

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÜMÜŞ (Ag) VE TİTANYUM DİOKSİT (TiO₂)
NANOPARTİKÜLLERİNİN KÜTANÖZ LEISHMANIASIS
ETKENİ *L.TROPICA* PARAZİTLERİ ÜZERİNDEKİ
ANTİLEISHMANIAL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Biyolog Emrah Şefik ABAMOR

FBE Biyomühendislik Anabilimdalı'nda

Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV (YTÜ)

İSTANBUL, 2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vi
KISALTMA LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ÖNSÖZ.....	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Leishmania Parazitleri.....	3
2.1.1 Parazitlerin Taksonomisi.....	3
2.2 Parazitlerin Morfolojisi	3
2.3 Leishmania Parazitlerinin Çoğalması.....	5
2.4 Parazitlerin Hayat Döngüsü	5
2.5 Leishmaniasis	6
2.5.1 Epidemiyolojisi	7
2.5.2 Leishmaniasis Hastalığının Değişik Formları	9
2.5.2.1 Kütanöz Leishmaniasis	10
2.5.2.2 Mukokütanöz Leishmaniasis.....	11
2.5.2.3 Visseral Leishmaniasis.....	11
2.6 Leishmania Parazitlerinin Kültürü	12
2.6.1 Klasik Kültür Yöntemi	12
2.6.2 Mikro Kültür Yöntemi	14
2.7. Leishmaniasis Tanısı	14
2.7.1 Serolojik Tanı.....	15
2.7.2 Moleküler Tanı.....	16
2.7.3 Mikro Kültür Yöntemine Dayalı Tanı.....	17
2.8 Kütanöz Leishmaniasis'in Tedavisinde Kullanılan Yöntemler	17
2.8.1 Sistemik Tedavi.....	17
2.8.1.1 Pentavalent Antimonlar.....	17
2.8.1.2 Pentamidine	19
2.8.1.3 İmidazoller / Triazoller.....	20
2.8.2 Lokal Tedavi	20
2.8.2.1 Fiziksel Yöntemler	20
2.8.2.2 %15 Paromomycin içeren Merhem.....	21
2.8.2.3 İntralezyonel Beş Değerli Antimon İnjesiyonu.....	21
2.8.3 Halen Araştırılmakta Olan İlaçlar	22
2.8.3.1 Miltefosine	22

2.8.3.2	Amfoterisin B/ Lipozomal Amfoterisin B	22
2.8.3.3	Allopurinol	22
2.8.3.4	Bağıışıklık Sistemini Etkileyen İlaçlar	23
2.8.3.5	Diğer İlaçlar	23
2.9	Kütanöz Leishmaniasis Tedavisinde Kullanılan İlaçların Dezavantajları ..	23
3	NANOTEKNOLOJİ NEDİR?	25
3.1	Nanobiyoteknoloji	25
3.2	Nanotıp	26
3.3	Nanopartiküller	27
3.4	Hastalıkların Tanısında Nanopartiküller	28
3.4.1	Quantum Dots	29
3.4.2	Nanokabuklar	30
3.5	İlaçların Taşınmasında Nanopartiküller	31
3.5.1	Lipozomlar	32
3.5.2	Miseller	33
3.5.3	Karbon Nanotüpler	33
3.6	Hastalıkların Tedavisinde Nanopartiküller	34
3.6.1	Metal Oksit Nanopartikülleri	35
4	TiO ₂ NANOPARTİKÜLLERİ	36
4.1	TiO ₂ Nanopartiküllerinin Genel Özellikleri	36
4.2	Fotokatalizm	36
4.3	TiO ₂ Nanopartiküllerinin Etki Mekanizmaları	37
5	GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİ	40
5.1	Gümüş Nanopartiküllerin Genel Özellikleri	40
5.2	Gümüş Nanopartikülleri ve Etki Mekanizmaları	41
6	REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ	43
6.1	Süper Oksit Radikalleri	44
6.2	Hidrojen Radikalleri	44
6.3	Reaktif Oksijen Türlerinin Leishmania Parazitlerinin Üzerindeki Etkisi	45
7	DENEYSEL ÇALIŞMALAR 47	
7.1	DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	47
7.1.2	DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri	47
7.1.3	Çözeltilerin Hazırlanması	48
7.1.3.1	PBS Tampon Hazırlanması	48
7.1.3.2	1X Tripsin solusyonu	49
7.1.3.3	RPMI 1640 Medyumun Hazırlanması	49
7.1.3.4	Hücre Dondurma Medyumunun Hazırlanması	49
7.1.3.5	MTT Solüsyonunun Hazırlanması	49
7.1.3.6	TiO ₂ Nanopartiküllerini İçeren Çözeltilerin Hazırlanması	49
7.1.3.7	Gümüş Nanopartiküllerini İçeren Çözeltilerin Hazırlanması	50
7.1.3.8	Bağlayıcı Tampon (Binding Buffer) Çözeltisi Hazırlanması	50
7.1.3.9	Annexin V-FITC Solüsyonu Hazırlanması	50
7.1.3.10	AAD Çalışma Solüsyonu Hazırlanması	50
7.2	Hücre Kültürü Teknikleri	50
7.2.1	Moni/Ep 39 <i>L.tropica</i> Suşu	50

7.2.1.1	MONI/EP39 <i>L. tropica</i> Suşlarının Kriyobanktan Çıkarılması.....	50
7.2.1.2	Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı.....	51
7.2.1.3	Moni/Ep39 <i>L. Tropica</i> Promastigotlarının Kültürü.....	51
7.2.1.4	Moni/Ep39 <i>L. Tropica</i> Promastigotlarının Dondurulması	51
7.2.2	J774 Hücre Hattı.....	52
7.2.2.1	J774 Makrofaj Hücrelerinin Kriyobanktan Çıkarılması.....	52
7.2.2.2	J774 Makrofaj Hücrelerinin Sayımı	52
7.2.2.3	J774 Makrofaj Hücrelerinin Kültürünün Yapılması	53
7.2.2.4	J774 Hücrelerinin Kriyoprezervasyonu	53
7.3	TiO ₂ Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	53
7.4	TiO ₂ Nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Proliferasyonuna ve Enfektifliğine Etkisi	54
7.4.1	TiO ₂ Nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisi.....	54
7.4.1.1	TiO ₂ Nanopartiküllerinin Farklı Ortam Koşullarında (Karanlık ve UV Işık) Leishmania Promastigotları Üzerindeki Etkisinin Tayini	54
7.4.1.2	Farklı Sürelerde UV Işığa Maruz Kalan Sabit Konsantrasyondaki TiO ₂ Nanopartiküllerinin <i>L.tropica</i> Promastigotları Üzerindeki Etkisinin Tayini	54
7.4.1.3	Farklı Ortam Koşullarında (Karanlık ve UV ışık) TiO ₂ Nanopartiküllerinin Parazitlerin Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Tayini	55
7.4.2	TiO ₂ nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Enfektifliğine Etkisinin Tayini	56
7.4.2.1	Makrofaj Hücrelerinin TiO ₂ Nanopartiküllerine Maruz Kalmış Parazitlerle Enfektifliğinin Hesaplanması	58
7.4.3	TiO ₂ Nanopartiküllerini İçeren Kaplamalara Maruz Kalmış <i>L.tropica</i> Promastigotlarının J774 Makrofaj Hücrelerini Enfektifliğinin Mikro Kültür Yöntemi ile Tayini	58
7.5	TiO ₂ nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Tayini	58
7.6	Gümüş Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....	59
7.7	Gümüş Nanopartiküllerin Leishmania Promastigotlarının Proliferasyonuna ve Enfektifliğine Etkisi	59
7.7.1	Gümüş nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisi.....	59
7.7.1.1	UV Işığa Maruz Kalan Gümüş Nanopartiküllerini İçeren Kaplamaların <i>L.tropica</i> Promastigotları Üzerindeki Etkisinin Tayini	59
7.7.1.2	Gümüş Kaplamaların Görünür Işık ve UV Işık Altında <i>L.tropica</i> Promastigotları Üzerinde Etkisinin Tayini.....	60
7.7.1.3	Gümüş Nanopartiküllerinin Farklı Konsantrasyonlarının Karanlık ve UV'li Ortamda Parazitlerin Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Tayini.....	60
7.8	Gümüş nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Enfektifliğine Etkisi.	61
7.8.1	Gümüş Nanopartiküllerini İçeren Kaplamalara Maruz Kalmış <i>L.tropica</i> Promastigotlarının J774 Makrofaj Hücrelerini Enfektifliğinin GIEMSA Boyama ile Tayini	61
7.8.2	Gümüş Nanopartiküllerini İçeren Kaplamalara Maruz Kalmış <i>L.tropica</i> Promastigotlarının J774 Makrofaj Hücrelerini Enfektifliğinin Mikro Kültür Yöntemi ile Tayini	62
7.9	Gümüş nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Tayini	63

7.10	İstatistik Analiz	63
8	DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMALAR.....	64
8.1	Titanyum Dioksit (TiO ₂) Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	64
8.2	Titanyum Dioksit (TiO ₂) Nanopartiküllerinin Farklı Konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi.....	65
8.3	Farklı Sürelerde UV Işığa Maruz Kalan Titanyum Dioksit (TiO ₂) Nanopartiküllerinin (100 µg/ml) <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi	66
8.4	Nanopartiküllerinin Farklı Konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Metabolik Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi	68
8.5	Karanlıkta ve UV Işık Altında TiO ₂ Nanopartiküllerinin <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi.....	72
8.6	Klasik Kültürde TiO ₂ Nanopartiküllerinin Leishmania Parazitlerinin Enfektifliğine Etkisinin İncelenmesi	74
8.7	Mikrokültür Yöntemi ile TiO ₂ Nanopartiküllerinin Leishmania Parazitlerinin Enfektifliğine Etkisinin İncelenmesi	78
8.8	Karanlıkta, Görünür ve UV Işık Altında Titanyum Dioksit (TiO ₂) Nanopartiküllerinin <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Hücre Döngüsüne Etkisi	79
8.9	Gümüş Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....	82
8.10	Gümüş Nanopartiküllerini İçeren Kaplamaların UV Işık Altında <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi	83
8.11	Gümüş Nanopartiküllerini İçeren Kaplamaların <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi.....	84
8.12	Gümüş Nanopartiküllerinin Farklı Konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Metabolik Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi	85
8.13	Karanlıkta ve UV Işık Altında Gümüş Nanopartiküllerine Maruz Kalan <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Morfolojilerinin İncelenmesi	91
8.14	Gümüş Nanopartiküllerinin Leishmania Parazitlerinin Enfektifliğine Etkisinin İncelenmesi	93
8.15	Mikrokültür Yöntemi ile Gümüş Nanopartiküllerinin Leishmania Parazitlerinin Enfektifliği Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi	96
8.16	Gümüş Nanopartiküllerinin <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Hücre Döngüsüne Etkisi.....	98
	TARTIŞMA	100
	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	106
	KAYNAKLAR.....	108
	ÖZGEÇMİŞ.....	118

SİMGE LİSTESİ

gr	Gram
kg	Kilogram
m ²	Metrekare
µm	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mW	Miliwatt
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
cm ²	Santimetrekare

KISALTMA LİSTESİ

AIDS	Edinilmiş Yetersiz Bağışıklık Sistemi Sendromu
ATP	Adenozin Tri Fosfat
AFM	Atomik Force Mikroskop
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
CB	İletkenlik Bandı
Cys-Gly	Sisteinil-glisin
DAT	Direkt Aglutinasyon Testi
DB	Değerlik Bandı
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EKG	Elektrokardiyogram
ELISA	Enzyme - Linked Immunosorbent Assay
EPR	Nüfuz ve Birikme Etkisi
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Yönetimi
FDS	Fetal Dana Serum
GAP	Güneydoğu Anadolu Projesi
GSH	Gluthathione
HEPES	N-2-hidroksi etilpiperazin N-2 etansulfonik asit
HAADF	Yüksek Açılı Dairesel Karanlık Alan Mikroskobu
HER-2	Meme Kanseri Hücre Hattı
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
IFAT	İndirekt Floresan Antikor Testi
J774	Makrofaj Hücre Hattı
KCl	Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
KL	Kütanöz Leishmaniasis
LB	Luria Bertoni
LIT	Karaciğer İnfüzyon Triptoz Besiyeri
MCM	Mikro Kültür Yöntemi

MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MKL	Mukokütanöz Leishmaniasis
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid
MWNT	Çok Duvarlı Nanotüpler
NaCl	Sodyum Klorür
Na ₂ HPO ₄	Di sodyum hidrojen fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NIR	Yakın İnfrared
NNN	Novy-MacNeal ve Nicole medyum
NO	Nitrik oksit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	Polietilen Glikol
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rRNA	Ribozomal Ribonükleik asit
SAG	Sodyum Antimon Glukonat
Sb(III)	Üç Değerlikli Stibium
Sb(V)	Beş Değerlikli Stibium
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SOD	Süperoksit Dismutaz
SWNT	Tek Duvarlı Karbon Nanotüp
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
TiO ₂	Titanyumdioksit
T(SH) ₂	Trypanothione
TTEM	Taramalı Transmisyon Elektron Mikroskobu
UV	Ultraviyole
VL	Visseral Leishmaniasis

