 1 mL PBS ile üçer kez yıkandı ve yeni hazırlanmış kültür besiyerinden 1 mL ilave edildi. Giemsa boyama yöntemi ile boyanması enfeksiyon indeksi hesaplandı. Giemsa boyamada kısaca, önce lameller steril kabinde kurutulduktan sonra metanol içinde 5 dakika bekletilerek enfekte makrofajların fiksasyonu sağlandı. Daha sonra lameller metanolden çıkarılıp kurutuldu. Enfekte makrofajların bulunduğu lamel, Giemsa boya içinde 37°C 10-15 dakika bekletildikten sonra distile su ile yıkandı. Giemsa ile boyanmış olan enfekte makrofajlar ışık mikroskopunda x100 büyütmede immersiyon yağı ile gözlendi.

3.2.5.1 Enfektifliğin Hesaplanması

Giemsa boyama ile elde edilen yaymalarda en az 200 makrofaj sayılarak, bunların içinden kaç tanesinin enfekte olduğu mikroskopik olarak belirlendi (yüzde enfektiflik). Daha sonra makrofaj başına düşen ortalama amastigot sayısı hesaplandı. Son olarak enfeksiyon indeksini (infection index) belirlemek için yüzde enfektiflik sayısı ile makrofaj başına düşen ortalama amastigot sayısı çarpımları alındı [1].

$$\%EI = 100 - \left(\frac{\text{İmmunize Farelerin Enfeksiyon İndeksi}}{\text{Kontrol Grubunun Enfeksiyon İndeksi}} \times 100 \right)$$

3.3 *Leishmania* Parazitlerinden Lipofosfoglikanın İzole Edilmesi

3.3.1 *L. donovani* Parazitlerinin Büyük Ölçekli Kültürünün Yapılması

Büyük ölçekli kültürün yapılmasında ekonomik olması amacıyla beyin kalp infüzyon besiyeri kullanıldı. *L. donovani* promastigotları 25 cm²'lik flaskta beyin kalp infüzyon besiyerine adapte edildikten sonra büyük ölçekli kültür için kullanıldı.



Şekil 3. 1 Büyük ölçekli flasklarda kültürün yapılması

Büyük ölçekli kültür için Şekil 3.1'de görülen kültür kapları kullanılarak 25 cm²'lik flaskta (A) 10⁶ parazit/mL olacak şekilde ekim yapıp 10⁷ parazit/mL'ye ulaştığında 75 cm²'lik flaskta (B) aktarıldı. Parazit sayısı tekrar mL'de 10⁷'ye ulaştığında 150 cm²'lik flasklara eklendi.



Şekil 3. 2 Kültürün (A) 25 cm²'lik (B) 75 cm²'lik ve (C) 150 cm²'lik flasklarda yapılması

Böylece ekilen parazit sayısı sabit tutularak farklı ölçekte kültürün yapılması sırasında başlangıçta 25 cm²'lik flaskta 5 mL'de 5x10⁶ parazit bulunurken 2. aşamada 75 cm²'lik flaskta 50 mL'de 5x10⁸ parazit, 3. aşamada ise toplamda 500 mL besiyerinde 5x10⁹ parazit sayısına ulaşıldı (Şekil 3. 2).

3.3.2 Santrifüj ile Parazit Biyomasının Elde Edilmesi

Parazitler kültür ortamında maksimum yoğunluğa ulaşp, durağan faza geçtiklerinde izolasyona başlandı. Kültürde sıvı besiyeri ortamındaki parazitler 50 mL'lik steril konik falkon tüplerine ayrılarak 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi.

Santrifüjden sonra süpernatantlar uzaklaştırıldı ve her bir tüpteki pelletler 3 mL PBS ile resüspanse edildi. Tüm tüplerin içerisindeki pelletler toplanarak 15 mL'lik steril tüplere aktarıldı ve 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve LPG izolasyonu yapılacak parazit kütlesi elde edildi.

3.3.3 Sonikatör ile Biyomasın Parçalanması

Sonikasyon, titreşimle ve yüksek ses dalgalarıyla hücre bütünlüğünün bozulması prensibine dayanan bir yöntemdir. Ultrasonikatörler, elektrik enerjisini kesikli karakterde mekanik enerjiye çevirerek, titanyumdan yapılmış bir sonda yardımıyla ultrases dalgalarını solüsyon içindeki materyale iletir. Bu tür parçalama işlemleri sırasında açığa çıkan ısıyı yok etmek için uygun soğutmanın yapılması gerekmektedir [425].

Pellet halinde elde ettiğimiz *L. donovani* parazitlerinin hücre bütünlüğünü bozmak amacı ile sonikasyon yapılmıştır. Bu amaçla pellet halinde elde edilen parazitlerin üzerine; pellet hacminin 3,75 katı kadar kloroform/methanol (1:2) solüsyonu ilave edildikten sonra vorteks ile süspanse edildi. Elde edilen süspansiyon sonikatörde 30 devir/sn' de 3 dakika parçalandı. Sonikasyonu yapılan pellet oda sıcaklığında 1 saat bekletildi ve 10.000 rpm'de 15 dakika santifüj edildi.

3.3.4 Propanol Ekstraksiyonu

Sonikatörle parçalanmış her bir pelletin üzerine 8 mL %9'luk 1-propanol solüsyonundan eklendi. Pellet bu solüsyonun içinde tekrar süspanse edildi ve sonikatörde 30 devir/sn' de 3 dakika parçalandı. Sonikasyonun ardından 1 saat oda sıcaklığında bekletildi ve süspansiyon 14.000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. LPG içeren süpernatant cam erlen mayer içine alındı ve dipte kalan pellette bulunan LPG'yi en verimli şekilde elde etmek için, propanol ekstraksiyonu 3 kere tekrarlandı. Her defasında erlen mayerde

biriktirilen süpernatantlar beher içerisinde vakumlu kurutucuya yerleştirildi. Elde edilen ekstrakt, 1-propanol uzaklaşmaya kadar (yaklaşık 1 gece) vakumlu kurutucuda bekletildi.

3.3.5 Elde Edilen Ekstraktların Liyofilize Edilmesi

Liyofilizasyon yönteminin prensibi ürünün dondurulması ve daha sonra düşük neme sahip bir atmosfere maruz bırakılarak üründe oluşturulan buz kristallerinin süblimasyonuna dayanır ve biyolojik kaynaklı ürün değişikliğe uğramadan kurutularak korunur. Elde edilen ürün kullanılmaya kadar oda sıcaklığında aylarca saklanabilir ve liyofilize ürün uygun bir çözücü ile tekrar çözelti haline getirilebilir.

Çalışmamızda propanol ekstraksiyonundan sonra evaporatörde alkolü uzaklaştırılıp yoğunlaştırılan izolat, -40°C'de dondurulup, liyofilizasyon cihazına yerleştirildi. Bir gün boyunca liyofilize olan örnek kolon kromatografisi yapılmaya kadar -20°C'de saklandı.

3.3.6 Lipofosfoglikan'ın Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması

Kromatografi; kimyasal maddelerin farklı adsorblanma özelliğine dayanan analiz yöntemi olarak tanımlanabilir. Sabit bir faz üzerinde hareketli bir faz kullanılarak elde edilen karışımın bileşenlerini ayırlama yöntemidir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi; protein, lipoprotein ve glikolipid moleküllerinin hidrofobik grupları ile durgun faz arasındaki hidrofobik çekime dayanır. Bu yöntemde kullanılan durgun faz (kolon dolgu maddesi), bütül, oktil ya da fenil gibi küçük non-polar grupların, çapraz bağlı dekstran ya da agaroz gibi hidrofilik polimer omurgasına bağlanmasıyla oluşur. Yapılan çalışmalara uygun olarak LPG'nin saflaştırılmasında oktil-sefaroze (%4 agaroz ve non-polar grup olarak oktil) dolgu maddesi kullanıldı. Ayrımı yapılacak molekül yüksek tuz konsantrasyonu içeren tampon içinde kolona yüklendi. Daha sonra hidrofobik etkileşimle oktil gruplarına bağlı olan moleküller ya tampondaki tuz değişimi azaltılarak ya da polar olmayan organik solventler kullanılarak kolondan uzaklaştırıldı.

3.3.6.1 Oktil-Sefaroz Kolonun Paketlenmesi ve Dengelenmesi:

LPG'nin saflaştırılması için 10 cm × 1 cm olan kolonun (BIO-RAD) %80'ini dolduracak kadar, yaklaşık 7 mL oktil sefaroz dolgu maddesi döküldü. Kolonda hava kabarcığı olması istenmediği için oktil sefaroz kolona döküldükten sonra, cam baget yardımıyla kolona hafifçe vurularak hava kabarcıkları yok edildi. Daha sonra kolonun şartlandırılması için, kolondan 1-propanol/0,1 M amonyum asetat çözeltisi geçirildi. Kolonun musluğu açılarak solvent akışına izin verildi ve oktil sefarozun kolona oturması sağlandı. Kolon %5 1-propanol/0,1 M amonyum asetat çözeltisi ile dengelendikten sonra, LPG izolatının yüklenmesi için hazır duruma geldi.

3.3.6.2 Lipofosfoglikan İzolatının Kolona Yüklenmesi

Daha önce izolasyonu yapılmış, liyofilize LPG kolona yüklenmeden önce başlangıç çözeltisi olan, %5 1-propanol/0,1 M amonyum asetat içinde çözöldü. Daha sonra kullanılan çözücü miktarının 4 katı kadar 0,1 M amonyum asetat eklendi. Son olarak çözülen LPG izolatu kolonun çeperlerine değdirilerek tatbik edildi.

3.3.6.3 Lipofosfoglikanın Hidrofobik Oktil Gruplarına Bağlanması

LPG izolatu kolona yüklendikten sonra, mobil faz olarak %5 1-propanol/0,1 M amonyum asetat çözeltisi kolondan geçirildi ve fraksiyonlar yaklaşık 50 damla olacak şekilde tüplerde toplandı. Elde edilen fraksiyonlar ince tabaka kromatografisinde analiz edildi. Bu işlem sırasında LPG'nin hidrofobik grupları, hidrofobik oktil gruplarına bağlandı.

3.3.6.4 Lipofosfoglikanın Elüsyonu

Polar moleküler kolondan uzaklaştırıldıktan sonra, oktil gruplarına hidrofobik olarak bağlanmış moleküllerin kolondan uzaklaştırılması gerekmektedir. Hazırlanan izolat kolona yüklendikten sonra 10 dakika beklenip yüklendikten sonra sırasıyla; kolon hacmi kadar (10 mL)

a.% 5 1-propanol (0,1 M amonyum asetat içerir)

b.% 10 1-propanol (0,1 M amonyum asetat içerir)

c.% 20 1-propanol (0,1 M amonyum asetat içerir)

d.% 30 1-propanol (0,1 M amonyum asetat içerir)

e.% 40 1-propanol (0,1 M amonyum asetat içerir)

f.% 50 1-propanol (0,1 M amonyum asetat içerir)

g.% 60 1-propanol (0,1 M amonyum asetat içerir) geçirildi ve tüm fraksiyonlar toplandı.

3.3.6.5 Kolonun Rejenerasyonu

Bu amaçla kolondan 100 mL %60 1-propanol/0,1 M amonyum asetat geçirildi.

3.3.7 Lipofosfoglikanın Karakterizasyonu

3.3.7.1 İnce Tabaka Kromatografisi ile LPG Varlığının Saptanması

Silika kaplı kağıtlara her fraksiyondan 2 µL örnek damlatıldı ve kurutuldu. Kağıt üzerine orkinol püskürtüldü ve kurutuldu. Daha sonra %15 sülfürik asit püskürtüldü ve 100°C'de 10 dakika tutuldu. Bu işlem renk oluşana kadar tekrarlandı. Pozitif sonuç çıkan tüplereki LPG toplanarak evaporasyon yapıldı.

3.3.7.2 Coomassie Brilliant Blue Yöntemi ile Protein Açısından Saflığın Tayini

Bu yöntem, Brilliant Blue boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm'de absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanır.

Kısaca; deney tüpüne analizi yapılacak LPG'den 100 µL eklendi ve üzerine hazırlanan Coomassie Brilliant Blue reaktifinden 5 mL eklenerek 5 dakika beklendi. Spektrofotometre küvetlerine hazırlanan örnekten 1 mL koyuldu.

Standart eğri oluşturmak için ise BSA (bovine serum albumin) stok çözeltisinden derişimi 0, 20, 40, 60, 80, 100 mg/L olacak şekilde hazırlanan standart çözeltilerin absorbansları okutularak konsantrasyona karşı absorbans grafiğı çizildi. Tüm örnekler ve standart çözeltileri absorbans değerleri spektrofotometre cihazı ile 595 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.3.7.3 Fenol Sülfürik Asit Metodu

Fenol sülfürik asit metodu karbonhidratların varlığını tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Metodun uygulanmasında standart olarak 1 mg/mL glikoz çözeltisi kullanıldı ve bu çözeltiden 10, 20, 40, 60 ve 80 µL alınarak distile su ile 100 µl'ye tamamlandı. Blank olarak 100 µL su kullanıldı. LPG içeren örnekten 50 µl alınıp 100 µl'ye tamamlandı. Her bir örneğe ve standarda %80 fenol solüsyonundan 50 µl eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Ardından 2 mL konsantre sülfürik asit eklenip 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve her bir örneğin 490 nm'de UV'de absorbanı ölçüldü. Çıkan sonuçtan standart eğri yapıldığında bu eğriden CHO miktarı ölçülmüş olmaktadır. Buradan da LPG miktarını hesaplamak için " $\mu\text{g LPG} = 1.25 \times \mu\text{g CHO}$ " formülü kullanıldı.

3.4 Lipofosfoglikan Polimerler ile Konjugasyonunun Yapılması

3.4.1 Polimerlerin *Leishmania* Parazitlerinden İzole Edilen Lipofosfoglikan ile Konjugasyonu

Çalışmanın konjugasyon kısmı Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü Polimerik Biyomalzeme Grubu tarafından yapılmıştır. Kısaca; saflaştırılan LPG ortamındaki tuzu uzaklaştırmak amacıyla 24 saat suya karşı diyaliz edildi. Diyaliz sonrasında 0,02 M fosfat tamponunda NaIO_4 yardımıyla LPG'deki hidroksil grupları aldehide yükseltgendi. Reaksiyon sonunda reaksiyona girmeyen maddeleri uzaklaştırmak amacıyla suya karşı 24 saat diyaliz yapıldı. Aldehite çevrilen hidroksil grupları yine fosfat tamponu içerisinde, etilendiamin ve NaCNBH_3 ile amin gruplarına çevrilerek, reaksiyon karışımı 0,1 M fosfat tamponuna karşı 24 saat diyaliz yapıldı.

Sonraki aşamada ise LPG'de oluşturulan amin grupları ile PAA'daki asit gruplarının bağlanmasına geçildi. Bu amaçla, 0,5 mg/mL konsantrasyondaki PAA (MA=100 kDa) çözeltisine, $[\text{EDC}]/[-\text{COOH}]=1$ olacak şekilde suda çözünür karbodiimid (EDC) eklendi. pH 5,0'e ayarlandı ve 30 dakika boyunca karıştırıldı. EDC ile aktive edilmiş PAA üzerine aynı hacimde aminlendirilmiş LPG eklendi. Gece boyunca $+4^\circ\text{C}$ 'de karıştırıldı. Elde edilen konjugat Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) cihazında incelendi.

3.4.2 Lipofosfoglikan-Polimer Konjugatının Karakterizasyonun Yapılması

3.4.2.1 GPC Analizi

GPC cihazında kırılma indisi, ışık saçılması ve viskozite dedektörleri bulunmaktadır. Tek bir polimer standart (PEO, 22 kDa) kullanılarak cihaz kalibrasyonu yapılmaktadır. Analiz sonucunda polimerin molekül kütlesi (ağırlıkça-ortalama molekül kütlesi, Mw; sayıca-ortalama molekül kütlesi, Mn), boyutu, polidispersite değeri, Mark-Houwink sabitleri elde edilmektedir. Bu çalışmada mobil faz olarak PBS (pH: 7,0) kullanıldı ve oda sıcaklığında çalışıldı. Üretilen PAA'lar Tosoh marka G5000PW_{XL} GPC kolonunda (30x0,78 cm) incelendi ve akış hızı 0,8 mL/dak. olarak çalışıldı. LPG, LPG-PAA konjugatı ve konjugasyonda kullanılan PAA ise Shim-Pack Diol-300 (50x0,79 cm) kolonunda analiz edildi ve akış hızı 1,0 mL/dak. olarak çalışıldı.

3.5 Sentezlenen Polimerlerin, Konjugatın ve İzole Edilen Lipofosfoglikanın Toksisitesinin İncelenmesi

3.5.1 Sentezlenen Polimerlerin, Konjugatın ve İzole Edilen Lipofosfoglikanın Toksisitesinin MTT Yöntemiyle İncelenmesi

3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) yönteminin prensibi, canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enziminin MTT reaktanını mor renkli formazan ürününe dönüştürmesine dayanır. Oluşan mor renkli formazan kristallerinin çözündürülmesi ve absorbansının okunması sonucu, canlı hücrelerde absorbans yüksek çıkarken, canlılık azaldıkça orantılı olarak absorbans da azalır [426]. Polimerin, LPG'nin ve konjugatın toksisitesinin incelenmesinde fare fibroblast hücreleri (L929) ve insan meme kanser hücreleri (MCF-7) kullanıldı.

3.5.2 PAA'nın L929 ve MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

96 kuyucuklu plaklara, her kuyucuğa 100 µL besiyeri içerisinde 10.000 fare fibroblast hücreleri (L929), insan meme kanser hücreleri (MCF-7) olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler ekildikten sonra, plaklar 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda 48 saat inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından, her konsantrasyon için 5 kuyucuk olacak şekilde PAA'nın (pH=7) farklı konsantrasyonları (1, 10, 20 ve 30 µg/100 µL) ilave edildi. Polimer ile 24 saat inkübasyonun ardından 10 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µL eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi.

İnkübasyonu takiben MTT durdurucu solüsyon olan dimetil sülfoksitten 100 µL eklendi. Plak 30 dakika oda sıcaklığında beklenip 570 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA cihazına yerleştirildi ve cihazın absorbans ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı.

3.5.3 LPG'nin J774, L929 ve MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

Fare fibroblast hücreleri (L929), insan meme kanser hücreleri (MCF-7) ve fare makrofaj (J774) hücreleri kültürde çoğaltıldıktan sonra her kuyucuğa 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, her konsantrasyon için 5 kuyucuk olacak şekilde LPG'nin farklı konsantrasyonları (1, 10 ve 20 µg/100 µL) ilave edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µL eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi.

İnkübasyonu takiben 100 µL DMSO eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri alındı.

3.5.4 LPG-PAA Konjugatının J774, L929 ve MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

J774, L929 ve MCF-7 hücrelerinden her kuyucuğa 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekimi yapıldı. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, her konsantrasyon için 5 kuyucuk olacak şekilde konjugatın farklı konsantrasyonları (1, 10, 20 ve 30 µg/100 µL) ilave edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından MTT solüsyonundan eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi.

İnkübasyonu takiben DMSO eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri alındı.

3.5.5 PAA, LPG ve LPG-PAA Konjugatının J774 ve L929 Hücreleri Üzerindeki Toksisitesinin Flow Sitometrik Olarak İncelenmesi

Annexin V ve 7-AAD boyama: Apoptozis sırasında, hücre zarının fosfolipid iç tabakasında bulunan fosfatidilserinin (PS), hücre zarının dış tabakasına geçer. Annexin V fosfatidilserine yüksek afinite ile bağlandığı için apoptotik hücrelerin belirlenmesini sağlar. 7 -Amino-Aktinomisin D (7-AAD) ise, DNA'nın sitozin ve guanin bazları arasına giren bir nükleik asit boyası olup canlı olan hücreleri canlı olmayanlardan ayırt edilmesinde kullanılır [427].

L929 ve J774 hücrelerinin kültüründe 6 kuyucuklu kültür plağı kullanıldı. Thoma lamında hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra 25×10^4 hücre olacak şekilde %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyeri bulunan hücre süspansiyonundan eklendi. Hücrelerin tutunması için 24 saat 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyonu sağlandı. Hücrelerin üzerine LPG (35 µg), PAA (70 µg) ve LPG-PAA konjugatı (105 µg) eklenerek, 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. Hücreler flow sitometrik inceleme için Tripsin-EDTA ile plak üzerinden kaldırılıp 2 kez PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelere Annexin V-FITC çalışma solüsyonundan 10 µL, 7-AAD çalışma solüsyonundanda 5 µL ve bağlama tamponundanda 100 µL eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 15 dakika inkübasyondan sonra her örneğe 900 µL daha bağlama tamponundan eklendi. Son olarak tüm örnekler 1 saat saat içinde flow sitometride analiz edildi.

3.6 *İn Vivo* Deney Hayvanı Çalışmaları

3.6.1 Çeşitli Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması

Çalışmalarda LPG antijeninden 4 tip aşı adayı hazırlanmıştır. Ayrıca LPG'nin 2 ayrı dozu (10 µg ve 35 µg LPG içerecek şekilde) incelenmiştir.

Birinci tip aşı adayı: LPG antijeni tek başına (10 µg/100 µL PBS ve 35 µg/100 µL PBS pH:7,4) immünizasyon için aşı adayı olarak kullanıldı.

İkinci tip aşı adayı: LPG-PAA konjugatı 20 µg PAA ve 10 µg LPG içerecek şekilde toplam 100 µl PBS içinde çözüldü. Ayrıca 70 µg PAA ve 35 µg LPG içerecek şekilde toplam 100 µl PBS içinde hazırlandı.

Üçüncü tip aşı adayı: Bu aşı grubunda ise PAA ve LPG'nin 2:1 oranında fiziksel karışımı hazırlandı. 20 µg PAA + 10 µg LPG ve 70 µg PAA ve 35 µg LPG, pH:7.4 100 µl PBS içinde çözülerek hazırlanan fiziksel karışım immünizasyon için aşı adayı olarak kullanıldı.

Dördüncü tip aşı adayı: Son aşı grubunda ise aşı çalışmalarında yaygın kullanılan Freund's adjuvanı (50 µl) ve LPG (10 µg ve 35 µg pH:7.4) toplam 100 µl olacak şekilde hazırlandı.

3.6.2 LPG İçeren Çeşitli Aşı Formülasyonlarının BALB/c Farelere Enjekte Edilmesi

Eter anestezisi altındaki farelerin sırt bölgesine, deri altından enjeksiyon yapıldı. Enjekte edilecek maddeler 0,1 mL hacimde PBS içerisinde çözündürüldü. Deney gruplarına göre ayrılan kafesler farelerin uygun yaşam koşulları sağlanan odalarda bırakıldı. Enjeksiyonu takiben, *Leishmania*'ya karşı antikor oluşumları incelenmek üzere her hafta farelerden serum örnekleri alındı.

3.6.3 BALB/c Farelerden Serum Örneklerinin Alınması

Kan örnekleri, eter anestezisi altındaki farelerin kuyruk bölgesinden alındı. Alkolle silinen kuyruğun uç kısmından yaklaşık 1 cm uzunlukta kesim yapıldı. Kuyruk kısmından çıkan yaklaşık 30–50 µL hacmindeki kan, otomatik pipet yardımıyla alınarak sitratlı ependorf tüpleri içerisine konuldu. Tüm hayvanlardan kan alımını takiben, tüpler 5000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar başka ependorf tüplerine alınarak ELISA yöntemi ile analiz edilinceye kadar -20°C'de saklandı.

3.6.4 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Testi) Yöntemi ile Serumdaki İmmünoglobulin Miktarlarının Tayini

Leishmania parazitlerine karşı fare serumunda oluşan antikorların tayin edilmesi için çeşitli yöntemler bulunmasına rağmen bu yöntemler parazitin önemli immünolojik

bölgesi olan LPG'ye karşı değildir. Buna göre de tez kapsamında, BALB/c farelerde LPG ve LPG-polimer konjugatlarına karşı antikor oluşumunun incelenmesi için, LPG'ye spesifik ELISA testi geliştirildi. Bu amaçla parazitlerden elde ettiğimiz saf LPG kullanıldı. Kuyucuklara, mevcut ELISA protokollerinden faydalanılarak, 100 ng LPG/ 100 µL PBS konsantrasyonunda eklenerek 4°C'de bir gece inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından plaklar 3 kere yıkama tamponu ile yıkandı ve non-spesifik bağlanmaların önlenmesi için her bir kuyucuğa 200 µL jelatin çözeltisinden eklendi. Plak 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra yıkama yapıldı.

Serum örnekleri 1:50 oranında dilue edilerek her bir kuyucuğa 100 µL eklendi. 4 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra tekrar yıkama yapıldı ve 1:1500 oranında dilue edilen polivalen çözeltisinden 100 µL eklendi. Plakların inkübasyonu ve yıkamasını takiben, Paranitrofenil çözeltisinden 100 µL eklendi ve 45 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi. ELISA ölçümlerinin sonuçları, ELISA okuyucu cihazında 405 nm dalga boyunda okuma yapılarak tespit edildi.

3.6.5 Fare Serum Örneklerindeki Antikorum IFAT (İndirekt Floresans Antikor Testi) ile İncelenmesi

İmmünize edilmiş farelerde antileishmanial antikor varlığı IFA testi ile incelendi. Çalışma için VL etkeni *L. donovani* promastigotlarından hazırlanan antijenler kullanıldı. Parazit kültürü % 0.9 NaCl içeren serum fizyolojik ile birkaç kez yıkanarak, IFA lamalarında her kuyucukta $2-3 \times 10^6$ parazit/mL olacak şekilde hazırlandı. Parazitleri yaydığımız lamalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Lamalar IFA testi uygulanana kadar -40° C'de sakladı. Çalışmalarda antikor olarak FITC-bağlı anti Mouse IgM kullanıldı. Hazırlanan antijen lamalarına uygulanan IFA testi kısaca şu şekildedir: Kuyular serumlarla kaplandı. 37° C'de 30 dakika inkübasyonun ardından 15 dakika PBS'de bırakılarak yıkandı. Daha sonra lamlara seyreltilmiş IgM antikor 30 dakika karanlık ortamda uygulandı ve tekrar PBS ile yıkama yapıldı. Gliserin ile lamelleri kapatılan örnekler 200× büyütme immün floresan mikroskopta incelendi.

3.6.6 Elde Edilen Antikorum *In Vitro* Hücre Kültüründe Antileishmanial Etkisinin

İncelenmesi

RPMI-1640 besiyerinde kültürü yapılan *L. donovani* promastigotlarının, 96 kuyulu plaklara 10^5 parazit/mL olacak şekilde ekimleri yapıldı. Parazitler 24 saat 27°C'lik soğutmalı etüvde inkübe edildi. Ters mikroskop ile hareketli, normal morfolojiye sahip olduğu gözlemlenen parazitlerin üzerlerine serum örnekleri eklendi. LPG, LPG+PAA (konjugat), LPG+PAA (fiziksel karışım) ve LPG+Freund's adjuvan ile immünize edilmiş farelerin 2, 3 ve 4. hafta serum örnekleri 4'er kuyuya eklendi ve 27°C'de 48 saat inkübe edildi. Kontrol olarak hiçbir enjeksiyon yapılmamış fare serumu ve hiçbir serum örneği eklenmemiş parazitler kullanıldı. 48 saatlik inkübasyonu takiben tüm kuyulara 10 µL MTT solüsyonu (10 mg/mL) eklendi ve 4 saat inkübe edildi. Daha sonra formazan kristallerini çözünmesini sağlamak amacıyla reaksiyon durdurucu olarak DMSO ilave edildi ve oda sıcaklığında yarım saat bekletilip ELISA okuyucuda absorbands değerleri saptandı.

3.6.7 İmmünize Edilen Farelerin *L. donovani* Parazitleri ile Enfekte Edilmesi

İmmünizasyon yapılan fareler 1×10^7 *L. donovani* promastigotları ile farelerin karın bölgesinde deri altına enjeksiyon yapılarak, enfekte edildi. Daha sonra farklı parazitolojik ve immünolojik çalışmalar için enfekte edilen fareler incelendi.

3.6.8 Giemsa Boyama ve Mikro Kültür Yöntemi (MKY) ile Fare Periferik Kanında Parazit Varlığının ve Miktarının Tespit Edilmesi

Deneylerde kullanılan farelerin *L. donovani* promastigotları ile enfekte edilmesini takiben 4 hafta boyunca kan alındı. Enfekte olan tüm fare kanlarından 10 µL alınarak alkolle temizlenmiş lam üzerine yayma yapıldı. Lam üzerindeki örnek kurutuldu ve metanol ile 5 dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Yayma örnekleri kurutuldu ve 1:10 oranında sulandırılmış Giemsa boyasında (Merck, 109204) 25 dakika oda sıcaklığında boyama işlemi gerçekleştirildi. Giemsa ile boyanmış örnekler yıkandı ve kurutuldu. Son olarak ışık mikroskopunda (100x) immersiyon yağı kullanılarak incelendi.

Mikrokültür yönteminde ise antikoagülan (EDTA) madde bulunan tüplere alınan 100 µL kan örneği kapiller bir tüpe aktararak 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Serum

bulunan üst fazı ile eritrositlerin bulunan alt faz arasında kalan buffy coat tabakası 10 µL'lik mikropipet yardımı ile alındı. %15 FBS içeren RPMI 1640 besiyerine alınan örnek, mikrokapiler tüplere aktarıldı. Kapiler tüplerin kenarları mum yardımı ile kapatılarak 27 °C'ye ayarlanmış soğutmalı etüve kaldırıldı. 24 saatlik inkübasyonu takiben mikrokapiler tüpler ters mikroskopta 40× büyütme ile incelendi.

3.6.9 Farelerin Sakrifiye Edilmesi ve Organlarının Ayrılması

Kontrol ve immünize gruptaki tüm fareler enfeksiyondan 30 gün sonra yüksek doz eter inhalasyonu ile sakrifiye edildi. Sakrifikasyonu takiben sırtüstü pozisyonda sabitlenen hayvandan hızla peritoneal makrofaj izolasyonu yapıldı. Bunun için öncelikle abdominal bölgesi alkol ile dezenfekte edilip steril pens ve makas yardımıyla derisi peritondan ayrıldı. Periton içerisine 1,5 mL steril RPMI-1640 besiyeri enjekte edildi. Abdomenin ön ve yan bölgelerine hafifce bastırılarak, besiyerinin periton içerisinde dolaşımı sağlandıktan sonra besiyeri enjektör ile geri alınarak peritoneal makrofaj izolasyonu sağlandı.

Daha sonra karaciğer ve dalak izolasyonu için periton kesildi. Organların hızla ve travmatize etmeksizin steril olarak tartımları yapıldı. İzole edilen lenfositler antijenle (LPG) uyarılarak kültür ortamına salgılanan sitokinleri belirlemek amacıyla süpernatantlar toplandı ve -20 °C'de saklandı. Karaciğerden ve dalaktan Leishman-Donavan Unit'in (LDU) hesaplanması için yayma hazırlandı.

3.6.10 Peritoneal Makrofaj Hücrelerinin İzolasyonu ve *Leishmania* Promastigotları ile *in vitro* Enfeksiyonu

Fareden 2,5 mL'lik enjektör içerisine fenol kırmızısı içermeyen RPMI-1640 ile izole edilen besiyeri-hücre karışımı santrifüj tüpüne alındı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı pellet üzerine 5 mL fenol kırmızısı içermeyen %10 FBS içeren RPMI 1640 eklenip süspanse edildi. Hücre süspansiyonu 25 cm²'lik kültür flaskına alındı ve % 5 CO₂ içeren 37° C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

Periton makrofajlarını *L. donovani* promastigotları ile enfekte etmek için 24 kuyucuklu kültür plağı kullanıldı. Steril 12 mm çapındaki yuvarlak lameller tek tek kuyulara

yerleştirildi. Daha önce Thoma lamında sayımı yapılan hücreler lamel yerleştirilen kuyulara 5×10^4 hücre olacak şekilde RPMI-1640 (%10 FBS) içeren hücre süspansiyonundan eklendi. Makrofajların lamellerin üzerine tutunması için 24 saat 37°C de %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyonu sağlandı.

24 saat 37°C de %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyona bırakılan 24 kuyucuklu kültür plağındaki makrofajlar üzerine hücre başına 10 promastigot düşecek şekilde (5×10^5 parazit) inoküle edildi. Hazırladığımız plate %5 CO_2 içeren etüvde 37°C 'de 4 saat süreyle inkübe edilerek makrofajların enfekte olması sağlandı. Daha sonra ekstrasellüler promastigotları uzaklaştırmak için 1 mL RPMI-1640 ile kuyular üçer kez yıkandı ve yeni hazırlanmış RPMI-1640 (%10 FBS) besiyerinden 1 mL ilave edildi. Deney ve kontrol grubunda bulunan lameller 72. saatte Giemsa ile boyanarak ışık mikroskopunda ($100\times$) enfeksiyon indeksi hesaplandı.

3.6.11 Enfekte Olmuş Periton Makrofajlarının Giemsa ile Boyanması

Enfekte makrofajlar 72 saat 37°C de %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyona bırakıldıktan sonra 24 kuyucuklu kültür plağındaki besiyeri döküldü. Her kuyu 500 μL PBS ile bir kez yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra her kuyu 500 μL PBS-metanol (1:1,5) çözeltisi ile yıkandı. PBS-metanol solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya 250 μL metanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika beklendi. Metanol uzaklaştırıldıktan sonra tekrar PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra hücre yüzeyini örtecek miktarda (200 μL) Giemsa eklendi. 3 dakika oda sıcaklığındaki boya uzaklaştırıldı. Boya uzaklaştırıldıktan sonra 24'lük kültür plağı yıkandı. Daha önceden 24'lük kültür plağı içine eklediğimiz 12 mm'lik lameller çıkarılarak, Giemsa ile boyanmış olan enfekte makrofajlar ışık mikroskopunda $100\times$ büyütmede immersiyon yağı ile gözlemlendi. Enfektiflik daha önce anlatıldığı gibi (3.2.5.1. Enfektifliğin hesaplanması) hesaplandı.

3.6.12 Karaciğer ve Dalaktan Yayma Hazırlanması ve Enfeksiyonun Değerlendirilmesi

Sakrifiye edilen her farenin dalak ve karaciğeri alınıp tartıldı. Dalak ve karaciğerin kesilen parçaları RPMI-1640 içinde yıkandı ve kesik kısımları lam üzerine sürülerek yayma hazırlandı. Yayma örnekleri metanolde fikse edilip Giemsa ile boyandı. Yaymalar immersiyon yağı ile mikroskopik ($100\times$) olarak incelendi. Her lam için en az 200 hücre

incelendi ve hücrelerin içindeki parazitler sayıldı. Parazit yükü Leishman-Donovan Units (LDU) kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{LDU} = \frac{\text{Amastigot sayısı}}{\text{Karaciğer hücre çekirdeği}} \times \text{Milligram Cinsinden Organ Ağırlığı}$$

LDU değeri kullanılarak ise parazit sayısındaki % düşüş ise şu formülle hesaplandı:

$$100 - \left[\left(\frac{\text{İmmunize Grubun LDU Değeri}}{\text{Kontrol Grubunun LDU Değeri}} \right) \times 100 \right]$$

3.6.13 Dalaktan Sitokin Üretiminin Değerlendirilmesi

Fareden izole edilen dalak hücreleri sitokin ölçümleri için RPMI-1640 besiyerinde kültüre alındı. İmmunize gruplardan izole edilen dalak hücreleri 10 µg LPG ile uyarıldı. LPG ile uyarılmadan önceki süpernatantları ve uyarıldıktan 72 saat sonraki kültür süpernatantları toplanarak sitokin ölçümlerinde kullanıldı.

3.6.13.1 INF-γ ve IL-2

Maddeye spesifik antikor (capture antibody) PBS tamponu ile sulandırıldı ve 96 kuyucuklu plağa 100 µL eklendi. Plak gece boyu oda sıcaklığında inkübe edildi. Yıkama çözeltisi ile 3 kere yıkama yapıldı ve blok çözelti eklenerek non-spesifik bağlanma engellendi ve oda sıcaklığında en az 1 saat bekletildi. Tekrar yıkama yapılarak reaksiyon çözeltisi-1'de sulandırılan örneklerden ve standarttan 100 µL eklenip oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Maddeler kaplı antikorlara bağlandıktan sonra tekrar yıkama yapıp aynı maddenin farklı bir bölgesine (epitopa) bağlanan işaretli bir antikor (detection antibody) eklenerek 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve yıkama yapıldı. 100 µL Streptavidin-HRP her bir kuyucuğa eklenip oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildikten sonra yıkama yapıldı ve her bir kuyucuğa 100 µL substrat çözeltisi eklendi. 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip 50 µL durdurucu çözelti eklendi ve 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

3.6.13.2 IL-4 ve IL-10

Maddeye spesifik antikor (capture antibody) PBS tamponu ile sulandırıldı ve 96 kuyucuklu plağa 100 µL eklendi. Plak gece boyu oda sıcaklığında inkübe edildi. Yıkama çözeltisi ile 3 kere yıkama yapıldı ve blok çözelti eklenerek nonspesifik bağlanma engellendi ve oda sıcaklığında en az 1 saat bekletildi. Tekrar yıkama yapılarak reaksiyon çözeltisi-2 de sulandırılan örneklerden ve standarttan 100 µL eklenip oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Maddeler kaplı antikorlara bağlandıktan sonra tekrar yıkama yapıp aynı maddenin farklı bir bölgesine (epitopa) bağlanan işaretli bir antikor (detection antibody) eklenerek 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve yıkama yapıldı. 100 µL Streptavidin-HRP her bir kuyucuğa eklenip oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildikten sonra yıkama yapıldı ve her bir kuyucuğa 100 µL substrat çözeltisi eklendi. 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip 50 µL durdurucu çözelti eklendi ve 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

3.7 İstatistiki Değerlendirme

Deney sonuçlarındaki anlamlılık ANOVA ve student t-test kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm veriler Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 16.0 for Windows) ile değerlendirilmiş ve $p < 0.05$ istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

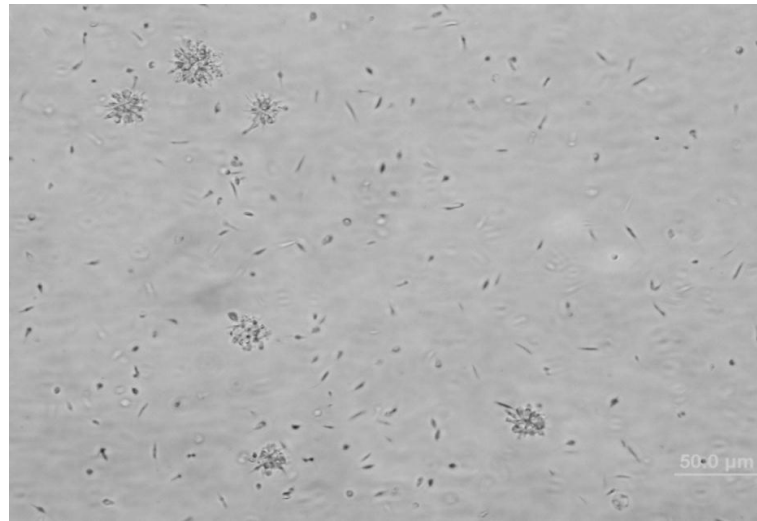
DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 *In Vitro* Kültür Çalışmaları

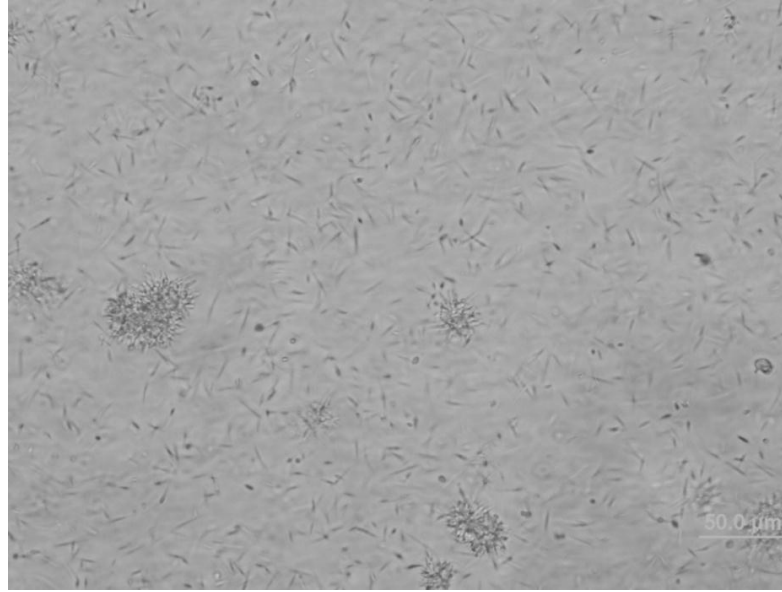
In vitro kültür çalışmalarında öncelikle Leishmania parazitlerinin çoğalmasına etki eden faktörler incelenmiş daha sonra büyük ölçekli kültür yöntemleri geliştirilmiştir. MCF-7 L-929 ve J-774 hücre serisinin ise kültürü başarılı şekilde yapılmış ve toksisite çalışmalarında kullanılmıştır.

4.1.1 *Leishmania* Promastigotlarının Büyümesini Destekleyen Farklı Kültür Koşulları

Çalışmanın bu bölümünde, MCF-7 kültürünün metabolitlerini de içeren atık besiyerinin *Leishmania* parazitlerinin *in vitro* çoğalmasına etkisi incelenmiştir. Kültür metabolitlerini içeren ortamda parazitlerin aktif, morfolojilerinin düzgün olduğu ve sayıca artışlarının kontrole göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4. 1 ve Şekil 4. 2).



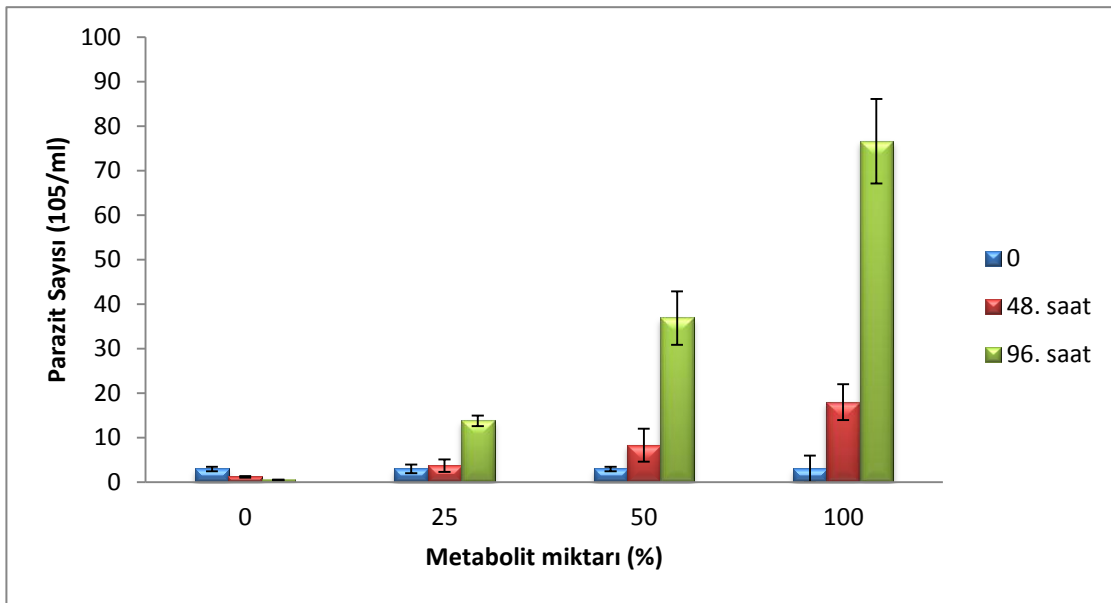
Şekil 4. 1 %10 FBS içeren kültür ortamında parazitlerin morfolojileri



Şekil 4. 2 Metabolit içeren kültür ortamında parazitlerin morfolojileri (× 20)

Çizelge 4. 1’de metabolitlerin farklı konsantrasyonlarının parazitlerin gelişimi üzerine etkisi görülmektedir. Parazit sayısı serum içermeyen kontrol grubunda (FBS’siz besiyeri) oldukça düşükken metabolit oranı arttıkça parazit sayısının yükseldiği tespit edilmiştir. 96. saate gruplar arasındaki parazit sayısında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($P < 0.05$).

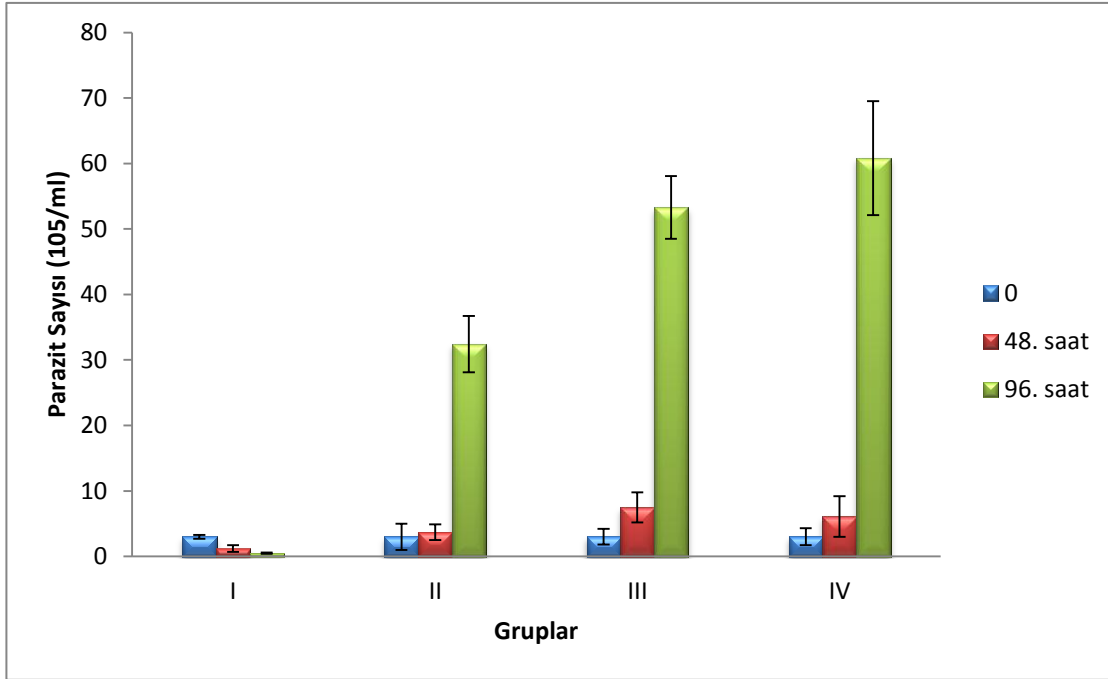
Çizelge 4. 1 Farklı konsantrasyonlardaki metabolitlerin parazitlerin proliferasyonuna etkisi



FBS içeren ve içermeyen MCF-7 atık besiyerinin ve standart besiyerinin parazit çoğalmasına etkisi incelendiğinde serum bulunan ortam ile atık besiyeri arasında

anlamalı bir fark bulunmamaktadır. Diğer taraftan FBS içermeyen kültür ortamı parazitlerin gelişimini yeterince sağlayamamıştır (Çizelge 4. 2).

Çizelge 4. 2 Farklı kültür ortamlarının parazit proliferasyonuna etkisi; (1) Besiyeri (FBS'siz), (2) FBS'siz ortamda çoğaltılan MCF-7 hücrelerinin metaboliti, (3) FBS'li standart besiyeri, (4) FBS'li standart besiyerinde çoğaltılmış MCF-7 hücrelerinin metaboliti

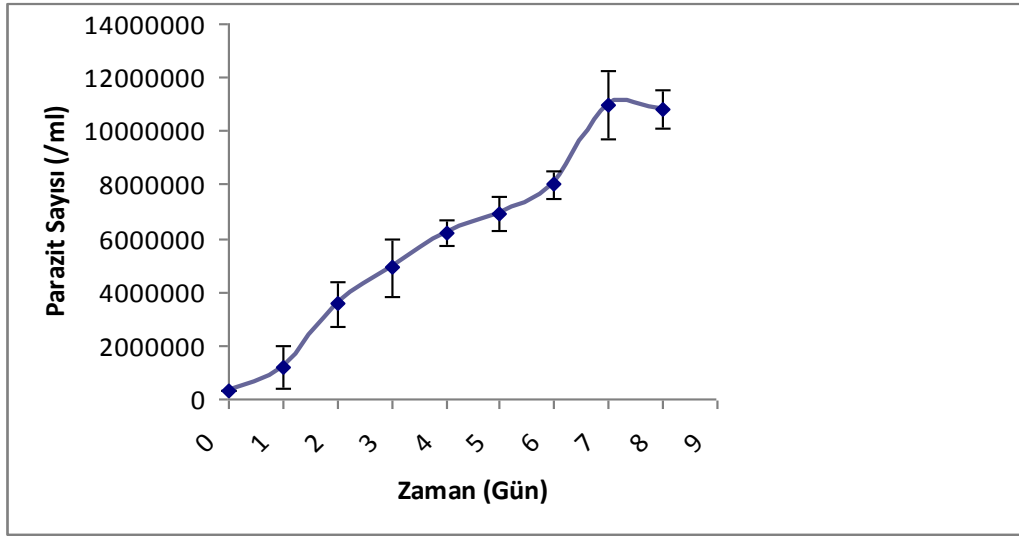


Ancak hem FBS'de hem de metabolitte bilinmeyen bazı makromoleküler yapılar bulunduğu için ve çoğaltılan kültürden izole edilecek LPG'nin saflığını etkilememesi için aynı zamanda ekonomik açıdan sağladığı avantajlar nedeniyle büyük ölçekli kültür çalışmalarında kullanılmak üzere, parazitlerin proliferasyonuna beyin kalp infüzyon besiyerinin etkisi incelenmiştir.

4.1.2 *L. donovani* Parazitlerinin Beyin Kalp İnfüzyon Besiyerinde Büyük Ölçekli Kültürünün Yapılması

Çizelge 4. 3'de 150 cm²'lik flasklar içindeki *L. donovani* promastigotlarının çoğalma eğrisi gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi parazit sayısı 8. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bu aşamada mL'deki parazit sayısı $\sim 11 \times 10^6$ parazit/mL yoğunluğundadır.

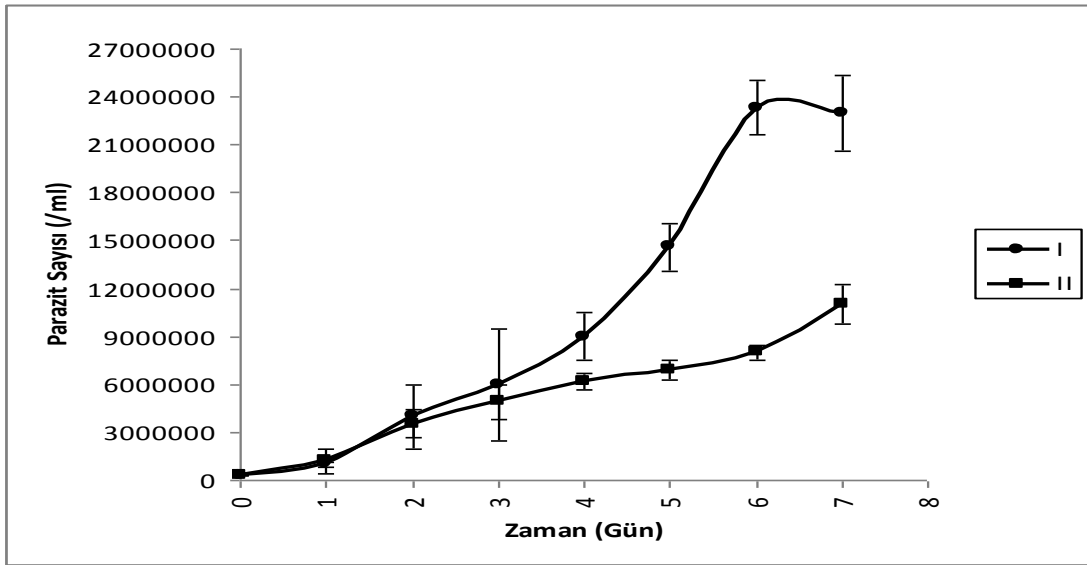
Çizelge 4. 3 Soğutmalı inkübatörde (27°C) flask içinde yapılan parazit kültürünün çoğalma eğrisi



Soğutmalı inkübatörde flask içerisinde yapılan parazit kültürüne ek olarak cam erlenler kullanılarak çalkalamalı ve durağan sistemde parazit kültürü yapıldı. Parazit kültürü için optimum çalkalama hızının 50 rpm olduğu belirlendi.

Şekil 4. 4’de durağan ve çalkalayıcı ortamda, *L. donovani*’nin büyüme eğrisi verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi çalkalamalı ortamda parazit sayısı durağan kültüre göre anlamlı ölçüde daha yüksektir ($p < 0,05$).

Çizelge 4. 4 *L. donovani* promastigotlarının cam kültür şişelerinde çalkalamalı (I) ve durağan (II) kültürlerin çoğalma eğrileri (27°C)

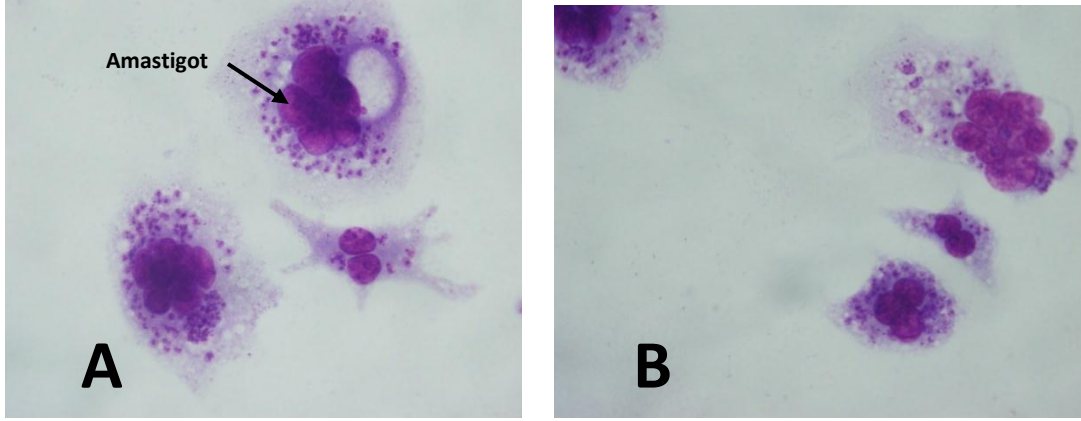


Çalkalamalı ortamda besiyeri sirkülasyonunun olması parazitlerin kültür şişesinin tabanında alt faz oluşturup, birbirlerinin gelişimini inhibe etmesini engellemiş olur. Bu ise homojen bir kültür ortamı oluşmasını sağlar.

LPG izolasyonu için çok miktarda parazite ihtiyaç duyulmasından dolayı parazit kültürünün orbital çalkalayıcıda yapılmasına devam edildi. Sonuç olarak *L. donovani* promastigot formlarının *in vitro* olarak devamlı kültürü ve kriyoprezervasyonu yapıldı. Ayrıca LPG izolasyonu için büyük ölçekte parazit elde etmek için optimize edildi.

4.1.3 *Leishmania* Parazitlerinin Amastigot Formlarının *in vitro* Kültürünün Yapılması

Leishmania promastigotları ile enfekte olmuş makrofajlar Şekil 4. 3 (A, B)'de gösterilmiştir. Enfektiflik hesaplamasına göre 24. saatte makrofajların %70,27'si enfekte olmuştur. Makrofaj başına düşen ortalama amastigot sayısının enfeksiyon indeksinin ise 218 ($70,27 \times 3,1$) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4. 3 A). 48. saatte enfekte olmuş makrofajların yüzdesi azalarak %28,12'ye, makrofaj başına düşen ortalama amastigot sayısı ise 0,6'ya düşmüştür. Bu durumda ise enfeksiyon indeksi 19 ($28,12 \times 0,6$) olmuştur (Şekil 4. 3 B). 24. saatte enfeksiyon indeksinin daha yüksek olması enfektiflik yüzdesi ve ortalama amastigot sayısının fazla olmasından kaynaklanır. Bu nedenle ileride yapılacak *in vitro* çalışmalarda enfektifliğin 24. saatindeki amastigot kültürünün kullanılmasının uygun olduğu belirlendi.



Şekil 4. 3 *Leishmania* promastigotları ile enfekte olmuş makrofajlar (A. 24. saat, B. 48. saat, ×100)

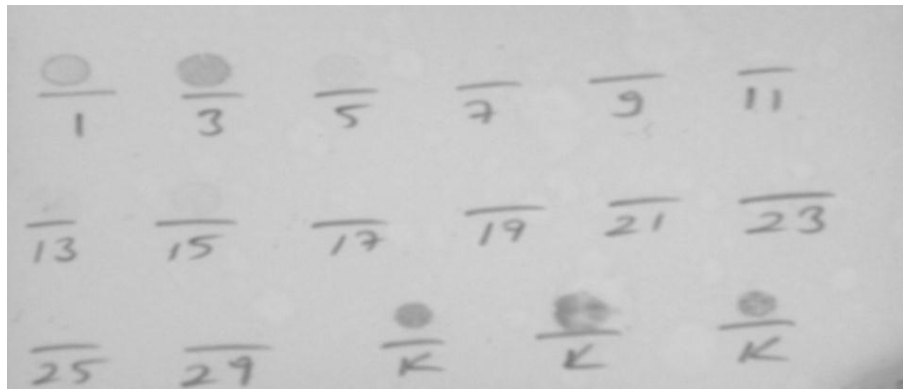
4.2 *Leishmania* Parazitlerinden LPG'nin İzole Edilmesi

Leishmania parazitlerinden LPG izole edildikten sonra saflığı ve miktarı ince tabaka kromatografisi, fenol sülfürik asit metodu ve Coomassie Blue yöntemi ile incelendi.

4.2.1 LPG'nin Karakterizasyonu

4.2.1.1 İnce Tabaka Kromatografisi

Şekil 4. 4'de kolon kromatografisi yapıldıktan sonra ince tabakaya damlatılan fraksiyonlarda orkinol ve sülfürik asit uygulamasından sonraki renk oluşumu gösterilmiştir. Kontrolde mor renk oluşması, mor renkli fraksiyonlarda glikokonjugat varlığını göstermektedir. Buradan renk oluşan fraksiyonlar toplanmış ve LPG içeren bu fraksiyonlar liyofilize edilerek kurutulmuş, fenol sülfürik asit yöntemi ile LPG varlığı saptandıktan sonra ileriki çalışmalar için kullanılmıştır.



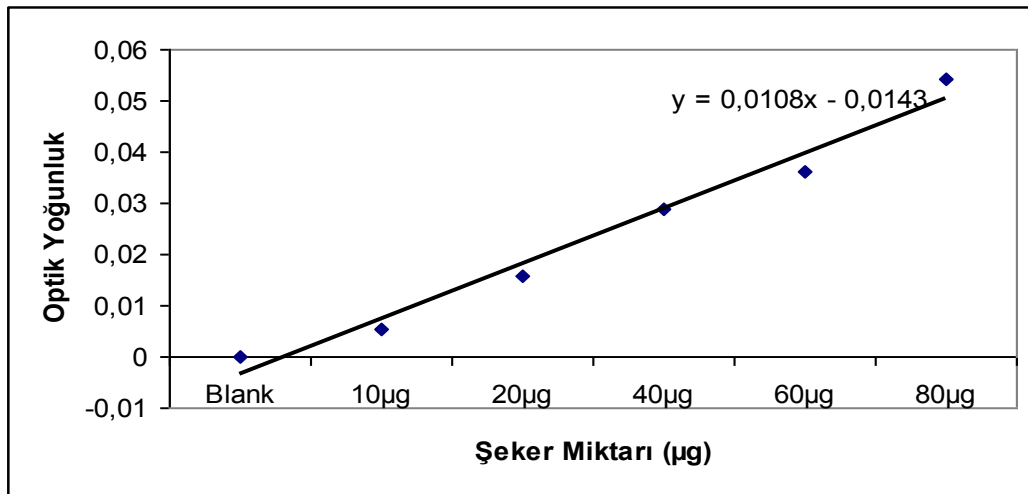
Şekil 4. 4 İnce tabaka kromatografisi ile LPG varlığının saptanması

4.2.1.2 Fenol Sülfürik Asit Metodu

Fenol sülfürik asit metodu karbonhidratların varlığını tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Çalışmamızda elde edilen LPG miktarını belirlemek amacıyla bu yöntem kullanıldı.

1 mg/mL glikoz çözeltisinden hazırlanan 10, 20, 40, 60 ve 80 µg/mL alındı, 490 nm’de absorbansı ölçülerek standart hazırlandı (Çizelge 4. 5). Oktil sefaroze kolon ile saflaştırılan LPG’nin 490 nm’de absorbans değerleri okundu. Şeker miktarına bağlı olarak oluşturulan standarda göre, saf LPG’nin içerdiği şeker miktarı, buradan da elde ettiğimiz LPG miktarı hesaplandı. Her bir izolasyon ve saflaştırma sonrasında bu yöntem uygulanarak miktar tayini yapıldı.

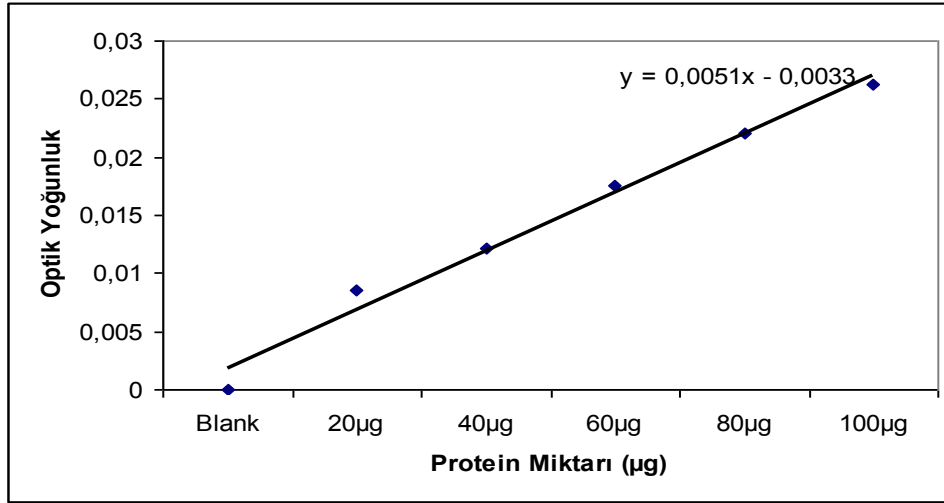
Çizelge 4. 5 Fenol sülfürik asit metodu ile 490 nm’de glukoz tarafından oluşturulan standart



4.2.1.3 Coomassie Blue Yöntemi Spektrofotometrik Protein Tayini

Standart eğri oluşturmak için BSA (bovine serum albumin) stok çözeltiden derişimi 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL olacak şekilde standartlar hazırlandı (Çizelge 4. 6). Oktil sefaroze kolon ile saflaştırılan LPG’nin 595 nm’de absorbans değerleri okundu. Protein miktarına bağlı olarak oluşturulan standarda göre saf LPG’nin protein içermediği belirlendi. Her bir izolasyon ve saflaştırma sonrasında bu yöntem uygulanarak protein kontaminasyonu açısından kontrol edildi.

Çizelge 4. 6 Coomassie blue yöntemi 595 nm’de BSA tarafından oluşturulan standart



4.3 LPG’nin PAA ile Konjugasyonunun Yapılması

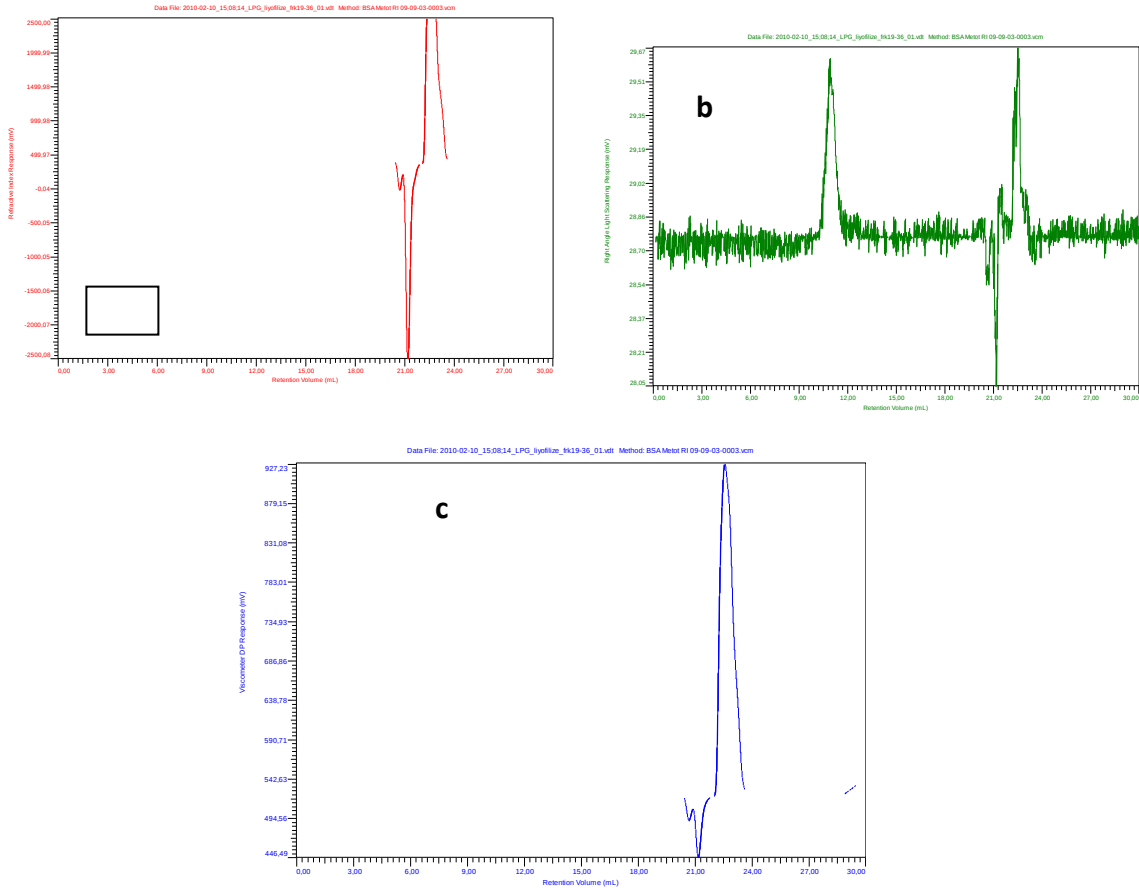
4.3.1 PAA’nın *Leishmania* Parazitlerinden İzole Edilen LPG İle Konjugasyonu ve Karakterizasyonunun Yapılması

LPG’nin yapı ve fonksiyonel grup analizi, söz konusu teknikler için (FTIR, H-NMR gibi) gereken örnek miktarı izolasyonda elde edilene kıyasla fazla olduğu için yapılmamış; buna karşılık LPG molekülü, polimer-LPG konjugatı ile kıyaslayabilmek amacıyla GPC cihazında analiz edilmiştir.