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Parazitlerin farklı yaşam formları (A: amastigot B: promastigot) ve sahip oldukları organeller	4
Şekil 2.2	Parazitlerin promastigot ve amastigot formlarının mikroskopik görüntüleri	5
Şekil 2.3	Leishmania parazitlerinin hayat döngüsü	6
Şekil 2.4	Leishmaniasis'in Dünya Üzerindeki yayılımı.....	8
Şekil 3.1	Nanobiyoteknolojinin Nanotıp ile ilişkisi.....	27
Şekil 3.2	Boyutlarına bağlı olarak renk değiştiren Kuantum Dotlar.....	30
Şekil 3.3	Nanokabuklar	31
Şekil 3.4	Lipozom ve ikili fosfolipit tabaka.....	32
Şekil 3.5	Karbon Nanotüpler.....	34
Şekil 4.1	TiO ₂ nanopartiküllerinden UV ışık altında serbest radikallerin oluşma Prosesi	37
Şekil 8.1	Atomik Force Mikroskop altında TiO ₂ nanopartiküllerinin üç boyutlu Görüntüsü	64
Şekil 8.2	<i>L.tropica</i> promastigotlarında formazan kristallerinin oluşumu (40 X).....	68
Şekil 8.3	TiO ₂ nanopartiküllerinin 100 µg/ml konsantrasyonunun karanlık ortamda <i>L.tropica</i> promastigotlarına sitopatik etkisi (40 X).....	69
Şekil 8.4	TiO ₂ nanopartiküllerinin 150 µg/ml konsantrasyonunun karanlık ortamda <i>L.tropica</i> promastigotlarına sitopatik etkisi (40 X).....	69
Şekil 8.5	UV ışığa maruz kalan <i>L.tropica</i> promastigotlarında formazan kristallerinin oluşumu (40 X)	70
Şekil 8.6	TiO ₂ nanopartiküllerinin 100 µg/ml konsantrasyonunun UV ışık altında <i>L.tropica</i> promastigotlarına sitopatik etkisi (40 X).....	70
Şekil 8.7	TiO ₂ nanopartiküllerinin 150 µg/ml konsantrasyonunun UV ışık altında <i>L.tropica</i> promastigotlarına sitopatik etkisi (40 X).....	71
Şekil 8.8	Karanlıkta kontrol grubunda bulunan parazitlerin mikroskopik görüntüsü (Giemsa, 100X)	73
Şekil 8.9	Karanlıkta TiO ₂ nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerin mikroskopik görüntüsü (Giemsa, 100X)	73
Şekil 8.10	UV ışık altında TiO ₂ nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerin mikroskopik görüntüsü.....	74
Şekil 8.11	<i>L.tropica</i> promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri (Giemsa, 100X).....	75
Şekil 8.12	Görünür ışığa tutulan <i>L.tropica</i> promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri (Giemsa, 100X)	75
Şekil 8.13	UV ışıklı ortamda tutulan <i>L.tropica</i> promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri (Giemsa, 100X)	76
Şekil 8.14	Karanlık ortamda TiO ₂ nanopartiküllere maruz kalan <i>L.tropica</i> promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri	76
Şekil 8.15	Görünür ışık altında TiO ₂ nanopartiküllerine maruz kalan <i>L.tropica</i> promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri (Giemsa, 100X)...	77
Şekil 8.16	UV ışıklı ortamda TiO ₂ nanopartiküllere maruz kalan <i>L.tropica</i> promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri (Giemsa, 100X)	77
Şekil 8.17	Kontrol grubunda amastigotların kapilerdeki görüntüsü (Mikrokültür Yöntemi, 20X).....	78
Şekil 8.18	TiO ₂ nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerle enfekte olan makrofajların	

	kapilerdeki görüntüsü (Mikrokültür Yöntemi, 20X).....	79
Şekil 8.19	Atomik Force Mikroskop altında gümüş nanopartiküllerinin üç boyutlu görüntüsü.....	82
Şekil 8.20	<i>L.tropica</i> promastigotlarında formazan kristallerinin oluşumu (40 X).....	86
Şekil 8.21	Gümüş nanopartiküllerinin (150 µg/ml) karanlık ortamda <i>L.tropica</i> promastigotlarına sitopatik etkisi (40 X)	86
Şekil 8.22	Gümüş nanopartiküllerinin (200 µg/ml) karanlık ortamda <i>L.tropica</i> promastigotlarına sitopatik etkisi (40 X).....	87
Şekil 8.23	UV ışık bulunan ortamda <i>L.tropica</i> promastigotlarında formazan kristallerinin oluşumu (40 X)	88
Şekil 8.24	Gümüş nanopartiküllerinin (150 µg/ml) UV ışıklı ortamda <i>L.tropica</i> promastigotlarına sitopatik etkisi(40 X).....	88
Şekil 8.25	Gümüş nanopartiküllerinin (200 µg/ml) UV ışıklı ortamda <i>L.tropica</i> promastigotlarına sitopatik etkisi(40X).....	89
Şekil 8.26	Karanlıkta gümüş nanopartiküllerini içermeyen ortamda (kontrol grubunda) bulunan parazitlerin mikroskopik görüntüsü (Giemsa, 100X).....	91
Şekil 8.27	Karanlıkta gümüş nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerin mikroskopik görüntüsü (Giemsa, 100X)	92
Şekil 8.28	UV ışık altında gümüş nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerin mikroskopik görüntüsü (Giemsa, 100X).....	92
Şekil 8.29	<i>L.tropica</i> promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri	93
Şekil 8.30	Görünür ışığa maruz bırakılan <i>L.tropica</i> promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri	94
Şekil 8.31	UV ışığa maruz bırakılan <i>L.tropica</i> promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri	94
Şekil 8.32	Karanlık ortamda nanopartiküllere maruz kalan <i>L.tropica</i> promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri.....	95
Şekil 8.33	Görünür Işık altında nanopartiküllere maruz kalan <i>L.tropica</i> promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri.....	95
Şekil 8.34	UV ışık altında nanopartiküllere maruz kalan <i>L.tropica</i> promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri.....	96
Şekil 8.35	Kontrol grubunda amastigotların kapilerdeki görüntüsü (Mikrokültür Yöntemi, 20X).....	97
Şekil 8.36	Gümüş nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerle enfekte olan makrofajların kapilerdeki görüntüsü (Mikrokültür Yöntemi, 20X)	97

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1	Leishmaniasis Hastalığının Değişik Formları.....	9
Çizelge 2.2	Leishmaniasisin tedavisinde kullanılan ilaçların toksik yan etkileri	24
Çizelge 7.1	Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri...	48
Çizelge 8.1	TiO ₂ nanopartiküllerinin Atomik Force Mikroskop altında boyut ölçümü değerleri.....	65
Çizelge 8.2	TiO ₂ nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının karanlıkta ve UV ışık altında <i>L.tropica</i> parazitlerinin proliferasyonuna etkisi	66
Çizelge 8.3	100 µg/ml konsantrasyonda TiO ₂ nanopartiküllerinin farklı sürelerde UV ışık altında ve karanlıkta <i>L.tropica</i> promastigotlarının proliferasyonuna etkisi	67
Çizelge 8.4	TiO ₂ nanopartiküllerinin UV Işıktaki konsantrasyona bağlı olarak <i>L.tropica</i> promastigotlarının metabolik aktivitesine etkisi	72
Çizelge 8.5	Karanlıkta TiO ₂ nanopartiküllerinin <i>L.tropica</i> promastigotlarının hücre döngüsüne etkisi.....	80
Çizelge 8.6	Görünür ışıktaki TiO ₂ nanopartiküllerinin <i>L.tropica</i> promastigotlarının hücre döngüsüne etkisi	81
Çizelge 8.7	Görünür ışıktaki TiO ₂ nanopartiküllerinin <i>L.tropica</i> promastigotlarının hücre döngüsü üzerine etkisi	81
Çizelge 8.8	Gümüş nanopartiküllerinin Atomik Force Mikroskop altında boyut ölçümü değerleri	83
Çizelge 8.9	Gümüş nanopartiküllerini içeren kaplamaların UV ışık altında <i>L.tropica</i> promastigotları üzerindeki etkisi	84
Çizelge 8.10	Gümüş nanopartiküllerini içeren kaplamaların karanlıkta, görünür ve UV ışık altında <i>L.tropica</i> promastigotlarının proliferasyonuna etkisi	85
Çizelge 8.11	Gümüş nanopartiküllerinin karanlıkta konsantrasyona bağlı olarak <i>L.tropica</i> promastigotlarının metabolik aktivitesine etkisi	90
Çizelge 8.12	Gümüş nanopartiküllerinin UV ışık altında konsantrasyona bağlı olarak <i>L.tropica</i> promastigotlarının metabolik aktivitesine etkisi	90
Çizelge 8.13	Karanlıkta gümüş nanopartiküllerinin <i>L.tropica</i> promastigotlarının hücre döngüsüne etkisi.....	98
Çizelge 8.14	Görünür Işıktaki gümüş nanopartiküllerinin <i>L.tropica</i> promastigotlarının hücre döngüsüne etkisi	99
Çizelge 8.15	UV Işıktaki gümüş nanopartiküllerinin <i>L.tropica</i> promastigotlarının hücre döngüsüne etkisi	99

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca akademik bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen çok değerli danışman Hocam Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e, çalışmalarım boyunca aynı ilgi ve desteği gösteren değerli Hocam Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya, verdiği mali destekten dolayı TÜBİTAK'a ve ek destek sağlayan Devlet Planlama Teşkilatı'na teşekkür ederim.

Bölümümüzün kurucusu Prof. Dr. Mehmet Mustafa AKDESTE'ye ve kurucu üyelerden Prof. Dr. Huriye KUZU'ya teşekkürü bir borç bilip yakın zamanda kaybettiğimiz bu iki değerli hocamızı saygı ve minnet ile anıyorum. Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanı ve şu anda biyomühendislik bölüm başkanlığını yürütmekte olan Prof. Dr. Sabriye PİŞKİN'e, çalışmam boyunca kullandığım nanopartikülleri bize temin eden Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü'nden Doç. Dr. Cengiz KAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Bununla birlikte bu çalışmanın yerine getirilmesine imkan sağlayan Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına, Fen Bilimleri Enstitüsüne, Biyomühendislik Bölüm Başkanlığına ve bütün değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Deneysel çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Rabia ÇAKIR, Sezen CANIM, Olga Nehir ÖZTEL, Serap YEŞİLKIR, Serhat ELÇİÇEK, Yeliz BAŞARAN, Elif METE ve Özlem ŞAHİN'e ve ayrıca bana devamlı manevi destek veren Melike ERSÖZ ve Necati FINDIKLI'ya, son olarak da hayatıma sonsuz katkılarından dolayı babam; Mustafa Ayhan ABAMOR'a annem; Arife Nuran ABAMOR'a, ve teyzem; Nurten BEKTAŞ'a en derin teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması 1085170SBAG-4007 ve 109R007 nolu TÜBİTAK projeleri tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Leishmaniasis Türkiye'nin ve Dünya'nın ciddi halk sağlığı problemlerinden biridir. Dünyada 12-40 milyon arasında kişinin *Leishmania* parazitleri ile enfekte olduğu, 350 milyona yakın kişinin hastalığa yakalanma riski taşıdığı bilinmektedir. Hastalığın geniş yayılımının nedeni hastalığın etkenlerinde kullanılan ilaçlara, vektörlerinde insektisitlere karşı direnç gelişmesi, yeterli bir aşının bulunmaması ve küresel ısınmadır. Son yıllarda tıp alanında nanoteknolojiye olan ilgi giderek artmaktadır. Nanopartiküllerin sahip oldukları eşsiz özelliklere ve geniş yüzey alanlarına bağlı olarak antimikrobiyal etki gösterdikleri bildirilmiştir. Ancak literatürde nanopartiküllerin leishmania parazitleri üzerinde gösterdiği etki ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Buna göre de bu çalışmada ilk kez olarak titanyum dioksit (TiO₂) ve gümüş (Ag) nanopartiküllerinin Kütanöz Leishmaniasis (KL) etkeni *L.tropica* parazitleri üzerindeki *in vitro* etkisi incelenerek, Leishmaniasisin tedavisinde nanopartiküllere dayalı yeni bir tedavi yaklaşımının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Deneylerde KL etkeni *L.tropica* promastigot, amastigot (enfekte olmuş makrofaj) kültürleri kullanıldı. Nanopartiküllerin boyut ölçümü Atomik Force Mikroskopta yapıldı. Çalışmalarda klasik ve mikrokültür yöntemleri, biyokimyasal (MTT), Flow sitometrik(G0,G1,S,M), mikroskopik(morfoloji, parazit sayımı) ve enfektiflik yöntemleri kullanılarak TiO₂ ve gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının proliferasyonuna, morfolojisine, metabolik aktivitesine, enfektifliğine ve hücre döngüsüne etkisi incelendi. Veriler, SPSS version 16.0 for Windows programı ile değerlendirildi ve p<0,05 değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar, titanyum dioksit ve gümüş nanopartiküllerinin incelenen tüm konsantrasyonlarda (25-200 µg/ml) parazitlerin morfolojisine, proliferasyonuna, hücre canlılığına, önemli ölçüde etki ettiğini gösterdi. Nanopartiküllerin parazitlerin enfektifliğini de kontrole nazaran büyük oranda azalttığı, parazitlerin hücre döngüsünü ise DNA sentezi ve mitoz safhalarında inhibe ettiği tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar, Dünyada ilk kez olarak Leishmaniasis'e karşı nanopartiküllere dayalı yeni bir tedavi yaklaşımının geliştirilebileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Leishmaniasis, nanoteknoloji, titanyum dioksit, gümüş, nanopartikül, hücre kültürü

ABSTRACT

Leishmaniasis is one of the serious public health problems in Turkey and also around the world. It is known that there are 12-40 million *Leishmania* infected people on the world and approximately 350 million people have the infection risk. The reason for wide-spreading of the disease is about the resistance to the agents of the disease, resistance to the insecticides of their vectors, the disability to improve a sufficient vaccine and the global. Of late years, interest regarding the nanotechnology in medicine has been increasing. Suggesting that, regarding to unique properties and wide surface area of the nanoparticles, they shows anti-microbial effects. Nevertheless, according to the literature there is no study about the effects of the nanoparticles on Leishmaniasis parasites. Thus, in this study, it has been searched the in vitro effects of titanium dioxide (TiO₂) and silver (Ag) nanoparticles on *L.tropica* parasites, the agent of Cutaneous Leishmaniasis (CL) and regarding this research, a nanoparticle-based new approach has been aimed to improve in the treatment of Leishmaniasis.

In the experiments, as an agent of CL, *L.tropica* promastigote, amastigote (infected macrophage) cultures were used. Size evaluation of nanoparticles has been done by atomic force microscope. Classical and micro culture technics, biochemical (MTT), Flow-cytometric (G0,G1,S,M), microscobic (morphology, parasite counting) used during the research and by using effectivity technics, it has been investigated the effect of TiO₂ and silver nanoparticles on proliferation, morphology, metabolic activity, infectivity and cell cycle of *L.tropica* promastigotes. Data assessed with SPSS version 16.0 for Windows program and $p < 0,05$ is taken as statistically acceptable. Results showed that, all studied concentrations of titanium dioxide and silver nanoparticles (25-200 µg/ml) effect the morphology, proliferation, cell viability of the parasites significantly. It has been detected that nanoparticles decrease the infectivity of the parasites significantly much more than controls, and also inhibit the cell cycle of the parasites at DNA synthesis and mitosis phases. According to these results, it has been showed that a novel nanoparticle-based treatment approach can be developed against to Leishmaniasis.

Key Words: Leishmaniasis, nanotechnology, titanium dioxide, silver, nanoparticle, cell culture

1.GİRİŞ

Leishmaniasis Türkiye' nin ve Dünya'nın ciddi halk sağlığı problemlerinden biridir. Her yıl dünya genelinde 12 - 40 milyon arasında kişinin *Leishmania* parazitleri ile enfekte olduğu, 350 milyona yakın kişinin hastalığa yakalanma riski altında olduğu bilinmektedir. Dünya üzerinde her yıl 1-1,5 milyon kişi hastalığın farklı formlarından Kütanöz Leishmaniasis'e, 500,000 kişi ise Visseral Leishmaniasis'e yakalanmaktadır (Desjeux, 2001). Ülkemizde ise yaklaşık 20 milyon kişi bu enfeksiyonun tehditi altındadır (Özcel, 1995). Küresel ısınmanın dünya üzerindeki etkisini arttırmasıyla birlikte *Leishmania* parazitlerinin vektörlerinde meydana gelecek artışa bağlı olarak olgu sayısının daha da artması beklenmektedir (Peterson vd. , 2003).

Bugüne kadar yapılan tüm çalışmalara rağmen, Leishmaniasis'in tedavisinde etkin bir ilaç geliştirilememiştir. Tedavide kullanılan ilaçlardan birisi olan ve tedavi için altın standart olarak kabul edilen beş değerlikli antimonların insanlar için son derece toksik oldukları bilinmektedir. Bunun dışında son yıllarda parazitlerde antileishmanial ilaçlara, vektörlerde ise insektisitlere karşı dirençlilik geliştiği gözlenmektedir. Ayrıca kullanılan ilaçların oldukça pahalı olması bunların gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde kullanımını sınırlamaktadır. Tüm bunların yanında ilaçların hastalığa neden olan tüm parazit türleri üzerinde etkili olmaması da antileishmanial ilaçların bir başka dezavantajını oluşturmaktadır. Tüm bu nedenlerden ötürü Leishmaniasisin tedavisi için yeni yaklaşımların geliştirilmesine olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır.

Son yıllarda bilimin her alanında olduğu gibi tıp alanında da nanoteknolojiye olan ilgi çoğalmaktadır. Bu durumun esas nedeni gelecek yıllarda çeşitli hastalıkların tanısında ve tedavisinde nanopartiküllerin ve nano boyuttaki cihazların kullanımının beklenmesidir (Sondi, 2004). Materyallerin kütsel boyutları ile kıyaslandığında nanomalzemeler eşsiz elektriksel, optik, manyetik ve kimyasal özellikler kazanırlar. Ancak nanopartiküllerin en önemli özellikleri küçük boyutlarına kıyasla sahip oldukları geniş yüzey alanlarıdır. Bu özellikleri sayesinde nanopartiküller temas halinde bulundukları yüzeylerle ciddi bir biçimde etkileşime girerler. Özellikle metal oksit nanopartikülleri hücre membranları ile etkileşime girdiklerinde reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmaktadır. Bunun haricinde küçük boyutları sayesinde hücre içersine kolaylıkla girebilen nanopartiküller, hücre içersinde bulunan yaşamsal enzimlerle ve DNA ile etkileşime girerler ve bu moleküller üzerinde ciddi bir biçimde hasara yol açarlar (Morones, 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu özellikleri nedeniyle metal oksit nanopartiküllerinin enfeksiyon yapıcı ajanların üzerinde öldürücü etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Bakterilerin haricinde metal oksit nanopartiküllerinin virüsler ve kanser hücreleri üzerinde de etkili oldukları gözlenmiştir. Diğer hücre modelleri üzerinde toksik etkisi ispatlanan metal oksit nanopartiküllerinin, özellikle TiO₂ ve gümüşün sahip oldukları eşsiz özelliklere ve Leishmania parazitlerinin duyarlı oldukları bilinen serbest radikalleri üretiliyor olmalarına bağlı olarak bu nanopartiküllerin Leishmania parazitleri üzerinde de etkili olabileceğini düşünmemizin temelini oluşturmaktadır. Bu konu ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Buna göre de bu çalışmada ilk kez olarak metal oksit nanopartiküllerinden titanyum dioksit (TiO₂) ve gümüşün *in vitro* kültür ortamında Kütanöz Leishmaniasis etkeni olan *L.tropica* parazitleri üzerindeki etkisi incelenerek, bu hastalığın tedavisinde nanopartiküllere dayalı yeni bir tedavi yaklaşımı geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Leishmania Parazitleri

2.1.1. Parazitlerin Taksonomisi

Filum	: Protozoa
Alt-Filum	: Sarcomastigophora
Süper Sınıf	: Mastigophora (Flagellata)
Sınıf	: Zoomastigophora (Zooflagellata)
Ordo	: Kinetoplastida
Aile	: Trypanosomatidae
Cins	: Leishmania (Ashford, 1983)

2.2. Parazitlerin Morfolojisi

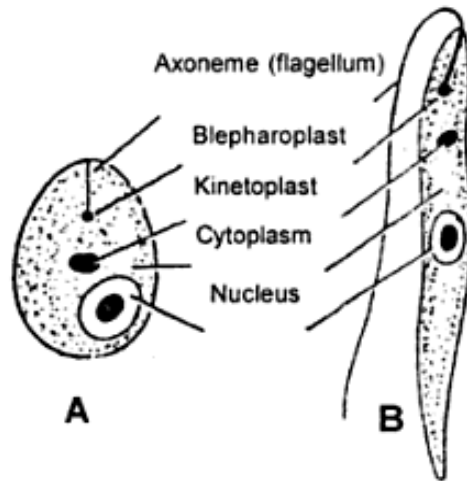
Leishmania parazitlerinin insan ve diğer memelilerde amastigot, vektörlerde ise promastigot olmak üzere iki farklı evrim şekli bulunmaktadır. Parazitlerin konak hücreleri enfekte etmiş ya da bu hücrelerin hemen yakınında bulunan formları olan amastigotlar 2-4 µm boyunda, kamçısız ve dolayısı ile hareketsiz yapılardır. Yuvarlak veya oval şekilde olan amastigotların hücre duvarlarına hemen bitişik büyük bir nukleusu ve bu nukleusa teğet halde bulunan çomak şeklindeki kinetoplastları içerdikleri bilinmektedir. Giemsa ile boyanan preparatlarda koyu pembeye boyanan nukleus, mor-menekşemsi bir renk alan kinetoplast ve açık pembe renge boyanan sitoplazma açık bir şekilde görülür. Parazitlerin tatarcıklarda bulunan formu olan promastigotlar ise yaklaşık 20 µm boyutunda ve bulundurdıkları kamçıları sayesinde hareketli olan yapılardır. Promastigotların nukleusları amastigotlardan farklı olarak daha küçüktür ve merkeze daha yakın olarak bulunmaktadır. Kinetoplastlar da amastigotların aksine nukleuslardan ayrı olarak hareketi sağlayan kamçının bulunduğu ön kısımda yer almaktadır.

Leishmania parazitleri dıştan oldukça ince, kolay kırılabilen, elastik bir pelikül tabakası ile çevrilmiştir. Bu tabaka parazitlere belirgin bir şekil verir ancak dalgalı bir membran oluşturmaz.

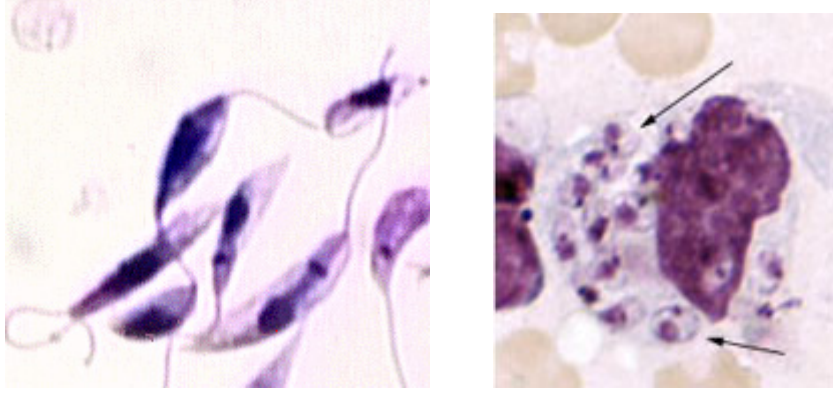
Leishmania parazitleri tek bir kamçıya sahiptir. Parazitlerin promastigot formunda kamçı oldukça uzun ve serbesttir. Promastigotlardaki bu kamçı parazitin anterior kısmının hemen yanında bulunan blefaroblasttan ya da bazal cisimcikten orjin

almaktadır. Blefaroblastın yakınında ise parabasal cisimcik ya da kinetoplast olarak isimlendirilen yapı bulunmaktadır. Ancak herhangi bir sitozom bulunmamaktadır. İnsanlardaki promastigotlarda ise kamçılar daha kısadır ve serbest halde bulunmazlar. Bu kamçılar fibril benzeri şekildedir ve sitoplazmanın içerisine gömülü halde bulunurlar. Kamçının enlemesine kesiti elektron mikroskobunda incelendiğinde tipik bir $9 + 2$ iç fibril düzeni gözlenir.

Pelikülün altında bulunan sitoplazma renksiz ve homojendir. Sitoplazma ektoplazma ve endoplazma olarak farklılaşmamıştır. Elektron mikroskobu çalışmaları sitoplazmanın boylamasına şeritlerli veya mikrotübüllerle işaretlendiğini göstermiştir. Sitoplazmada bulunan diğer yapılar ise blefaroblast, kinetozom, rizoplast, golgi cisimciği, mitokondri, vakuol ve nukleustur. *Leishmania* parazitleri geniş, küresel ve veziküler bir nukleusa sahiptir. Ayrıca merkezi bir karyozom ve nukleolus içerir. Nukleusun etrafı porlu ve çift katmanlı bir membran ile çevrilmiştir (Prakashan, 2000).



Şekil 2.1. Parazitlerin farklı yaşam formları (A: amastigot B: promastigot) ve sahip oldukları organeller



Şekil 2.2. Parazitlerin promastigot ve amastigot formlarının mikroskopik görüntüleri

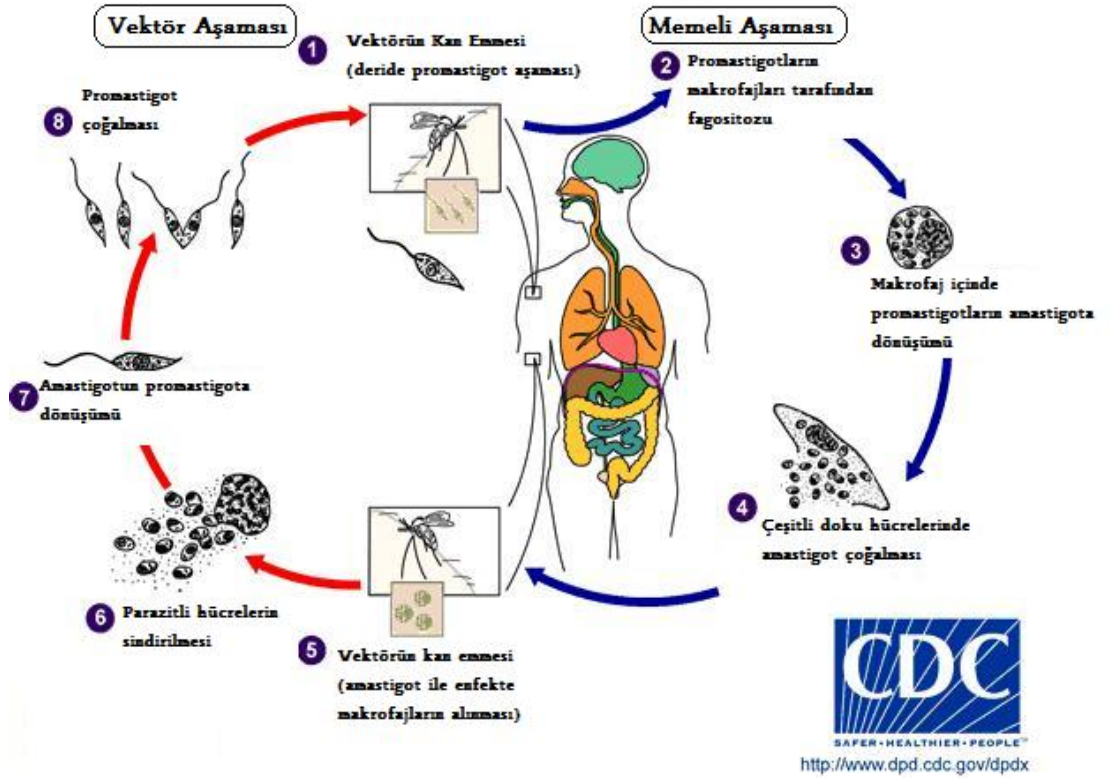
2.3. Leishmania Parazitlerinin Çoğalması

Leishmania parazitleri ile bağlı herhangi bir seksüel üreme bilinmemektedir. Aseksüel üreme ise hücrenin boylamasına ikiye bölünmesi şeklinde gerçekleşir. Öncelikle kinetoplast ve blefaroplast bölünür ve böylece çiftlerini oluştururlar. Yeni kamçı blefaroplastlardan bir tanesinden gelişmeye başlarken, eski kamçı diğer blefaroplasta tutunmuş halde kalır. Mitozun ardından nukleus 2 tane kardeş çekirdek oluşturur. En son olarak da Leishmania paraziti ön taraftan arkaya doğru tam ortadan boylamasına olacak şekilde ikiye bölünür ve iki tane kardeş Leishmania ortaya çıkmış olur (Prakashan, 2000).