LPG’nin, GPC cihazı ile analizinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 7’de görülmektedir. Kromatogramların ilk 20 mL’sinde ışık saçılması hariç hiçbir dedektörde pik gözlenmemektedir. Işık saçılması molekül kütesine bağlı olarak sinyal oluşturan bir dedektördür. 10,8 mL’de çıkan pik, miktarı çok az ama molekül kütesi yüksek olan bir molekül olabilir. Ama diğer dedektörlerde aynı dakikada sinyal alınmadığından mobil fazdan kaynaklı bir pik olabilir. 21,3 mL’de kırılma indisinde çıkan negatif pik tuz pikidir. Diğer dedektörlerde de bu dakikada çıkan negatif ve pozitif pikler bu sebepten oluşmaktadır. Kırılma indisi dedektöründe daha sonra gelen şiddetli pik ise LPG izolatu içinde bulunan amonyum asetat tuzu olabilir. Zira konsantrasyona hassas olan kırılma

indisi dedektöründe bu kadar şiddetli pik vermesine rağmen ışık saçılması dedektöründe çok ufak bir pik görülmesi, molekül kütlesi çok az olan moleküllere uygun gelmektedir. Bu analizden elde edilebilecek sonuç, LPG molekülünün miktarının GPC yöntemi ile izlenebilecek düzeyde olmayışı olabilir.

Çizelge 4. 7 İzole edilen LPG'nin GPC cihazından elde edilen kırılma indisi (a), ışık saçılması (b), viskozimetri (c) kromatogramları.

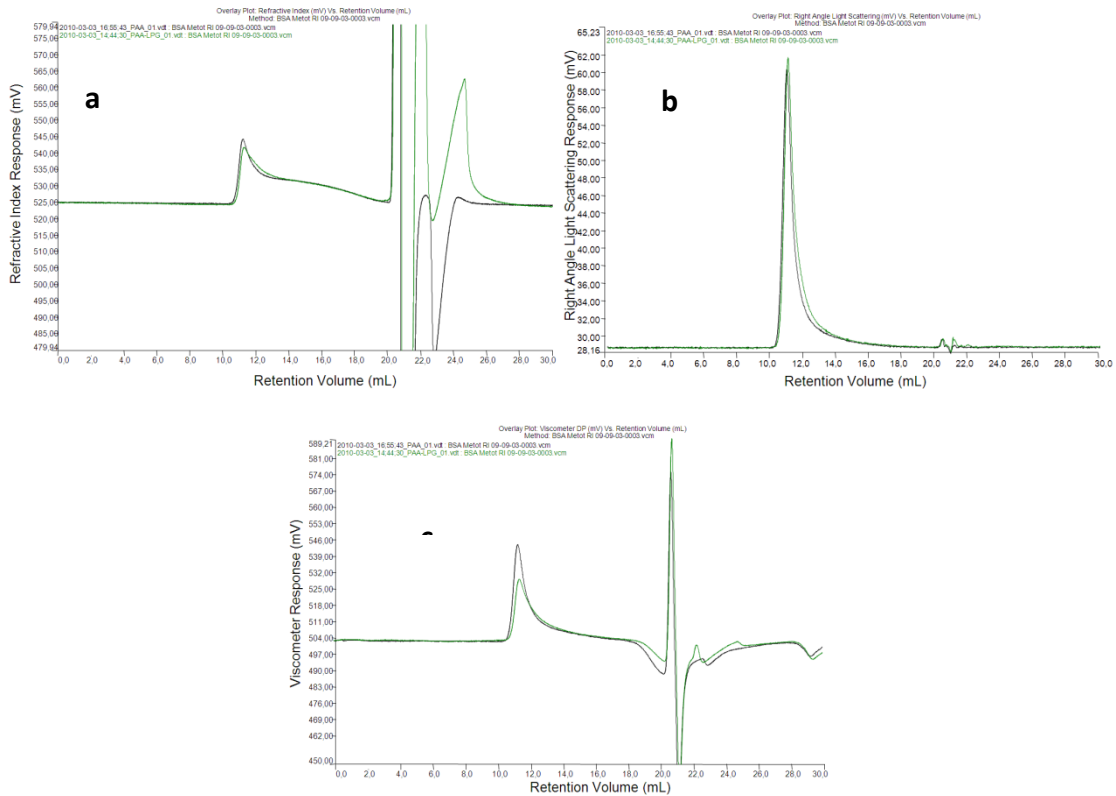


LPG molekülünün yetersiz miktarda olması sebebiyle GPC ile gözlenememiş olmasına rağmen, LPG-PAA konjugatının polimerin davranışına bağlı olarak gözlenebileceği düşüncesinden hareketle, elde edilen konjugat da GPC ile analiz edilmiştir. PAA (Mw=100 kDa), GPC ile kolaylıkla analiz edilebilen bir moleküldür. Bu nedenle PAA ile oluşturulan bir konjugatın da bu yöntem ile analiz edilebileceği düşünülmektedir. Elde edilen konjugat ve PAA, GPC ile incelendiğinde Çizelge 4. 8'de görülen sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlara göre 10,9 mL'de çıkan pik PAA'ya aittir. Konjugasyon

sonrasında LPG-PAA konjugatı da aynı sürede kolonu terk etmektedir. Kırılma indisi dedektöründeki PAA ve LPG-PAA konjugatının pik alanları değişmemiştir. Işık saçılması kromatogramında ise konjugatın pik alanı artmıştır. Bu, polimerin molekül kütlesinde bir artışın olduğunu göstermektedir. Viskozimetri dedektöründe ise konjugatın pik alanı PAA'ya göre oldukça azalmıştır. EDC ile aktivasyon sonrasında polianyonun toplam net yükünün azalmasından dolayı daha kompakt hale gelmesi viskozite değerini düşürmüştür. Bu da polimerin viskozitesine bağlı olarak sinyal oluşturan viskozimetri dedektöründen elde edilen pikin alanında azalmaya yol açmıştır.

Tüm kromatogramlar göz önüne alındığında, konjugasyon sonrasında tüm dedektörlerdeki PAA pikinde meydana gelen değişimlerin PAA'ya LPG bağlanması sonucunda olduğu düşünülebilir.

Çizelge 4. 8 LPG-PAA konjugatı (yeşil) ve PAA'nın (siyah) GPC cihazından elde edilen kırılma indisi (a), ışık saçılması (b), viskozimetri (c) kromatogramları



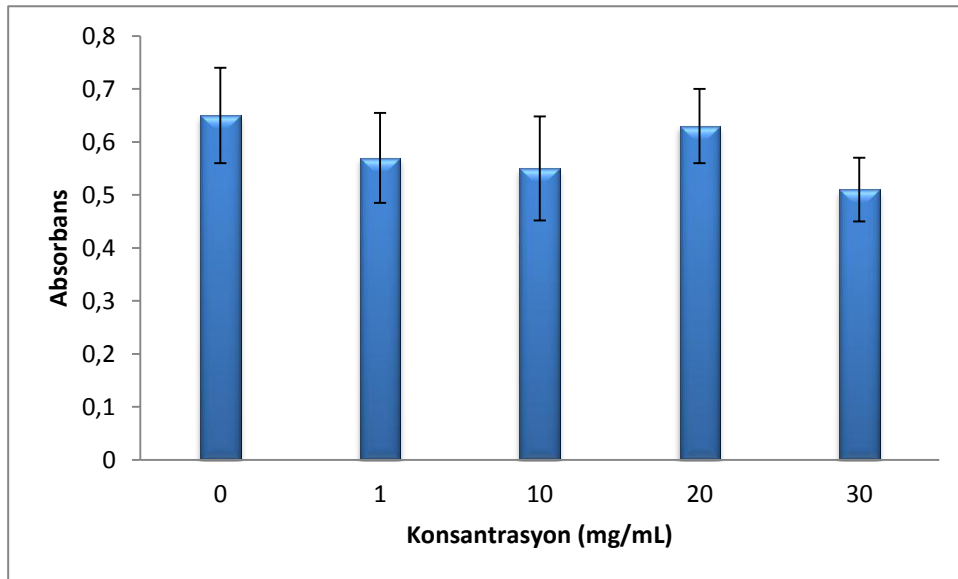
4.4 PAA'nın, LPG-PAA Konjugatının ve İzole Edilen LPG'nin Toksisitesinin İncelenmesi

4.4.1 PAA'nın L929 ve MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

PAA'nın fare fibroblast hücreleri (L929) ve insan meme kanser (MCF-7) hücreleri üzerindeki toksik etkisi MTT yöntemi ile incelenmiştir.

Çizelge 4. 9'da polimerin farklı konsantrasyonlarının L929 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi incelenen konsantrasyonlarda kontrole kıyasla absorbans değerlerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Bu da poliakrilik asitin incelenen konsantrasyonlarda L929 hücre kültüründe toksik etki oluşturmadığını göstermektedir.

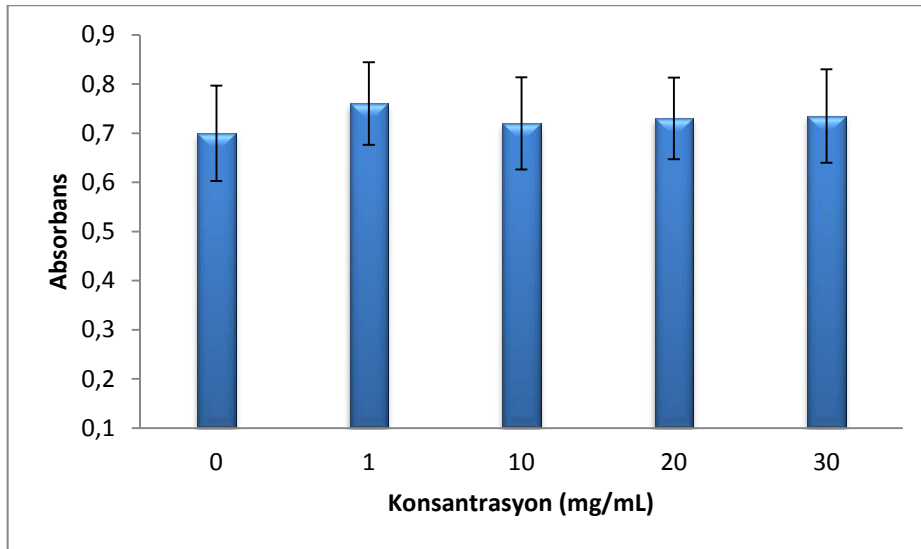
Çizelge 4. 9 PAA'nın farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi



Polimerin aynı konsantrasyonlarının toksik etkisi MCF-7 hücrelerinde de incelenmiştir.

Çizelge 4. 10'da polimerin incelenen konsantrasyonlarda MCF-7 hücreleri üzerinde toksik etki göstermediği görülmektedir.

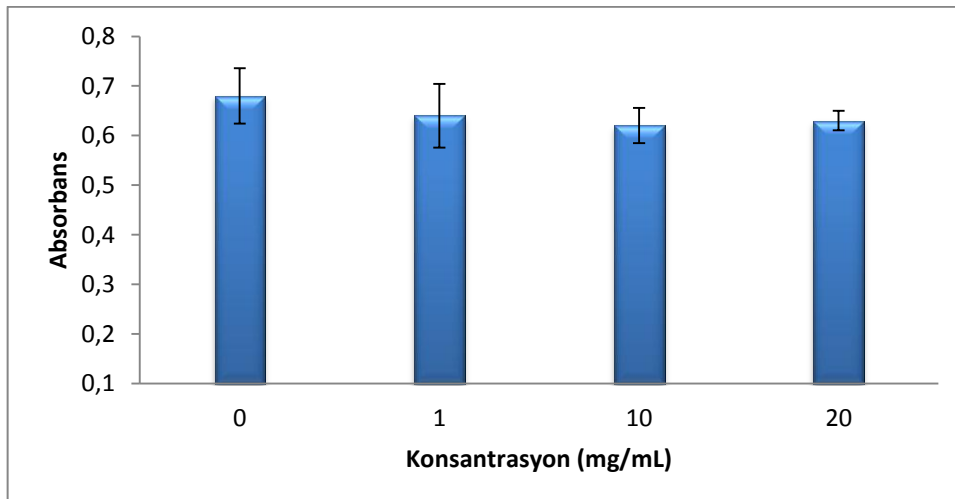
Çizelge 4. 10 PAA'nın farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerinin canlılığına etkisi



4.4.2 LPG'nin J774 ve L929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

Çizelge 4. 11'de LPG molekülünün 3 farklı konsantrasyonunun L929 hücre canlılığına etkisi gösterilmektedir. LPG'nin incelenen hiçbir konsantrasyonda toksik etki göstermediği tespit edilmiştir. Hücreler kontrole kıyasla benzer canlılık ve metabolik aktivite göstermişlerdir.

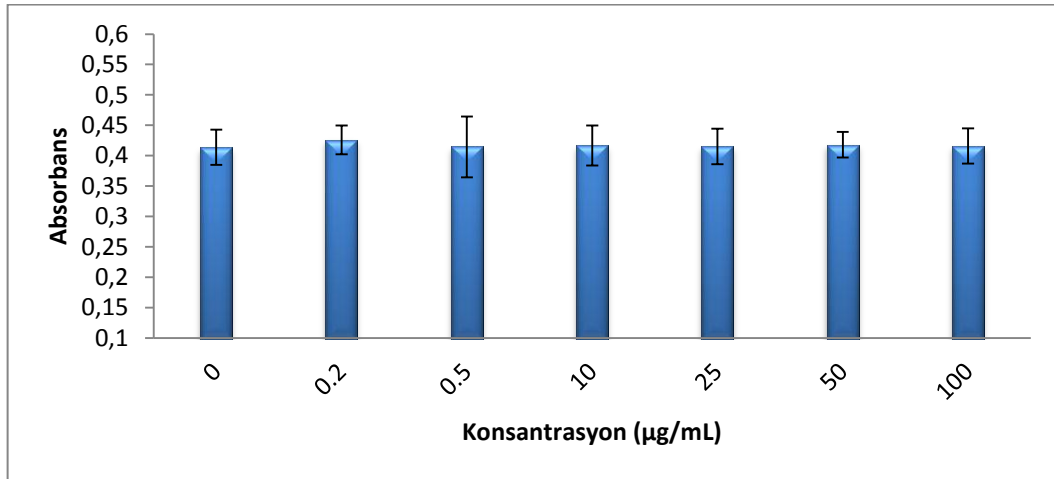
Çizelge 4. 11 LPG'nin farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi



Çizelge 4. 12'de LPG molekülünün 6 farklı konsantrasyonunun J774 fare makrofaj hücre canlılığına etkisi gösterilmektedir. İncelenen hiçbir konsantrasyonda toksik etki

görülmemiştir. Hücreler kontrole kıyasla benzer canlılık ve metabolik aktivite göstermişlerdir.

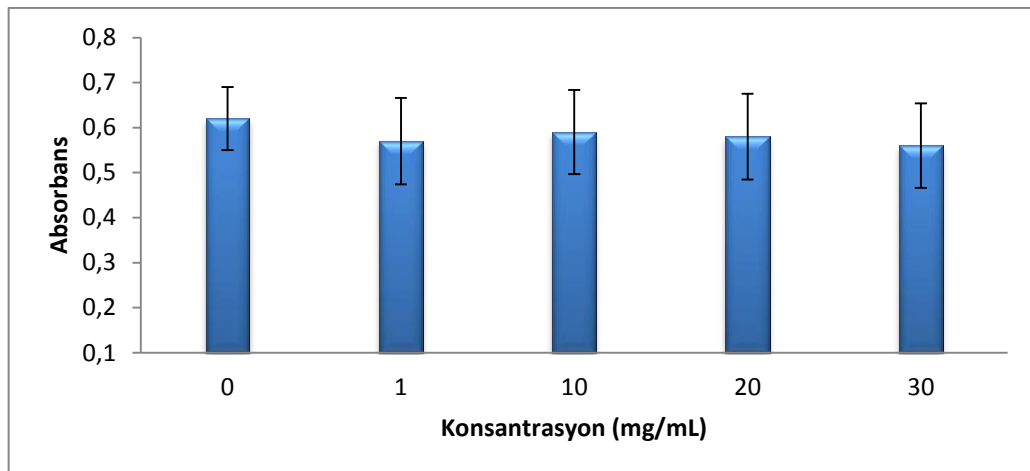
Çizelge 4. 12 LPG'nin farklı konsantrasyonlarının J774 fare makrofaj hücre canlılığına etkisi



4.4.3 LPG - PAA Konjugatının J774, L929 ve MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

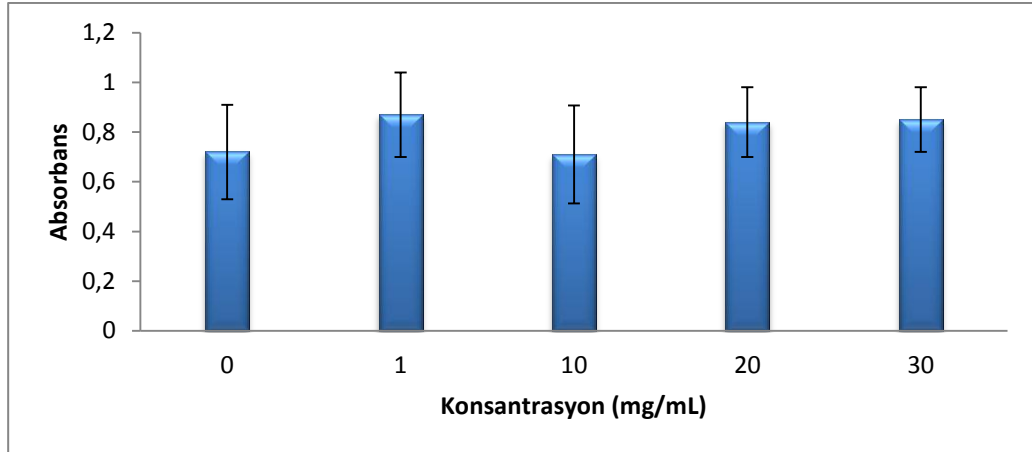
LPG-PAA konjugatının fare makrofaj hücreleri (J774), fare fibroblast hücreleri (L929) ve insan meme kanser hücreleri (MCF-7) üzerindeki toksik etkisi MTT yöntemi ile incelenmiştir. Konjugatın L929 hücrelerinin üzerine toksik etkisi incelenmiş ve kontrole kıyasla canlılıkta anlamlı bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4. 13).

Çizelge 4. 13 LPG-PAA konjugatının farklı konsantrasyonlarının L-929 hücrelerinin canlılığına etkisi



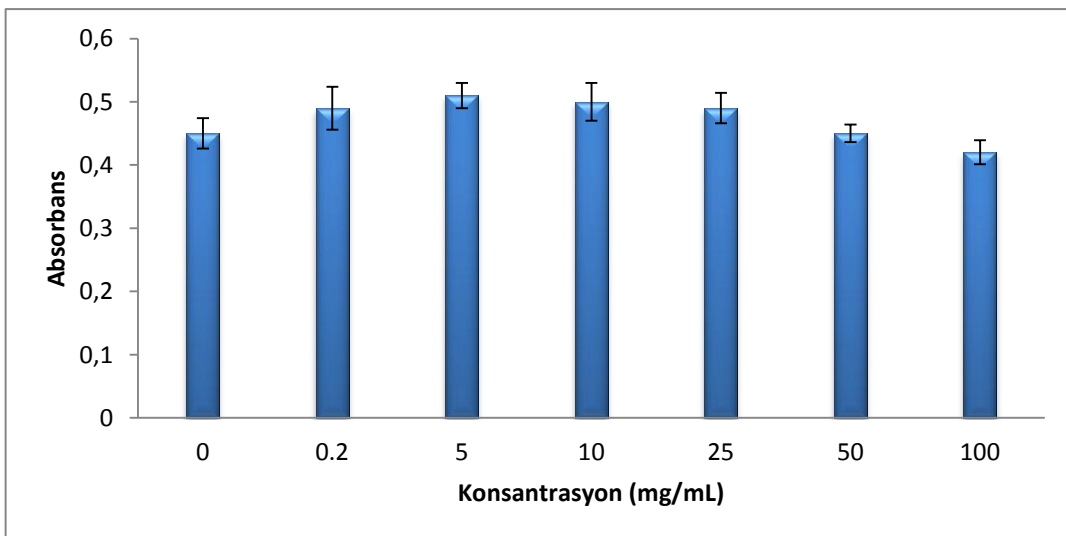
Çizelge 4. 14’de ise konjugatın aynı konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine toksik etkisi incelenmiştir. İncelenen bu konsantrasyonlarda MCF-7 hücreleri üzerinde de toksik etki olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

Çizelge 4. 14 LPA-PAA konjugatının farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerinin canlılığına etkisi



LPG-PAA konjugatının J774 fare makrofaj hücreleri üzerindeki toksik etkisi MTT yöntemi ile incelenmiş ve konjugatın J774 fare makrofaj hücreleri üzerine toksik etkisi sadece PAA kullanılan konsantrasyonlarla benzerlik göstermiştir. Çizelge 4. 15’de görüldüğü gibi *in vivo* çalışmalarda kullanılan aşı formülasyonlarının fare makrofaj hücreleri üzerine herhangi bir toksik etkisi olmadığı belirlenmiştir.

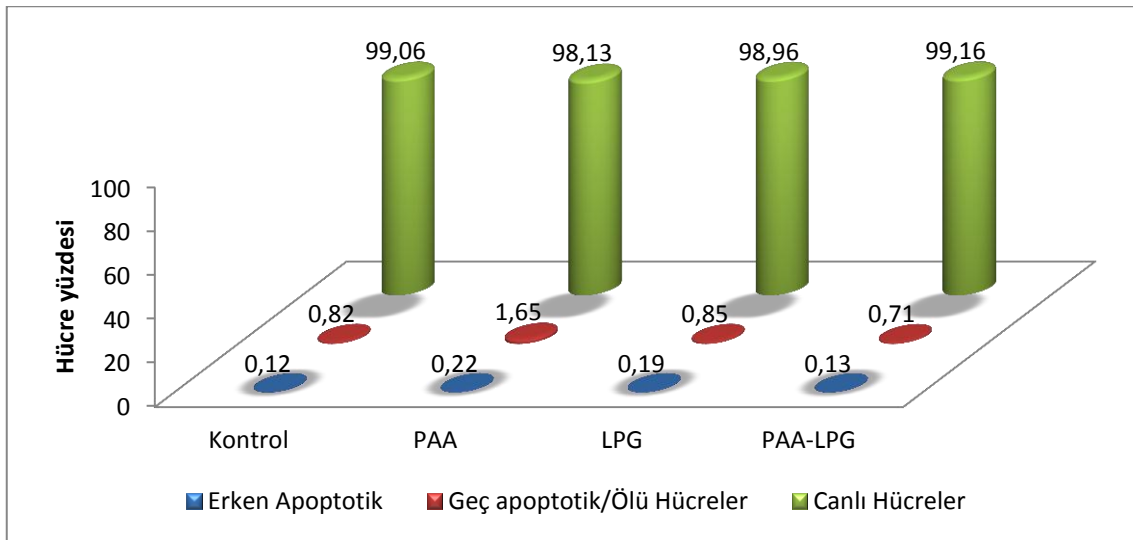
Çizelge 4. 15 LPA-PAA konjugatının farklı konsantrasyonlarının J774 fare makrofaj hücre canlılığına etkisi



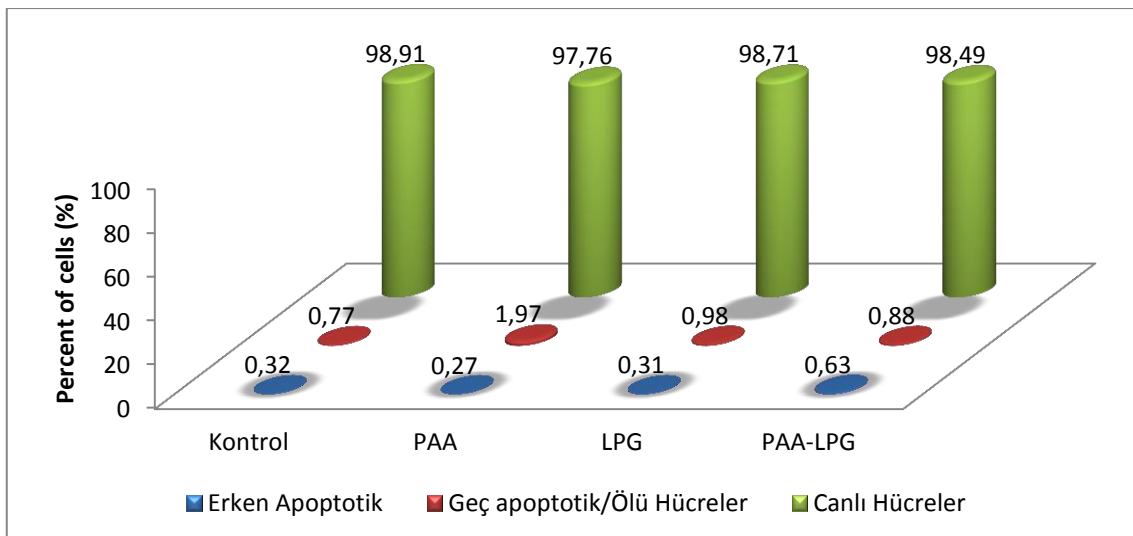
4.4.4 PAA, İzole Edilen LPG ve PAA-LPG Konjugatının L929 ve J774 Hücreleri Üzerindeki Toksisitesinin Flow Sitometrik Olarak İncelenmesi

Çizelge 4. 16'da PAA, LPG ve konjugatın incelenen konsantrasyonlarda J774 hücrelerinin canlılığına etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi incelenen bileşikler hücreler üzerine toksik etki göstermemiş, hücrelerde apoptoz veya nekroza neden olmamıştır. Hücre canlılıklarında da kontrol ile anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Çizelge 4. 17'de ise PAA, LPG ve konjugatın incelenen konsantrasyonlarda L929 hücrelerinin canlılığına etkisi verilmiştir.

Çizelge 4. 16 LPG, PAA ve LPG-PAA konjugatının J 774 hücreleri üzerindeki toksik etkisinin flow sitometrik olarak incelenmesi



Çizelge 4. 17 LPG, PAA ve LPG-PAA konjugatının L929 hücreleri üzerindeki toksik etkisinin flow sitometrik olarak incelenmesi



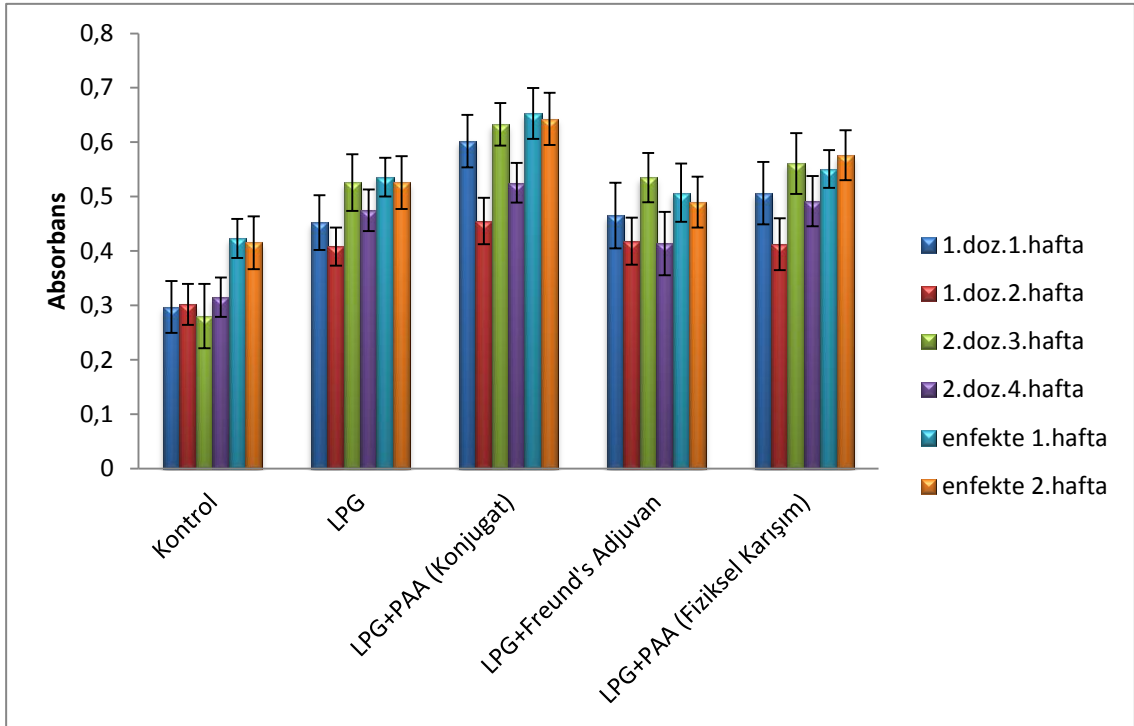
J774 hücrelerinde olduğu gibi incelenen bileşikler L929 hücreleri üzerinde toksik etki göstermemiş, hücrelerde apoptoz veya nekroza neden olmamıştır. Hücre canlılıklarında kontrol ile anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

4.5 In Vivo Deney Hayvanı Çalışmaları

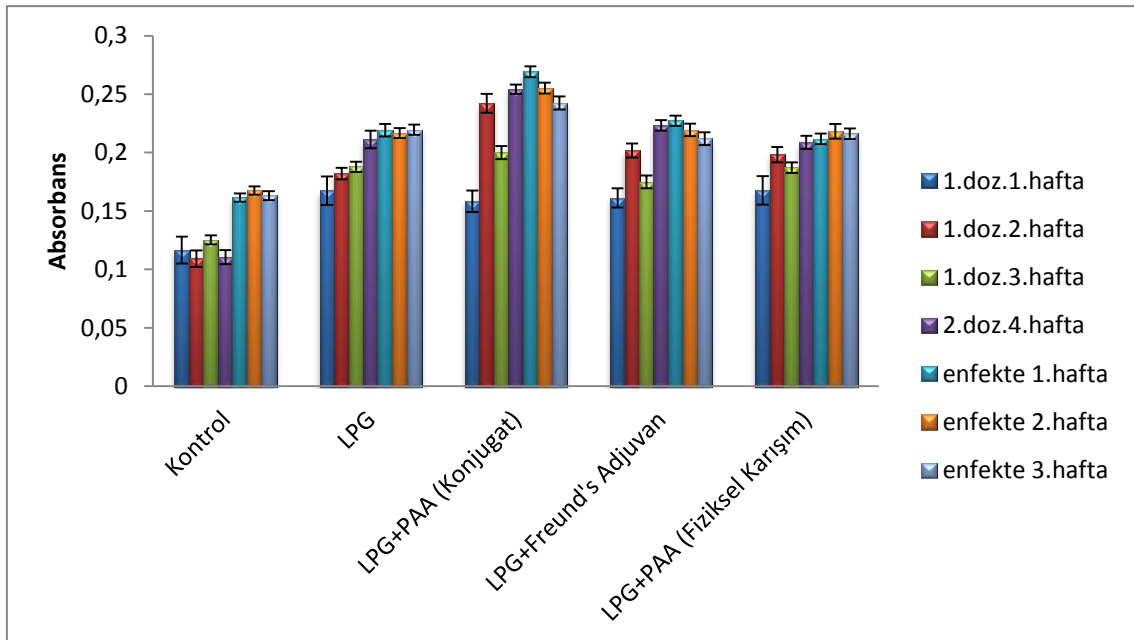
4.5.1 ELISA Yöntemi ile Serumdaki İmmünoglobulin Miktarlarının Tayini

ELISA testi sonucunda 10 ve 35 µg LPG içeren çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmiş BALB/c fare gruplarından elde edilen absorbans değerleri Çizelge 4. 18 ve Çizelge 4. 19’da sunulmuştur. Daha önce açıklandığı gibi ilk immünizasyondan sonra fareler aynı doz aşı adayı ile tekrar immünize edildi. İkinci immünizasyondan sonra ise fareler *L. donovani* promastigotları ile enfekte edilmiştir. Kontrol grubunda antijen ile immünizasyon yapılmadığında antikor seviyesi değişmezken, enfeksiyondan sonra verilen parazitlerden dolayı düşük seviyede antikor üretimi belirlendi. Tüm immünize gruplarda birinci hafta antikor seviyesinde kontrole göre artış gözlemlendi. İkinci immünizasyondan sonra üçüncü hafta serum örneklerinde tekrar antikor seviyesinde artış meydana geldi (ikincil immün yanıt). Tüm aşı adayları arasında ise antikor seviyesinde en belirgin artış LPG-PAA konjugatlarının olduğu grupta gözlemlendi. Freund’s adjuvanı, genellikle mikobakteriler gibi öldürülmüş mikroorganizmaları içeren yağ ve su emülsiyonu olup immün sistemi uyarmaktadır. Ancak şekilde görüldüğü gibi Freund’s adjuvanı ile beraber verilen LPG, polimer konjuge edilmiş LPG (konjugat) kadar yüksek verimlilikte antikor üretimini sağlayamamıştır. Aynı zamanda LPG’in konjuge edilmeden polimer ile karıştırılarak verilen aşı formülasyonunun da (fiziksel karışım) yüksek bir immünite sağladığı tespit edilmiş, ancak absorbans konjugat ile immünize edilen farelerdeki kadar yüksek olamamıştır. Son olarak tüm immünize gruplarda enfeksiyondan sonra antileishmanial antikor seviyesinde artış gözlenmiştir. Benzer olarak LPG-PAA konjugat grubunda diğer aşı adaylarına göre antikor seviyesindeki artış daha fazladır. Aşı adayı grupları arasında yapılan istatistik analizleri sonucunda LPG-PAA konjugat içeren grup, diğer gruplardan anlamlı olarak farklı çıkmıştır (10 µg LPG için P değeri = 0.014, 35 µg LPG için P değeri = 0.026).