2.4. Parazitlerin Hayat Döngüsü

Leishmania türlerinin yaşam siklusu *Phlebotominae* vektör ile omurgalı konak arasında birbirini takip eden düzenli bir döngüyü içermektedir (Evans, 1996). Kan emme sırasında parazitler, enfekte ettikleri tatarcıklar (vektör) tarafından konakçı hücreye verilirler ve konakçının makrofaj ve makrofaj benzeri hücrelerine invaginasyonla girerek, vektörlerin vakuelleri içinde gelişmeye başlarlar (Zuckerman, 1977). *Leishmania* parazitleri, vektör olarak kullandıkları tatarcıkların sindirim kanalının farklı bölgelerinde farklı morfolojik özellikler göstermektedir. Bunun esas nedeni, parazitlerin vektörlerin sindirim kanallarının değişik kısımlarındaki farklı koşullara uyum sağlamaya çalışmalarıdır (Ozcel, 1997). Vektör, *Leishmania* ile enfekte olan konaktan kan emmesi esnasında makrofajlarla birlikte, makrofajları konak hücre olarak kullanan parazitlerin hücre içi formu olan amastigotları da alır. Makrofajların tatarcığın midesinde parçalanması ile serbest kalan amastigotlar boylarının uzaması ve kamçı gelişimi ile promastigotlara dönüşür. Promastigotlar bölünerek çoğalırlar ve ön mideye oradan da

özafagusa geçerler. Özafagustaki promastigotlar enfektif yapıya sahiptirler ve uzun kamçıların bulunması, arka uçlarının sivri ve dar olması ile diğer promastigot formlardan ayrılırlar. Promastigotların tatarcıkların ağız kısmına gelmesiyle döngü tamamlanmaktadır (Ribeiro, 1986 , Wargburg, 1986 , Lawyer, 1990). Tatarcıkların insanları ısırması sırasında insan kanına *Leishmania* promastigotlarını vermesiyle döngü yeniden başlamış olur.



Şekil 2.3. *Leishmania* parazitlerinin hayat döngüsü

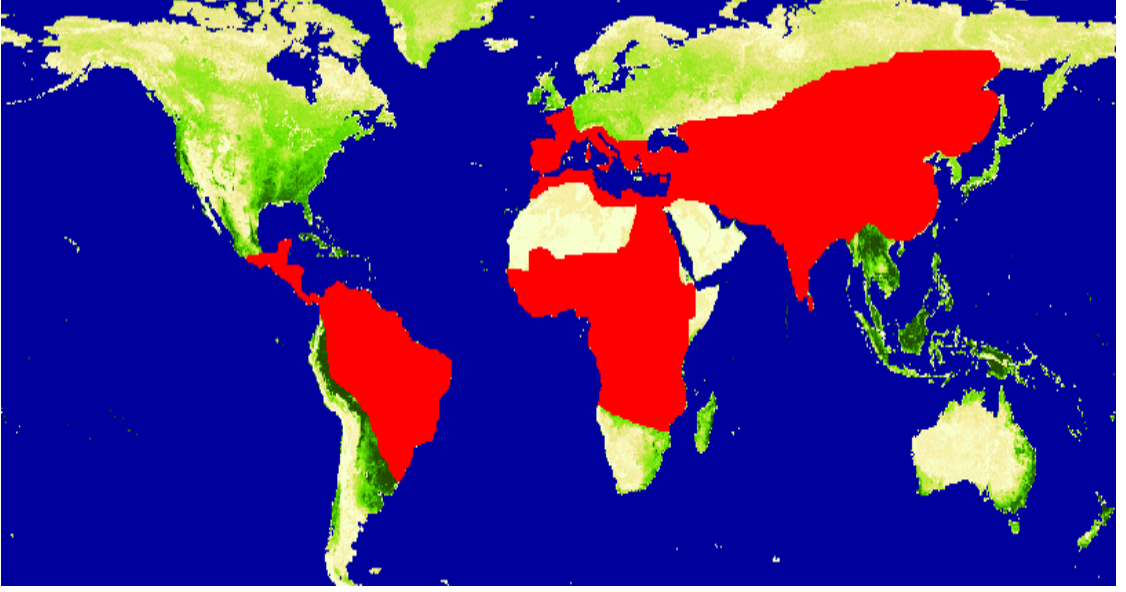
2.5. Leishmaniasis

Memelilerin zorunlu hücre içi parazitleri olan *Leishmania* türlerinin neden olduğu Leishmaniasis, dünya genelinde Türkiye ve Amerika Birleşik Devletleri'ni de kapsayan 88 ülkede ciddi halk sağlığı problemlerinden birini oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı en önemli tropikal hastalıklar listesinde Leishmaniasis, sıtmanın ardından ikinci sırada bulunmaktadır (Desjeux, 2001).

2.5.1. Epidemiyolojisi

Dünyada 12 ila 40 milyon arasında kişinin *Leishmania* ile enfekte olduğu ve her yıl bu sayıya yaklaşık 400,000 yeni olgunun eklendiği tahmin edilmektedir. 350 milyona yakın kişinin ise bu hastalığa yakalanma riski altında olduğu bilinmektedir. Her yıl dünya genelinde 1,0-1,5 milyon insan hastalığın farklı formlarından deri leishmaniasisine, 500.000 kişi ise visseral leishmaniasis'e yakalanmaktadır. Türkiye'de ise yaklaşık 20 milyon kişi bu enfeksiyonun tehdidi altındadır. Her yıl yeni olgu sayısı da yaklaşık 5000 kişi civarındadır. Küresel ısınma ile tropikal bölgelerde görülen hastalığın taşıyıcısı olan vektörlerin yaşam alanının genişlemesinden dolayı, dünya üzerinde önümüzdeki yıllarda leishmaniasis vakalarında ciddi bir artışın meydana gelebileceği düşünülmektedir (Peterson, 2003).

Hastalığın farklı formlarından biri olan Visseral Leishmaniasis Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz havzası, Güney Batı Asya, Batı Afrika, Hindistan ve Çin gibi ülkelerde endemik olarak görülmektedir. Visseral leishmaniasis Asya, Afrika, Güney Avrupa ve Güney Amerika'da 80'den fazla ülkede görülebilmektedir. *Leishmania donovani* esas patojen olup, Hindistan, Sudan, Bangladeş, Nepal ve Brezilya gibi 5 ülkede yılda 500 bin yeni vaka bildirilmektedir (Petit, 1999, Henry, 2001) Ülkemizde daha çok Ege ve Akdeniz Bölgelerinde görülen Visseral Leishmaniasis, diğer bölgelerimizden de sporadik olarak bildirilmektedir (Ozensoy, 2009). Hastalığın diğer bir formu olan Kutanöz Leishmaniasis ise tüm dünyada görülebilen bir hastalık olup özellikle Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde, tüm Orta Doğu ülkelerinde, Orta Asya'da, Hindistan, Pakistan ve Güneybatı Afrika'da insidansı çok yüksektir (Gurel, 2002, Ok, 2002). Kutanöz Leishmaniasis (KL), ülkemizde Güneydoğu Anadolu Bölgesinde özellikle Şanlıurfa ilinde hiperendemik, Çukurova bölgesinde ise endemik bir hastalık olarak yıllardır hüküm sürmektedir. Sağlık Bakanlığının istatistiklerine göre hastalık son 10-12 yıl içinde artış göstermekte ve özellikle Şanlıurfa, Osmaniye, Adana, Hatay ve Mersin illerinden çok sayıda olgu bildirilmektedir (Akkafa, 2000). Olguların, 1950'li yıllardan önce en fazla Güneydoğu Anadolu Bölgesinde görüldüğü, 1950'den sonra sıtma kontrolünde kullanılan insektisitler yoluyla azaldığı, ancak daha sonraki yıllarda kontrol çalışmalarındaki yetersizlik sonucu tekrar olgu sayısının arttığı belirtilmektedir (Uzun, 1999). GAP projesi ile artan tarımsal sulama ile KL'nin artış gösterebileceği de bildirilmektedir.



Şekil 2.4. Leishmaniasis'in Dünya Üzerindeki yayılımı

2.5.2. Leishmaniasis Hastalığının Değişik Formları

Leishmania türleri klinik olarak Visseral Leishmaniasis (VL), Kutanöz Leishmaniasis (KL) ve Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL) olmak üzere 3 farklı klinik tablo oluşturur (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Leishmaniasis Hastalığının Değişik Formları

Klinik Hastalık	Etkilediği Organ	Leishmania Türü	Coğrafi Dağılım
Kutanöz Leishmaniasis	Deri	<i>L.tropica</i> Kompleksi <i>L.tropica</i> <i>L.aethiopia</i> <i>L.major</i>	Eski Dünya
		<i>L.mexicana</i> Kompleksi <i>L.mexicana</i> <i>L.pifanoi</i> <i>L.amazonensis</i>	Yeni Dünya
		<i>L.Braziliensis</i> Kompleksi <i>L.peruvianna</i> <i>L.guyanensis</i> <i>L.panamensis</i> <i>L.lainsoni</i> <i>L.columbiensis</i>	Yeni Dünya
		<i>L.infantum</i> <i>L.chagasi</i>	Eski Dünya Yeni Dünya
Mukukutanöz Leishmaniasis	Deri ve Mukoz Membran	<i>L.Braziliensis</i> Kompleksi <i>L.Braziliensis</i> <i>L.guyanensis</i> <i>L.panamensis</i> <i>L.mexicana</i> <i>L.tropica</i> <i>L.major</i>	Yeni Dünya Yeni Dünya Eski Dünya Eski Dünya
Visseral Leishmaniasis	İç Organlar	<i>L.donovani</i> Kompleksi <i>L.donovani</i> <i>L.infantum</i> <i>L.chagasi</i> <i>L.tropica</i> <i>L.amazonensis</i>	Eski Dünya Eski Dünya Yeni Dünya Eski Dünya Yeni Dünya

2.5.2.1. Kütanöz Leishmaniasis

Kütanöz leishmaniasis (KL) ülkemizde daha çok Şark Çıbanı, Antep Çıbanı, Halep Çıbanı, Yıl Çıbanı gibi isimlerle anılan, çoğunlukla *L.tropica* parazitlerinin neden olduğu bir deri hastalığıdır. Leishmaniasis hastalığının ülkemizde ve dünyada en sık görülen formu olan Kütanöz Leishmaniasis genellikle yüz ve el gibi açık bölgelerde iyileşmeyen lezyonlar oluşturmaktadır ve tedavisi oldukça zordur (Culha, 2006). Kutanöz Leishmaniasis tüm dünyada görülebilen bir hastalık olup özellikle Akdeniz’e kıyısı olan ülkelerde, tüm Orta Doğu ülkelerinde, Orta Asya’da, Hindistan, Pakistan ve Güneybatı Afrika’da insidansı çok yüksektir. Ayrıca 2001 yılından beri Afganistan ve Irak’ta bulunan Amerikan askerlerinden yaklaşık 1000 tanesinin de Kütanöz Leishmaniasis’e yakalandığı dikkate alındığında, hastalığın Amerika Birleşik Devletleri (ABD) için de büyük bir sorun teşkil ettiği düşünülmektedir. Kutanöz Leishmaniasis (KL), ülkemizde ise Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde özellikle Şanlıurfa ilinde hiperendemik, Çukurova bölgesinde ise endemik bir hastalık olarak yıllardır hüküm sürmektedir.

Kütanöz Leishmaniasis klinik olarak lokalize ve generalize olmak üzere başlıca iki grupta incelenir. Lokalize Kütanöz Leishmaniasis akut, kronik ve rezidivan olmak üzere 3 grupta sınıflandırılır. Akut Kütanöz Leishmaniasis kuru ve yaş tipte olabilir. Kuru tip daha çok kentlerde görülür ve kuluçka süresi iki aydan daha fazla sürer. Papüller veya nodüller olabilen derideki lezyon, genellikle tektir ve içinde bol miktarda bol miktarda parazit bulundurur. Zaman içinde nodülün ortasında ülserasyon gelişir ve ülserasyonun üzeri sert bir krut ile örtülür. Buraya kadar geçen süre 6 aydır.(Memisoglu,1994) Ülserasyonun üzerindeki krutun kaldırılması oldukça zordur. Kaldırıldığında skutün alt yüzeyinde “ Hulusi Behçet’in çivi belirtisi ” adı verilen çıkıntılar görülür. Lezyon 8-12 ay sürer ve sikatris bırakarak iyileşir. Böylece hastalık 1,5 yıl kadar sürmüş olur. Yaş tip ise genellikle kırsal kesimde yaz ve bahar aylarında görülür ve hızlı bir biçimde seyreder. Lezyonları kuru tipe göre kenarları daha az belirgin nodüloülserler şeklinde olup nodüllerin içinde bulunan parazit miktarı daha azdır. Birkaç aydan bir yıla kadar değişen sürede derin sikatris bırakarak iyileşirler.(Kotogyan, 1995)

Kronik KL yaşlı insanlarda sık görülür ve yıllarca sürebilir. Rezidivan Leishmaniasis, leishmaniasis skarı çevresinde iyileşme olduktan sonra ufak, kırmızı-kahverengi papüller ve tüberküller gelişmesiyle karakterizedir. Bu papüller genişleyerek lupus vulgaris’e benzeyen bir görünüm alırlar ve plaklar oluştururlar. Lezyonlar yaz aylarında

kötüleşip ülserleşebilir. Lezyonlarda nadir olarak parazitler görülür (Arnold, 1990, Markel, 1992).

2.5.2.2. Mukokütanöz Leishmaniasis

Latin Amerika'da Espundia olarak da adlandırılan hastalığın etkeni *L. Braziliensis*'tir. *L.braziliensis* ile enfekte olan kişilerde, burun, ağız, farinks ve larinkste mukozal lezyonların gelişmesi ile mukozal (mukokütanöz) leishmaniasis olarak isimlendirilen klinik tablo ortaya çıkabilir (Desjeux, 2005). Hastalığın kuluçka süresi 10 gün ile birkaç ay arasında değişebilir. Tatarcığın kan emdiği bölgede meydana gelen nodül-papül-vezikül-ülser lezyonları 10 cm'den büyük olabilir. Herhangi bir komplikasyon oluşmazsa lezyon 6 ay ile 2 yıl arasında kendiliğinden iyileşebilir. MKL lezyonları mukozal bölgelerde meydana geldiğinden, şark çıbanından ayırt edilebilir (DSÖ, 1990). Burundaki lezyonlar sonucu doku kayıpları oluşur. Doku harabiyeti sonucunda burun, üst dudak ve alt göz kapağında ciddi patolojik değişiklikler gelişir (Memişoğlu vd. , 1994).