Çizelge 4. 18 10 µg LPG içeren çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmiş BALB/c fare serumlarındaki LPG'ye karşı polivalen antikor seviyeleri



Çizelge 4.19 35 µg LPG içeren çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmiş BALB/c fare serumlarındaki LPG'ye karşı IgG antikor seviyeleri



Böylece fare serum örneklerinde ELISA yöntemi ile antileishmanial antikor incelenmesi sonucunda kontrol grubundan farklı olarak tüm immünize gruplarda antileishmanial

antikor varlığı tespit edildi. Tüm immünize gruplarda ikinci immünizasyondan sonra birinci immünizasyona göre absorbansta artış olduğu belirlendi. Ayrıca LPG-PAA konjugatı içeren gruplarda diğer immünize gruplara göre, antileishmanial antikor seviyesinin daha yüksek olduğu saptandı.

4.5.2 Fare Serum Örneklerindeki Antikor Varlığının IFAT (İndirekt Floresans Antikor Testi) ile İncelenmesi

Fare serum örneklerindeki antikor varlığı IFAT ile incelendiğinde kontrol grubunda incelenen 4 haftada da *Leishmania*'ya spesifik IgM antikor saptanmamıştır (Çizelge 4. 20). LPG içeren çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmeye çalışılan BALB/c farelerinde ise *Leishmania*'ya spesifik IgM antikor yanıtı tabloda gösterildiği gibi 2+'dır. İncelenen gruplar arasında en fazla floresan yoğunluğu LPG-PAA (konjugat) grubunun 2, 3 ve 4. haftasında ve LPG-PAA (fiziksel) grubunun 4. haftasında olmuştur. Sonuçlara göre antileishmanial antikor üretimi floresan yoğunluğuna göre en fazla LPG-PAA (konjugat) grubunda gözlemlendi ve bu da ELISA sonuçlarını desteklemektedir. Böylece tüm aşı adayı gruplarında LPG antijenik özellik göstermiş ve ancak farklı antikor seviyeleri belirlenmiştir.

Çizelge 4. 20 Çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmiş BALB/c fare serumlarındaki LPG spesifik IgM antikor seviyelerinin IFAT yöntemi ile incelenmesi

	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta
Kontrol				
LPG				
LPG + PAA(Konjugat)				
LPG + PAA(Fiziksel Karışım)				
LPG + Freund's Adjuvan				

Band Yoğunluğu

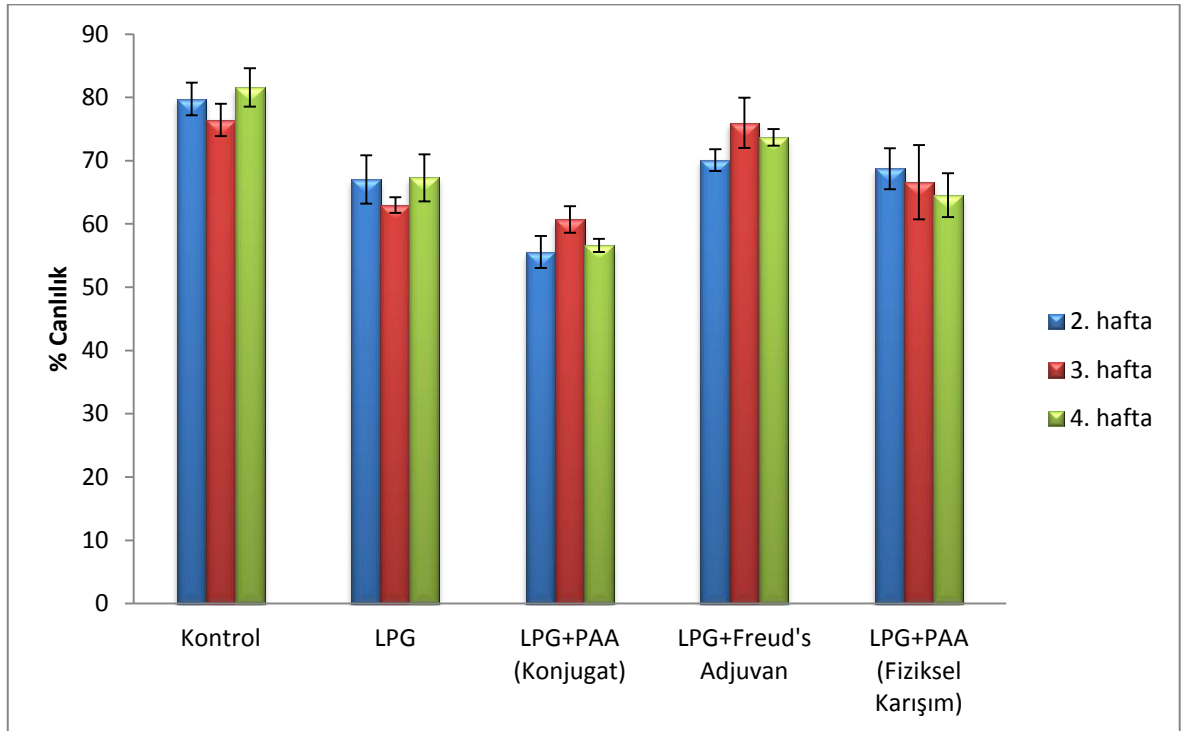


++++
+++
++
+
Negatif

4.5.3 Çeşitli Aşı Formülasyonları ile İmmünize Edilen BALB/c Fare Serumunun *in vitro* Ortamda *L. donovani* Promastigotlarının Canlılığı Üzerine Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

İmmünize ve kontrol grubundan alınan serumların *L. donovani* promastigotları üzerine antileishmanial etkisi incelendiğinde serum eklenmeyen kontrol grubunun canlılığına bağlı olarak fare serumu bulunan promastigotların canlılığındaki düşüş görülmektedir (Çizelge 4. 21). Buna göre LPG-PAA konjugatı içeren gruptan alınan serum örneklerinin *L. donovani* promastigotlarına karşı antileishmanial etkisi en fazladır. Antileishmanial antikor içermeyen kontrol grubunda ise kompleman proteinlerinden dolayı promastigot canlılığında azalma olduğu belirlendi. İmmünize gruplarda antileishmanial etkinin en fazla LPG-PAA konjugatında görülmesi, üretilen antikor miktarının en fazla bu grupta olmasından kaynaklanabilir.

Çizelge 4. 21 Çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmiş BALB/c fare serumlarının antileishmanial etkisi



4.5.4 Giemsa Boyama ve Mikro Kültür Yöntemi (MKY) ile Fare Periferik Kanında Parazit Varlığının ve Miktarının Tespit Edilmesi

Gimsa boyama ile periferik kanda yapılan incelemelerde duyarlılık oldukça düşüktür. Bunun nedeni kandaki parazit sayısının oldukça düşük sayıda olmasıdır. Bu nedenle mikrokültür yönteminde parazit sayısına göre Çizelge 4. 22'deki şekilde yapıldı. Bu yöntemin temeli kapiler tüp içinde mikroaerofilik ortamda bulunan hücre içi amastigotların 27°C'lik etüvde hareketli promastigotlara dönüşmesine dayanır. Mikrokültür yöntemi özellikle asemptomatik *Leishmania* enfeksiyonlarında bile oldukça duyarlıdır [428]. Yaptığımız çalışmalarda immünize gruplarda parazit yükünde azalma beklendiğinden parazit varlığını belirlemek Giemsa yöntemi ile oldukça zordur. Elde edilen sonuçlara göre Giemsa yöntemi ile periferik kanda tüm immünize gruplarda parazit belirlenememiştir. Fakat kontrol grubunda 2. haftadan itibaren Giemsa sonuçlarının pozitif olduğu belirlendi (Çizelge 4. 22). Tüm immünize gruplarda ve tüm haftalarda alınan kan örneklerinde Giemsa sonuçları negatif çıkmasına rağmen mikrokültür sonuçları pozitif çıkmıştır. Ancak incelenen gruplarda parazit yoğunluğuna göre farklıklar tespit edilmiştir (Çizelge 4. 22). Konjugat grubunda parazit sayısının en az olduğu, buna karşın kontrolde 6+ olduğu saptanmıştır.

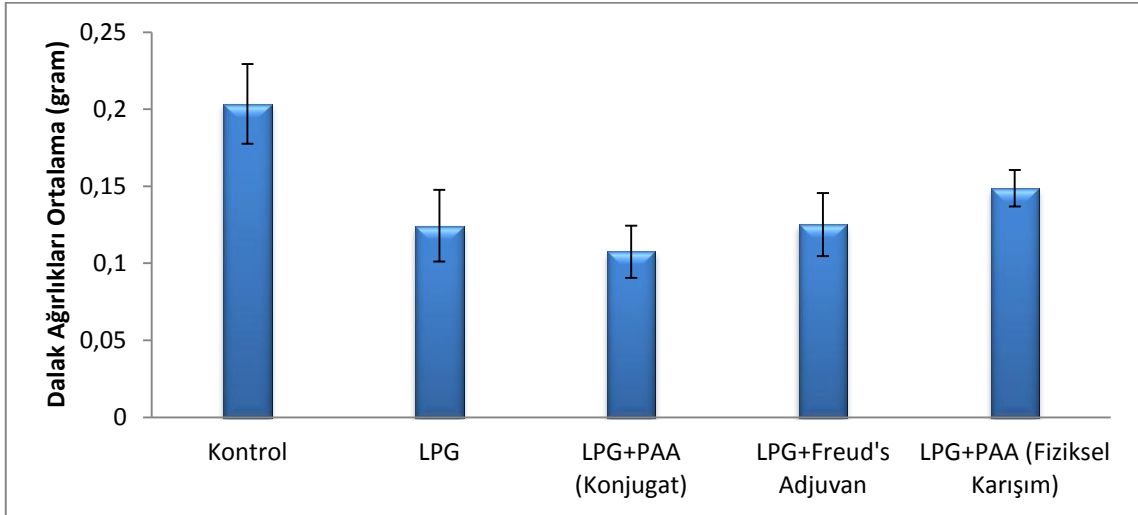
Çizelge 4. 22 Giemsa ve Mikrokültür yöntemi ile fare periferik kanında parazit derecelendirme sonuçları

	1. hafta		2. hafta		3. hafta		4. hafta	
	Giemsa	MCM	Giemsa	MCM	Giemsa	MCM	Giemsa	MCM
Kontrol	0	6+	2+	6+	2+	6+	3+	6+
LPG	0	2+	0	2+	0	2+	0	3+
LPG+PAA (Konjugat)	0	2+	0	2+	0	1+	0	1+
LPG+Freund's Adjuvan	0	2+	0	2+	0	3+	0	3+
LPG+PAA (Fiziksel Karışım)	0	2+	0	2+	0	2+	0	2+

4.5.5 Dalak Ağırlıklarının Tespit Edilmesi

VL'in en önemli klinik bulgularından biri dalak ağırlığının artmasıdır. 10 ve 35 µg LPG içeren çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmiş BALB/c fare gruplarından elde edilen dalak ağırlıkları ölçülmüş ve ortalamaları Çizelge 4. 23'te verilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarda özellikle LPG+PAA konjugatı ile immünize edilen gruplarda dalak ağırlığı kontrol grubunun yarısı kadardır. Aşı formülasyonlarının içerdiği LPG miktarı 35 µg olan farklı zamanda farklı gruplarla yapıldığından dalak ağırlıklarında farklılık görülmüştür. Fakat 10 ve 35 µg LPG içeren aynı aşı grupları arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p > 0,05$). Bu da LPG+PAA konjugat grubunda parazit yükünün oldukça düşük olduğunu göstermektedir. Ayrıca tüm immünize gruplarda kontrole göre dalak ağırlığında anlamlı bir düşüş belirlendi (Çizelge 4. 23).

Çizelge 4. 23 İmmünize ve kontrol grubu deney hayvanlarının dalak ağırlık ortalamaları

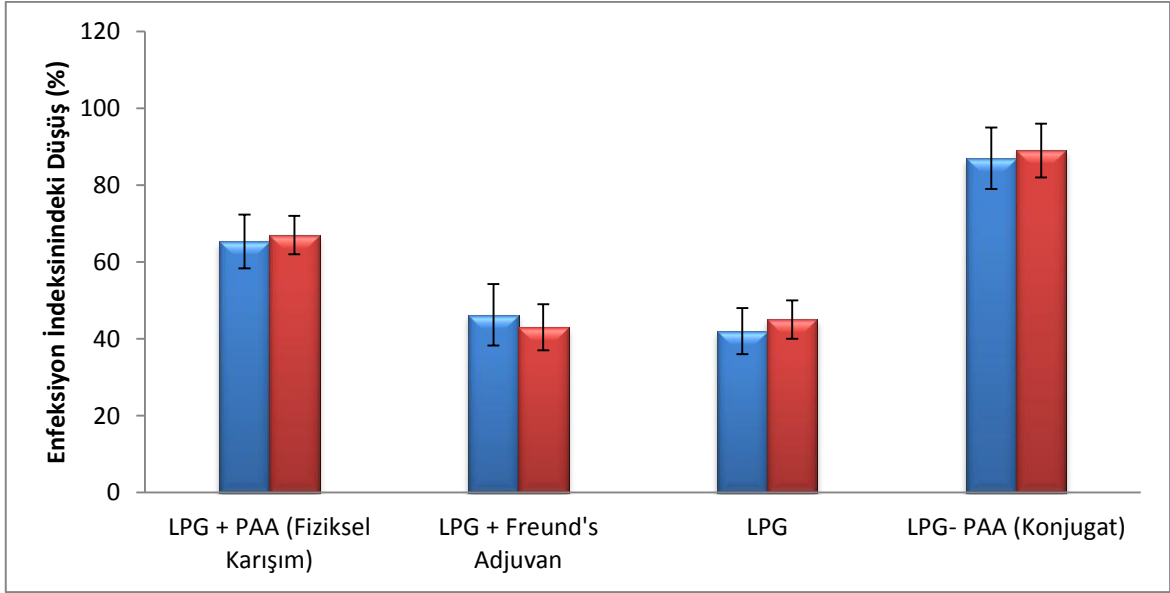


4.5.6 Peritoneal Makrofaj Hücrelerinin İzolasyonu ve *Leishmania* Promastigotları ile *In Vitro* Enfeksiyonu

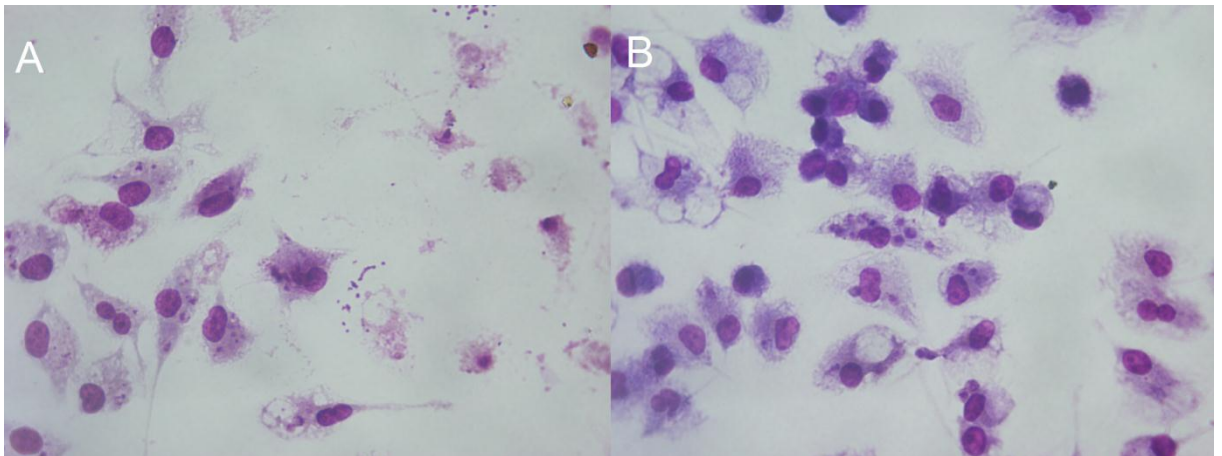
Enfekte makrofajların yüzdesi ve enfekte olmuş makrofaj başına düşen amastigot sayısı kontrol grubu ile kıyaslandığında immünize edilmiş gruplarda daha düşük olduğu belirlendi. Enfeksiyon indeksindeki en belirgin azalma LPG-PAA konjugatında (10 µg LPG için %87; 35 µg LPG için % 89) sonrasında ise LPG-PAA fiziksel karışım (10 µg LPG için %65,36; 35 µg LPG için %67), LPG+ Freund's Adjuvan grubu (10 µg LPG için %46,22; 35 µg LPG için %43) ile immünize edilmiş farelerde belirlendi (Çizelge 4. 25).

LPG-PAA konjugatı ile immünize edilen farelerden elde edilen makrofajlar en düşük enfekte makrofaj oranını ve makrofaj başına düşen amastigot sayısını gösterdi. Diğer immünize edilen farelerden elde edilen oranlar ile kıyaslandığında oluşan fark oldukça yüksektir ($P < 0,01$).

Çizelge 4. 24 10 ve 35 µg LPG içeren çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmiş BALB/c fare gruplarından *in vitro* enfekte peritoneal makrofajlarının enfeksiyon indekslerindeki düşüş yüzdeleri



LPG+PAA konjugat içeren grup ile diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($P < 0,01$). LPG ve LPG+ Freund's Adjuvan grupları arasında enfeksiyon indeksleri arasında belirgin bir düşüş farkı bulunmamaktadır.

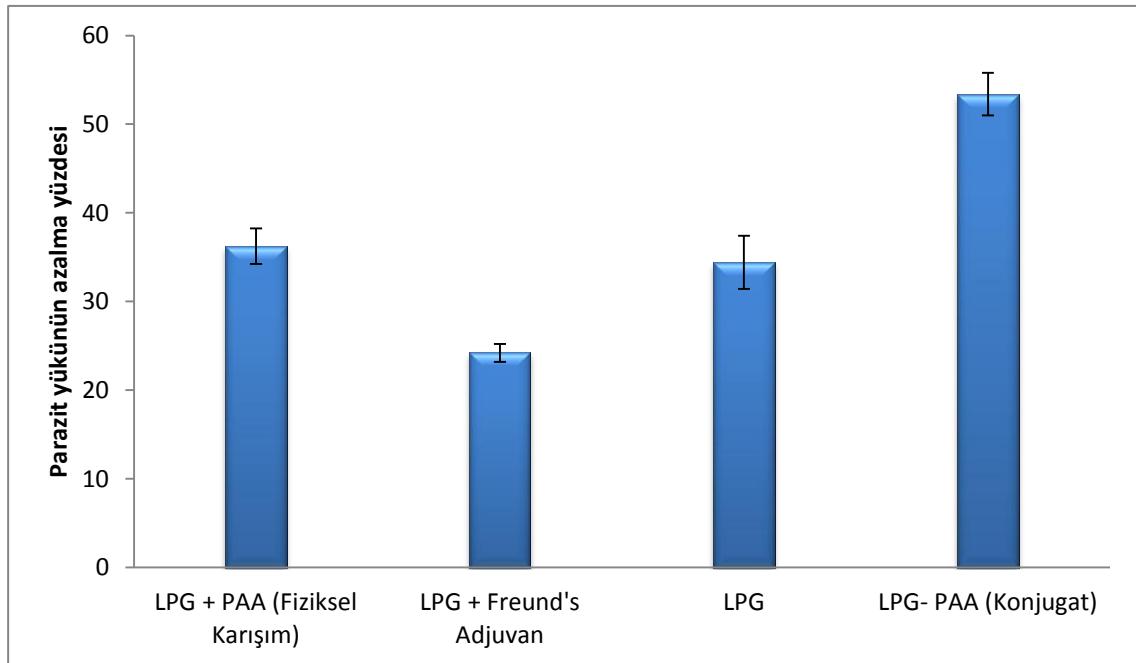


Şekil 4. 5 *Leishmania donovani* ile enfekte edilmiş periton makrofajları, LPG (A); Kontrol (B)

4.5.7 Karaciğer ve Dalaktan Yayma Hazırlanması ve Enfeksiyonun Değerlendirilmesi

Parazit yükü Leishman-Donovan Unit (LDU) kullanılarak hesaplandıktan sonra immünize gruplarda meydana gelen parazit yükündeki azalma Çizelge 4. 25’de gösterilmiştir. Aşı formülasyonlarının içerdiği LPG miktarı artırıldığı zaman, oluşan immün yanıtla ilgili olarak parazit yükünde anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir. Buna göre parazit yükünde en belirgin azalma % 81,17 ile 35 µg LPG içeren LPG + PAA konjugat grubunda gözlenmiştir. 10 µg LPG içeren grupta ise bu düşüş %53,37’dir. Ayrıca 35 µg LPG içeren LPG + PAA fiziksel karışımında % 55,2, sadece LPG ile immünize edilen grupta %44,93 son olarak LPG + Freund’s adjuvanı içeren grupta %65,8 parazit yükünde düşüş belirlenmiştir. 10 µg LPG içeren gruplarda ise LPG + PAA fiziksel karışımındaki düşüş % 36.23, sadece LPG ile immünize edilen grupta %34,40 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4. 25 Farklı formülasyonlarda immünize edilip enfekte edilen farelerdeki parazit yükünün azalma yüzde değeri.



4.5.8 İmmünize Fare Dalak Hücrelerinin IFN- γ , IL-2, IL-4 ve IL-10 Sitokin Üretimi

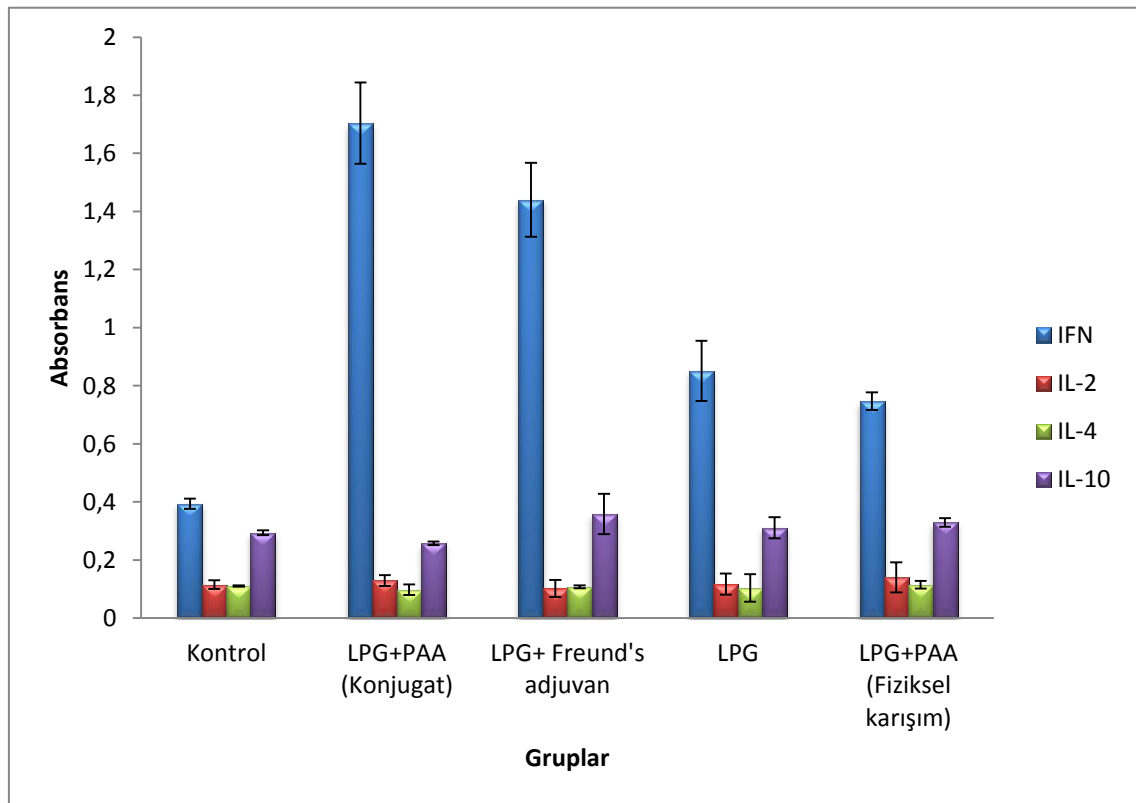
Çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilen farelerin dalak hücrelerinin süpernatantında ölçülen sitokin cevapları (IFN- γ , IL-2, IL-4 ve IL-10) incelenen aşı formülasyonlarının immün cevaba etkisini ortaya koymuştur.

Çizelge 4. 26’da görüldüğü gibi immünize farelerde IFN- γ seviyesi kontrole göre anlamlı ölçüde yüksek seviyededir. Özellikle LPG-PAA konjugatı ile immünize edilen farelerde IFN- γ en yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir. Ayrıca adjuvan grubunda da yüksek bir sitokin cevabı tespit edilmiştir.

IL-12 üretiminde ise kontrole kıyasla anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$). IL-4 Th2 tip hücre yanıtın göstergesi olan bir sitokindir. İmmünize gruplarda IL-4 ve IL-10 üretiminde kontrole göre herhangi bir artış olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

IFN- γ seviyesinin immünize edilen farelerde yüksek olması immün yanıtın T1 tipi olduğunu düşündürmekte, konjugat ile immünize farelerdeki leishmaniasise karşı koruma özelliklerini desteklemektedir. Bu da kontrolde farelerin iyileşmeme sebebini açıklayan önemli bir bulgudur. Konjugat grubunda ise bu durum tam tersi olup farelerdeki parazit yükündeki ciddi azalmayı desteklemektedir.

Çizelge 4. 26 İmmünize farelerden izole edilen dalak hücrelerinden IFN- γ üretimi



4.6 TARTIŞMA

Leishmaniasis, enfekte *Flebotomus* cinsi sineklerin kan emme sırasında *Leishmania* cinsi protozoan parazitleri memeli konaklara bulaştırması ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSO) belirlediği en önemli tropikal hastalıklar listesindeki 6 hastalıktan biridir. Dünyada 350 milyon insan leishmaniasise yakalanma riski altındadır. Bu hastalık 98 ülkede endemik olup enfekte kişilerin sayısı 12 milyondur [1]. Hastalık Türkiye'nin de ciddi halk sağlığı problemlerinden biri olup 20 milyon kişi bu hastalığın tehdidi altındadır. Ayrıca ülkemizde birçok bölgede hastalığın visseral ve özellikle de kutanöz formlarına rastlanmaktadır. Sağlık Bakanlığı istatistiklerine göre, yalnızca kütanöz leishmaniasis (KL) için her yıl yeni olgu sayısı yaklaşık 5.000 kişidir [2], [3]. Endemik komşu ülkelerden göç ile hastalığın daha da artması beklenmektedir. Hastalığın bu kadar yaygın olmasının en önemli sebepleri; hastalık etkenlerinde kullanılan ilaçlara karşı dirençliliğin gelişmesi, birçok memeli hayvanın hastalığın rezervuarı olması, küresel iklim değişiklikleri gibi nedenlerdir. Hastalığın tanısının konulmasındaki problemler, tedavisindeki zorluklar ve direnç gelişimi hastalık ile mücadelede etkin bir aşının gerekliliğini ortaya koymaktadır. Şimdiye kadar etkin bir aşının geliştirilememiş olması aşı çalışmalarının önemini artırmaktadır ve DSÖ tarafından da bu gereklilik vurgulanmaktadır [4], [5].

1940'lı yıllardan günümüze kadar hastalığa karşı etkin bir aşı geliştirilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların temelini farklı yaklaşımlar oluşturmaktadır. Bu yaklaşımlara uygun olarak aşı çalışmaları birinci, ikinci ve üçüncü nesil aşılar olarak gruplandırılmıştır. En ideal aşı organizmaya verildikten sonra herhangi bir hastalık oluşturma riski bulunmayan aşıdır. Bu açıdan ölü parazit aşıları oldukça önemlidir. Ancak yapılan çalışmalarda bu tür aşılarda etkinliğinin düşük olduğu ortaya çıkmıştır. Zayıflatılmış aşılar ise ölü aşılarından farklı olarak daha etkindir. Ancak bu gruptan olan aşılarda en büyük dezavantajı belli bir süre sonra organizmada var olan zayıflatılmış hastalık etkeninin kendini yeniden yapılandırarak, immun sistemin zayıfladığı durumlarda yeniden hastalık oluşturmalarıdır. Leishmaniasise karşı leishmanizasyon ile aşılama yıllar sonra parazitin yeniden aktifleşerek hastalık oluşturduğu belirlenmiştir. Leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde aynı zamanda rekombinant antijenler ile DNA

aşılarının etkinliği incelenmiş olmasına rağmen yeterli koruma sağlayamamıştır. Böylece 1940'lardan beri leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesi çalışmaları yapılmasına rağmen hala etkin bir aşı geliştirilememiştir.

Son zamanlarda yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda özellikle saflaştırılmış doğal antijenlere dayalı aşılarda önemi vurgulanırken, parazitin yüzey antijenlerinden özellikle lipofosfoglikan önem kazanmıştır.

Yapılan son çalışmalarda, leishmaniasise karşı geliştirilecek aşılarda kompleks doğal antijenlerden ve geliştirilmiş adjuvanlardan oluşması beklenmektedir [278]. Son zamanlarda karbonhidrat antijenlerin aşı çalışmalarında hedef yapılar olarak önemi giderek artmaktadır ve Haemophilus influenzae type B, Neisseria meningitidis, ve Streptococcus pneumoniae halihazırda rutin immünizasyon prosedürlerinde kullanılmaktadır [429], [430], [431], [432]. Polisakkaritler çoğunlukla heterozigot olup doğal kaynaklardan elde edilmesi zor olmasına rağmen karbonhidrat sentezindeki son teknolojiler yeni sentetik karbonhidrat aşılarda geliştirilmesine olanak sağlamaktadır [433]. Bu kompleks doğal antijenlerden özellikle LPG, *Leishmania*'nın yüzeyindeki baskın bir moleküldür [6]. LPG *Leishmania* yüzeyinde bulunan önemli bir virulans faktör olup parazitlerin yaşamasında ve enfektifliğinde önemli rollere sahiptir. LPG gibi hastalık etkenlerine özgü karbonhidratlardan özellikle de kompleks oligosakkaritlerin sentez metotları geliştikçe aşı adayları olarak dikkat çekmektedir. Bakterilere, HIV'e, malaria'ya ve meme ve prostat kanserlerine karşı sentetik oligosakkarit antijenlere dayalı aşılarda prelinik veya klinik geliştirme aşamasındadır [433]. Ancak LPG'nin etkin bir aşı adayı olması için uygun bir adjuvana ihtiyaç vardır. Alum hala insan aşılarda için dominant bir adjuvan olarak kalmaktadır. Bunun sebebi diğer adjuvan adaylarının reaktiflik, toksisite, değişkenlik veya yüksek maliyet gibi uygun olmayan özellikleridir. Ancak alum polisakkarit antijenler için göreceli olarak düşük adjuvan etkisine sahiptir [434]. Poliakrilik asit gibi polielektrolit polimerlerin ise, protein, doğal mikrobiyal polisakkaritler ve onların sentetik analogları gibi antijenler ile karıştırıldıklarında immün uyarıcı olarak görev yaptıkları ve bağışıklık yanıtını birkaç kat güçlendirdikleri bilinmektedir. Kendileri yeterince aktif olmayan bireysel bakteriyel veya viral antijenler, kimyasal sentetik polielektrolitlere bağlandığında güçlendirilmiş spesifik immün yanıtı uyarırlar [406].

Adjuvan etkisi gösteren polimerler leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde de önemli rol oynayabilir. Buna göre de; bu çalışmada *Leishmania* parazitlerinin en önemli yüzey komponenti olan ve son yıllarda aşı adayı olarak gösterilen LPG'yi immün uyarıcı özelliğe sahip PAA ile konjuge ederek aşı olarak etkinliğini inceledik. Özellikle de lipofosfoglikanın yapısında bulunan NH₂ grupları ile poliakrilik asitin COOH grupları arasında konjugat oluşturma'nın mümkün olması çalışmanın teorik olarak mümkün olacağını gösteren en önemli özelliklerden biridir.