2.5.2.3. Visseral Leishmaniasis

Kala-azar olarak da bilinen Visseral Leishmaniasis karaciğer dalak, kemik iliği gibi Retiküloendotelyal Sistemi oluşturan organların intraselüler Leishmania parazitleri tarafından enfekte edilmesi sonucunda ortaya çıkan bir hastalıktır (Singh, 2006, Murray, 2005). *L. infantum*, *L.donovani*, *L chagasi* parazitleri bu hastalığın oluşmasına neden olmaktadır. Visseral Leishmaniasis özellikle HIV virüsü ile enfekte olmuş veya organ transplantasyonunun ardından bağışıklık sistemi baskılanmış insanlar için giderek artan potansiyel bir problem olarak tanınmaktadır. Visceral Leishmaniasis hastalığının esas belirtileri yüksek ateş, kilo kaybı, karaciğer büyümesi, dalak büyümesi, lenf bezlerinin şişmesi, pansitopeni ve kandaki gammaglobulin seviyesinin azalmasıdır (Pintado, 2001). Gastrointestinal sistemi de içeren tüm organların retiküloendotelyal hücreleri bu hastalık yüzünden kuşatılabilir. Laboratuvar açısından bakıldığında meydana gelen anomaliler serum aminotransferaz ve alkalik fosfataz seviyelerinin makul bir şekilde artması ve albumin seviyesinin aniden düşmesidir. Visseral Leishmaniasis eğer tedavi edilmezse yüksek oranda hastayı öldürme potansiyeline sahiptir (di Martino, 1992).

Bağışıklık sistemi bozulmuş kişilerin Visseral Leishmaniasis'e daha yatkın hale gelmelerine neden olan düzensizlikler; hematolojik tümörler, sistemik lupus eritematozus, renal transplantasyon, yetersiz beslenme, yaş ve immün sistemi baskılayıcı

kortikosteroid terapidir (Berenguer, 1989). Visseral Leishmaniasis vakalarının yaklaşık olarak %50'sinin HIV ile birlikte enfekte olmuş insanlarda görüldüğü hesaplanmıştır. Bağışıklık sistemi sağlam olan hastalarda Visseral Leishmaniasis vakalarının hemen hemen tamamında dalak büyümesi görülürken, HIV ile birlikte enfekte olan Visseral Leishmaniasisli hastalarda dalak büyümesi görülmemiştir. Bu iki popülasyon arasındaki bir diğer fark ise Leishmania parazitiine karşı oluşan antikorlardır. Bağışıklık sistemi sağlam olan kişilerde Leishmania parazitiine karşı antikorların oluşma oranı % 95 iken, HIV ile enfekte olmuş kişilerde bu antikorların % 66'sı oluşmamaktadır (Vigevani, 1989).

2.6. Leishmania Parazitlerinin Kültürü

2.6.1. Klasik Kültür Yöntemi

Hemoflagellatların kültürünün yapılması için pek çok farklı besiyeri kullanılmaktadır. Leishmania promastigotları da düzenli bir şekilde pasajlanmak suretiyle bir çok besiyeri kullanılarak aksenik olarak kültüre edilir. Bu yolla üretilen parazitler yaygın olarak Leishmania türlerinin moleküler biyolojisi, immünolojisi, biyokimyası üzerinde yapılan çalışmalarda kullanılır. Promastigotlar birbirinden nitel ve nicel olarak farklı kültür ortamlarında büyümeye adapte olabilirler. Primer lezyonlardan alınan bazı parazit türleri devamlı kültürleri için % 30 FCS ile zenginleştirilmiş Schneider's *Drosophila* besiyeri gibi zengin ve çok bileşenli bir besiyerine ihtiyaç duyarken, daha az miktarda serum içeren ya da serumun yerini başka komponentlere bıraktığı besiyerlerinde üremeye adapte olabilirler.

Leishmania genusu üyelerinin in vitro olarak standartlaştırılmış kültürünün yapılması, konak-parazit etkileşiminin daha iyi anlaşılabilmesi için tanı amaçlı olarak ya da parazitlerin biyolojik ya da immünolojik özelliklerini belirlemek için uygun miktarda parazitin üretilmesi için yararlı bir yaklaşımdır. Parazitlerin kültürünün yapılmasındaki en büyük amaç farklı *Leishmania* türlerinin aktif ve bölünen popülasyonlarının uzun süreli olarak devam ettirilmesidir. Leishmania parazitlerinin kültürü için 90 yılı aşkın süredir kullanılan besiyerleri iki farklı sınıf altında toplanabilir : yarı-katı bifazik besiyeri ve sıvı monofazik besiyeri. Leishmania parazitlerinin kültürü ilk kez olarak bir difazik besiyeri olan NNN (Novy, Mac Neal, Nicole) agarda yapılmıştır (Novy, Mac Neal, 1904, Nicole, 1908). NNN besiyeri 900 ml suda çözünmüş 14 gr agar ve 6 gr NaCl içermektedir. Bu karışım tüplere dağıtılır ve hacminin üçte biri kadar tavşan kanı

45- 50 °C'ye soğutulmuş agarın içerisine ilave edilir. NNN agar zaman içerisinde beyin kalp infüzyonu gibi bakteriyolojik katkı maddeleri ile zenginleştirilmiştir ve günümüzde sıvı fazın katı faza eklenmesinin çeşitli modifikasyonları ile birlikte kullanılmaktadır (Chance,1974). Bu tam olarak tanımlanmamış difazik besiyeri günümüzde halen omurgalı ve omurgasız konaklardan direkt olarak izole edilen *Leishmania* suşlarının kültürü ve adaptasyonu için kullanılmaktadır. Bununla birlikte NNN besiyerinin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin hazırlanması karışık, standartlaştırılması ise oldukça zordur. Ayrıca bu besiyeri parazitlerin replikasyonu için önemli faktörler olarak biyolojik ve immünolojik çalışmaları zorlaştıran kan agar ve bakteriyolojik katkı maddelerini içermektedir.

Son zamanlardaki çalışmalar serum ile zenginleştirilmiş sıvı monofazik besiyerinin kullanımı ile yapılmaktadır. Afrikan trypanosomalarından orijinal olarak geliştirilen tanımlanmamış glukoz-laktalbumin-serum-hemoglobin besiyeri (Jadin, 1963), karaciğer infüzyon triptoz besiyeri (LIT) (Castellani, 1967), Panmede besiyeri (Rezai, 1977), tavşan kanı ile hemolize edilerek hazırlanan modifiye NIH besiyeri (Mansour, 1973) ve yarı tanımlı HOMEN besiyeri (Berens, 1976) bu tür besiyerlerine örnek olarak verilebilir. Başlangıçta memeli ve böcek hücrelerinin kültürü için formülize edilen serum ile zenginleştirilmiş doku kültür besiyerleri de pek çok Eski ve Yeni Dünya *Leishmania* türünün başarılı bir şekilde kültüre edilmesi için kullanılmaktadır. Bu besiyerleri ise 199H besiyeri, RPMI 1640 besiyeri, Schneider *Drosophila* besiyeri ve Grace's böcek doku kültür besiyeridir (Sadigursky, 1986). Tüm bu doku kültür besiyerlerine, *Leishmania* promastigotlarının uzun süreli büyümesi için gerekli bir faktör olarak yüksek konsantrasyonda fetal dana serumunun (% 10-30) ilave edilmesi gerekmektedir.

L.donovani promastigot formlarının kültürü için serumun, bovine serum albumin ile veya pürin bazların, vitaminlerin veya bovin albumin fraksiyonlarının karışımı ile değişimi de yapılmıştır. En kolay şekilde hazırlanan ve tuzları, glukozu ve triptozu içeren hemen hemen tamamen tanımlanmış besiyerinin(örneğin LIT besiyeri) konsantre edilmiş RPMI 1640 ve 199 besiyerine eklenmesi ile oluşturulan yeni besiyerinin *L.chagasi* ve *L.amazonensis* promastigotları ve diğer *Leishmania* türleri için uygun olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *Leishmania* türlerinin seri kültürleri, memeli hücrelerinin serumdan bağımsız olarak büyümesi için geliştirilen besiyerine adaptasyonu da gerçekleştirilmiştir. Bu besiyeri belirli amino asitlerin, vitaminlerin, bovin albuminin,

hormonların, peptidlerin ve özellikle son zamanlarda insan idrarının yüksek konsantrasyonları ile zenginleştirilmiştir (Howard, 1991, Armstrong, 1994).

2.6.2. Mikro Kültür Yöntemi

Allahverdiyev ve arkadaşları tarafından geliştirilen mikro kültür yöntemi yalnızca 70 µl'lik kapiler tüplerden ve sıvı besiyerinden oluşmaktadır. Mikrokültür yöntemi ile tanı konulabilmesi için oldukça düşük miktarda besiyerine ihtiyacın olması ve kapiler tüplerin kullanılması ile geleneksel tüp kullanımına kıyasla maliyetin yaklaşık 10 kat azalması bu yöntemin en büyük avantajlarını oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra yöntemin hazırlanmasının ve kullanımının oldukça kolay olması ve parazit sayısının az olduğu durumlarda bile diğer yöntemlere göre daha hassas olması yöntemin diğer önemli avantajlarıdır. Bu yöntem kullanılarak *in vitro* ortamda az sayıda bulunan amastigotların hareketli promastigotlara ne oranda dönüştüğü kolaylıkla saptanabilir. Bu yöntemin PCR çalışmaları ile kombine şekilde kullanılması Kütanöz ve Visseral Leishmaniasis'in hızlı tanısında ve parazitlerin genotipik tiplendirilmesinde büyük kolaylık sağladığı belirlenmiştir (Allahverdiyev, 2004).

2.7. Leishmaniasis Tanısı

Leishmaniasisin tanısı kemik iliği ve dalaktan alınan doku aspiratlarının ya da biyopsi örneklerinin besiyerine inoküle edilmesinin ardından parazitlerin izole edilmesi ya da hazırlanan simirlerde parazitlerin görülmesi ile güvenilir bir şekilde yapılır. Bu yöntemler arasında dalak aspirasyonu en yüksek duyarlılığa sahiptir(%98) ancak aşırı kan kaybı gibi komplikasyonların oluşma ihtimali de yüksektir. Bazen karaciğer biyopsisinde (%50 duyarlı), lenf nodülü aspiratlarında ya da HIV ve Leishmania ile birlikte enfekte olmuş kişilerin buffy coat simirlerinde de amastigotlar gözlenebilir (Davidson, 1998).

Kütanöz Leishmaniasisin parazitolojik tanısı ise deri lezyonlarından alınan biyopsilerde amastigotların görülmesi veya bu örneklerin kültürünün yapılması sonucu gerçekleştirilir. Geleneksel simir ve kültür tekniklerindeki en büyük sorun, bu tekniklerin gizli ve herhangi bir belirti göstermeyen enfeksiyonların belirlenmesindeki düşük hassasiyetleridir. Bu teknikler aynı zamanda yavaş sonuç veren, zaman kaybettrici ve sahada yapılması mümkün olmayan tanı teknikleridir.

2.7.1. Serolojik Tanı

Serolojik testler visseral leishmaniasisde spesifik hümoral yanıtın varlığına, kütanöz ve mukokütanöz leishmaniasisde ise hücre aracılı immün yanıtı dayanır. Kütanöz Leishmaniasis'in tanısının serolojik testler ile yapılmasının güvenilir olmadığı düşünülmektedir. Bunun nedeni düşük serum antikor titreleri ve parazitolojik vakaların %30'nun bu yolla belirlenememesidir (Edrissian vd. 1979). Yüksek miktarda antileishmanial antikor titrelerinin varlığı nedeniyle serolojik testler visseral leishmaniasisin tanısında daha başarılıdır. Visseral Leishmaniasisin tanısı için duyarlılığı ve spesifikliğı değişen pek çok serolojik metot kullanılmaktadır. Ancak bu metotlar arasında en çok başvurulanlar ; İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT), ELISA ve Direkt Aglutinasyon Testi (DAT)' dir.

IFAT tanıda kullanılan en duyarlı testlerden biridir. Bu yöntemin temeli enfeksiyonun en erken safhalarında ortaya çıkan ve iyileşmenin ardından 6 ile 9 ay sonra fark edilemez hale gelen antikorların belirlenmesine dayanır. Eğer antikorlar düşük titrede devam ediyorsa, bu hastalığın yeniden n ksettiğinin iyi bir göstergesidir. 1:20'nin üzerindeki titreler kayda değer, 1:128'in üzerindekiler ise tanısaldır (Davidson, 1998). Bunun yanında tripanazomal serumlar ile çapraz bir reaksiyon ihtimali bulunmaktadır. Ancak promastigotların yerine Leishmania amastigotları kullanılarak bu durumun üstesinden gelinir. Her ne kadar bu test ELISA ile kıyaslandığında daha duyarlı (% 98) ve spesifik (% 96) ise de sonuç alınması oldukça uzun bir süre almaktadır ve saha koşullarına uygun değildir (Sassi, 1999).

Direkt Aglutinasyon Testi (DAT) de oldukça spesifik ve duyarlı bir testtir. Aynı zamanda ucuz ve hem sahada hem de laboratuvar ortamında kullanımı kolaydır. Bu yöntemde dondurulup kurutulmuş ya da süspansiyon haldeki boyanmış promastigotlar kullanılır. Dondurulup kurutulmuş form ısıya karşı stabildir ve bu nedenle bu yöntemin sahada kullanımına yardımcı olmaktadır. Bununla birlikte DAT'ın en büyük dezavantajı 18 saatlik uzun inkübasyon süresi ve serumun seri dil syonlarına olan ihtiyaçtır (Schallig, 2001). Ayrıca DAT hastalığın seyriyle ilgili herhangi bir bilgi vermez. Test tedavinin ardından yıllar boyunca pozitif olarak kalabilir. DAT son yıllarda L.major promastigotlarını kullanarak Kütanöz Leishmaniasisin tanısı için değerlendirilmektedir ve oldukça spesifik ve hassas (% 90.5) oldukları gösterilmiştir (Schoone, 2001).

ELISA leishmaniasisin serolojik tanısında oldukça değerli bir araçtır. Bu test hem laboratuvar analizleri için hem de saha uygulamaları için kullanılabilir. Buna rağmen ELISA'nın hassaslığı ve spesifikliğı kullanılan antijenden oldukça fazla miktarda

etkilenmektedir. Son zamanlarda *L.donovani*' den rGBP, *L. infantum*' dan RORFF, *L.chagasi* ' den rgp63, rK9, rK26 ve rK39 gibi pek çok rekombinant antijen geliştirilmiş ve test edilmiştir (Montoya, 1997, Martin, 1998, Jensen, 1999, Rajasekariah, 2001). Bunların içerisinde rK39 antijeninin oldukça duyarlı olduğu ve Visseral Leishmaniasis'li hastalarda hastalığın belirtilerinin ortaya çıkma süresi konusunda tahmin edici olduğu bulunmuştur. Buna karşılık bu test Kütanöz ve Mukokütanöz Leishmaniasis için fark edilebilir antijenler göstermemektedir. Bu antijene karşı antikor titreleri direkt olarak aktif hastalıkla ilişkilidir ve klinik olarak hastalığın tekrardan nüksetmesini tahmin etme ve kemoterapiyi görüntüleme potansiyeli vardır. Buna ek olarak rK39 ELISA AIDS gibi hastalıklar nedeniyle bağışıklık sistemi bozulmuş kişilerde Visseral Leishmaniasisin fark edilmesi için yüksek miktarda tahmin edici değere sahiptir.

2.7.2. Moleküler Tanı

Mikroskopik gözlemler ve alınan örneklerin kültürünün yapılması düşük hassasiyet sorununu beraberinde getirir ve oldukça zaman kaybettiricidir. İmmünolojik metodlar ise enfeksiyonun geçmişi ve geleceğini ayırma konusunda başarısızdır ve immün sistemi bozulmuş hastalarda güvenilirliğini yitirir. Buna karşın moleküler yaklaşımlar parazite özgü nükleik asitleri belirleme kapasitesine sahiptir ve aynı zamanda diğer yöntemlerdeki sınırlamaları ortadan kaldırabilirler. Günümüze kadar hem DNA'yı hem de RNA'yı hedefleyen çok sayıda nükleik asit görüntüleme yöntemi geliştirilmiştir. Bunların içerisinde PCR yönteminin oldukça spesifik ve yüksek duyarlılığa sahip bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. PCR testi hastalığa özgü belirtilerin ve semptomların ortaya çıkmasının 1-2 hafta sonrasında parazitlerin DNA' sını ve RNA' sını görüntüleme kapasitesine sahiptir. ITS bölgesi, gp63 lokusu, telomerik sekanslar 18s rRNA ve SSU-rRNA gibi rRNA genlerini hedefleyen sekanslar gibi Leishmania genomundaki farklı DNA sekansları ve kinetoplast DNA'sındaki değişken bölgeler PCR yönteminde kullanılmaktadır (Attar, 2001, Santos-Gomes, 2000, El Tai 2001, Pizzuto, 2001).

Konvansiyonel dalak aspirasyonu ya da kemik iliği ve karaciğer biyopsisine kıyasla PCR yönteminde yalnızca kan örneklerinin kullanılması bu yöntemin daha ümit verici bir araç olarak kullanılmasını sağlamıştır. Periferik kanın kullanıldığı PCR yönteminin duyarlılığı (% 75) mikroskopik gözlemin (% 26,3) ve kan kültürünün (%42,3) duyarlılığına göre oldukça yüksektir. Bununla birlikte PCR yöntemi halen sahada

kullanılmak için pahalı bir yöntem olarak durmaktadır. Ayrıca kültürü pozitif olan asemptomatik donörlerin kan örnekleri için negatif sonuçlar vermektedir. Buna ek olarak PCR mililitrede yalnızca 10 paraziti görüntüleyebilir (Singh, 1995).

2.7.3. Mikro Kültür Yöntemine Dayalı Tanı

Allahverdiyev ve arkadaşları tarafından geliştirilen mikro kültür yöntemi yalnızca 70 µl'lik kapiler tüplerden ve sıvı besiyerinden oluşmaktadır. Mikrokültür yöntemi ile tanı konulabilmesi için oldukça düşük miktarda besiyerine ihtiyacın olması ve kapiler tüplerin kullanılması ile geleneksel tüp kullanımına kıyasla maliyetin yaklaşık 10 kat azalması bu yöntemin en büyük avantajlarını oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra yöntemin hazırlanmasının ve kullanımının oldukça kolay olması ve parazit sayısının az olduğu durumlarda bile diğer yöntemlere göre daha hassas olması yöntemin diğer önemli avantajlarıdır. Bu yöntem kullanılarak *in vitro* ortamda az sayıda bulunan amastigotların hareketli promastigotlara ne oranda dönüştüğü kolaylıkla saptanabilir. Bu yöntemin PCR çalışmaları ile kombine şekilde kullanılması Kütanöz ve Visseral Leishmaniasis'in hızlı tanısında ve parazitlerin genotipik tiplendirilmesinde büyük kolaylık sağladığı belirlenmiştir (Allahverdiyev, 2004).

2.8. Kütanöz Leishmaniasis'in Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

Kutanöz Leishmaniasis hastalığının tedavisi ile ilgili çok sayıda bilimsel çalışma olmasına rağmen ideal tek bir tedavi tanımlanamamıştır. Kütanöz Leishmaniasis tedavisinde amaç, mukozal yayılımı önlemek, iyileşmeyi hızlandırmak ve yara izi oluşumunu engellemektir. Her ne kadar bazı durumlarda hastalık kendi kendine iyileşse de, bazen de daha invazif bir form olan ve deride geniş yara izleri bırakan Mukokutanöz Leishmaniasis'e dönüşür. Bu nedenle hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar ile bu tür komplikasyonların önlenmesi hedeflenmelidir. Hastalığın tedavisinde geliştirilen yöntemler sistemik ve lokal tedavi başlıkları altında toplanmaktadır.

2.8.1. Sistemik Tedavi

2.8.1.1. Pentavalent Antimonlar

Meglumin antimoniate (glukantim) ve sodyum stiboglukonatı (pentostam) içeren pentavalent antimonlar 50 yıldan daha uzun süredir parazitik leishmaniasis hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Leishmaniasis'in tüm formlarına karşı tedavide halen

öncelikli olarak pentavalent antimonlara başvurulmaktadır. Buna rağmen ilacın klinik olarak kullanımı pek çok nedenden ötürü sınırlanmaktadır. Bu bileşikler en az 3 hafta boyunca (20 mg of Sb/kg/gün) her gün parenteral olarak verilmelidir. Antimon terapiye kas içi enjeksiyon sırasında çoğu zaman yerel bir ağrı ve pek çok yan etki eşlik eder. Tipik yan etkiler miyalji, karın ağrısı, diyare, hepatotoksisite ve daha da önemlisi kardiyotoksisitedir. Hastalığın tedavisinde ilaca karşı dirençliliğin oluşması bir diğer önemli problemidir. Tüm bu dezavantajlarının yanında ilacın yüksek maliyeti özellikle gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde ilacın satın alınmasını ve kullanımını en düşük seviyeye getirmektedir. İlacın tüm dezavantajlarına rağmen hastalığın tedavisi için tam olarak etkin başka bir ilacın geliştirilememiş olmasından ötürü beş değerlikli antimon kullanımı leishmaniasis ile mücadelede ilk başvuru yöntemidir (Seaton, 1992, Aronson, 1998) .

Pentavalent antimoniallerin etki mekanizması hala net olarak anlaşılamamıştır. Antimonun son aktif formunun üç değerlikli mi yoksa beş değerlikli mi olduğu net değildir (Duffin, 1991). Araştırmacılar ilacın etki mekanizması ile ilgili 2 farklı model ortaya atmışlardır. Birinci modele göre beş değerlikli Sb(V) öncü bir ilaç gibi davranır ve organizmanın içerisinde daha toksik ve aktif form olan Sb(III)'e redükte olur (Shaked-Mishan, 2001). Bu model yapılan *in vivo* çalışmalarda Sb(V)'in Sb(III)'e indirgenmesi ile desteklenmiştir. Yapılan son çalışmalar tiyol gruplarının bu çevirimde redükleyici ajan olarak rol alabileceği göstermektedir. 4 farklı tiyol grubu değerlendirilmiştir: glutathione (GSH) memeli hücrelerinin sitosollerinde bulunan ana tiyol grubudur, Sistein ve sisteinil glisin (Cys-Gly) lizozomlar içerisindeki baskın tiollerdir. Glutathione-spermine konjugatı, trypanothione (T(SH)₂) parazit içerisindeki baskın tiyol grubudur (Fairlamb, 1992). Cys, Cys-Gly ve T(SH)₂ 37 °C'de Sb(V)'in Sb(III)'e indirgenmesini arttırabilirler. Şaşırtıcı olarak Sb(V)'in indirgenmesi ile ilgili başlangıç oranları Cys-Gly, Cys ve T(SH)₂ varlığında tek başına GSH 'tan daha büyüktür. Tüm bu reaksiyonlar pH 5 ve pH 7'de meydana gelir ancak genellikle asidik pH ve yavaş bir şekilde artan sıcaklık tercih edilir. Tüm bu veriler Sb(V)'in Leishmania parazitleri içerisinde *in vivo* olarak T(SH)₂ tarafından, memeli hücrelerinin asidik kısımları içerisinde de Cys veya Cys-Gly tarafından indirgendiği hipotezini desteklemektedir. Bu nedenle indirgenme işleminin promastigotlara göre daha düşük hücre içi pH'a sahip ve daha yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen amastigotlarda meydana geldiği bulunmuştur (Fairlamb, 1992).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Sb (III)'ün sistein ve histidin residuellerinden oluşan çinko parmak proteinler ile bağlanma yeteneğinde olduğu gösterilmiştir. Bu yapısal elementler DNA tanıma, RNA paketlenme, protein katlanması ve sentezi, lipid bağlanması, transkripsiyonel aktivasyon, hücre farklılaşması ve büyümesi ve apoptozun regülasyonu gibi protein-nükleik asit ve protein-protein etkileşimlerinden sorumludur. Bu nedenle *Leishmania infantum* amastigotlarının düşük konsantrasyonda Sb(III) ile bile tedavisi apoptoz oluşumunu indükler (Leon, 2000).

İkinci modele göre ise Sb(V) esas antileishmanial aktiviteyi oluşturmaktadır. Sb(V)'in *Leishmania donovani*'de tip I DNA topoizomeras'ı spesifik olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Sb(V) bunu pBR322 supercoil plasmidinin klavajını engelleyerek gerçekleştirmektedir (Chakraborty, 1988). De Micheli ve arkadaşları (2002) da Sb(V) 'in adenin ribonükleosit ile bir kompleks oluşturabileceğini bildirmişlerdir. Ribozda bulunan –OH grupları Sb(V) için bağlanma bölgeleridir. Sb(V)'in ribonükleositlerle kompleks oluşturması asidik pH'larda daha hızlı bir şekilde gerçekleşir.

Pentavalent antimoniallerin etki mekanizmasının T-hücre kümeleri ve sitokinleri de içeren çok sayıda faktöre bağlı olduğu önerilmiştir (Murray, 2001). Sodium stiboglukonat'ın sitokin cevabının artmasını sağlayan protein tirozin fosfatların güçlü bir inhibitörü olduğu bulunmuştur (Pathak, 2001). Son zamanlarda yapılan bir başka çalışma da meglumin antimoniat'ın monositlerin ve nötrofillerin fagositik kapasitesini arttırdığını ve fagositoz sırasında üretilen süperoksit anyonlarında belirli bir artış gözlemlendiğini göstermiştir. Bu yönleriyle bu ilaçlar parazitlere karşı savunmada öncelikli olarak kullanılırlar. Tüm bu sonuçlar bir araya getirildiğinde Sb(V)'in konak hücre cevabını önemli hale getirerek direkt ve indirekt mekanizmalarla parazitleri öldürebileceği önerilmektedir (Muniz-Junqueira, 2008).

2.8.1.2. Pentamidine

Pentamidine, aromatik bir diaimidin olup *Leishmania*, *Pneumocystis carini* ve *African Trypanosomes* gibi birçok protozoa için toksik olmaktadır. Aktivite mekanizması tam olarak belirlenmemiştir. Pentamidine pentavalent antimonallere alternatif olarak kullanılır ve French Guyana'da Kutanöz Leishmaniasis vakalarının %90'ından fazlasından sorumlu *L. guyanensis* tedavisinde kullanılan ilk seridir (Nacher, 2001).

Kısa süreli düşük dozlu olarak pentamidinin verilmesi Kutanöz Leishmaniasis'i bulunan sağlıklı insanlarda, *Pneumocystis* için yüksek dozaj uygulanan HIV-pozitif hastalara göre daha iyi tolere edilir (Pradinaud, 1994).. Tüm yan etkiler geri dönüşümlüdür ve

düşük doz uygulanan 2200'den fazla hastada yeni diabetes mellitus görülmemiştir. Ancak tedavide yüksek dozajlara (>2000 mg) ihtiyaç duyulan Mukozal Leishmaniasis'de diabetes mellitus görülebilir (Amato, 1998). Kan şekeri ve glisemi her enjeksiyonda kontrol edilmelidir. İlacın diğer yan etkileri ise azotemi, böbrek yetmezliği, mide bulantısı, diyare, lökopeni, trombositopeni, anemi, akut hepatitis, neralji ve halüsinasyonlardır (Tomkins, 1972).

2.8.1.3. İmidazoller / Triazoller

İmidazoller ve onlarla yapısal olarak bağlantılı olan triazoller antifungal ilaçlar olarak tanımlanırlar. Ancak bu ilaçların aynı zamanda antileishmanial aktiviteleri de vardır. İmidazol ve triazollerin az sayıda yan etkiye sahip olması ve ağız yoluyla alınabiliyor olması bir avantaj olarak görülse de bu ilaçlar sadece bazı türlere karşı etkilidir.

Itraconazole de kullanılan ilaçlardan birisidir ancak bu ilaçla ilgili veriler çok az ve tartışmalıdır.

Fluconazol İran'da rasgele olarak kontrollü ilaç denemelerinde çalışılmıştır. Bu denemelerde *Leishmania major* türlerine karşı ümit verici sonuçlar alınmasına rağmen ilacın diğer *Leishmania* türlerine karşı gösterdiği etki ile ilgili herhangi bir veri yoktur (Alrajhi, 2002).