Hedefe ulaşmak için, *Leishmania* parazitlerinin kültürü elde edilip büyük ölçekli kültür metotları geliştirildi. Daha sonra çoğaltılan kültürden biyomas elde edilip LPG izolasyonunda kullanıldı. Saflaştırılan LPG'nin polimer ile konjugasyonu ve karakterizasyonları gerçekleştirilip çeşitli hücre kültürlerinde MTT yöntemi ve flow sitometrik olarak toksisiteleri incelendi. Toksik olmadığı belirlenen farklı aşı formülasyonlarının BALB/c farelere enjeksiyonu yapıldı ve immün yanıtlar, ELISA, IFAT, sitokin ölçülmesi, Mikrokültür yöntemi, peritoneal makrofajların *in vitro* enfektifliğinin ölçülmesi, dalak ve karaciğer ağırlıklarının ölçülmesi, Leishman-Donovan Units (LDU) ile parazit yükünün belirlenmesi yöntemleri ile incelendi.

Leishmania parazitlerinden LPG'nin izolasyonu için, parazitlerin kültürde oldukça yüksek miktarlarda üretilmesi gerekmektedir. Diğer yandan mevcut klasik kültür yöntemleri yeterli sayıda parazit elde etmeye imkân vermemektedir. Ayrıca üreme faktörü olarak kullanılan FBS oldukça pahalıdır ve mevcut yöntemler yüksek miktarda parazit elde etmeyi sınırlandırmaktadır. Ayrıca LPG'nin ticari satışı yoktur ve sadece dünyanın sayılı laboratuvarında izole edilebilmektedir. Yüksek miktarda parazit kütlesi elde edebilmek amacıyla, çalışmalarda öncelikle kültür ortamında *Leishmania* parazitlerinin çoğalmasına ve biyokütle elde edilmesine etki eden çeşitli faktörler incelendi. Daha sonra büyük ölçekli kültür çalışmalarında kullanılmak üzere, beyin kalp infüzyon besiyerinin kullanılmasının ve ölçek büyütme ile çalkalamalı kültür metotlarının parazitlerin proliferasyonunu artırdığı gösterildi.

Büyük ölçekli kültür elde edildikten sonra, parazit biyomasından LPG'nin saflaştırılması ve karakterizasyonu Prof. Dr. Sam Turco'nun protokolleri kullanılarak yapıldı (REF. Olabilir). Ayrıca çalışmalarda kendisi de laboratuvarında bulunup elde edilen sonuçları

takip etti ve önerilerde bulundu. Saflaştırılan LPG ince tabaka kromatografisi, fenol sülfürik asit metodu ve Coomassie blue metodu gibi LPG'nin çeşitli parametrelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler ile incelenerek karakterize edildi ve literatüre uygun olarak LPG saf halde elde edildi. TÜBİTAK projesi dahilinde, Polimerik Biyomalzeme Grubu tarafından LPG ve polimerlerin konjugasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen konjugat ve PAA, GPC ile incelendiğinde ışık saçılması kromatogramında konjugatın pik alanının arttığı tespit edildi. Bu, polimerin molekül kütlelerinde bir artışın olduğunu göstermektedir. Viskozimetri dedektöründe ise konjugatın pik alanı PAA'ya göre oldukça azalmıştır. Bu da polimerin viskozitesine bağlı olarak sinyal oluşturan viskozimetri dedektöründen elde edilen pikin alanında azalmaya yol açmıştır. Tüm kromatogramlar göz önüne alındığında, konjugasyon sonrasında tüm dedektörlerdeki PAA pikinde meydana gelen değişimlerin PAA'ya LPG bağlanması sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir. Böylece ilk kez olarak bu çalışmada *Leishmania* parazitlerinden elde edilen LPG ile polimer konjugasyonu hazırlandı.

Elde edilen LPG, polimer ve konjugatların fare fibroblast (L929), insan meme kanser hücrelerinde (MCF-7) ve fare makrofaj hücrelerinde (J774) toksisiteyi literatürde yaygın kullanılan MTT yöntemi ve son yıllarda güncel olarak toksisite ve apoptoz belirlenmesinde kullanılan flow sitometrik yöntemler ile incelendi. İncelenmeler sonucunda bu bileşiklerin incelenen konsantrasyonlarda (*in vivo*'da kullanılan dozlar) toksik etki göstermediği, MTT yöntemi ve flow sitometrik olarak gösterildi.

Toksik etkisi olmadığı tespit edilen aşı adaylarının etkinliği, ELISA, IFAT, MKY yöntemlerinin yanı sıra aşı çalışmalarında kullanılan güncel yöntemler olan peritoneal makrofajların *in vitro* enfektifliğinin ölçülmesi, dalak ağırlıklarının ölçülmesi, Leishman-Donovan Units (LDU) ile parazit yükünün ölçülmesi ve dalak hücrelerinden sitokin üretiminin tespit edilmesi yöntemleri ile de incelendi.

BALB/c modellerine, LPG-PAA konjugatı, tek başına LPG, LPG'nin PAA ile fiziksel karışımı ve literatürde etkinliği bilinen bir Freund'un adjuvanı ile LPG'nin beraber enjeksiyonu yapılmış ve farelerde oluşan IgG miktarları ELISA yöntemi ile tayin edilmiştir. Ticari olarak satılan ELISA kitleri, *Leishmania* parazitlerinin LPG'den farklı moleküllerine karşı olduğu için bu kitler kullanılarak LPG'ye karşı oluşan antikoru

ölçmek mümkün değildir. Bu nedenle LPG'ye karşı farelerde oluşan antikor miktarlarını tayin etmeye imkan sağlayacak LPG-spesifik ELISA yöntemi geliştirildi. Elde edilen sonuçlara göre, LPG, konjugat ve fiziksel karışım enjekte edilen fare gruplarındaki antikor miktarının, kontrole göre daha yüksek olduğu, ayrıca LPG-polimer konjugatı içeren gruplarda diğer immünize gruplara göre, antileishmanial antikor seviyesinin daha yüksek olduğu saptandı. Böylece geliştirdiğimiz ELISA protokolünün LPG'ye karşı oluşan antikoru tayin edilmesinde ELISA kiti olarak kullanılmasının mümkün olduğu gösterildi. Bu sonuçlar, LPG'nin bundan sonraki çalışmalarda da tanı kiti olarak kullanımında rol oynayabilir.

IFA testinde ise kontrol grubunda incelenen 4 haftada da *Leishmania*'ya spesifik IgM antikoru saptanmazken, LPG içeren çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmeye çalışılan BALB/c farelerinde *Leishmania*'ya spesifik IgM antikor yanıtı belirlendi. İncelenen gruplar arasında en fazla floresan ışıma yoğunluğu ise LPG-PAA (konjugat) grubunun 2, 3, 4. haftasında ve LPG-PAA (fiziksel) grubunun 4. haftasında gözlenmiş, bu da elde edilen ELISA sonuçlarını desteklemiştir. Böylece tüm aşı adayı gruplarında LPG antijenik özellik göstermiş ve adjuvan özelliğine göre de farklı antikor seviyeleri belirlenmiştir.

İmmünize ve kontrol grubundan alınan serum örneklerinin *L. donovani* promastigotları üzerine antileishmanial etkisinin *in vitro* incelenmesi sonucunda, LPG-PAA konjugatı içeren gruptan alınan serum örneklerinin, *L. donovani* promastigot canlılığına en fazla etkiyi gösterdiği tespit edildi. Antileishmanial antikor içermeyen kontrol grubunda ise hiçbir serum örneği ilave edilmeyen gruba göre parazit canlılığındaki azalmanın, kompleman proteinlerine bağlı olduğu düşünülmektedir. İmmünize gruplarda antileishmanial etkinin en fazla LPG-PAA konjugatında görülmesi, üretilen antikor miktarının en fazla bu grupta olmasından kaynaklanmaktadır. Sonuçlar ELISA ve IFA testinde elde edilen sonuçları destekler niteliktedir. Böylece aşı adayları olan konjugatın etkinliğini belirlemek amacı ile incelenen serolojik yöntemler konjugatın kontrol grubu ve diğer aşı gruplarına göre daha yüksek IgG ve IgM miktarlarına sahip olduğunu göstermiştir. Literatürde de polimerler ile yapılan çalışmalarda, immünojen moleküllere bağlanan polielektrolitlerin B hücre yanıtını artırdığı gösterilmiştir [406].

Daha sonra ise farklı aşı grupları ile immünize edilen fareler *Leishmania* parazitleri ile enfekte edilerek aşı adaylarının koruma özellikleri incelendi. Enfekte farelerin yaşadıkları süre boyunca parazitlerin varlığı MKY ve Giemsa yöntemi ile incelendi. Öldürülen farelerde ise aşı adaylarının koruma özellikleri, dalak ağırlıkları, Leishman-Donovan Units (LDU) ve peritonel makrofajların *in vitro* enfektifliği parametrelerine göre değerlendirildi.

Giemsa boyama ve Mikro Kültür Yöntemi (MCM) ile yapılan incelemelere göre, tüm immünize gruplarda ve tüm haftalarda alınan kan örneklerinde, Giemsa sonuçlarının negatif çıkmasına rağmen mikrokültür sonuçları pozitif çıkmıştır. Ancak örnekteki parazit sayıları incelendiğinde aşılardan farelerin kanındaki parazit sayılarının kontrol grubuna göre daha düşük miktarda olduğu gösterildi.

MKY ile kandaki parazit sayısı çok düşük olsa bile canlı parazit varlığı belirlenebilmektedir. Bu yöntemin en büyük avantajı aşı çalışmalarında deney hayvanlarını sakrifiye etmeden, non-invaziv olarak elde edilen örneklerde, parazit yükünü uzun süre takip etmeye olanak sağlamasıdır. Böylece ilk kez olarak deney hayvanlarında mikrokültür yönteminin uygulanmasının avantajı ortaya konulmuştur.

VL'nin en önemli klinik bulgularından biri dalak ve karaciğer ağırlığının artmasıdır. Buna göre de aşı çalışmalarında, aşının etkinliğinin belirlenmesinde dalak ve karaciğerin büyüklüğünün ölçülmesi önemli parametrelerden biridir. Parazit yükünün artmasına bağlı olarak dalakta büyüme meydana gelmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlarda özellikle LPG+PAA konjugatı ile immünize edilen gruplarda dalak ağırlığı, kontrol grubunun yarısı kadardır. Ayrıca tüm immünize gruplarda dalak ağırlığında kontrole göre düşüş olduğu belirlenmiştir.

In vitro peritonel makrofaj modellerinde parazit yükündeki azalma, aşı aracılığıyla sağlanan koruyucu immün yanıtı gösteren önemli bir parametre olduğundan, farelerin peritonel makrofajları izole edilerek enfeksiyon indeksindeki azalmalar incelendi. Periton makrofajlarında enfeksiyon indeksindeki en belirgin azalma LPG-PAA konjugatında (10 µg LPG için %87; 35 µg LPG için %89) sonrasında ise LPG-PAA fiziksel karışım (10 µg LPG için %65,36; 35 µg LPG için %67), LPG+ Freund's Adjuvan grubu (10 µg LPG için %46,22; 35 µg LPG için %43) ile immünize edilmiş aşılarla belirlendi. Bu

sonuçlar da aşı aracılı koruyucu immün yanıtın en iyi LPG-PAA konjugatı ile aşılanan fare gruplarında olduğunu göstermektedir.

Leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde kullanılan ve aşı aracılığıyla sağlanan koruyucu immün yanıtı gösteren önemli bir diğer parametre de Leishman-Donovan unittir. Bu parametre ile dalak ve karaciğerdeki parazit yükünü hesaplamak mümkün olmaktadır [9]. Buna göre parazit yükünde en belirgin azalma % 81,17 ile 35 µg LPG içeren LPG + PAA konjugat grubunda gözlenmiştir. 10 µg LPG içeren grupta ise bu düşüş % 53,37'dir. Ayrıca 35 µg LPG içeren LPG + PAA fiziksel karışımında % 55,2, sadece LPG ile immünize edilen grupta % 44,93, son olarak ta LPG + Freund's adjuvanı içeren grupta % 65,8 parazit yükünde düşüş belirlenmiştir. 10 µg LPG içeren gruplarda ise LPG + PAA fiziksel karışımındaki düşüş % 36,23 sadece LPG ile immünize edilen grupta % 34,40 olarak belirlenmiştir. Böylece aşı formülasyonlarının içerdiği LPG miktarı artırıldığı zaman, oluşan immün yanıtı bağlı olarak parazit yükünde anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir. Elde edilen bu sonuçlar literatürde tek başına LPG kullanılması ile ilgili önceden yapılmış çalışmaları desteklemekte ve uygun bir adjuvanın etkinliği artırmadaki önemini göstermektedir. Fiziksel karışım grubunda tek başına LPG'ye göre daha yüksek bir immün cevap oluşması, polimer ile kovalent bağlanma olmasa bile adjuvan etkisinin olduğunu göstermektedir. LPG, adjuvan özelliğinin yanı sıra taşıyıcı olarak görev yapmış ve LPG'nin vücuttaki yarı ömrünü artırmış da olabilir.

Sitokin değerleri ölçüldüğünde ise INF-γ seviyesinin kontrol grubunda düşük, aşı gruplarında ise yüksek olması, aşılanan farelerde immün yanıtın Th1 yönünde olabileceğini göstermektedir. Bu da kontrolde farelerin iyileşmeme sebebini açıklayan önemli bir bulgudur. Konjugat grubunda ise bu durum tam tersi olup farelerdeki parazit yükündeki ciddi azalmayı desteklemektedir.

Serolojik, parazitolojik ve immünolojik yöntemler ile incelenmesi sonucunda aşı adayı olan LPG-polimer konjugatının diğer aşı gruplarına ve kontrole kıyasla aşı etkinliğinin tüm parametrelere göre daha yüksek olduğu tespit edildi.

Böylece bu çalışmada tezin amacına uygun olarak şimdiye kadar aşı geliştirilmesi için kullanılan yaklaşımlardan farklı olarak polimere dayalı yeni bir yaklaşımla geliştirilerek ilk kez olarak LPG-PAA konjugatının antileishmanial aşı özelliği ortaya çıkartılmıştır.

Elde edilen bu sonuçların leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde bundan sonraki çalışmalara ışık tutacak yeni bir yaklaşımın öncüsü olacağını düşünmekteyiz.

SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuç Değerlendirmesi

Bu çalışmada tezin amacına uygun olarak, şimdiye kadar aşı geliştirilmesi için kullanılan yaklaşımlardan farklı olarak polimere dayalı yeni bir yaklaşım geliştirilerek ilk kez LPG-PAA konjugatının antileishmanial aşı özelliği ortaya çıkartılmıştır. Bu amaçla *Leishmania* parazitlerinden LPG izolasyonu, saflaştırılması, karakterizasyonu, LPG-PAA konjugatının toksisite çalışmaları ve aşı etkinliğinin ELISA, IFAT, MKY yöntemlerinin yanı sıra aşı çalışmalarında kullanılan güncel yöntemler olan peritoneal makrofajların *in vitro* enfektifliğinin ölçülmesi, dalak ağırlıklarının ölçülmesi, Leishman-Donovan Units (LDU) ile parazit yükünün ölçülmesi ve dalak hücrelerinden sitokin üretiminin tespit edilmesi yöntemleri ile aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

1. Parazitlerden LPG elde etmek için büyük miktarda parazit biyomasi gerektiğinden büyük ölçekli kültür optimizasyonu sağlandı ve ölçek büyütme ile kültürün büyük miktarda çoğaltılması yöntemi geliştirildi.
2. Parazit biyomasi elde edildikten sonra LPG'nin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapıldı. Ticari olarak satılmayan ve dünyanın sayılı laboratuvarlarında üretimi olan LPG ülkemizde ise ilk kez olarak saf halde elde edildi.
3. Daha sonra elde edilen LPG, PAA ve konjugatların fare fibroblast (L929), insan meme kanser hücrelerinde (MCF-7) ve fare makrofaj hücrelerinde (J774)

incelenen konsantrasyonlarda toksik etki göstermediği MTT yöntemi ve flow sitometrik olarak gösterildi.

4. Ticari olarak satılan ELISA kitleri, *Leishmania* parazitlerinin LPG'den farklı moleküllerine karşı olduğu için bu kitler kullanılarak LPG'ye karşı oluşan antikor ölçmek mümkün olmadığı için LPG'ye karşı farelerde oluşan antikor miktarlarını tayin etmeye imkan sağlayacak LPG-spesifik ELISA yöntemi geliştirildi. Elde edilen sonuçlara göre, LPG, konjugat ve fiziksel karışım enjekte edilen fare gruplarındaki antikor miktarının, kontrole göre daha yüksek olduğu, ayrıca LPG-polimer konjugatı içeren gruplarda diğer immünize gruplara göre, antileishmanial antikor seviyesinin daha yüksek olduğu saptandı.
5. IFA testinde ise kontrol grubunda incelenen 4 haftada da *Leishmania*'ya spesifik IgM antikor saptanmazken, LPG içeren çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilmeye çalışılan BALB/c farelerinde *Leishmania*'ya spesifik IgM antikor yanıtı belirlendi. İncelenen gruplar arasında en fazla floresan ışıma yoğunluğu ise LPG-PAA (konjugat) grubunun 2, 3, 4. haftasında ve LPG-PAA (fiziksel) grubunun 4. haftasında gözlemlendi.
6. İmmünize ve kontrol grubundan alınan serum örneklerinin *L. donovani* promastigotları üzerine antileishmanial etkisinin *in vitro* incelenmesi sonucunda, LPG-PAA konjugatı içeren gruptan alınan serum örneklerinin, *L. donovani* promastigot canlılığına en fazla etkiyi gösterdiği tespit edildi.
7. Enfekte edilen farelerin Giemsa boyama ve MKY ile yapılan incelemelere göre, tüm immünize gruplarda ve tüm haftalarda alınan kan örneklerinde, Giemsa sonuçları negatif çıkmasına rağmen mikrokültür sonuçları pozitif çıkmıştır. Ancak örnekteki parazit sayıları incelendiğinde aşılanan farelerin kanındaki parazit sayılarının kontrol grubuna göre daha düşük miktarda olduğu gösterildi. Ayrıca MKY'nin aşı deneylerinde mevcut yöntemlerden farklı olarak fareleri öldürmeden parazit yükünü tayin etmeye imkan sağladığı tespit edildi.

8. LPG+PAA konjugatı ile immünize edilen gruplarda dalak ağırlığının, kontrol grubunun yarısı kadar olduğu tespit edildi. Ayrıca tüm immünize gruplarda dalak ağırlığında kontrole göre düşüş olduğu belirlendi.
9. Periton makrofajlarında enfeksiyon indeksindeki en belirgin azalma LPG-PAA konjugatında (10 µg LPG için %87; 35 µg LPG için %89), sonrasında ise LPG-PAA fiziksel karışım (10 µg LPG için %65,36; 35 µg LPG için %67), LPG+ Freund's Adjuvan grubu (10 µg LPG için %46,22; 35 µg LPG için %43) ile immünize edilmiş farelerde belirlendi. Bu sonuçlar da aşı aracılı koruyucu immün yanıtın en iyi LPG-PAA konjugatı ile aşılanan fare gruplarında olduğunu göstermektedir.
10. Leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde kullanılan ve önemli bir parametre olan Leishman-Donovan unite göre parazit yükünde en belirgin azalma % 81,17 ile 35 µg LPG içeren LPG + PAA konjugat grubunda gözlenmiştir. 10 µg LPG içeren grupta ise bu düşüş % 53,37'dir. Ayrıca 35 µg LPG içeren LPG + PAA fiziksel karışımında % 55,2, sadece LPG ile immünize edilen grupta % 44,93, son olarak ta LPG + Freund's adjuvanı içeren grupta % 65,8 oranında parazit yükünde düşüş belirlenmiştir. 10 µg LPG içeren gruplarda ise LPG + PAA fiziksel karışımındaki düşüş % 36,23, sadece LPG ile immünize edilen grupta % 34,40 olarak belirlenmiştir. Böylece aşı formülasyonlarının içerdiği LPG miktarı artırıldığı zaman, oluşan immün yanıtı bağli olarak parazit yükünde anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir.
11. Sitokin incelenmesi ile konjugat grubunda IFN-γ seviyesinin yüksek olması, immün yanıtın Th1 yönünde olduğunu göstermektedir.

5.2 Öneriler

Elde edilen sonuçlara dayanarak;

1. İleride parazitin farklı antijenlerinin elde edilmesi için biyomas elde edilmesinde aşamalı büyütme ve çalkalamalı kültür yöntemleri kullanılabilmesi,
2. Mikrokültür yöntemi kullanılarak aşı deneylerinde mevcut yöntemlerden farklı olarak fareleri öldürmeden parazit yükünün tayin edilmesi,
3. Çeşitli amaçlarla LPG'nin elde edilmesinde optimize edilen bu protokolün uygulanması,
4. LPG-polimer konjugat yaklaşımı kullanılarak LPG'nin yanı sıra aşı adayı olarak önemli olan diğer *Leishmania* molekülleri ile de polimere dayalı aşı çalışmalarının yapılması,
5. Elde edilen aşının bundan sonraki aşamada leishmaniasisin rezervuarı olan ve epidemiyolojisinde önemli bir rol oynayan köpekler üzerinde denenmesi ve ileride veterinerlikte de kullanılabilmesi,
6. Dünyada az sayıda laboratuvarıda izole edilen ve ülkemizde ise ilk kez olarak elde edilen LPG'nin ileride *Leishmania* tanı kitlerinde kullanılabileceği önerilmektedir

KAYNAKLAR

- [1] Allahverdiyev, A.M. Bagirova, M. Elcicek, S. Koc, R.C. Baydar, S.Y. Findikli, N. ve Oztel, O.N., (2011). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new host cell in latent leishmaniasis", *Am J Trop Med Hyg*, 85: 535-539.
- [2] Uzun, S. Durdu, M. Culha, G. Allahverdiyev, A.M. ve Memisoglu, H.R., (2004). "Clinical features, epidemiology, and efficacy and safety of intralesional antimony treatment of cutaneous leishmaniasis: recent experience in Turkey", *J Parasitol*, 90: 853-859.
- [3] Uzun, S. Uslular, C. Yucel, A. Acar, M.A. Ozpoyraz, M. ve Memisoglu, H.R., (1999). "Cutaneous leishmaniasis: evaluation of 3,074 cases in the Cukurova region of Turkey", *Br J Dermatol*, 140: 347-350.
- [4] Claborn, D.M., (2010). "The biology and control of leishmaniasis vectors", *J Glob Infect Dis*, 2: 127-134.
- [5] Romero, G.A. ve Boelaert, M., (2010). "Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review", *PLoS Negl Trop Dis*, 4: e584.
- [6] Turco, S.J. ve Descoteaux, A., (1992). "The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites", *Annu Rev Microbiol*, 46: 65-94.
- [7] McNeely, T.B. Rosen, G. Londner, M.V. ve Turco, S.J., (1989). "Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*", *Biochem J*, 259: 601-604.
- [8] Tonui, W.K. Mbatia, P.A. Anjili, C.O. Orago, A.S. Turco, S.J. Githure, J.I. ve Koech, D.K., (2001). "Transmission blocking vaccine studies in leishmaniasis: II. Effect of immunisation using *Leishmania major* derived 63 kilodalton glycoprotein, lipophosphoglycan and whole parasite antigens on the course of *L. major* infection in BALB/c mice", *East Afr Med J*, 78: 90-92.
- [9] Nagill, R. ve Kaur, S., (2010). "Enhanced efficacy and immunogenicity of 78 kDa antigen formulated in various adjuvants against murine visceral leishmaniasis", *Vaccine*, 28: 4002-4012.

- [10] Al-Mutawakel, K. Scutaru, C. Shami, A. Sakr, M. Groneberg, D. ve Quarcoo, D., (2010). "Scientometric analysis of the world-wide research efforts concerning Leishmaniasis", *Parasites & vectors*, 3: 14.
- [11] Mishra, B.B. Kale, R.R. Singh, R.K. ve Tiwari, V.K., (2009). "Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis", *Fitoterapia*, 80: 81-90.
- [12] Descoteaux, A. ve Turco, S.J., (2002). "Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection", *Microbes Infect*, 4: 975-981.
- [13] Saraiva, E.M. Pinto-da-Silva, L.H. Wanderley, J.L.M. Bonomo, A.C. Barcinski, M.A. ve Moreira, M.E.C., (2005). "Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers", *Experimental Parasitology*, 110: 39-47.
- [14] McConville, M.J. de Souza, D. Saunders, E. Likic, V.A. ve Naderer, T., (2007). "Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes", *Trends in parasitology*, 23: 368-375.
- [15] Mukkada, A.J. Meade, J.C. Glaser, T.A. ve Bonventre, P.F., (1985). "Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth", *Science*, 229: 1099-1101.
- [16] Doyle, P.S. Engel, J.C. Pimenta, P.F. da Silva, P.P. ve Dwyer, D.M., (1991). "*Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37 degrees C", *Exp Parasitol*, 73: 326-334.
- [17] Ioset, J.R., (2008). "Natural products for neglected diseases: a review", *Current Organic Chemistry*, 12: 643-666.
- [18] Glew, R. Saha, A. Das, S. ve Remaley, A., (1988). "Biochemistry of the *Leishmania* species", *Microbiological reviews*, 52: 412.
- [19] Grimaldi Jr, G. ve McMahon-Pratt, D., (1996). "Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91: 37-42.
- [20] Rioux, J.A. Lanotte, G. Serres, E. Pratlong, F. Bastien, P. ve Perieres, J., (1990). "Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification", *Ann Parasitol Hum Comp*, 65: 111-125.
- [21] Banuls, A.L. Hide, M. ve Prugnolle, F., (2007). "*Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans", *Adv Parasitol*, 64: 1-109.
- [22] Lukes, J. Mauricio, I.L. Schonian, G. Dujardin, J.C. Soteriadou, K. Dedet, J.P. Kuhl, K. Tintaya, K.W. Jirku, M. Chocholova, E. Haralambous, C. Pratlong, F. Obornik, M. Horak, A. Ayala, F.J. ve Miles, M.A., (2007). "Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 9375-9380.

- [23] Fraga, J. Montalvo, A.M. De Doncker, S. Dujardin, J.C. ve Van der Auwera, G., (2010). "Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene", *Infect Genet Evol*, 10: 238-245.
- [24] Schonian, G. Mauricio, I. ve Cupolillo, E., (2010). "Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*?", *Trends Parasitol*, 26: 466-469.
- [25] Bern, C. Maguire, J.H. ve Alvar, J., (2008). "Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis", *PLoS Negl Trop Dis*, 2: e313.
- [26] Singh, S.P. Reddy, D.C. Rai, M. ve Sundar, S., (2006). "Serious underreporting of visceral leishmaniasis through passive case reporting in Bihar, India", *Trop Med Int Health*, 11: 899-905.
- [27] Dujardin, J.C. Campino, L. Canavate, C. Dedet, J.P. Gradoni, L. Soteriadou, K. Mazeris, A. Ozbek, Y. ve Boelaert, M., (2008). "Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe", *Emerg Infect Dis*, 14: 1013-1018.
- [28] Ready, P.D., (2010). "Leishmaniasis emergence in Europe", *Euro Surveill*, 15: 19505.
- [29] Maroli, M. Rossi, L. Baldelli, R. Capelli, G. Ferroglia, E. Genchi, C. Gramiccia, M. Mortarino, M. Pietrobelli, M. ve Gradoni, L., (2008). "The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors", *Trop Med Int Health*, 13: 256-264.
- [30] Biglino, A. Bolla, C. Concialdi, E. Trisciuglio, A. Romano, A. ve Ferroglia, E., (2010). "Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic", *J Clin Microbiol*, 48: 131-136.
- [31] Postigo, J.A., (2010). "Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region", *Int J Antimicrob Agents*, 36 Suppl 1: S62-65.
- [32] Mosleh, I.M. Geith, E. Natsheh, L. Abdul-Dayem, M. ve Abotteen, N., (2008). "Cutaneous leishmaniasis in the Jordanian side of the Jordan Valley: severe under-reporting and consequences on public health management", *Trop Med Int Health*, 13: 855-860.
- [33] Çulha, G. ve Akçalý, C., (2006). "Hatay ve çevresinde saptanan kutanöz leishmaniasis olgularý", *Türkiye Parazitoloj Derg*, 30: 268-271.
- [34] Alvar, J. Canavate, C. Gutierrez-Solar, B. Jimenez, M. Laguna, F. Lopez-Velez, R. Molina, R. ve Moreno, J., (1997). "Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years", *Clin Microbiol Rev*, 10: 298-319.
- [35] Paredes, R. Munoz, J. Diaz, I. Domingo, P. Gurgui, M. ve Clotet, B., (2003). "Leishmaniasis in HIV infection", *J Postgrad Med*, 49: 39-49.
- [36] Alvar, J. Aparicio, P. Aseffa, A. Den Boer, M. Canavate, C. Dedet, J.P. Gradoni, L. Ter Horst, R. Lopez-Velez, R. ve Moreno, J., (2008). "The

relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years", *Clin Microbiol Rev*, 21: 334-359, table of contents.

- [37] ter Horst, R. Collin, S.M. Ritmeijer, K. Bogale, A. ve Davidson, R.N., (2008). "Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome", *Clin Infect Dis*, 46: 1702-1709.
- [38] Gorski, S. Collin, S.M. Ritmeijer, K. Keus, K. Gatluak, F. Mueller, M. ve Davidson, R.N., (2010). "Visceral leishmaniasis relapse in Southern Sudan (1999-2007): a retrospective study of risk factors and trends", *PLoS Negl Trop Dis*, 4: e705.
- [39] Petrela, R. Kuneshka, L. Foto, E. Zavalani, F. ve Gradoni, L., (2010). "Pediatric visceral leishmaniasis in Albania: a retrospective analysis of 1,210 consecutive hospitalized patients (1995-2009)", *PLoS Negl Trop Dis*, 4.
- [40] Antinori, S. Cascio, A. Parravicini, C. Bianchi, R. ve Corbellino, M., (2008). "Leishmaniasis among organ transplant recipients", *Lancet Infect Dis*, 8: 191-199.
- [41] Kopterides, P. Mourtzoukou, E.G. Skopelitis, E. Tsavaris, N. ve Falagas, M.E., (2007). "Aspects of the association between leishmaniasis and malignant disorders", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 101: 1181-1189.
- [42] van Thiel, P.P. Leenstra, T. de Vries, H.J. van der Sluis, A. van Gool, T. Krull, A.C. van Vugt, M. de Vries, P.J. Zeegelaar, J.E. Bart, A. van der Meide, W.F. Schallig, H.D. Faber, W.R. ve Kager, P.A., (2010). "Cutaneous leishmaniasis (*Leishmania major* infection) in Dutch troops deployed in northern Afghanistan: epidemiology, clinical aspects, and treatment", *Am J Trop Med Hyg*, 83: 1295-1300.
- [43] Berman, J.D., (1997). "Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years", *Clin Infect Dis*, 24: 684-703.
- [44] Pintado, V. Martin-Rabadan, P. Rivera, M.L. Moreno, S. ve Bouza, E., (2001). "Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study", *Medicine (Baltimore)*, 80: 54-73.
- [45] Lopez-Velez, R., (2003). "The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV", *Ann Trop Med Parasitol*, 97 Suppl 1: 143-147.
- [46] Mary, C. Faraut, F. Lascombe, L. ve Dumon, H., (2004). "Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity", *J Clin Microbiol*, 42: 5249-5255.
- [47] Antinori, S. Longhi, E. Bestetti, G. Piolini, R. Acquaviva, V. Foschi, A. Trovati, S. Parravicini, C. Corbellino, M. ve Meroni, L., (2007). "Post-kala-azar dermal leishmaniasis as an immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient with acquired immune deficiency syndrome", *Br J Dermatol*, 157: 1032-1036.

- [48] Berman, J., (1997). "Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years", *Clinical Infectious Diseases*, 24: 684-703.
- [49] Bettini, S. Gramiccia, M. Gradoni, L. Pozio, E. Mugnai, S. ve Maroli, M., (1983). "Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VIII. Human population response to leishmanin in the focus of Monte Argentario (Grosseto) and epidemiological evaluation", *Ann Parasitol Hum Comp*, 58: 539-547.
- [50] Kharazmi, A. Kemp, K. Ismail, A. Gasim, S. Gaafar, A. Kurtzhals, J.A. El Hassan, A.M. Theander, T.G. ve Kemp, M., (1999). "T-cell response in human leishmaniasis", *Immunol Lett*, 65: 105-108.
- [51] Cillari, E. Vitale, G. Arcoleo, F. D'Agostino, P. Mocciaro, C. Gambino, G. Malta, R. Stassi, G. Giordano, C. Milano, S. ve et al., (1995). "In vivo and in vitro cytokine profiles and mononuclear cell subsets in Sicilian patients with active visceral leishmaniasis", *Cytokine*, 7: 740-745.
- [52] Ghalib, H.W. Piuvezam, M.R. Skeiky, Y.A. Siddig, M. Hashim, F.A. el-Hassan, A.M. Russo, D.M. ve Reed, S.G., (1993). "Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections", *J Clin Invest*, 92: 324-329.
- [53] Kemp, M. Theander, T.G. ve Kharazmi, A., (1996). "The contrasting roles of CD4+ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example", *Immunology today*, 17: 13.
- [54] Kenney, R.T. Sacks, D.L. Gam, A.A. Murray, H.W. ve Sundar, S., (1998). "Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment", *J Infect Dis*, 177: 815-818.
- [55] Karp, C.L. el-Safi, S.H. Wynn, T.A. Satti, M.M. Kordofani, A.M. Hashim, F.A. Hag-Ali, M. Neva, F.A. Nutman, T.B. ve Sacks, D.L., (1993). "In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma", *J Clin Invest*, 91: 1644-1648.
- [56] Sundar, S. Reed, S.G. Sharma, S. Mehrotra, A. ve Murray, H.W., (1997). "Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis", *Am J Trop Med Hyg*, 56: 522-525.
- [57] Bahrenscheer, J. Kemp, M. Kurtzhals, J.A. Gachihi, G.S. Kharazmi, A. ve Theander, T.G., (1995). "Interferon-gamma and interleukin-4 production by human T cells recognizing *Leishmania donovani* antigens separated by SDS-PAGE", *APMIS*, 103: 131-139.
- [58] Cenini, P. Berhe, N. Hailu, A. McGinnes, K. ve Frommel, D., (1993). "Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy", *J Infect Dis*, 168: 986-993.
- [59] Kemp, M. Kurtzhals, J.A. Bendtzen, K. Poulsen, L.K. Hansen, M.B. Koech, D.K. Kharazmi, A. ve Theander, T.G., (1993). "*Leishmania donovani*-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis", *Infect Immun*, 61: 1069-1073.