2.8.2. Lokal Tedavi

2.8.2.1. Fiziksel Yöntemler

Kütanoz leishmaniasis, fiziksel yöntemlerin geniş bir aralığını kapsayan, koterizasyon (elektrik veya kimyasal maddelerle dokuları yakma), cerrahi kesim, kriyoterapi ve lokalize kontrollü ısı gibi yöntemlerle tüm yaş gruplarında tedavi edilmektedir. Kriyoterapi, 2 mm 'den geniş olan lezyonlarda, pamuk uçlu aplikator yada pamuktan bir bezle sıvı nitrojenin lezyon bölgesine tekrar eden periyotlarla uygulanmasıdır. Uygulama başına dondurma süresi 15-20 saniyedir. Bu işlem toplam süre 30-120 saat olacak şekilde, kısa periyotlarla 2 yada 3 kez tekrarlanır. Yeterli uygulamada lezyon sınırının 2-3 mm dışında beyazlama görülmektedir. Dondurma sonrası lezyon üzerinde 2-3 gün boyunca ödem ve kabarıklıklar olur ve daha sonra kabuklaşır (Gurel, 2000).

2.8.2.2. %15 Paromomycin içeren Merhem

Lokal formülasyonların; ilacın uygulama kolaylığı, daha düşük yan etki ve daha düşük maliyet etkinliği gibi önemli avantajları vardır. Fakat deri içine yapılan emilim intakt deri tarafından özellikle derinin dış tabakası tarafından engellenir. Lokal tedaviler açık lezyonlara uygulanabilir fakat epiltelyal kalınlaşma yüzünden lezyon içine emilim çok etkin değildir.

Paromomycin bir aminoglikosit antibiyotik olup, sistematik olarak hem Visseral hem de Kütanoz Leishmaniasise karşı kullanılır. Bir merhem olarak farklı formülasyonları ya beyaz yumuşak parafin içinde methylbenzethonium ile ya da beyaz yumuşak parafin ve üre ile test edilmektedir.

Paromomycin'nin methylbenzethonium ile olan kombinasyonları, üre ile olanlardan daha etkilidir. Fakat daha fazla lokal iltihaplı reaksiyonlara neden olurlar (Bryceson, 1994). Yeni dünya leishmaniasisi ile yapılan iki çalışmada merhem, ilaçlardan daha iyi tedavi etme hızı rapor edilmesine rağmen, uzmanlar, mukozal hastalık risklerinden dolayı kütanoz lezyonların kullanılması konusunda kararsızdılar (Arana, 2001).

2.8.2.3. İntralezyonel Beş Değerli Antimon İnjesiyonu

Beş değerli antimon injesiyonu, lezyonlarda çok az yan etkiye sahiptir. Fakat metastatik enfeksiyonlar görülmez. Esas hedef lezyonun bulunduğu deri bölgesine beş değerli antimonu doldurmaktır. Bunun anlamı lezyon bölgesine ilacı dikkatli bir şekilde enjekte etmektir. 25G ölçekli bir iğne ilacın lezyon bölgesine basınç altında enjekte edilmesinde kullanılır. Doku boşlukları çok küçük olduğundan deri içine injesiyon zordur. İlaç subkutan dokuya geçmemelidir, aksi takdirde hızlı bir şekilde absorbe olur ve enfeksiyon bölgesine geçemez.

İlacın injesiyonu lezyonun merkezine doğru uygulanır. Çözelti lezyonun altından tüm lezyon bölgesini kapsayacak şekilde enjekte edilir. Lezyon her 5-7 günde, 2 yada 5 kez tedavi edilmelidir. Eğer lezyon beş uygulamadan sonra iyileşmezse, bir ay boyunca incelenmelidir. Lezyon altına yapılan injesiyon oldukça acı verici olup uygulama açısından da çok tecrübeli olmak gerekir (Berman, 1997).

2.8.3. Halen Araştırılmakta Olan İlaçlar

2.8.3.1. Miltefosine

Bir fosfokolin analogu olan Miltefosine leishmania'ya karşı yüksek *in vitro* aktivite gösterir. Kolombiya'daki kontrollü olmayan denemelerde elde edilen sonuçlar ümit vericidir. 3-4 hafta süre ile günde 133-150 mg doz kullanıldığında iyileşme oranı %94'tür. Terapinin ardından yaralı bölgede herhangi bir parazite rastlanmamıştır. 3 ay sonra ise epitel doku yeniden oluşmuştur. Bununla birlikte hastalığın nüksetme oranını hesaplayabilmek için hastaların uzun süre gözetim altında tutulması gerekmektedir. Bu ilaçların pentavalen antimon bileşiklerine karşı dirençli olan suşlara karşı etkili olduğu ispatlanmıştır. Ancak teratojenik etkileri, dar doz aralığı, kısa yarılanma ömrü ve ilaca karşı kısa sürede direnç gelişimi konularında ciddi endişeler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar da bu endişeleri doğrulamaktadır. En sık görülen yan etkileri mide bulantısı, gastrointestinal şikayetler, baş ağrısı ve karaciğer enzimlerindeki artıştır. Miltefosine kullanımının Kütanöz Leishmaniasis' in rutin tedavisi olarak önerilebilmesi için çeşitli Leishmania türleri ile daha fazla kontrollü denemelerin yapılması gerekmektedir (Soto, 2001).

2.8.3.2. Amfoterisin B/ Lipozomal Amfoterisin B

Antifungal bir ajan olan Amfoterisin B Leishmania türlerine karşı da aktiftir ancak çok sayıda yüksek insidanslı karışık reaksiyonlara yol açabilir (Örneğin; hyperpyrexia ,yüksek tansiyon ,anemi , thrombophlebitis , hepatitis , böbrekte hasar ve azotemi gibi). Serbest haldeki ilaca göre çok daha az toksik özellik gösteren çok sayıda amfoterisin B lipid formülasyonu geliştirilmiştir ve bunların Visseral Leishmaniasis' in tedavisinde faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Ancak Kütanöz Leishmaniasis için lipozomal Amfoterisin B' nin formülasyonu ve etki gösteren dozajının hesaplanması konusunda yeterli çalışma yapılmamıştır (D'Oliveira, 1997).

2.8.3.3. Allopurinol

Bir hipoksantin analogu olan Allopurinol, pentavalen antimonun eksikliğinde etkili değildir. Ancak bununla birlikte Allopurinol (20 mg/kg/gün 15 gün için) ve stiboglukonat (20 mg/kg/gün 15 gün için) kombinasyonu aynı dozda stiboglukonatın tek başına gösterdiği etkidenden (%36-39 iyileşme oranı) çok daha fazla bir etki gösterir (%71-74 iyileşme oranı).

2.8.3.4. Bağımsızlık Sistemini Etkileyen İlaçlar

İmmünomodülatörler ilginç bir şekilde pentavalen antimonların yaraları iyileştirme oranlarını geliştirebilirler ancak bugün için net bir verinin bulunmayışı bu ilacın tavsiye edilmesini engeller.

2.8.3.5. Diğer İlaçlar

Rifampisin, dapsone ve çinko sülfat gibi diğer ilaçlar da Leishmaniasis tedavisi için test edilmişlerdir (Kochar, 2000, Dogra, 1991, Sharquie, 2001). Bazıları ümit verici olmakla birlikte tedavi için kullanılmadan önce bu ilaçların kesin bir şekilde hastalığı önleyici etkiye sahip olduğunu gösteren sonuçların elde edilmesi gerekmektedir.

2.9. Kütanöz Leishmaniasis Tedavisinde Kullanılan İlaçların Dezavantajları

Leishmaniasis'in tedavisinde kullanılan ilaçların en büyük dezavantajı sebep oldukları yan etkilerdir. Başta tedavide altın standart olarak kabul edilen pentavalent antimonlar olmak üzere kullanılan tüm ilaçlar pek çok yan etkiye sebebiyet verirler.(Çizelge 2.2) Aynı zamanda antileishmanial ilaç tedavisinin ardından derideki lezyonlar tam olarak iyileşememekte ve deride geniş yara izleri kalmaktadır (Scope, 2003, Schubach, 1998). Ayrıca son yıllarda hastalık etkenlerinde kullanılan ilaçlara, vektörlerinde ise insektisitlere karşı dirençliliğin artması bir başka önemli sorunu oluşturmaktadır. Pentamidin gibi ilaçlar ise hastalığa neden olan Leishmania parazitlerinden sadece bir kaç üzerinde etkili olabilmektedir . Ayrıca *Leishmania* parazitleri ile HIV virüslerinin birlikte enfekte ettikleri hastalarda leishmaniasis tedavisinde kullanılan klasik ilaçlara karşı direnç oluşmakta ve tedavi genellikle başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Kütanöz Leishmaniasis tedavisinde kullanılan ilaçların bir diğer dezavantajı ise uzun süreli kullanım gerektiren ilaçların oldukça pahalı olmasıdır. Tüm bu nedenlerden ötürü Kütanöz Leishmaniasis hastalığı ile mücadele için yeni yaklaşımlara oldukça fazla ihtiyaç duyulmaktadır.

Çizelge 2.2. Leishmaniasisin tedavisinde kullanılan ilaçların toksik yan etkileri

İLAÇ	YAN ETKİLERİ
Beş değerlikli antimonlar	Miyalji, diyare, EKG ile %30-60 oranında görülebilen kardiyak toksisitesi , %50 geri dönüşümlü olarak karaciğer zehirlenmesi Hematoksisite (anemi, lökopeni, trombopeni)
Pentamidin	Kişisel şikayetler: kas-iskelet semptomları, miyalgiya, baş ağrısı, mide bulantısı, sindirim sistemi şikayetleri, enjeksiyon bölgesinde ağrı, sırt ağrısı Nadiren görülen komplikasyonlar: glomerulonefritis, , periferik böbrek iltihabı, deride pul pul dökülme, herpes zoster, Aseptik apse (pentamidin ile subkütanöz dokunun kazara teması), diyabet, hipoglisemi, proteinüre, düşük tansiyon
Ketokonazol	Geri dönüşümlü karaciğer zehirlenmesi, (genellikle hafif) Testosteron değerlerinde (%70) düşüş, Kişisel şikayetler: sırt ağrısı, baş ağrısı, mide bulantısı, ateş ve halsizlik
Flukonazol	Karaciğer zehirlenmesi Alerjik deri reaksiyonları Hematoksisite (anemi, lökopeni, trombopeni) Kişisel şikayetler: baş ağrısı, sindirim sistemi şikayetleri

3. NANOTEKNOLOJİ NEDİR?

“Nano” sözcük olarak, bir fiziksel büyüklüğün milyarda biri anlamına gelir. Bir nanometreyse, metrenin milyarda birine eşit uzunluk birimidir. Nano ölçekteki malzemeler, malzemenin moleküler haldeki özelliklerinden çok farklı olan yeni özelliklere sahiptirler. Nanomalzemeler kütleli halde bulunan malzemelerle kıyaslandığında toplam hacimlerine göre çok daha büyük oranda yüzey alanına sahiptir. Geniş yüzey alanı elementlerin ve nanoparçacıkların birbirleriyle olan etkileşimini etkiler. İşte bu şekilde daha büyük boyutlarına göre oldukça farklı elektriksel, mekanik, optik ve manyetik özellikler gösteren atomik ve moleküler boyutlardaki (1-100 nm) fonksiyonel materyallerin, aletlerin, sistemlerin üretilmesini konu alan bilim dalı nanoteknoloji olarak isimlendirilmektedir (Singh, 2006).

Bu nedenle nanoteknoloji aşağıdaki anahtar fiziksel ve kimyasal konuları kapsar:

- Nano boyuttaki yeni fiziksel özelliklerin varlığı
- Atomik ve moleküler boyutlardaki analizler
- Maddelerin atomik boyutlarda kontrolü
- Niteliksel olarak yeni özelliklere sahip olan fonksiyonel kompleks sistemlerin üretilmesi

3.1. Nanobiyoteknoloji

Nano boyuttaki materyallerin insan vücudunda bulunan hücrelerden daha küçük olmakla birlikte hücrelerin içerisinde bulunan makro moleküllerle hemen hemen aynı boyutta oldukları bilinmektedir. Yapılan araştırmalar DNA’nın eninin yaklaşık olarak 2.5 nm olduğunu ve protein moleküllerinin eninin ise 1-20 nm arasında değiştiğini ortaya koymuştur. Canlı hücrelerin fonksiyonel bileşenlerinin bu doğal nano boyutları, nanoteknolojinin biyoteknoloji içerisinde uygulanmasını kaçınılmaz hale getirmektedir. Bu durum nanobiyoteknoloji teriminin ortaya çıkmasını sağlar. Nanobiyoteknoloji, nanoteknoloji ve biyoteknolojinin ortak bir noktada birleşmesi sonucu ortaya çıkan bir bilim dalıdır. Nanobiyoteknoloji, nano boyuttaki materyallerin ya da ürünlerin yapımında biyolojik moleküllerden yararlanır. Oluşan bu nano materyaller ise biyolojik sistemleri etkilerler.

Nanobiyoteknolojinin katılımıyla birlikte gelecekte biyolojik sistemlerde özelleşmiş bölgeleri hedefleyebilen, bulunduğu bölgeden farklı olarak çevresindeki yapıları denetleyebilen, çeşitli kimyasalların salınımında görev alabilen, dokuların veya hücrelerin verdikleri yanıtları algılayabilen ve çevresinde bulunan dokuları yeniden

oluşturabilen çeşitli nanopartiküllerin veya başka yapıların geliştirilmesi hedeflenmektedir. Sonuç olarak nanobiyoteknolojideki gelişmeler gelecek yıllarda özel olarak dizayn edilmiş nano yapıların iletişimi sağlayan bir operatör vasıtasıyla kontrol edilerek canlı bir organizma (örneğin bir hastada) içerisinde idare edilebileceğini ve verilen sinyallerle istenen noktalara yönlendirilebileceğini göstermektedir.

3.2. Nanotıp

Nanotıp terimi tam olarak nanoteknolojinin tıp alanında uygulanması anlamına gelmektedir. Nanotıp fikri ilk kez olarak Nobel ödüllü Profesör Richard Feynman tarafından dile getirilmiştir. Feynman ince robotların ve nano boyuttaki aletlerin tanı ve tedavide daha güvenilir, kesin, ucuz ve hızlı yaklaşımların sağlanmasında kullanılabileceğini söylemiştir (Feynman, 1992).