- [60] Carvalho, E.M. Johnson, W.D. Barreto, E. Marsden, P.D. Costa, J.L. Reed, S. ve Rocha, H., (1985). "Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis", *J Immunol*, 135: 4144-4148.
- [61] Cillari, E. Milano, S. Dieli, M. Arcoleo, F. Perego, R. Leoni, F. Gromo, G. Severn, A. ve Liew, F.Y., (1992). "Thymopentin reduces the susceptibility of aged mice to cutaneous leishmaniasis by modulating CD4 T-cell subsets", *Immunology*, 76: 362-366.
- [62] Holaday, B.J. Pompeu, M.M. Evans, T. Braga, D.N. Texeira, M.J. Sousa Ade, Q. Sadick, M.D. Vasconcelos, A.W. Abrams, J.S. Pearson, R.D. ve et al., (1993). "Correlates of Leishmania-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*", *J Infect Dis*, 167: 411-417.
- [63] Suffia, I. Ferrua, B. Stien, X. Mograbi, B. Marty, P. Rousseau, D. Fragaki, K. ve Kubar, J., (2000). "A novel *Leishmania infantum* recombinant antigen which elicits interleukin 10 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with visceral leishmaniasis", *Infect Immun*, 68: 630-636.
- [64] Ghalib, H.W. Whittle, J.A. Kubin, M. Hashim, F.A. el-Hassan, A.M. Grabstein, K.H. Trinchieri, G. ve Reed, S.G., (1995). "IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections", *J Immunol*, 154: 4623-4629.
- [65] Ihalamulla, R.L. Rajapaksa, U.S. ve Karunaweera, N.D., (2006). "Microculture for the isolation of *Leishmania*, modified to increase efficacy: a follow-up to a previous study", *Ann Trop Med Parasitol*, 100: 87-89.
- [66] Boggild, A.K. Ramos, A.P. Espinosa, D. Valencia, B.M. Veland, N. Miranda-Verastegui, C. Arevalo, J. Low, D.E. ve Llanos-Cuentas, A., (2010). "Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis", *Am J Trop Med Hyg*, 83: 345-350.
- [67] Boggild, A.K. Miranda-Verastegui, C. Espinosa, D. Arevalo, J. Martinez-Medina, D. Llanos-Cuentas, A. ve Low, D.E., (2008). "Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru", *Am J Trop Med Hyg*, 79: 847-852.
- [68] Boggild, A.K. Miranda-Verastegui, C. Espinosa, D. Arevalo, J. Adai, V. Tulliano, G. Llanos-Cuentas, A. ve Low, D.E., (2007). "Evaluation of a microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru", *J Clin Microbiol*, 45: 3680-3684.
- [69] Hide, M. Singh, R. Kumar, B. Banuls, A.L. ve Sundar, S., (2007). "A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients", *Acta Trop*, 102: 197-200.
- [70] Allahverdiyev, A.M. Uzun, S. Bagirova, M. Durdu, M. ve Memisoglu, H.R., (2004). "A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis", *Am J Trop Med Hyg*, 70: 294-297.

- [71] Mitropoulos, P. Konidas, P. ve Durkin-Konidas, M., (2010). "New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment", *J Am Acad Dermatol*, 63: 309-322.
- [72] Srivastava, P. Dayama, A. Mehrotra, S. ve Sundar, S., (2011). "Diagnosis of visceral leishmaniasis", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 105: 1-6.
- [73] Boelaert, M. El-Safi, S. Hailu, A. Mukhtar, M. Rijal, S. Sundar, S. Wasunna, M. Aseffa, A. Mbui, J. Menten, J. Desjeux, P. ve Peeling, R.W., (2008). "Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102: 32-40.
- [74] Pattabhi, S. Whittle, J. Mohamath, R. El-Safi, S. Moulton, G.G. Guderian, J.A. Colombara, D. Abdoon, A.O. Mukhtar, M.M. Mondal, D. Esfandiari, J. Kumar, S. Chun, P. Reed, S.G. ve Bhatia, A., (2010). "Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis", *PLoS Negl Trop Dis*, 4.
- [75] Bensoussan, E. Nasereddin, A. Jonas, F. Schnur, L.F. ve Jaffe, C.L., (2006). "Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis", *J Clin Microbiol*, 44: 1435-1439.
- [76] Verma, S. Kumar, R. Katara, G.K. Singh, L.C. Negi, N.S. Ramesh, V. ve Salotra, P., (2010). "Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis", *PLoS One*, 5: e10107.
- [77] Romero, I. Tellez, J. Suarez, Y. Cardona, M. Figueroa, R. Zelazny, A. ve Gore Saravia, N., (2010). "Viability and burden of *Leishmania* in extralesional sites during human dermal leishmaniasis", *PLoS Negl Trop Dis*, 4.
- [78] Nagill, R. ve Kaur, S., (2011). "Vaccine candidates for leishmaniasis: a review", *Int Immunopharmacol*, 11: 1464-1488.
- [79] Sundar, S., (2001). "Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis", *Trop Med Int Health*, 6: 849-854.
- [80] Rashid, B.N. Tabassum, S. Ullah Rao, M.S. Masood, S. Abbas, M.M. ve Mumtaz, M.J., (2010). "Glucantime fever with parenteral meglumine antimonate in patients of cutaneous leishmaniasis", *J Coll Physicians Surg Pak*, 20: 496.
- [81] Sundar, S. Chakravarty, J. Agarwal, D. Rai, M. ve Murray, H.W., (2010). "Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India", *N Engl J Med*, 362: 504-512.
- [82] Bhattacharya, S.K. Sinha, P.K. Sundar, S. Thakur, C.P. Jha, T.K. Pandey, K. Das, V.R. Kumar, N. Lal, C. Verma, N. Singh, V.P. Ranjan, A. Verma, R.B. Anders, G. Sindermann, H. ve Ganguly, N.K., (2007). "Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis", *J Infect Dis*, 196: 591-598.

- [83] Antinori, S. Schifanella, L. ve Corbellino, M., (2012). "Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31: 109-118.
- [84] Sundar, S. Jha, T.K. Thakur, C.P. Sinha, P.K. ve Bhattacharya, S.K., (2007). "Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India", *N Engl J Med*, 356: 2571-2581.
- [85] Hailu, A. Musa, A. Wasunna, M. Balasegaram, M. Yifru, S. Mengistu, G. Hurissa, Z. Hailu, W. Weldegebreal, T. Tesfaye, S. Makonnen, E. Khalil, E. Ahmed, O. Fadlalla, A. El-Hassan, A. Raheem, M. Mueller, M. Koummuki, Y. Rashid, J. Mbui, J. Mucee, G. Njoroge, S. Manduku, V. Musibi, A. Mutuma, G. Kirui, F. Lodenyo, H. Mutea, D. Kirigi, G. Edwards, T. Smith, P. Muthami, L. Royce, C. Ellis, S. Aloba, M. Omollo, R. Kesusu, J. Owiti, R. ve Kinuthia, J., (2010). "Geographical variation in the response of visceral leishmaniasis to paromomycin in East Africa: a multicentre, open-label, randomized trial", *PLoS Negl Trop Dis*, 4: e709.
- [86] Chappuis, F. Alirol, E. Worku, D.T. Mueller, Y. ve Ritmeijer, K., (2011). "High mortality among older patients treated with pentavalent antimonials for visceral leishmaniasis in East Africa and rationale for switch to liposomal amphotericin B", *Antimicrob Agents Chemother*, 55: 455-456.
- [87] Chang, K. Hendricks, L. ve Bray, R., (1985). "Laboratory cultivation and maintenance of Leishmania", *Leishmaniasis.(Human Parasitic Diseases Vol. 1.):* 213-244.
- [88] Somanna, A. Mundodi, V. ve Gedamu, L., (2002). "In vitro cultivation and characterization of Leishmania chagasi amastigote-like forms", *Acta Trop*, 83: 37-42.
- [89] Gholamhosseinian, A. ve Vassef, A., (1988). "Superiority of Hemoglobin to Hemin for Cultivation of Leishmania tropica Promastigotes in Serum Free Media1", *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 35: 446-449.
- [90] Grimaldi Jr, G. Tesh, R.B. ve McMahon-Pratt, D., (1989). "A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 41: 687.
- [91] Bogdan, C. ve Rollinghoff, M., (1999). "How do protozoan parasites survive inside macrophages?", *Parasitol Today*, 15: 22-28.
- [92] Ho, M. Koech, D.K. Iha, D.W. ve Bryceson, A.D., (1983). "Immunosuppression in Kenyan visceral leishmaniasis", *Clin Exp Immunol*, 51: 207-214.
- [93] Sacks, D. ve Noben-Trauth, N., (2002). "The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice", *Nat Rev Immunol*, 2: 845-858.
- [94] Das, L. Datta, N. Bandyopadhyay, S. ve Das, P.K., (2001). "Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves up-regulation of nitric oxide and a favorable T cell response", *J Immunol*, 166: 4020-4028.

- [95] Rodriguez, V. Centeno, M. ve Ulrich, M., (1996). "The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response", *Parasite Immunol*, 18: 341-345.
- [96] Alexander, J. Carter, K.C. Al-Fasi, N. Satoskar, A. ve Brombacher, F., (2000). "Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis", *Eur J Immunol*, 30: 2935-2943.
- [97] Fernandez-Botran, R. Chilton, P.M. Hondowicz, B.D. Vetvickova, J. Yan, J. Jones, W., 3rd ve Scott, P., (1999). "Regulation of the production of soluble IL-4 receptors in murine cutaneous leishmaniasis. The roles of IL-12 and IL-4", *J Leukoc Biol*, 66: 481-488.
- [98] Stenger, S. Solbach, W. Rollinghoff, M. ve Bogdan, C., (1991). "Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. II. Endogenous tumor necrosis factor-alpha production by macrophages is induced by the synergistic action of interferon (IFN)-gamma and interleukin (IL) 4 and accounts for the antiparasitic effect mediated by IFN-gamma and IL 4", *Eur J Immunol*, 21: 1669-1675.
- [99] Reiner, N.E. Ng, W. ve McMaster, W.R., (1987). "Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products", *J Immunol*, 138: 1926-1932.
- [100] Bogdan, C. Gessner, A. Solbach, W. ve Rollinghoff, M., (1996). "Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites", *Curr Opin Immunol*, 8: 517-525.
- [101] Heinzl, F.P. Rerko, R.M. ve Hujer, A.M., (1998). "Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity", *Cell Immunol*, 184: 129-142.
- [102] Scott, P., (1993). "IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity", *Science*, 260: 496-497.
- [103] Sypek, J.P. Chung, C.L. Mayor, S.E. Subramanyam, J.M. Goldman, S.J. Sieburth, D.S. Wolf, S.F. ve Schaub, R.G., (1993). "Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response", *J Exp Med*, 177: 1797-1802.
- [104] Park, A.Y. Hondowicz, B. Kopf, M. ve Scott, P., (2002). "The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*", *J Immunol*, 168: 5771-5777.
- [105] Carrera, L. Gazzinelli, R.T. Badolato, R. Hieny, S. Muller, W. Kuhn, R. ve Sacks, D.L., (1996). "*Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice", *J Exp Med*, 183: 515-526.
- [106] Gorak, P.M. Engwerda, C.R. ve Kaye, P.M., (1998). "Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection", *Eur J Immunol*, 28: 687-695.

- [107] Snijders, A. Kalinski, P. Hilken, C.M. ve Kapsenberg, M.L., (1998). "High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals", *Int Immunol*, 10: 1593-1598.
- [108] Murray, H.W., (1997). "Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis", *J Infect Dis*, 175: 1477-1479.
- [109] Launois, P. Maillard, I. Pingel, S. Swihart, K.G. Xenarios, I. Acha-Orbea, H. Diggelmann, H. Locksley, R.M. MacDonald, H.R. ve Louis, J.A., (1997). "IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice", *Immunity*, 6: 541-549.
- [110] Roberts, M.T., (2005). "Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment", *Br Med Bull*, 75-76: 115-130.
- [111] Wang, Z.E. Reiner, S.L. Zheng, S. Dalton, D.K. ve Locksley, R.M., (1994). "CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*", *J Exp Med*, 179: 1367-1371.
- [112] Scott, P., (1991). "IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis", *J Immunol*, 147: 3149-3155.
- [113] Belosevic, M. Finbloom, D.S. Van Der Meide, P.H. Slayter, M.V. ve Nacy, C.A., (1989). "Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*", *J Immunol*, 143: 266-274.
- [114] Tumang, M.C. Keogh, C. Moldawer, L.L. Helfgott, D.C. Teitelbaum, R. Hariprashad, J. ve Murray, H.W., (1994). "Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis", *J Immunol*, 153: 768-775.
- [115] Liew, F.Y. Parkinson, C. Millott, S. Severn, A. ve Carrier, M., (1990). "Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis", *Immunology*, 69: 570-573.
- [116] Kindler, V. Sappino, A.P. Grau, G.E. Piguet, P.F. ve Vassalli, P., (1989). "The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection", *Cell*, 56: 731-740.
- [117] de Waal Malefyt, R. Abrams, J. Bennett, B. Figdor, C.G. ve de Vries, J.E., (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes", *J Exp Med*, 174: 1209-1220.
- [118] Ribeiro-de-Jesus, A. Almeida, R.P. Lessa, H. Bacellar, O. ve Carvalho, E.M., (1998). "Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis", *Braz J Med Biol Res*, 31: 143-148.
- [119] Carvalho, E.M. Bacellar, O. Brownell, C. Regis, T. Coffman, R.L. ve Reed, S.G., (1994). "Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis", *J Immunol*, 152: 5949-5956.

- [120] Oswald, I.P. Wynn, T.A. Sher, A. ve James, S.L., (1992). "Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 8676-8680.
- [121] D'Andrea, A. Aste-Amezaga, M. Valiante, N.M. Ma, X. Kubin, M. ve Trinchieri, G., (1993). "Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells", *J Exp Med*, 178: 1041-1048.
- [122] Ding, L. Linsley, P.S. Huang, L.Y. Germain, R.N. ve Shevach, E.M., (1993). "IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression", *J Immunol*, 151: 1224-1234.
- [123] Kubin, M. Kamoun, M. ve Trinchieri, G., (1994). "Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells", *J Exp Med*, 180: 211-222.
- [124] Williams, A.E., (2011). *Immunology: Mucosal and Body Surface Defences*: Wiley.
- [125] McConville, M.J. ve Ferguson, M.A., (1993). "The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes", *Biochem J*, 294 (Pt 2): 305-324.
- [126] McConville, M.J. ve Menon, A.K., (2000). "Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids (review)", *Mol Membr Biol*, 17: 1-16.
- [127] Naderer, T. Vince, J.E. ve McConville, M.J., (2004). "Surface determinants of Leishmania parasites and their role in infectivity in the mammalian host", *Curr Mol Med*, 4: 649-665.
- [128] Orlandi, P.A., Jr. ve Turco, S.J., (1987). "Structure of the lipid moiety of the Leishmania donovani lipophosphoglycan", *J Biol Chem*, 262: 10384-10391.
- [129] Mahoney, A.B. Sacks, D.L. Saraiva, E. Modi, G. ve Turco, S.J., (1999). "Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control Leishmania donovani-sand fly interactions", *Biochemistry*, 38: 9813-9823.
- [130] McConville, M.J. Turco, S.J. Ferguson, M.A. ve Sacks, D.L., (1992). "Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of Leishmania major promastigotes to an infectious stage", *EMBO J*, 11: 3593-3600.
- [131] McConville, M.J. Schnur, L.F. Jaffe, C. ve Schneider, P., (1995). "Structure of Leishmania lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species", *Biochem J*, 310 (Pt 3): 807-818.
- [132] Sacks, D.L. Pimenta, P.F. McConville, M.J. Schneider, P. ve Turco, S.J., (1995). "Stage-specific binding of Leishmania donovani to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan", *J Exp Med*, 181: 685-697.

- [133] Soares, R.P. Barron, T. McCoy-Simandle, K. Svobodova, M. Warburg, A. ve Turco, S.J., (2004). "Leishmania tropica: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different Phlebotomus species", *Exp Parasitol*, 107: 105-114.
- [134] Barron, T.L. ve Turco, S.J., (2006). "Quantitation of Leishmania lipophosphoglycan repeat units by capillary electrophoresis", *Biochim Biophys Acta*, 1760: 710-714.
- [135] Soares, R.P. Cardoso, T.L. Barron, T. Araujo, M.S. Pimenta, P.F. ve Turco, S.J., (2005). "Leishmania braziliensis: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis", *Int J Parasitol*, 35: 245-253.
- [136] Soares, R.P. Macedo, M.E. Ropert, C. Gontijo, N.F. Almeida, I.C. Gazzinelli, R.T. Pimenta, P.F. ve Turco, S.J., (2002). "Leishmania chagasi: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector Lutzomyia longipalpis", *Mol Biochem Parasitol*, 121: 213-224.
- [137] McConville, M. ve Blackwell, J., (1991). "Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of Leishmania donovani. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids", *Journal of Biological Chemistry*, 266: 15170.
- [138] Turco, S.J. ve Sacks, D.L., (1991). "Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in Leishmania major amastigotes", *Molecular and biochemical parasitology*, 45: 91-99.
- [139] Moody, S.F. Handman, E. ve Bacic, A., (1991). "Structure and antigenicity of the lipophosphoglycan from Leishmania major amastigotes", *Glycobiology*, 1: 419.
- [140] Sacks, D. ve Kamhawi, S., (2001). "Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis", *Annu Rev Microbiol*, 55: 453-483.
- [141] Pimenta, P.F. Turco, S.J. McConville, M.J. Lawyer, P.G. Perkins, P.V. ve Sacks, D.L., (1992). "Stage-specific adhesion of Leishmania promastigotes to the sandfly midgut", *Science*, 256: 1812-1815.
- [142] Pimenta, P.F. Saraiva, E.M. Rowton, E. Modi, G.B. Garraway, L.A. Beverley, S.M. Turco, S.J. ve Sacks, D.L., (1994). "Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of Leishmania is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 9155-9159.
- [143] Kamhawi, S., (2006). "Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?", *Trends Parasitol*, 22: 439-445.
- [144] Myskova, J. Svobodova, M. Beverley, S.M. ve Volf, P., (2007). "A lipophosphoglycan-independent development of Leishmania in permissive sand flies", *Microbes Infect*, 9: 317-324.
- [145] Wilson, R. Bates, M.D. Dostalova, A. Jecna, L. Dillon, R.J. Volf, P. ve Bates, P.A., (2010). "Stage-specific adhesion of Leishmania promastigotes to sand fly

midguts assessed using an improved comparative binding assay", *PLoS Negl Trop Dis*, 4.

- [146] Bates, P.A., (2008). "Leishmania sand fly interaction: progress and challenges", *Curr Opin Microbiol*, 11: 340-344.
- [147] Kamhawi, S. Ramalho-Ortigao, M. Pham, V.M. Kumar, S. Lawyer, P.G. Turco, S.J. Barillas-Mury, C. Sacks, D.L. ve Valenzuela, J.G., (2004). "A role for insect galectins in parasite survival", *Cell*, 119: 329-341.
- [148] Dillon, R.J. Ivens, A.C. Churcher, C. Holroyd, N. Quail, M.A. Rogers, M.E. Soares, M.B. Bonaldo, M.F. Casavant, T.L. Lehane, M.J. ve Bates, P.A., (2006). "Analysis of ESTs from *Lutzomyia longipalpis* sand flies and their contribution toward understanding the insect-parasite relationship", *Genomics*, 88: 831-840.
- [149] Soares, R.P.P. ve Turco, S.J., (2003). "*Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review", *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75: 301-330.
- [150] Volf, P. ve Myskova, J., (2007). "Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors", *Trends Parasitol*, 23: 91-92.
- [151] Volf, P. Benkova, I. Myskova, J. Sadlova, J. Campino, L. ve Ravel, C., (2007). "Increased transmission potential of *Leishmania major*/*Leishmania infantum* hybrids", *Int J Parasitol*, 37: 589-593.
- [152] Lainson, R. Shaw, J.J. Peters, W. ve Killick-Kendrick, R., (1987). *Evolution, classification and geographical distribution*: Academic Press.
- [153] Azevedo-Pereira, R.L. Pereira, M.C. Oliveria-Junior, F.O. Brazil, R.P. Cortes, L.M. Madeira, M.F. Santos, A.L. Toma, L. ve Alves, C.R., (2007). "Heparin binding proteins from *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigotes", *Vet Parasitol*, 145: 234-239.
- [154] Soares, R.P. Margonari, C. Secundino, N.C. Macedo, M.E. da Costa, S.M. Rangel, E.F. Pimenta, P.F. ve Turco, S.J., (2010). "Differential midgut attachment of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* and *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia*", *J Biomed Biotechnol*, 2010: 439174.
- [155] Piani, A. Ilg, T. Elefanty, A.G. Curtis, J. ve Handman, E., (1999). "*Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function", *Microbes Infect*, 1: 589-599.
- [156] Dermine, J.F. Scianimanico, S. Prive, C. Descoteaux, A. ve Desjardins, M., (2000). "*Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis", *Cell Microbiol*, 2: 115-126.
- [157] Brittingham, A. ve Mosser, D.M., (1996). "Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes", *Parasitol Today*, 12: 444-447.

- [158] Proudfoot, L. Nikolaev, A.V. Feng, G.J. Wei, W.Q. Ferguson, M.A. Brimacombe, J.S. ve Liew, F.Y., (1996). "Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 10984-10989.
- [159] Giorgione, J.R. Turco, S.J. ve Epand, R.M., (1996). "Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 11634-11639.
- [160] Guimaraes-Costa, A.B. Nascimento, M.T. Froment, G.S. Soares, R.P. Morgado, F.N. Conceicao-Silva, F. ve Saraiva, E.M., (2009). "*Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 6748-6753.
- [161] Vivarini Ade, C. Pereira Rde, M. Teixeira, K.L. Calegari-Silva, T.C. Bellio, M. Laurenti, M.D. Corbett, C.E. Gomes, C.M. Soares, R.P. Silva, A.M. Silveira, F.T. ve Lopes, U.G., (2011). "Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2", *FASEB J*, 25: 4162-4173.
- [162] Gazzinelli, R.T. Roport, C. ve Campos, M.A., (2004). "Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites", *Immunol Rev*, 201: 9-25.
- [163] Wilson, M.E. ve Pearson, R.D., (1986). "Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism", *J Immunol*, 136: 4681-4688.
- [164] Wilson, M.E. ve Pearson, R.D., (1988). "Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes", *Infect Immun*, 56: 363-369.
- [165] Ueno, N. Bratt, C.L. Rodriguez, N.E. ve Wilson, M.E., (2009). "Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum* chagasi promastigotes", *Cell Microbiol*, 11: 1827-1841.
- [166] Da Silva, R.P. Hall, B.F. Joiner, K.A. ve Sacks, D.L., (1989). "CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages", *J Immunol*, 143: 617-622.
- [167] Mosser, D.M. ve Edelson, P.J., (1985). "The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes", *J Immunol*, 135: 2785-2789.
- [168] Kima, P.E. Constant, S.L. Hannum, L. Colmenares, M. Lee, K.S. Haberman, A.M. Shlomchik, M.J. ve McMahon-Pratt, D., (2000). "Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis", *J Exp Med*, 191: 1063-1068.

- [169] Padigel, U.M. ve Farrell, J.P., (2005). "Control of infection with *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice lacking the common gamma-chain for FcR is associated with reduced production of IL-10 and TGF-beta by parasitized cells", *J Immunol*, 174: 6340-6345.
- [170] de Veer, M.J. Curtis, J.M. Baldwin, T.M. DiDonato, J.A. Sexton, A. McConville, M.J. Handman, E. ve Schofield, L., (2003). "MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling", *Eur J Immunol*, 33: 2822-2831.
- [171] Becker, I. Salaiza, N. Aguirre, M. Delgado, J. Carrillo-Carrasco, N. Kobeh, L.G. Ruiz, A. Cervantes, R. Torres, A.P. Cabrera, N. Gonzalez, A. Maldonado, C. ve Isibasi, A., (2003). "*Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2", *Mol Biochem Parasitol*, 130: 65-74.
- [172] Flandin, J.F. Chano, F. ve Descoteaux, A., (2006). "RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages", *Eur J Immunol*, 36: 411-420.
- [173] Gregory, D.J. ve Olivier, M., (2005). "Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*", *Parasitology*, 130 Suppl: S27-35.
- [174] Ilg, T., (2000). "Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*", *EMBO J*, 19: 1953-1962.
- [175] Ilg, T. Demar, M. ve Harbecke, D., (2001). "Phosphoglycan repeat-deficient *Leishmania mexicana* parasites remain infectious to macrophages and mice", *J Biol Chem*, 276: 4988-4997.
- [176] Turco, S.J. Spath, G.F. ve Beverley, S.M., (2001). "Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species", *Trends Parasitol*, 17: 223-226.
- [177] Peters, N.C. Egen, J.G. Secundino, N. Debrabant, A. Kimblin, N. Kamhawi, S. Lawyer, P. Fay, M.P. Germain, R.N. ve Sacks, D., (2008). "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies", *Science*, 321: 970-974.
- [178] Gueirard, P. Laplante, A. Rondeau, C. Milon, G. ve Desjardins, M., (2008). "Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages", *Cell Microbiol*, 10: 100-111.
- [179] Brinkmann, V. ve Zychlinsky, A., (2007). "Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs", *Nat Rev Microbiol*, 5: 577-582.
- [180] Gabriel, C. McMaster, W.R. Girard, D. ve Descoteaux, A., (2010). "*Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps", *J Immunol*, 185: 4319-4327.
- [181] Desjardins, M. ve Descoteaux, A., (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan", *J Exp Med*, 185: 2061-2068.

- [182] Russell, D.G. Xu, S. ve Chakraborty, P., (1992). "Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages", *J Cell Sci*, 103 (Pt 4): 1193-1210.
- [183] Allen, L.A. ve Aderem, A., (1995). "Protein kinase C regulates MARCKS cycling between the plasma membrane and lysosomes in fibroblasts", *EMBO J*, 14: 1109-1121.
- [184] Rosen, A. Keenan, K.F. Thelen, M. Nairn, A.C. ve Aderem, A., (1990). "Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctate structures in macrophage filopodia", *J Exp Med*, 172: 1211-1215.
- [185] Holm, A. Tejle, K. Magnusson, K.E. Descoteaux, A. ve Rasmusson, B., (2001). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation", *Cell Microbiol*, 3: 439-447.
- [186] Holm, A. Tejle, K. Gunnarsson, T. Magnusson, K.E. Descoteaux, A. ve Rasmusson, B., (2003). "Role of protein kinase C α for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages", *Biochem Biophys Res Commun*, 302: 653-658.
- [187] Delgado-Dominguez, J. Gonzalez-Aguilar, H. Aguirre-Garcia, M. Gutierrez-Kobeh, L. Berzunza-Cruz, M. Ruiz-Remigio, A. Robles-Flores, M. ve Becker, I., (2010). "*Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice", *Parasite Immunol*, 32: 440-449.
- [188] Tolson, D.L. Turco, S.J. ve Pearson, T.W., (1990). "Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*", *Infect Immun*, 58: 3500-3507.
- [189] Dermine, J.F. Goyette, G. Houde, M. Turco, S.J. ve Desjardins, M., (2005). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages", *Cell Microbiol*, 7: 1263-1270.
- [190] Vinet, A.F. Jananji, S. Turco, S.J. Fukuda, M. ve Descoteaux, A., (2011). "Exclusion of synaptotagmin V at the phagocytic cup by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan results in decreased promastigote internalization", *Microbiology*, 157: 2619-2628.
- [191] Garg, R. Lodge, R. Descoteaux, A. ve Tremblay, M.J., (2008). "*Leishmania infantum* promastigotes reduce entry of HIV-1 into macrophages through a lipophosphoglycan-mediated disruption of lipid rafts", *J Infect Dis*, 197: 1701-1708.
- [192] Miao, L. Stafford, A. Nir, S. Turco, S.J. Flanagan, T.D. ve Epanand, R.M., (1995). "Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*", *Biochemistry*, 34: 4676-4683.

- [193] Martin, I. Turco, S.J. Epand, R.M. ve Ruysschaert, J.M., (1998). "Lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* inhibits lipid vesicle fusion induced by the N-terminal extremity of viral fusogenic simian immunodeficiency virus protein", *Eur J Biochem*, 258: 150-156.
- [194] Lodge, R. Diallo, T.O. ve Descoteaux, A., (2006). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane", *Cell Microbiol*, 8: 1922-1931.
- [195] Winberg, M.E. Holm, A. Sarndahl, E. Vinet, A.F. Descoteaux, A. Magnusson, K.E. Rasmusson, B. ve Lerm, M., (2009). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts", *Microbes Infect*, 11: 215-222.
- [196] Huang, F.P. Niedbala, W. Wei, X.Q. Xu, D. Feng, G.J. Robinson, J.H. Lam, C. ve Liew, F.Y., (1998). "Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages", *Eur J Immunol*, 28: 4062-4070.
- [197] Moncada, S. ve Higgs, A., (1993). "The L-arginine-nitric oxide pathway", *N Engl J Med*, 329: 2002-2012.
- [198] Olivier, M. Gregory, D.J. ve Forget, G., (2005). "Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view", *Clin Microbiol Rev*, 18: 293-305.
- [199] Liew, F.Y. Li, Y. Moss, D. Parkinson, C. Rogers, M.V. ve Moncada, S., (1991). "Resistance to *Leishmania* major infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages", *Eur J Immunol*, 21: 3009-3014.
- [200] Stenger, S. Thuring, H. Rollinghoff, M. ve Bogdan, C., (1994). "Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania* major", *J Exp Med*, 180: 783-793.
- [201] Wei, X.Q. Charles, I.G. Smith, A. Ure, J. Feng, G.J. Huang, F.P. Xu, D. Muller, W. Moncada, S. ve Liew, F.Y., (1995). "Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase", *Nature*, 375: 408-411.
- [202] Green, S.J. Crawford, R.M. Hockmeyer, J.T. Meltzer, M.S. ve Nacy, C.A., (1990). "*Leishmania* major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha", *J Immunol*, 145: 4290-4297.
- [203] Wilhelm, P. Ritter, U. Labbow, S. Donhauser, N. Rollinghoff, M. Bogdan, C. ve Korner, H., (2001). "Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF", *J Immunol*, 166: 4012-4019.
- [204] Balestieri, F.M. Queiroz, A.R. Scavone, C. Costa, V.M. Barral-Netto, M. ve Abrahamsen Ide, A., (2002). "*Leishmania* (L.) *amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages", *Microbes Infect*, 4: 23-29.
- [205] Bhardwaj, S. Srivastava, N. Sudan, R. ve Saha, B., (2010). "*Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy", *J Biomed Biotechnol*, 2010: 109189.

- [206] Tuon, F.F. Amato, V.S. Bacha, H.A. Almusawi, T. Duarte, M.I. ve Amato Neto, V., (2008). "Toll-like receptors and leishmaniasis", *Infect Immun*, 76: 866-872.
- [207] Kropf, P. Freudenberg, N. Kalis, C. Modolell, M. Herath, S. Galanos, C. Freudenberg, M. ve Muller, I., (2004). "Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication", *J Leukoc Biol*, 76: 48-57.
- [208] Kropf, P. Freudenberg, M.A. Modolell, M. Price, H.P. Herath, S. Antoniazzi, S. Galanos, C. Smith, D.F. ve Muller, I., (2004). "Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*", *Infect Immun*, 72: 1920-1928.
- [209] Schleicher, U. Liese, J. Knippertz, I. Kurzmann, C. Hesse, A. Heit, A. Fischer, J.A. Weiss, S. Kalinke, U. Kunz, S. ve Bogdan, C., (2007). "NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs", *J Exp Med*, 204: 893-906.
- [210] Buxbaum, L.U. Uzonna, J.E. Goldschmidt, M.H. ve Scott, P., (2002). "Control of New World cutaneous leishmaniasis is IL-12 independent but STAT4 dependent", *Eur J Immunol*, 32: 3206-3215.
- [211] Aebischer, T. Bennett, C.L. Pelizzola, M. Vizzardelli, C. Pavelka, N. Urbano, M. Capozzoli, M. Luchini, A. Ilg, T. Granucci, F. Blackburn, C.C. ve Ricciardi-Castagnoli, P., (2005). "A critical role for lipophosphoglycan in proinflammatory responses of dendritic cells to *Leishmania mexicana*", *Eur J Immunol*, 35: 476-486.
- [212] Argueta-Donohue, J. Carrillo, N. Valdes-Reyes, L. Zentella, A. Aguirre-Garcia, M. Becker, I. ve Gutierrez-Kobeh, L., (2008). "*Leishmania mexicana*: participation of NF-kappaB in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG)", *Exp Parasitol*, 120: 1-9.
- [213] Rocha, F.J. Schleicher, U. Mattner, J. Alber, G. ve Bogdan, C., (2007). "Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice", *Infect Immun*, 75: 3823-3832.
- [214] Vargas-Inchaustegui, D.A. Tai, W. Xin, L. Hogg, A.E. Corry, D.B. ve Soong, L., (2009). "Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice", *Infect Immun*, 77: 2948-2956.
- [215] Soong, L. Xu, J.C. Grewal, I.S. Kima, P. Sun, J. Longley, B.J., Jr. Ruddle, N.H. McMahon-Pratt, D. ve Flavell, R.A., (1996). "Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection", *Immunity*, 4: 263-273.
- [216] Villasenor-Cardoso, M.I. Salaiza, N. Delgado, J. Gutierrez-Kobeh, L. Perez-Torres, A. ve Becker, I., (2008). "Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host", *Parasite Immunol*, 30: 425-434.

- [217] Karin, M., (1992). "Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease", *FASEB J*, 6: 2581-2590.
- [218] Radler-Pohl, A. Sachsenmaier, C. Gebel, S. Auer, H.P. Bruder, J.T. Rapp, U. Angel, P. Rahmsdorf, H.J. ve Herrlich, P., (1993). "UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase", *EMBO J*, 12: 1005-1012.
- [219] Feng, G.J. Goodridge, H.S. Harnett, M.M. Wei, X.Q. Nikolaev, A.V. Higson, A.P. ve Liew, F.Y., (1999). "Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase", *J Immunol*, 163: 6403-6412.
- [220] Balaraman, S. Singh, V.K. Tewary, P. ve Madhubala, R., (2005). "Leishmania lipophosphoglycan activates the transcription factor activating protein 1 in J774A.1 macrophages through the extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinase", *Mol Biochem Parasitol*, 139: 117-127.
- [221] Nishizuka, Y., (1988). "The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation", *Nature*, 334: 661-665.
- [222] Descoteaux, A. ve Turco, S.J., (1993). "The lipophosphoglycan of Leishmania and macrophage protein kinase C", *Parasitol Today*, 9: 468-471.
- [223] Moore, K.J. Labrecque, S. ve Matlashewski, G., (1993). "Alteration of Leishmania donovani infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction", *J Immunol*, 150: 4457-4465.
- [224] Olivier, M. Brownsey, R.W. ve Reiner, N.E., (1992). "Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with Leishmania donovani is associated with altered activation and translocation of protein kinase C", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 7481-7485.
- [225] Descoteaux, A. Matlashewski, G. ve Turco, S.J., (1992). "Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by Leishmania donovani lipophosphoglycan", *J Immunol*, 149: 3008-3015.
- [226] Gusella, G.L. Musso, T. Rottschäfer, S.E. Pulkki, K. ve Varesio, L., (1995). "Potential requirement of a functional double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) for the tumoricidal activation of macrophages by lipopolysaccharide or IFN-alpha beta, but not IFN-gamma", *J Immunol*, 154: 345-354.
- [227] Yeung, M.C. Liu, J. ve Lau, A.S., (1996). "An essential role for the interferon-inducible, double-stranded RNA-activated protein kinase PKR in the tumor necrosis factor-induced apoptosis in U937 cells", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 12451-12455.
- [228] Goh, K.C. deVeer, M.J. ve Williams, B.R., (2000). "The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin", *EMBO J*, 19: 4292-4297.

- [229] Pereira, R.M. Teixeira, K.L. Barreto-de-Souza, V. Calegari-Silva, T.C. De-Melo, L.D. Soares, D.C. Bou-Habib, D.C. Silva, A.M. Saraiva, E.M. ve Lopes, U.G., (2010). "Novel role for the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR: modulation of macrophage infection by the protozoan parasite *Leishmania*", *FASEB J*, 24: 617-626.
- [230] Berman, J.D. Dwyer, D. ve Wyler, D., (1979). "Multiplication of *Leishmania* in human macrophages in vitro", *Infection and immunity*, 26: 375.
- [231] Chang, K.P. ve Dwyer, D.M., (1976). "Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro", *Science*, 193: 678.
- [232] El-On, J. Bradley, D. ve Freeman, J., (1980). "*Leishmania donovani*: action of excreted factor on hydrolytic enzyme activity of macrophages from mice with genetically different resistance to infection", *Experimental Parasitology*, 49: 167-174.
- [233] Eilam, Y. El-On, J. ve Spira, D.T., (1985). "*Leishmania major*: excreted factor, calcium ions, and the survival of amastigotes", *Experimental Parasitology*, 59: 161-168.
- [234] Greenberg, M.E. ve Ziff, E.B., (1984). "Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene", *Nature*, 311: 433-438.
- [235] Radzioch, D. Bottazzi, B. ve Varesio, L., (1987). "Augmentation of c-fos mRNA expression by activators of protein kinase C in fresh, terminally differentiated resting macrophages", *Molecular and cellular biology*, 7: 595.
- [236] Bravo, R. Neuberg, M. Burckhardt, J. Almendral, J. Wallich, R. ve Müller, R., (1987). "Involvement of common and cell type-specific pathways in c-fos gene control: stable induction by cAMP in macrophages", *Cell*, 48: 251-260.
- [237] Descoteaux, A. Turco, S.J. Sacks, D.L. ve Matlashewski, G., (1991). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages", *The Journal of Immunology*, 146: 2747.
- [238] Frankenburg, S. Leibovici, V. Mansbach, N. Turco, S. ve Rosen, G., (1990). "Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan", *The Journal of Immunology*, 145: 4284.
- [239] Chan, J. Fujiwara, T. Brennan, P. McNeil, M. Turco, S.J. Sibille, J.C. Snapper, M. Aisen, P. ve Bloom, B.R., (1989). "Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86: 2453.
- [240] Green, J., (1980). "Oxidative reactions and degradations", *The Carbohydrates: Chemistry and biochemistry*. Academic Press, New York: 1101-1156.
- [241] Unanue, E.R. ve Allen, P.M., (1987). "The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells", *Science*, 236: 551.
- [242] Argueta-Donohué, J. Carrillo, N. Valdés-Reyes, L. Zentella, A. Aguirre-García, M. Becker, I. ve Gutiérrez-Kobeh, L., (2008). "*Leishmania mexicana*:

Participation of NF-[kappa] B in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG)", *Experimental Parasitology*, 120: 1-9.

- [243] Mitchell, G. ve Handman, E., (1986). "The glycoconjugate derived from a Leishmania major receptor for macrophages is a suppressogenic, disease-promoting antigen in murine cutaneous leishmaniasis", *Parasite immunology*, 8: 255.
- [244] Russell, D.G. ve Alexander, J., (1988). "Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes [published erratum appears in *J Immunol* 1988 Apr 15; 140 (8): 2858]", *The Journal of Immunology*, 140: 1274.
- [245] Allahverdiyev, A. Bağırova, M. Cakir, K.R. Oztel, O. Elçiçek, S. Ateş, S.C. ve Karaca, T.D., (2010). "Approaches and problems in vaccine development against leishmaniasis", *Türkiye parazitolojii dergisi/Türkiye Parazitoloji Derneği= Acta parasitologica Turcica/Turkish Society for Parasitology*, 34: 122.
- [246] Garg, R. ve Dube, A., (2006). "Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis", *Indian J Med Res*, 123: 439-454.
- [247] Handman, E., (1997). "Leishmania vaccines: old and new", *Parasitol Today*, 13: 236-238.
- [248] Reizenstein, P. Ogier, C. ve Sjogren, A.M., (1980). "Immunotherapy versus chemotherapy of acute myeloid leukemia: response to PHA, allogeneic lymphocytes, and leukemic myeloblasts of remission lymphocytes from leukemia patients", *Recent Results Cancer Res*, 75: 29-36.
- [249] Mayrink, W. Magalhaes, P.A. Michalick, M.S. da Costa, C.A. Lima Ade, O. Melo, M.N. Toledo, V.P. Nascimento, E. Dias, M. Genaro, O. ve et al., (1992). "Immunotherapy as a treatment of American cutaneous leishmaniasis: preliminary studies in Brazil", *Parassitologia*, 34: 159-165.
- [250] Khalil, E.A. El Hassan, A.M. Zijlstra, E.E. Mukhtar, M.M. Ghalib, H.W. Musa, B. Ibrahim, M.E. Kamil, A.A. Elsheikh, M. Babiker, A. ve Modabber, F., (2000). "Autoclaved Leishmania major vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan", *Lancet*, 356: 1565-1569.
- [251] Handman, E. Symons, F.M. Baldwin, T.M. Curtis, J.M. ve Scheerlinck, J., (1995). "Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from Leishmania major is mediated by a TH1 type of immune response", *Infection and immunity*, 63: 4261.
- [252] Hommel, M. Jaffe, C.L. Travi, B. ve Milon, G., (1995). "Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines", *Ann Trop Med Parasitol*, 89 Suppl 1: 55-73.
- [253] Bradley, D.J., (1974). "Letter: Genetic control of natural resistance to Leishmania donovani", *Nature*, 250: 353-354.

- [254] Blackwell, J.M., (1996). "Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man", *Parasitology*, 112 Suppl: S67-74.
- [255] Kaye, P.M. Gorak, P. Murphy, M. ve Ross, S., (1995). "Strategies for immune intervention in visceral leishmaniasis", *Ann Trop Med Parasitol*, 89 Suppl 1: 75-81.
- [256] Rachamim, N. ve Jaffe, C.L., (1993). "Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis", *J Immunol*, 150: 2322-2331.
- [257] Afrin, F. ve Ali, N., (1997). "Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes", *Infect Immun*, 65: 2371-2377.
- [258] Afrin, F. Anam, K. ve Ali, N., (2000). "Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigote antigens in negatively charged liposomes", *Journal of Parasitology*, 86: 730-735.
- [259] Howard, J.G. Hale, C. ve Chan-Liew, W.L., (1980). "Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice", *Parasite Immunol*, 2: 303-314.
- [260] Himmelrich, H. Launois, P. Maillard, I. Biedermann, T. Tacchini-Cottier, F. Locksley, R.M. Rocken, M. ve Louis, J.A., (2000). "In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease", *J Immunol*, 164: 4819-4825.
- [261] Cook, J.A. ve Holbrook, T.W., (1983). "Immunogenicity of soluble and particulate antigens from *Leishmania donovani*: effect of glucan as an adjuvant", *Infect Immun*, 40: 1038-1043.
- [262] Titus, R.G. Gueiros-Filho, F.J. de Freitas, L.A. ve Beverley, S.M., (1995). "Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 10267-10271.
- [263] Veras, P. Brodskyn, C. Balestieri, F. Freitas, L. Ramos, A. Queiroz, A. Barral, A. Beverley, S. ve Barral-Netto, M., (1999). "A dhfr-ts- *Leishmania major* knockout mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94: 491-496.
- [264] Khamesipour, A. Abbasi, A. Firooz, A. Mohammadi, A.M. Eskandari, S.E. ve Jaafari, M.R., (2012). "Treatment of cutaneous lesion of 20 years' duration caused by leishmanization", *Indian J Dermatol*, 57: 123-125.
- [265] Tabbara, K.S. Peters, N.C. Afrin, F. Mendez, S. Bertholet, S. Belkaid, Y. ve Sacks, D.L., (2005). "Conditions influencing the efficacy of vaccination with live organisms against *Leishmania major* infection", *Infect Immun*, 73: 4714-4722.
- [266] Modabber, F., (1995). "Vaccines against leishmaniasis", *Ann Trop Med Parasitol*, 89 Suppl 1: 83-88.

- [267] Kedzierski, L. Zhu, Y. ve Handman, E., (2006). "Leishmania vaccines: progress and problems", *Parasitology*, 133 Suppl: S87-112.
- [268] Streit, J.A. Recker, T.J. Filho, F.G. Beverley, S.M. ve Wilson, M.E., (2001). "Protective immunity against the protozoan *Leishmania chagasi* is induced by subclinical cutaneous infection with virulent but not avirulent organisms", *J Immunol*, 166: 1921-1929.
- [269] Amaral, V.F. Teva, A. Oliveira-Neto, M.P. Silva, A.J. Pereira, M.S. Cupolillo, E. Porrozi, R. Coutinho, S.G. Pirmez, C. Beverley, S.M. ve Grimaldi, G., Jr., (2002). "Study of the safety, immunogenicity and efficacy of attenuated and killed *Leishmania* (*Leishmania*) major vaccines in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of the human disease", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97: 1041-1048.
- [270] Uzonna, J.E. Spath, G.F. Beverley, S.M. ve Scott, P., (2004). "Vaccination with phosphoglycan-deficient *Leishmania* major protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response", *J Immunol*, 172: 3793-3797.
- [271] Kebaier, C. Uzonna, J.E. Beverley, S.M. ve Scott, P., (2006). "Immunization with persistent attenuated Delta lpg2 *Leishmania* major parasites requires adjuvant to provide protective immunity in C57BL/6 mice", *Infect Immun*, 74: 777-780.
- [272] Spath, G.F. Lye, L.F. Segawa, H. Turco, S.J. ve Beverley, S.M., (2004). "Identification of a compensatory mutant (lpg2-REV) of *Leishmania* major able to survive as amastigotes within macrophages without LPG2-dependent glycoconjugates and its significance to virulence and immunization strategies", *Infect Immun*, 72: 3622-3627.
- [273] Silvestre, R. Cordeiro-Da-Silva, A. Santarem, N. Vergnes, B. Sereno, D. ve Ouaisi, A., (2007). "SIR2-deficient *Leishmania infantum* induces a defined IFN-gamma/IL-10 pattern that correlates with protection", *J Immunol*, 179: 3161-3170.
- [274] Selvapandiyan, A. Debrabant, A. Duncan, R. Muller, J. Salotra, P. Sreenivas, G. Salisbury, J.L. ve Nakhasi, H.L., (2004). "Centrin gene disruption impairs stage-specific basal body duplication and cell cycle progression in *Leishmania*", *J Biol Chem*, 279: 25703-25710.
- [275] Silvestre, R. Cordeiro-da-Silva, A. ve Ouaisi, A., (2008). "Live attenuated *Leishmania* vaccines: a potential strategic alternative", *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 56: 123-126.
- [276] Muyombwe, A. Olivier, M. Harvie, P. Bergeron, M.G. Ouellette, M. ve Papadopolou, B., (1998). "Protection against *Leishmania* major challenge infection in mice vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene", *J Infect Dis*, 177: 188-195.
- [277] Allahverdiyev, A. Bagirova, M. Cakir Koc, R. Oztel, O.N. Elcicek, S. Ates, S.C. ve Karaca, T.D., (2010). "[Approaches and problems in vaccine development against leishmaniasis]", *Turkiye Parazit Derg*, 34: 122-130.

- [278] Palatnik-de-Sousa, C.B., (2008). "Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years", *Vaccine*, 26: 1709-1724.
- [279] Mayrink, W. da Costa, C.A. Magalhaes, P.A. Melo, M.N. Dias, M. Lima, A.O. Michalick, M.S. ve Williams, P., (1979). "A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 73: 385-387.
- [280] Velez, I.D. Gilchrist, K. Arbelaez, M.P. Rojas, C.A. Puerta, J.A. Antunes, C.M. Zicker, F. ve Modabber, F., (2005). "Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99: 593-598.
- [281] Ghalib, H. ve Modabber, F., (2007). "Consultation meeting on the development of therapeutic vaccines for post kala azar dermal leishmaniasis", *Kinetoplastid Biol Dis*, 6: 7.
- [282] Rivier, D. Bovay, P. Shah, R. Didisheim, S. ve Mael, J., (1999). "Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection", *Parasite Immunol*, 21: 461-473.
- [283] Handman, E. Button, L.L. ve McMaster, R.W., (1990). "*Leishmania major*: production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice", *Exp Parasitol*, 70: 427-435.
- [284] Olobo, J.O. Anjili, C.O. Gicheru, M.M. Mbatia, P.A. Kariuki, T.M. Githure, J.I. Koech, D.K. ve McMaster, W.R., (1995). "Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant *Leishmania* 'major surface glycoprotein' (gp63)", *Vet Parasitol*, 60: 199-212.
- [285] Russell, D.G. ve Alexander, J., (1988). "Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes", *J Immunol*, 140: 1274-1279.
- [286] Abdelhak, S. Louzir, H. Timm, J. Blel, L. Benlasfar, Z. Lagranderie, M. Gheorghiu, M. Dellagi, K. ve Gicquel, B., (1995). "Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice", *Microbiology*, 141 (Pt 7): 1585-1592.
- [287] McSorley, S.J. Xu, D. ve Liew, F.Y., (1997). "Vaccine efficacy of *Salmonella* strains expressing glycoprotein 63 with different promoters", *Infect Immun*, 65: 171-178.
- [288] Xu, D. McSorley, S.J. Chatfield, S.N. Dougan, G. ve Liew, F.Y., (1995). "Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA- AroD-)", *Immunology*, 85: 1-7.
- [289] Berberich, C. Ramirez-Pineda, J.R. Hambrecht, C. Alber, G. Skeiky, Y.A. ve Moll, H., (2003). "Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens", *J Immunol*, 170: 3171-3179.

- [290] Lohman, K.L. Langer, P.J. ve McMahon-Pratt, D., (1990). "Molecular cloning and characterization of the immunologically protective surface glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 8393-8397.
- [291] Kahl, L.P. ve McMahon-Pratt, D., (1987). "Structural and antigenic characterization of a species- and promastigote-specific *Leishmania mexicana amazonensis* membrane protein", *J Immunol*, 138: 1587-1595.
- [292] McMahon-Pratt, D. Rodriguez, D. Rodriguez, J.R. Zhang, Y. Manson, K. Bergman, C. Rivas, L. Rodriguez, J.F. Lohman, K.L. Ruddle, N.H. ve et al., (1993). "Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection", *Infect Immun*, 61: 3351-3359.
- [293] Kedzierski, L. Montgomery, J. Bullen, D. Curtis, J. Gardiner, E. Jimenez-Ruiz, A. ve Handman, E., (2004). "A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3", *J Immunol*, 172: 4902-4906.
- [294] Murray, P.J. ve Spithill, T.W., (1991). "Variants of a *Leishmania* surface antigen derived from a multigenic family", *J Biol Chem*, 266: 24477-24484.
- [295] Handman, E. Symons, F.M. Baldwin, T.M. Curtis, J.M. ve Scheerlinck, J.P., (1995). "Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response", *Infect Immun*, 63: 4261-4267.
- [296] Sjolander, A. Baldwin, T.M. Curtis, J.M. Bengtsson, K.L. ve Handman, E., (1998). "Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection", *Vaccine*, 16: 2077-2084.
- [297] Mougneau, E. Altare, F. Wakil, A.E. Zheng, S. Coppola, T. Wang, Z.E. Waldmann, R. Locksley, R.M. ve Glaichenhaus, N., (1995). "Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen", *Science*, 268: 563-566.
- [298] Fernandes, A.P. Herrera, E.C. Mayrink, W. Gazzinelli, R.T. Liu, W.Y. de Costa, C.A. Tavares, C.A. Melo, M.N. Michalick, M.S. Gentz, R. ve Nascimento, E., (1997). "Immune responses induced by a *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* recombinant antigen in mice and lymphocytes from vaccinated subjects", *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 39: 71-78.
- [299] Carvalho, L.P. Passos, S. Dutra, W.O. Soto, M. Alonso, C. Gollob, K.J. Carvalho, E.M. ve Ribeiro de Jesus, A., (2005). "Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients", *Scand J Immunol*, 61: 337-342.
- [300] Parra, L. Borja-Cabrera, G. Santos, F. Souza, L. Palatnik-de-Sousa, C. ve Menz, I., (2007). "Safety trial using the Leishmune[®] vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil", *Vaccine*, 25: 2180-2186.

- [301] Palatnik-de-Sousa, C. Dutra, H. ve Borojevic, R., (1993). "< i> Leishmania donovani</i> surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the Fucose-Mannose Ligand (FML)", *Acta tropica*, 53: 59-72.
- [302] Palatnik-de-Sousa, C.B. Barbosa Ade, F. Oliveira, S.M. Nico, D. Bernardo, R.R. Santos, W.R. Rodrigues, M.M. Soares, I. ve Borja-Cabrera, G.P., (2008). "FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine", *Expert Rev Vaccines*, 7: 833-851.
- [303] da Silva, V.O. Borja-Cabrera, G.P. Correia Pontes, N.N. de Souza, E.P. Luz, K.G. Palatnik, M. ve Palatnik de Sousa, C.B., (2000). "A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN)", *Vaccine*, 19: 1082-1092.
- [304] Borja-Cabrera, G.P. Correia Pontes, N.N. da Silva, V.O. Paraguai de Souza, E. Santos, W.R. Gomes, E.M. Luz, K.G. Palatnik, M. ve Palatnik de Sousa, C.B., (2002). "Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN)", *Vaccine*, 20: 3277-3284.
- [305] Lemesre, J.L. Holzmuller, P. Goncalves, R.B. Bourdoiseau, G. Hugnet, C. Cavaleyra, M. ve Papierok, G., (2007). "Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial", *Vaccine*, 25: 4223-4234.
- [306] Holzmuller, P. Cavaleyra, M. Moreaux, J. Kovacic, R. Vincendeau, P. Papierok, G. ve Lemesre, J.L., (2005). "Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis", *Vet Immunol Immunopathol*, 106: 247-257.
- [307] Rafati, S. Zahedifard, F. ve Nazgouee, F., (2006). "Prime-boost vaccination using cysteine proteinases type I and II of *Leishmania infantum* confers protective immunity in murine visceral leishmaniasis", *Vaccine*, 24: 2169-2175.
- [308] McKerrow, J.H. Engel, J.C. ve Caffrey, C.R., (1999). "Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections", *Bioorg Med Chem*, 7: 639-644.
- [309] Robertson, C.D. Coombs, G.H. North, M.J. ve Mottram, J.C., (1996). "Parasite cysteine proteinases", *Perspectives in drug discovery and design*, 6: 99-118.
- [310] Zadeh-Vakili, A. Taheri, T. Taslimi, Y. Doustdari, F. Salmanian, A.H. ve Rafati, S., (2004). "Immunization with the hybrid protein vaccine, consisting of *Leishmania major* cysteine proteinases Type I (CPB) and Type II (CPA), partially protects against leishmaniasis", *Vaccine*, 22: 1930-1940.
- [311] Tibbetts, R.S. Kim, I.Y. Olson, C.L. Barthel, L.M. Sullivan, M.A. Winkquist, A.G. Miller, S.D. ve Engman, D.M., (1994). "Molecular cloning and characterization of the 78-kilodalton glucose-regulated protein of *Trypanosoma cruzi*", *Infect Immun*, 62: 2499-2507.

- [312] Soong, L. Duboise, S.M. Kima, P. ve McMahon-Pratt, D., (1995). "Leishmania pifanoi amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis", *Infect Immun*, 63: 3559-3566.
- [313] Whitaker, S.M. Colmenares, M. Pestana, K.G. ve McMahon-Pratt, D., (2008). "Leishmania pifanoi proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through Toll-like receptor 4", *Infect Immun*, 76: 2149-2156.
- [314] Kar, S. Metz, C. ve McMahon-Pratt, D., (2005). "CD4+ T cells play a dominant role in protection against New World leishmaniasis induced by vaccination with the P-4 amastigote antigen", *Infect Immun*, 73: 3823-3827.
- [315] Carrillo, E. Ahmed, S. Goldsmith-Pestana, K. Nieto, J. Osorio, Y. Travi, B. Moreno, J. ve McMahon-Pratt, D., (2007). "Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis", *Vaccine*, 25: 1534-1543.
- [316] Resende, D.M. Caetano, B.C. Dutra, M.S. Penido, M.L. Abrantes, C.F. Verly, R.M. Resende, J.M. Pilo-Veloso, D. Rezende, S.A. Bruna-Romero, O. Fernandes, A.P. ve Gazzinelli, R.T., (2008). "Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the Leishmania amastigote specific A2 antigen: correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8+ T cells", *Vaccine*, 26: 4585-4593.
- [317] Moreno, J. Nieto, J. Masina, S. Canavate, C. Cruz, I. Chicharro, C. Carrillo, E. Napp, S. Reymond, C. Kaye, P.M. Smith, D.F. Fasel, N. ve Alvar, J., (2007). "Immunization with H1, HASPB1 and MML Leishmania proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis", *Vaccine*, 25: 5290-5300.
- [318] Wilson, M.E. Young, B.M. Andersen, K.P. Weinstock, J.V. Metwali, A. Ali, K.M. ve Donelson, J.E., (1995). "A recombinant Leishmania chagasi antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice", *Infect Immun*, 63: 2062-2069.
- [319] Streit, J.A. Recker, T.J. Donelson, J.E. ve Wilson, M.E., (2000). "BCG Expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* Induces Protective Immunity in Susceptible Mice", *Experimental Parasitology*, 94: 33-41.
- [320] Streit, J.A. Recker, T.J. Donelson, J.E. ve Wilson, M.E., (2000). "BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice", *Exp Parasitol*, 94: 33-41.
- [321] Solioz, N. Blum-Tirouvanziam, U. Jacquet, R. Rafati, S. Corradin, G. Mauel, J. ve Fasel, N., (1999). "The protective capacities of histone H1 against experimental murine cutaneous leishmaniasis", *Vaccine*, 18: 850-859.
- [322] Jain, M. ve Madhubala, R., (2008). "Characterization and localization of ORFF gene from the LD1 locus of *Leishmania donovani*", *Gene*, 416: 1-10.
- [323] Tewary, P. Sukumaran, B. Saxena, S. ve Madhubala, R., (2004). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides are potent enhancers of protective immunity in mice immunized with recombinant ORFF leishmanial antigen", *Vaccine*, 22: 3053-3060.

- [324] Jaffe, C.L. ve Zalis, M., (1988). "Use of purified parasite proteins from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis", *J Infect Dis*, 157: 1212-1220.
- [325] Jaffe, C.L. Rachamim, N. ve Sarfstein, R., (1990). "Characterization of two proteins from *Leishmania donovani* and their use for vaccination against visceral leishmaniasis", *J Immunol*, 144: 699-706.
- [326] Soto, M. Requena, J.M. Quijada, L. Guzman, F. Patarroyo, M.E. ve Alonso, C., (1995). "Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis", *Immunol Lett*, 48: 23-28.
- [327] Iborra, S. Carrion, J. Anderson, C. Alonso, C. Sacks, D. ve Soto, M., (2005). "Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice", *Infect Immun*, 73: 5842-5852.
- [328] Iborra, S. Parody, N. Abanades, D.R. Bonay, P. Prates, D. Novais, F.O. Barral-Netto, M. Alonso, C. ve Soto, M., (2008). "Vaccination with the *Leishmania* major ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice", *Microbes Infect*, 10: 1133-1141.
- [329] Trujillo, C. Ramirez, R. Velez, I.D. ve Berberich, C., (1999). "The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes", *Immunol Lett*, 70: 203-209.
- [330] Jensen, A.T. Gasim, S. Ismail, A. Gaafar, A. Kurtzhals, J.A. Kemp, M. El Hassan, A.M. Kharazmi, A. ve Theander, T.G., (1998). "Humoral and cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11", *Scand J Immunol*, 48: 103-109.
- [331] Carrillo, E. Crusat, M. Nieto, J. Chicharro, C. Thomas Mdel, C. Martinez, E. Valladares, B. Canavate, C. Requena, J.M. Lopez, M.C. Alvar, J. ve Moreno, J., (2008). "Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis", *Vaccine*, 26: 1902-1911.
- [332] Saravia, N.G. Hazbon, M.H. Osorio, Y. Valderrama, L. Walker, J. Santrich, C. Cortazar, T. Lebowitz, J.H. ve Travi, B.L., (2005). "Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*", *Vaccine*, 23: 984-995.
- [333] Molano, I. Alonso, M.G. Miron, C. Redondo, E. Requena, J.M. Soto, M. Nieto, C.G. ve Alonso, C., (2003). "A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*", *Vet Immunol Immunopathol*, 92: 1-13.

- [334] Parody, N. Soto, M. Requena, J.M. ve Alonso, C., (2004). "Adjuvant guided polarization of the immune humoral response against a protective multicomponent antigenic protein (Q) from *Leishmania infantum*. A CpG + Q mix protects Balb/c mice from infection", *Parasite Immunol*, 26: 283-293.
- [335] Campos-Neto, A. Porrozzì, R. Greeson, K. Coler, R.N. Webb, J.R. Seiky, Y.A. Reed, S.G. ve Grimaldi, G., Jr., (2001). "Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease", *Infect Immun*, 69: 4103-4108.
- [336] Salay, G. Dorta, M.L. Santos, N.M. Mortara, R.A. Brodskyn, C. Oliveira, C.I. Barbieri, C.L. ve Rodrigues, M.M., (2007). "Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World", *Clin Vaccine Immunol*, 14: 1173-1181.
- [337] Fujiwara, R.T. Vale, A.M. Franca da Silva, J.C. da Costa, R.T. Quetz Jda, S. Martins Filho, O.A. Reis, A.B. Correa Oliveira, R. Machado-Coelho, G.L. Bueno, L.L. Bethony, J.M. Frank, G. Nascimento, E. Genaro, O. Mayrink, W. Reed, S. ve Campos-Neto, A., (2005). "Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis", *Vet Res*, 36: 827-838.
- [338] Gradoni, L. Foglia Manzillo, V. Pagano, A. Piantedosi, D. De Luna, R. Gramiccia, M. Scalone, A. Di Muccio, T. ve Oliva, G., (2005). "Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals", *Vaccine*, 23: 5245-5251.
- [339] Marr, J.J. Nilsen, T.W. ve Komuniecki, R., (2003). *Molecular medical parasitology*: Academic Pr.
- [340] Tsagozis, P. Karagouni, E. ve Dotsika, E., (2004). "Dendritic cells pulsed with peptides of gp63 induce differential protection against experimental cutaneous leishmaniasis", *Int J Immunopathol Pharmacol*, 17: 343-352.
- [341] Papadopoulou, B. Roy, G. Breton, M. Kundig, C. Dumas, C. Fillion, I. Singh, A.K. Olivier, M. ve Ouellette, M., (2002). "Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* bioperin transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination", *Infection and immunity*, 70: 62.
- [342] Nishikawa, H. ve Shiku, H., (2008). "[DNA vaccine]", *Nihon Rinsho*, 66: 1867-1872.
- [343] Liu, M.A. Wahren, B. ve Karlsson Hedestam, G.B., (2006). "DNA vaccines: recent developments and future possibilities", *Hum Gene Ther*, 17: 1051-1061.
- [344] Restifo, N.P. Ying, H. Hwang, L. ve Leitner, W.W., (2000). "The promise of nucleic acid vaccines", *Gene Ther*, 7: 89-92.
- [345] Coler, R.N. ve Reed, S.G., (2005). "Second-generation vaccines against leishmaniasis", *Trends Parasitol*, 21: 244-249.

- [346] Ahmed, S.B. Bahloul, C. Robbana, C. Askri, S. ve Dellagi, K., (2004). "A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*", *Vaccine*, 22: 1631-1639.
- [347] Gonzalo, R.M. del Real, G. Rodriguez, J.R. Rodriguez, D. Heljasvaara, R. Lucas, P. Larraga, V. ve Esteban, M., (2002). "A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis", *Vaccine*, 20: 1226-1231.
- [348] Yang, D.M. Fairweather, N. Button, L.L. McMaster, W.R. Kahl, L.P. ve Liew, F.Y., (1990). "Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis", *J Immunol*, 145: 2281-2285.
- [349] Xu, D. ve Liew, F.Y., (1994). "Genetic vaccination against leishmaniasis", *Vaccine*, 12: 1534-1536.
- [350] Walker, P.S. Scharton-Kersten, T. Rowton, E.D. Hengge, U. Bouloc, A. Udey, M.C. ve Vogel, J.C., (1998). "Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis", *Hum Gene Ther*, 9: 1899-1907.
- [351] Dumonteil, E. Maria Jesus, R.S. Javier, E.O. ve Maria del Rosario, G.M., (2003). "DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*", *Vaccine*, 21: 2161-2168.
- [352] Rosado-Vallado, M. Mut-Martin, M. Garcia-Miss Mdel, R. ve Dumonteil, E., (2005). "Aluminium phosphate potentiates the efficacy of DNA vaccines against *Leishmania mexicana*", *Vaccine*, 23: 5372-5379.
- [353] Rodriguez-Cortes, A. Ojeda, A. Lopez-Fuertes, L. Timon, M. Altet, L. Solano-Gallego, L. Sanchez-Robert, E. Francino, O. ve Alberola, J., (2007). "Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge", *Vaccine*, 25: 7962-7971.
- [354] Melby, P.C. Yang, J. Zhao, W. Perez, L.E. ve Cheng, J., (2001). "*Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis", *Infect Immun*, 69: 4719-4725.
- [355] Ahmed, S.B. Touihri, L. Chtourou, Y. Dellagi, K. ve Bahloul, C., (2009). "DNA based vaccination with a cocktail of plasmids encoding immunodominant *Leishmania* (*Leishmania*) major antigens confers full protection in BALB/c mice", *Vaccine*, 27: 99-106.
- [356] Campbell, K. Diao, H. Ji, J. ve Soong, L., (2003). "DNA immunization with the gene encoding P4 nuclease of *Leishmania amazonensis* protects mice against cutaneous Leishmaniasis", *Infect Immun*, 71: 6270-6278.
- [357] Zanin, F.H. Coelho, E.A. Tavares, C.A. Marques-da-Silva, E.A. Silva Costa, M.M. Rezende, S.A. Gazzinelli, R.T. ve Fernandes, A.P., (2007). "Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase

- (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections", *Microbes Infect*, 9: 1070-1077.
- [358] Pal, R. Kalyanaraman, V.S. Nair, B.C. Whitney, S. Keen, T. Hocker, L. Hudacik, L. Rose, N. Mboudjeka, I. Shen, S. Wu-Chou, T.H. Montefiori, D. Mascola, J. Markham, P. ve Lu, S., (2006). "Immunization of rhesus macaques with a polyvalent DNA prime/protein boost human immunodeficiency virus type 1 vaccine elicits protective antibody response against simian human immunodeficiency virus of R5 phenotype", *Virology*, 348: 341-353.
 - [359] Xiao-wen, H. Shu-han, S. Zhen-lin, H. Jun, L. Lei, J. Feng-juan, Z. Ya-nan, Z. ve Ying-jun, G., (2005). "Augmented humoral and cellular immune responses of a hepatitis B DNA vaccine encoding HBsAg by protein boosting", *Vaccine*, 23: 1649-1656.
 - [360] Gonzalo, R.M. del Real, G. Rodriguez, J.R. Rodriguez, D. Heljasvaara, R. Lucas, P. Larraga, V. ve Esteban, M., (2002). "A heterologous prime–boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the< i> Leishmania infantum</i> P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis", *Vaccine*, 20: 1226-1231.
 - [361] Tapia, E. Perez-Jimenez, E. Lopez-Fuertes, L. Gonzalo, R. Gherardi, M.M. ve Esteban, M., (2003). "The combination of DNA vectors expressing IL-12 + IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK", *Microbes Infect*, 5: 73-84.
 - [362] Rafati, S. Zahedifard, F. Azari, M.K. Taslimi, Y. ve Taheri, T., (2008). "Leishmania infantum: prime boost vaccination with C-terminal extension of cysteine proteinase type I displays both type 1 and 2 immune signatures in BALB/c mice", *Exp Parasitol*, 118: 393-401.
 - [363] Sukumaran, B. Tewary, P. Saxena, S. ve Madhubala, R., (2003). "Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *Leishmania donovani*", *Vaccine*, 21: 1292-1299.
 - [364] Belkaid, Y. Valenzuela, J.G. Kamhawi, S. Rowton, E. Sacks, D.L. ve Ribeiro, J., (2000). "Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly?", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 6704.
 - [365] Andrade, B. De Oliveira, C. Brodskyn, C. Barral, A. ve Barral Netto, M., (2007). "Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights", *Scandinavian journal of immunology*, 66: 122-127.
 - [366] Valenzuela, J.G. Belkaid, Y. Garfield, M.K. Mendez, S. Kamhawi, S. Rowton, E.D. Sacks, D.L. ve Ribeiro, J., (2001). "Toward a Defined Anti-*Leishmania* Vaccine Targeting Vector Antigens", *The Journal of experimental medicine*, 194: 331.

- [367] Lima, H.C. ve Titus, R.G., (1996). "Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice", *Infection and immunity*, 64: 5442.
- [368] Olobo, J. Anjili, C. Gicheru, M. Mbatia, P. Kariuki, T. Githure, J. Koech, D. ve McMaster, W., (1995). "Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant *Leishmania* [] major surface glycoprotein'(gp63)", *Veterinary Parasitology*, 60: 199-212.
- [369] Brandonisio, O. Spinelli, R. ve Pepe, M., (2004). "Dendritic cells in *Leishmania* infection", *Microbes and infection*, 6: 1402-1409.
- [370] Flohé, S.B. Bauer, C. Flohé, S. ve Moll, H., (1998). "Antigen pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major*", *European journal of immunology*, 28: 3800-3811.
- [371] Berberich, C. Ramírez-Pineda, J.R. Hambrecht, C. Alber, G. Skeiky, Y.A.W. ve Moll, H., (2003). "Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens", *The Journal of Immunology*, 170: 3171.
- [372] Breton, M. Tremblay, M.J. Ouellette, M. ve Papadopolou, B., (2005). "Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis", *Infection and immunity*, 73: 6372-6382.
- [373] Chedid, L., (1985). "Adjuvants of immunity".
- [374] Liew, F.Y. ve O'Donnell, C.A., (1993). "Immunology of leishmaniasis", *Adv Parasitol*, 32: 161-259.
- [375] D'Andrea, A. Rengaraju, M. Valiante, N.M. Chehimi, J. Kubin, M. Aste, M. Chan, S. Kobayashi, M. Young, D. ve Nickbarg, E., (1992). "Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells", *The Journal of experimental medicine*, 176: 1387-1398.
- [376] Trinchieri, G., (1993). "Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells", *Immunol Today*, 14: 335-338.
- [377] Afonso, L.C. Scharon, T.M. Vieira, L.Q. Wysocka, M. Trinchieri, G. ve Scott, P., (1994). "The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*", *Science*, 263: 235-237.
- [378] Hsieh, C.S. Macatonia, S.E. Tripp, C.S. Wolf, S.F. O'Garra, A. ve Murphy, K.M., (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages", *Science*, 260: 547-549.
- [379] Scott, P. Natovitz, P. Coffman, R.L. Pearce, E. ve Sher, A., (1988). "Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens", *J Exp Med*, 168: 1675-1684.
- [380] Skeiky, Y.A. Coler, R.N. Brannon, M. Stromberg, E. Greeson, K. Crane, R.T. Webb, J.R. Campos-Neto, A. ve Reed, S.G., (2002). "Protective efficacy of a

tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant", *Vaccine*, 20: 3292-3303.

- [381] Romani, L. Mencacci, A. Tonnetti, L. Spaccapelo, R. Cenci, E. Wolf, S. Puccetti, P. ve Bistoni, F., (1994). "Interleukin-12 but not interferon-gamma production correlates with induction of T helper type-1 phenotype in murine candidiasis", *Eur J Immunol*, 24: 909-915.
- [382] Badaro, R. Lobo, I. Nakatani, M. Muinos, A. Netto, E.M. Coler, R.N. ve Reed, S.G., (2001). "Successful use of a defined antigen/GM-CSF adjuvant vaccine to treat mucosal Leishmaniasis refractory to antimony: A case report", *Braz J Infect Dis*, 5: 223-232.
- [383] Badaro, R. Nascimento, C. Carvalho, J.S. Badaro, F. Russo, D. Ho, J.L. Reed, S.G. Johnson, W.D., Jr. ve Jones, T.C., (1994). "Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reverses neutropenia and reduces secondary infections in visceral leishmaniasis", *J Infect Dis*, 170: 413-418.
- [384] Herwaldt, B.L., (1999). "Leishmaniasis", *Lancet*, 354: 1191-1199.
- [385] Misra, A. Dube, A. Srivastava, B. Sharma, P. Srivastava, J.K. Katiyar, J.C. ve Naik, S., (2001). "Successful vaccination against *Leishmania donovani* infection in Indian langur using alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* with BCG", *Vaccine*, 19: 3485-3492.
- [386] Shoenfeld, Y. ve Isenberg, D.A., (1988). "Mycobacteria and autoimmunity", *Immunol Today*, 9: 178-182.
- [387] Milstien, J.B. ve Gibson, J.J., (1990). "Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety", *Bull World Health Organ*, 68: 93-108.
- [388] Mutiso, J.M. Macharia, J.C. ve Gicheru, M.M., (2010). "A review of adjuvants for *Leishmania* vaccine candidates", *Journal of Biomedical Research*, 24: 16-25.
- [389] Masina, S. M, M.G. Demotz, S.O. ve Fasel, N.J., (2003). "Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys using a recombinant histone H1 antigen", *J Infect Dis*, 188: 1250-1257.
- [390] Reed, S.G. Bertholet, S. Coler, R.N. ve Friede, M., (2009). "New horizons in adjuvants for vaccine development", *Trends Immunol*, 30: 23-32.
- [391] Kaslow, D.C. Bathurst, I.C. Lensen, T. Ponnudurai, T. Barr, P.J. ve Keister, D.B., (1994). "*Saccharomyces cerevisiae* recombinant Pfs25 adsorbed to alum elicits antibodies that block transmission of *Plasmodium falciparum*", *Infect Immun*, 62: 5576-5580.
- [392] Spickler, A.R. ve Roth, J.A., (2003). "Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects", *J Vet Intern Med*, 17: 273-281.

- [393] Glenny, A. Buttle, G. ve Stevens, M.F., (1931). "Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: Toxoid precipitated with alum", *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 34: 267-275.
- [394] Eickhoff, T.C. ve Myers, M., (2002). "Workshop summary - Aluminum in vaccines", *Vaccine*, 20: S1-S4.
- [395] Gupta, R. Rost, B. Relyveld, E. ve Siber, G., (1995). "Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds", *Pharmaceutical biotechnology*, 6: 229.
- [396] Kumar, S. Jones, T.R. Oakley, M.S. Zheng, H. Kuppusamy, S.P. Taye, A. Krieg, A.M. Stowers, A.W. Kaslow, D.C. ve Hoffman, S.L., (2004). "CpG oligodeoxynucleotide and Montanide ISA 51 adjuvant combination enhanced the protective efficacy of a subunit malaria vaccine", *Infect Immun*, 72: 949-957.
- [397] Verthelyi, D. Kenney, R.T. Seder, R.A. Gam, A.A. Friedag, B. ve Klinman, D.M., (2002). "CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates", *J Immunol*, 168: 1659-1663.
- [398] Sohrabi, Y. ve Mahmoud, R., (2005). "Evaluation of immune response against leishmaniasis in resistance C57 BL/6 mice immunized with liposomes containing autoclaved *Leishmania major* with BCG", *Cell Mol. Biol. Lett*, 10: S98.
- [399] Holbrook, T.W. Cook, J.A. ve Parker, B.W., (1981). "Immunization against *Leishmania donovani*: glucan as an adjuvant with killed promastigotes", *Am J Trop Med Hyg*, 30: 762-768.
- [400] Lindblad, E.B., (2004). "Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect", *Vaccine*, 22: 3658-3668.
- [401] Sharples, C.E. Shaw, M.A. Castes, M. Convit, J. ve Blackwell, J.M., (1994). "Immune response in healthy volunteers vaccinated with BCG plus killed leishmanial promastigotes: antibody responses to mycobacterial and leishmanial antigens", *Vaccine*, 12: 1402-1412.
- [402] Kensil, C.R. Wu, J.Y. ve Soltysik, S., (1995). "Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21", *Pharm Biotechnol*, 6: 525-541.
- [403] Osebold, J., (1982). "Mechanisms of action by immunologic adjuvants", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181: 983.
- [404] Panaro, M.A. Acquafredda, A. Lisi, S. Lofrumento, D.D. Mitolo, V. Sisto, M. Fasanella, A. Trotta, T. Bertani, F. Consenti, B. ve Brandonisio, O., (2001). "Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes", *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 24: 187-195.
- [405] Gicheru, M.M. Olobo, J.O. Anjili, C.O. Orago, A.S. Modabber, F. ve Scott, P., (2001). "Vervet monkeys vaccinated with killed *Leishmania major* parasites and interleukin-12 develop a type 1 immune response but are not protected against challenge infection", *Infect Immun*, 69: 245-251.

- [406] Kabanov, V.A., (2004). "From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines. Review", *Polymer Science Series A*, 46: 451-470.
- [407] Kabanov, V.A., (2004). "From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines", *Pure and Applied Chemistry*, 76: 1659-1677.
- [408] Diamantstein, T. Vogt, W. Ruhl, H. ve Bochert, G., (1973). "Stimulation of DNA synthesis in mouse lymphoid cells by polyanions in vitro. I. Target cells and possible mode of action", *Eur J Immunol*, 3: 488-493.
- [409] Kabanov, V.A. Mustafaev, M.I. Nekrasov, A.V. Norimov, A. ve Petrov, R.V., (1984). "[Critical nature of the effect of the degree of polyelectrolyte polymerization on immunostimulating properties]", *Dokl Akad Nauk SSSR*, 274: 998-1001.
- [410] Roitt, I. Brostoff, J. ve Male, D., (1985). "Cells involved in the immune response", Chapter, 2: 19.
- [411] Khaitov, R.M. ve Leskov, V.P., (2001). "[Immunity and stress]", *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 87: 1060-1072.
- [412] Kabanov, V.A., (1986). "Synthetic membrane active polyelectrolytes in design of artificial immunogens and vaccines": Wiley Online Library.
- [413] Kabanov, V. Zezin, A. Mustafaev, M. Kasaikin, V. ve Goethals, E., (1980). "Polymeric Amines and Ammonium Salts", Pergamon Press, Oxford, 173.
- [414] Ataullakhanov, R.I. Petrov, R.V. Khaitov, R.M. Ataullakhanov, F.I. ve Abdullaev, D.M., (1984). "[Activation of the ion-transporting ATPases of the lymphocyte plasma membrane as affected by mitogenic doses of polyanions]", *Dokl Akad Nauk SSSR*, 274: 479-482.
- [415] Petrov, R. Khaitov, R. ve Ataullakhanov, R., (1987). "Artificial antigens and vaccines based on non-natural polyelectrolytes", *Sov Med Rev D Immunol Rev*, 1: 241-443.
- [416] Gebhardt, J. ve Fuerstenau, D., (1983). "Adsorption of polyacrylic acid at oxide/water interfaces", *Colloids and Surfaces*, 7: 221-231.
- [417] Kriwet, B. Walter, E. ve Kissel, T., (1998). "Synthesis of bioadhesive poly (acrylic acid) nano-and microparticles using an inverse emulsion polymerization method for the entrapment of hydrophilic drug candidates", *Journal of controlled release*, 56: 149-158.
- [418] Ma, W.D. Xu, H. Wang, C. Nie, S.F. ve Pan, W.S., (2008). "Pluronic F127-g-poly (acrylic acid) copolymers as in situ gelling vehicle for ophthalmic drug delivery system", *International journal of pharmaceuticals*, 350: 247-256.
- [419] Lele, B. ve Hoffman, A., (2000). "Mucoadhesive drug carriers based on complexes of poly (acrylic acid) and PEGylated drugs having hydrolysable PEG-anhydride-drug linkages", *Journal of controlled release*, 69: 237-248.
- [420] Bromberg, L., (1998). "Polyether-modified poly (acrylic acid): synthesis and applications", *Industrial & engineering chemistry research*, 37: 4267-4274.

- [421] Ahn, J.S. Choi, H.K. Chun, M.K. Ryu, J.M. Jung, J.H. Kim, Y.U. ve Cho, C.S., (2002). "Release of triamcinolone acetonide from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly (acrylic acid) in vitro", *Biomaterials*, 23: 1411-1416.
- [422] Brooks, S.C. Locke, E.R. ve Soule, H.D., (1973). "Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma", *Journal of Biological Chemistry*, 248: 6251-6253.
- [423] Cheng, D. ve Sefton, M.V., (2009). "Dual delivery of placental growth factor and vascular endothelial growth factor from poly (hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) microcapsules containing doubly transfected luciferase-expressing I929 cells", *Tissue Engineering Part A*, 15: 1929-1939.
- [424] TAYŞİ, B. KAYHAN, B. AYBAY, C. ve İMİR, T., "Deneysel Çalışma".
- [425] Riesz, P. ve Kondo, T., (1992). "Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications", *Free radical biology & medicine*, 13: 247.
- [426] Sladowski, D. Steer, S.J. Clothier, R.H. ve Balls, M., (1993). "An improved MIT assay", *Journal of immunological methods*, 157: 203-207.
- [427] GARCIA, S., "METHODS FOR THE DETECTION OF APOPTOSIS".
- [428] Allahverdiyev, A.M. Bagirova, M. Cakir-Koc, R. Elcicek, S. Oztel, O.N. Canim-Ates, S. Abamor, E.S. ve Yesilkir-Baydar, S., (2012). "Utility of the microculture method in non-invasive samples obtained from an experimental murine model with asymptomatic leishmaniasis", *Am J Trop Med Hyg*, 87: 81-86.
- [429] Jennings, H.J. ve Pon, R.A., (1996). "Polysaccharides and glycoconjugates as human vaccines", *Polysaccharides in medicinal applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY: 443-479.
- [430] Finn, A., (2004). "Bacterial polysaccharide–protein conjugate vaccines", *British medical bulletin*, 70: 1-14.
- [431] Moreau, M. ve Schulz, D., (2000). "Polysaccharide based vaccines for the prevention of pneumococcal infections".
- [432] Weintraub, A., (2003). "Immunology of bacterial polysaccharide antigens", *Carbohydrate research*, 338: 2539-2547.
- [433] Liu, X. Siegrist, S. Amacker, M. Zurbriggen, R. Pluschke, G. ve Seeberger, P.H., (2006). "Enhancement of the immunogenicity of synthetic carbohydrates by conjugation to virosomes: a leishmaniasis vaccine candidate", *ACS Chemical Biology*, 1: 161-164.
- [434] Stewart, T.D., (1996). *Theory and Practical Application of Adjuvants*: John Wiley & Sons, Ltd. (UK).

EK-A



T.C.
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2012/07

16.01.2012

KONU: Sn. Prof. Dr. Adil M. Allahverdiyev

Sayın Prof. Dr. Adil M. Allahverdiyev,

Başlığı “Leishmania parazitlerinden Lipofosfoglikan (LPG) saflaştırılması ve LPG-polimer konjugatının aşı modeli olarak antileishmanial etkinliğinin in vitro ve in vivo incelenmesi” olan projeniz 16.01.2012 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve deneklerin sakrifikasyonu sırasında uygulanacak maddenin dozunun belirtilmesi kaydıyla onanmıştır.

Prof. Dr. Erhan Ayşan
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet Belce
Üye

Prof. Dr. Serdar Üşümez
Üye

Doç. Dr. Ülkan Kılıç
Üye

Yrd. Doç. Dr. Mahmut Gürkan
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer Uysal
Üye

Uzm. Vet. Hek. Öznur İnan
Üye

Muhsin Ceylan
Üye

Ahmet Sıvil
Üye



T.C
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Sayı no: 13

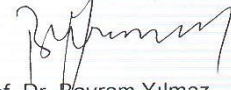
15.09.2008

İLGİLİ KURUMA;

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nden Prof. Dr. Adil Allahverdiyev'in yürütücülüğünü yaptığı "Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesinde polimerlere dayalı yeni bir yaklaşım: lipofosfoglikan (LPG)-Polimer konjugatları" başlıklı proje için etik kurulumuza yapılan başvuru değerlendirilerek uygun görülmüştür.

Bilgilerinize arz ederim.

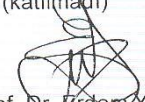

Prof. Dr. Ece Genç
Y.Ü.D.H.E.K Başkanı


Prof. Dr. Bayram Yılmaz
Üye


Doç. Dr. Işıl Kurnaz
Raportör

Sn. Yakup Yılmaz
Üye
(katılmadı)

Prof. Dr. Kemal Şençift
Başkan Yardımcısı
(katılmadı)


Prof. Dr. Erdem Yeşilada
Üye

Sn Arif Sarıkaya
Üye
(katılmadı)

26 Ağustos Yerleşimi, Kayışdağı Caddesi 34755 Kayışdağı / İSTANBUL

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Rabia ÇAKIR KOÇ
Doğum Tarihi ve Yeri : 20.10.1985 – İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : rabiacakir@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2008
Lisans	Tıbbi Biyolojik Bilimler	İstanbul Üniversitesi	2006
Lise	Fen-Matematik	Süleyman Nazif Lisesi	2002

YAYINLARI

Makale

- 1.Melahat Bağirova, Rabia Çakir Koç, Adil Allahverdiyev, Melike Ersöz, Effect of cell-conditioned media on biomass production of Leishmania parasites, Turk. J. Biol., 36, (2012), 653-657
- 2.Mesut Karahan, Zeynep Mustafaeva, Rabia Çakır Koç, Melahat Bağirova, Adil M. Allahverdiyev, Investigation of Metal-Polyelectrolyte complexes Toxicity, Toxicology and Industrial Healty, (2012)

3. Allahverdiyev A., Bagirova M., Cakir Koc R., Elcicek S., Oztel O., Canim Ates S., Abamor E. S., Yesilkir Baydar S., Utility of The Microculture Method in Non-Invasive Samples Obtained from An Experimental Murine Model With Asymptomatic Leishmaniasis, American Journal of Tropical Medicine & Hygiene, (2012)
4. Canim-Ates S., Bagirova M., Allahverdiyev A.M., Yesilkir-Baydar S., Cakir-Koc R., Elcicek S., Abamor E.S and Oztel O.N., Detection of Antileishmanial Antibodies In Blood Sampled From Blood Bank Donors in Istanbul, Future Microbiology, (2012)
5. Allahverdiyev A., Bagirova M., Elcicek S., Oztel ON., Cakir Koc R., Novruzova M., Canim Ates S., Growth of Leishmania tropica Promastigotes in Urine Samples of Different Genders and the Role of Citrate in Culture, Romanian Biotechnological Letters, Vol.17, Issue 1, (2012)
6. Allahverdiyev A. M., Bagirova M., Elcicek S., Koc R. C., Oztel O. N., Effect of human urine on cell cycle and infectivity of leishmania species promastigotes in vitro, Am J Trop Med Hyg., Vol.85, Issue 4, pp. 639-643, (2011)
7. Allahverdiyev A. M., Bagirova M., Elcicek S., Cakir Koc R., Yesilkir Baydar S., Findikli S., Oztel O. N., Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new host cell in latent leishmaniasis, American Journal of Tropical Medicine & Hygiene, Vol.85, Issue 3, (2011)
8. Allahverdiyev A. M., Koc R. C., Ates S. C., Bagirova M., Elcicek S., Oztel O. N., Leishmania tropica: The effect of darkness and light on biological activities in vitro, Experimental Parasitology, Vol.128, Issue 4, pp. 318-23, (2011)
9. Allahverdiyev A., Bağırova M., Çakır-Koç R., Öztel O.N., Elçiçek S., Canım-Ateş S., Karaca T.D, Leishmaniasise Karşı Aşı Geliştirilmesinde Yaklaşımlar ve Problemler, Türkiye Parazitol Derg. 2010, 2(34);. 122-130

Bildiri

1. Rabia Çakır Koç, Melahat Bağırova, Adil Allahverdiyev “The Development of Lipophosphoglycan Based ELISA Method for Diagnosis of Leishmaniasis”. 18th International Biomedical Science& Technology Symposium, 10-13.09.2012.
2. Allahverdiyev A.M., Bagirova M.I, Esabamor E.S., Cakir Koc R., Elcicek S., Rafailovich M. A new approach in treatment of leishmaniasis: nanoparticles and nanoparticle-containing compounds, First Congress of Euro-Asian Society of Infectious Diseases, Issue 4, Vol.2, pp. 132, (2010)
3. Allahverdiyev A., Bagirova M., Elcicek S. , Oztel O. N., Cakir R., Novruzova M., The Effect of Urine Samples of Different Genders on Growth of L.tropica Promastigotes, Eurasia Congress of Infectious Diseases (EACID), pp. 176, (2009)
4. Allahverdiyev A. M., Bağırova M., Yeşil kır S., Elçi çek S., Çakır R., Fındıkl ı N., Adipose-derived Stem Cells (ADSCs) As A New Host Cell of Leishmania Parasites, Eurasia Congress of Infectious Diseases, (2009)
5. M. Allahverdiyev, M. Bağırova, E. Ş. Abamor, Cakir R.. Nanotechnologic developments in microbiology. Eurasia Congress of Infectious Diseases (EACID) (2009)

- 6.O. N. Oztel, Cakir R., S. Yesilkir, M. Bagirova, A. M. Allahverdiyev. Investigation of Interaction between Adipocyte Stem Cells and PEG, 15th International Biomedical Science and Technology Symposium; 16-19 August 2009, Cyprus, p. 130
7. M. Allahverdiyev, M. Bagirova, E. S. Abamor, Cakir R., C. B. Ustundag, F. Kaya, C. Kaya , The Anti-Parasitic (Anti-Leishmanial) Effect of Titanium Nanoparticles in vitro, 15th International Biomedical Science and Technology Symposium; 16-19 August 2009. Cyprus, p.127
8. M. Bagirova, A. M. Allahverdiyev, Cakir R., E. S. Abamor, C. B. Ustundag, F. Kaya, C. Kaya, The Effect of Titanium Nanoparticles on Human Breast Cancer Cells (MCF) in Vitro , 15th International Biomedical Science and Technology Symposium; 16-19 August 2009. Cyprus, p. 128
9. Cakir R., M. Bagirova, A. M. Allahverdiyev The New Culture Methods for Investigation Polymers Toxicity in vitro , 15th International Biomedical Science and Technology Symposium; 16-19 August 2009. Cyprus p. 129
- 10.Allahverdiyev A.,Cakir R, Bagirova M., The Interactions Of Polymers With Leishmania Parasites, 4th World Congress on Leishmaniasis, 03-07 February 2009, India.
- 11.Allahverdiyev A.,Bagirova M., Elcicek S., Cakir R, Oztel O.N. , The Study Of Viability Of Leishmania Promastigotes Under The Light Conditions In vitro , 4th World Congress on Leishmaniasis, 03-07 February 2009, India.
- 12.Bagirova M., Allahverdiyev A., Oztel O.N, Elcicek S., Cakir R, Influence Of Human Urine On Development Of L.Tropica In Vitro 4th World Congress on Leishmaniasis, 03-07 February 2009, India.
- 13.Bagirova M., Oztel O.N., Elcicek S., Cakir R., Necati Fındıklı "Isolation and cultivation of mesenchymal stem cells obtained from cord blood. International Conference for the 85. Birthday of Professor Tagizade, page: 82-85, December 2008, Baku Azerbaijan
- 14.Bagirova M, Cakir R, Elcicek S, Novruzova M, Oztel O.N, "The importance of Flow Cytometer on Leishmania studies" International Conference for the 85. Birthday of Professor Tagizade, page: 82-85, December 2008, Baku Azerbaijan (Tur)
- 15.Yasemin Budama Kiliç, Rabia Çakir Koç, Melahat Bağirova, Adil Allahverdiyev, Zeynep Mustafaeva, "Antijenik Influenza A M2 Peptidinin Polielektrolitler Ile Biyokonjugatlarının Karakterizasyonu Ve MCF 7 Hücreleri Üzerinde Toksisitesinin İncelenmesi" 24. Ulusal Biyofizik Kongresi, İstanbul, 25-28.09.2012, sf 49
- 16.Başak Işcani Eroğlu, Rabia Çakir Koç, Melahat Bağirova, Adil Allahverdiyev, Zeynep Mustafaeva. Amiloid Beta Peptidine Ait 1-21 Dizisinin Poliakrilik Asit Ile Sentezlenen Biyokonjugatlarının MTT Yöntemi Ile Meme Kanseri Hücresindeki Etkilerinin İncelenmesi, 24. Ulusal Biyofizik Kongresi, İstanbul, 25-28.09.2012, sf 24.
- 17.Melahat Bağirova., Adil Allahverdiyev, Rabia Çakır, Serhat Elçiçek, Sezen Canım-Ateş, "Leishmania Parazitleri ile Enfekte Olmuş Uzun Süreli Fibroblast Kültüründe Enfektifliğin Mikrokültür Yöntemi ile Belirlenmesi" 16.Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım 2009, Adana, Türkiye.

- 18.Rabia Çakır, Olga Nehir Öztel, Sezen Canım-Ateş, Serhat Elçiçek, Melahat Bağirova, "Büyük Ölçekte Leishmania Parazitlerinin Üretilmesi: Kademeli Büyütme Yöntemi" 16.Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım 2009, Adana, Türkiye.
- 19.Melahat Bağirova, Adil Allahverdiyev, Rabia Çakır, Serhat Elçiçek, Sezen Canım Ateş, Leishmania Parazitleri İle Enfekte Olmuş Uzun Süreli Fibroblast Kültüründe Enfektifliğin Mikrokültür Yöntemi İle Belirlenmesi, 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım 2009, Adana, Türkiye.
- 20.Rabia Çakır, Melahat Bağirova, Adil Allahverdiyev, Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Polimerlerin In Vitro Leishmania Parazitleri İle Etkileşiminin Klinik Önemi, 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım 2009, Adana, Türkiye. (Sözlü Sunum)
- 21.Adil M. Allahverdiyev, Melahat Bağirova, Emrah Sefik Abamor, Rabia Çakır, Cem B. Ustundag, Figen Kaya, Cengiz Kaya, Gümüş Nanopartiküllerini İçeren Kaplamaların Görünür Ve UV Işık Altında Antileishmanial Etkisinin In Vitro İncelenmesi, 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım 2009, Adana, Türkiye.
- 22.Adil M. Allahverdiyev, Melahat Bağirova, Serap Yeşilkır, Serhat Elçiçek, Rabia Çakır, Necati Fındıklı, Leishmania Parazitleri Tarafından Üretilen Metabolitlerin Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (ADSCS) Proliferasyonuna Etkisi, 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım 2009, Adana, Türkiye.
- 23.Bağirova M., Canım S., M.S. Novruzova, Çakır R., "Leishmania Parazitlerinin Promastigot Kültüründen Antijen Hazırlanmasının Optimizasyonu ve IFAT Yöntemi İle İncelenmesi" XXII. Ulusal Kimya Kongresi, 6 – 10 Ekim 2008, Kıbrıs.
- 24.Öztel O.N., Elçiçek S., Çakır R., Bağirova M., Allahverdiyev A. "İnsan Kaynaklı Atık Maddelerin Leishmanial Biyomasın Elde Edilmesinde Destek Materyali Olarak Kullanılmasının İncelenmesi" 4.Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008, İzmir.
- 25.Çakır R. Bağirova M., Allahverdiyev A., "Poliakrilik Asitin Molekül Ağırlığı Ve Konsantrasyona Bağlı Olarak İn Vitro Hücre Kültüründe Toksisitesinin İncelenmesi" 4.Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008, İzmir.
- 26.Bağirova M., Çakır R., Ersöz M., Allahverdiyev A. "Meme Kanseri Hücre Metabolitlerinin Kültür Destek Materyali Olarak Kullanımı" 4.Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008, İzmir.
- 27.Elçiçek S., Bağirova M., Öztel O.N., Çakır R., Allahverdiyev A., "Işığa Maruz Kalmış Farklı Doku Kültürü Besiyerlerinin Hücre Kültürü Üzerine Etkisinin İncelenmesi" 4.Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008, İzmir.
- 28.Çakır R, Bağirova M, Allahverdiyev A.M., "MTT Yönteminin Duyarlılığının Leishmania Parazitlerinin Sayısına Bağlı Olarak İncelenmesi", 15. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kayseri, 18-23 Kasım 2007.
- 29.Bağirova M., Çakır R, Ersöz M., Allahverdiyev A.M., "Meme Kanseri Hücre Metabolitlerini İçeren Ortamda Leishmania Parazitlerinin Gelişmesinin İncelenmesi", 15. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kayseri, 18-23 Kasım 2007.

Kitap

1.Allahverdiyev AM, Bagirova M, Oztel ON, Yaman S, Abamor ES, Koc RC, Ates SC, Elcicek S, Baydar SY., *Aldehyde Dehydrogenase: Cancer And Stem Cells*, (2012) p:3-22.

2.Allahverdiyev AM, Bagirova M, Elcicek S, Koc RC, Ates SC, Baydar SY, Yaman S, Abamor ES, Oztel ON., *A Problem in Treatment of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficient Patients Infected with Malaria*, (2012) p: 66-82.

Proje

Prof. Dr. Adil Allahverdiyev yürütücülüğünde 1085170SBAG-4007 nolu “Leishmaniasis’e karşı aşı geliştirilmesinde polimerlere dayalı yeni bir yaklaşım: LPG-polimer konjugatları”, adlı TÜBİTAK projesinde araştırmacı.

Prof. Dr. Mustafa Akdeste, Prof. Dr. Sabriye Pişkin yürütücülüğünde “Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular” DPT Projesinde (Proje No: 25-DPT-07-04-01) araştırmacı.

Yrd. Doç. Dr. Melahat Bağirova yürütücülüğünde “İstanbul daki Kan Merkezlerinden Elde Edilen Donör Kan Örneklerinde, Yeni ve Klasik Tanı Yöntemleri ile Leishmania nın İncelenmesi” adlı YTÜ-BAP projesinde (29-04-04-02) araştırmacı.

ÖDÜLLERİ

- 1.Yıldız Teknik Üniversitesi Fikirler Pazarı Poster ödülü
- 2.“First Congress of Euro-Asian Society of Infectious Diseases” Kongresinde Poster Ödülü
- 3.TUBİTAK son sınıf öğrencileri için yüksek lisans bursu
- 4.TUBİTAK yurtiçi doktora bursu