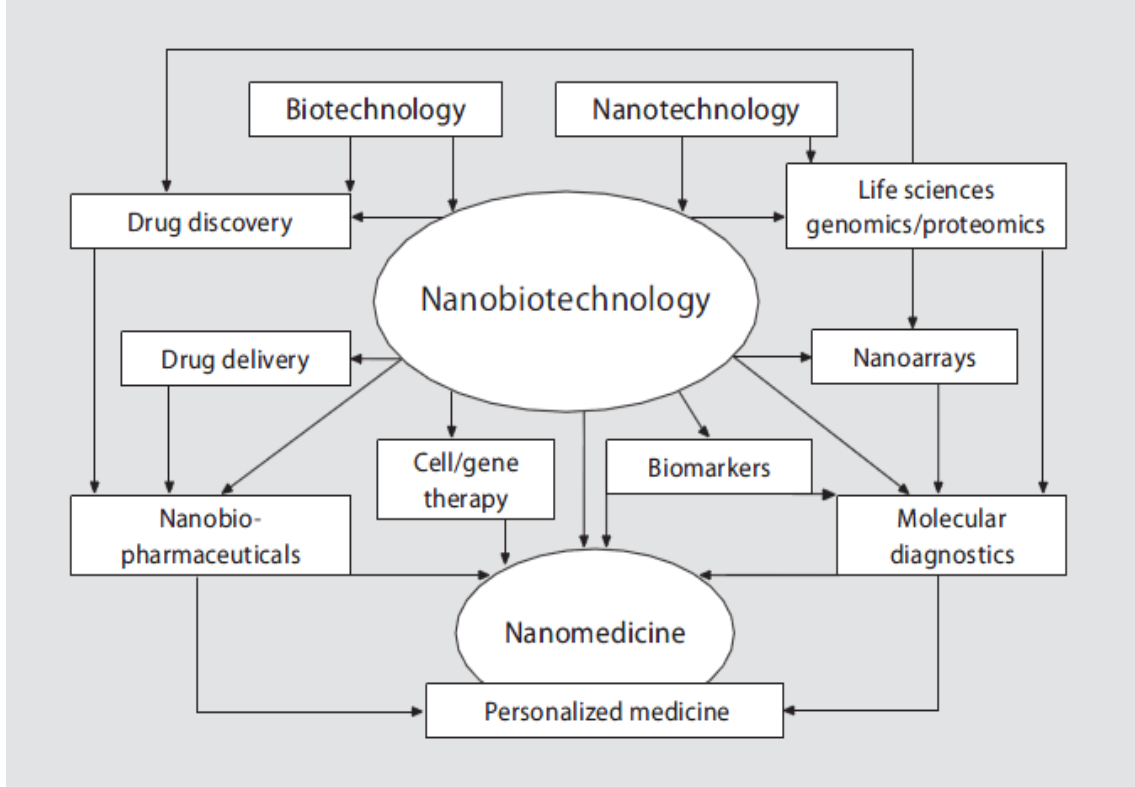
Bazı konularda birbirleriyle alakalı olsalar da, nanobiyoteknoloji ve nanotıpın çalışma alanları birbirinden farklıdır. Genel olarak nanotıp tıbbi uygulamalarda nanoteknolojik kavramların kullanımı üzerine odaklanmaktadır. Nanobiyoteknoloji ise biyolojik sistemler üzerinde nano boyutta yapılan tüm araştırmaları kapsamaktadır (Riehemann, 2009).

Feynmann'ın yıllar önce öngördüğü gibi son yıllarda nanotıpa olan ilgi giderek artmaktadır. Günümüzde nanotıbbın çalışma alanları ilaçların taşınması, biyomateriyallerin oluşturulması, *in vivo* görüntüleme, *in vitro* tanı, aktif implantların oluşturulması ve hastalıkların tedavisi olmak üzere çeşitli başlıklar altında toplanabilir.

Temel yaklaşımı hasta hücrelerin sağlıklı hücrelere oranla daha çabuk bir biçimde ortadan kaldırılması olan ameliyat, kemoterapi ve radyasyon ile muamele gibi konvansiyonel tedavilerin aksine, nanotıp spesifik hücrelerin belirlenmesi, öldürülmesi veya tedavi edilebilmesi için çok yönlü uygulamaları kullanmayı amaçlamaktadır. Bu nedenle nanotıp yalnızca nanoteknolojik kavramların kabul edilmesine ve uygulanmasına değil, aynı zamanda gerekli bilgilerin nanoteknolojiye aktarılmasına da ihtiyaç duymaktadır. Bu yüzden bu iki çalışma alanı birlikte gelişmektedir (SEER Cancer Statistics Review; 1975 – 2003).

Nanotıp'ın hedeflerinden birisi de tıp alanında uygulanması amaçlanan ve yeni fonksiyonel ve dinamik özelliklere sahip çok düzeyli moleküler agregatların tasarlanmasıdır. Bu amaç doğrultusunda boyuta ve bölgeye spesifik nano boyuttaki sistemler üretilmeye çalışılmaktadır. Bu yaklaşım aynı zamanda kişiselleştirilmiş tıbbın geliştirilmesi doğrultusunda yeni olasılıklar önermektedir. Kişiselleştirilmiş tıp

gelecekte genomik ve proteomik teknolojileri kullanarak her hasta için en uygun farmakoterapinin geliştirilmesini hedeflemektedir (Yang, 2008).



Şekil 3.1. Nanobiyoteknolojinin Nanotıp ile ilişkisi

3.3. Nanopartiküller

Nanopartiküller 100 nm'den daha küçük boyutlardaki, boyutlarına kıyasla oldukça geniş yüzey alanlarına sahip çözünmeyen partiküllerdir. Nanopartiküller kütleli materyallerle atomik yapılar arasında bulunan ara yapılardır. Kütleli materyaller genellikle sabit fiziksel özelliklere sahiptirler. Kütleli materyallerin aksine nanopartiküllerin ise oldukça değişken elektriksel, manyetik ve optik özellikleri bulunmaktadır (Sinha, 2006). Tüm bu farklı özellikleri nanopartiküllerin hastalıkların tanısı ve tedavisi konusunda ilgi odağı haline gelmelerini sağlamaktadır (Suri, 2007).

Nanopartiküller boyut olarak insan hücrelerinden daha küçük olmakla birlikte enzimler ve reseptörler gibi biyolojik makro moleküllerle aynı boydadırlar. Bu nedenle nanopartiküller aynı boyda oldukları peptidler, antikorlar veya nükleik asitlerle konjuge edilerek problemler şeklinde kullanılabilirler. Böylece patolojik bölgeler ile ilgili olan hücreli hareketler ve moleküler değişiklikler gözlemlenebilir. Bu problemler geniş bir spektral

aralığa karşı yüksek düzeyde hassasiyet, stabilite ve absorpsiyon kat sayısı sağlarlar (Cuencha, 2006). Antikorlarla, kollajenlerle ve mikro moleküllerle kaplanan nanopartiküller kanser gibi hastalıkların erken tanısı için de denenmektedir. Vitaminleri, hormonları, enzimleri sentezleyen genlerle tasarlanan biyolojik robotlar ırsi ya da sonradan kazanılmış hastalıkların tedavisinde kullanılabilir (Freitas, 2005). Ayrıca nano boyuttaki aletler yüksek dozda antikanserojen ilaçların ve genlerin normal hücrelere zarar vermeden kötü huylu ve hasta hücrelerin içine taşınması için özelleşmişlerdir. Bu sayede antikanserojen ilaçlar en az yan etki ile maksimum yeterlilik gösterirler. Bu nano taşıyıcılar aynı zamanda kimyasallar, manyetik alan, ısı ve pH gibi uyaranlar tarafından aktive olacak şekilde düzenlenebilirler (Lee, 2008). Nano taşıyıcılar benzer şekilde ilaçların kan-beyin bariyeri gibi anatomik bariyerlerden, akciğerler ve deriden penetre olması için de kullanılırlar. Son zamanlarda nano taşıyıcılar hedefleme, ilaç taşıma cihazı ve biyolojik sensör olarak fonksiyon gösterme gibi çok fonksiyonlu şekilde tasarlanmaktadır (Lepage, 2007).

Son yıllarda nanopartiküllerden mikrobiyoloji alanında da yararlanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda nanopartiküllerin pek çok bakteri türü ve diğer hücre modelleri üzerinde antimikrobiyal özellik gösterdikleri ortaya çıkmıştır. Ayrıca nanopartiküllerin mevcut antibiyotiklere karşı dirençli olan bakteriler üzerinde de etkili olması enfeksiyonlarla mücadele konusunda ümit verici bir gelişme olarak nitelendirilmektedir. Günümüzde hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılmak üzere halen araştırılmakta olan nanopartiküller ve nano cihazlar; quantum dotlar, nano kabuklar, nano küreler, metal nanopartiküller, paramanyetik nanopartiküller ve karbon nanotüplerdir. Kanser tanı ve tedavisi ile nanoteknolojinin birleştirilmesi hızla ilerleyen çalışma alanlarından bir tanesidir ve bu kavramların daha geniş bir şekilde anlaşılabilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

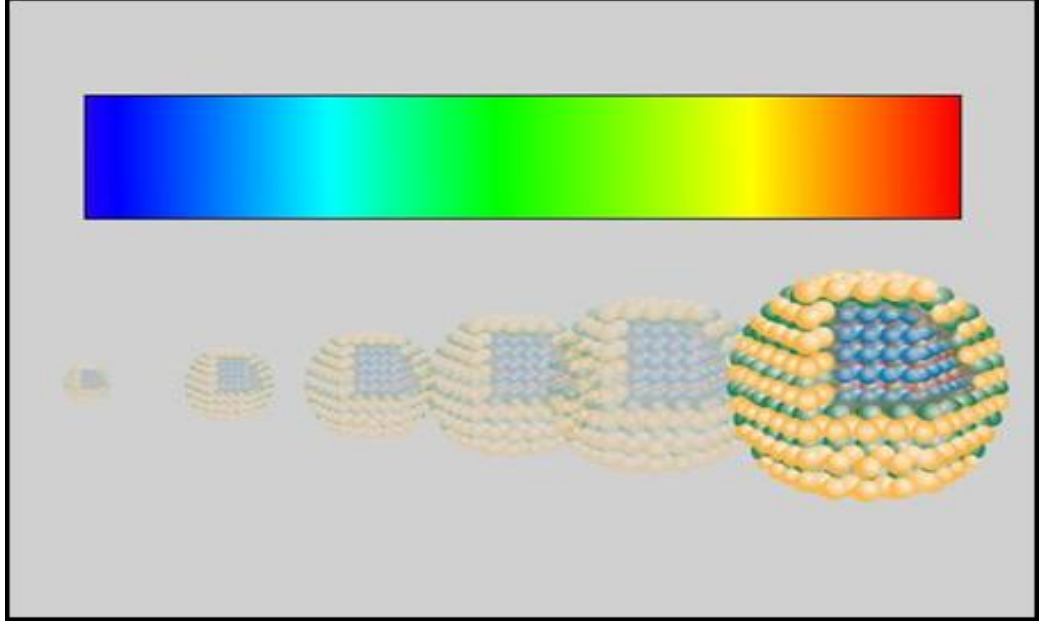
3.4. Hastalıkların Tanısında Nanopartiküller

Günümüzdeki senaryoda Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) ve tomografi tanı ve görüntülemede önemli bir rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra nano boyuttaki kontrast ajanları gadolinium gibi geleneksel kontrast ajanlarına göre daha yüksek miktarda manyetik hassaslığa sahiptir. Süper paramanyetik nanopartiküller vücuda intravenöz olarak verildikten sonra hızlı bir şekilde karaciğerler tarafından alındıkları için hepatik tümörlerin karakterize edilmesi için kullanılırlar (Wang, 2001). Benzer şekilde 5-10 nm boyutunda oldukça küçük, süper paramanyetik demir oksit kontrast ajanları lenf

nodülleri ve kemik iliği tarafından hücre içerisine alınır. Bu nanopartiküller serviks, meme, akciğer ve prostat kanseri hastalarında lenf nodüllerinin durumlarını karakterize etmek için kullanılır. Pozitron emisyon tomografisinin algılama limitinin altında olan lenf nodüllerindeki 2 mm'den daha küçük çaptaki mikro metastazlar demir oksit kontrast ajanları kullanılarak tanımlanır (Harisinghani, 2003, Torchilin, 2007). Aynı şekilde LH-RH içeren silika kaplı lipid miseller demir oksit partiküllerin LHRH reseptörü pozitif olan kanser hücrelerine bırakılması için kullanılırlar. Kanser hücreleri tarafından alınan partiküller MRI kullanılarak görüntülenir. Süperparamanyetik nanopartiküller in vivo olarak MRI için bir kontrast ajanı olarak kullanılabilir. Bu nanopartiküller metastazların tanımlanabilmesi için hassasiyeti arttırırlar ve periferik organlardaki, lenf nodüllerindeki ve kemiklerdeki hücrelerin yayılmasını sağlarlar. Ayrıca yapılan bir çalışmada nanopartiküllere dayalı indirekt immüno Floresan mikroskopun *Mycobacterium tuberculosis*'in hızlı tanısında oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (Qin, 2007).

3.4.1. Quantum Dots

Quantum dotlar kadmiyum veya gümüş gibi elemental inorganik çekirdektan ve onu çevreleyen metal bir kabuktan oluşan nanokristallerdir. Dış taraftaki kabuk quantum dotları fotokimyasal zarardan korur ve onların suda çözünürlüğünü arttırır. Quantum dotlar spesifik dokuları ve organları hedeflemek için antikolar ile veya nükleik asitlerle konjuge edilebilir ve floresan probolar olarak kullanılabilir. Boyutlarına ve kompozisyonlarına bağlı olarak 400-2000 nm arasında değişen bir iç floresan emisyon spektra dalga boyuna sahiptir (Medintz, 2008). Ayrıca quantum dotlar görünür spektrumda yetersiz penetrasyona sahip olan bağırsak gibi dokuları görüntülemek için de kullanılır. 700-1000 nm dalga boyunda yakın infrared (NIR) spektrumda floresan ışık yayan quantum



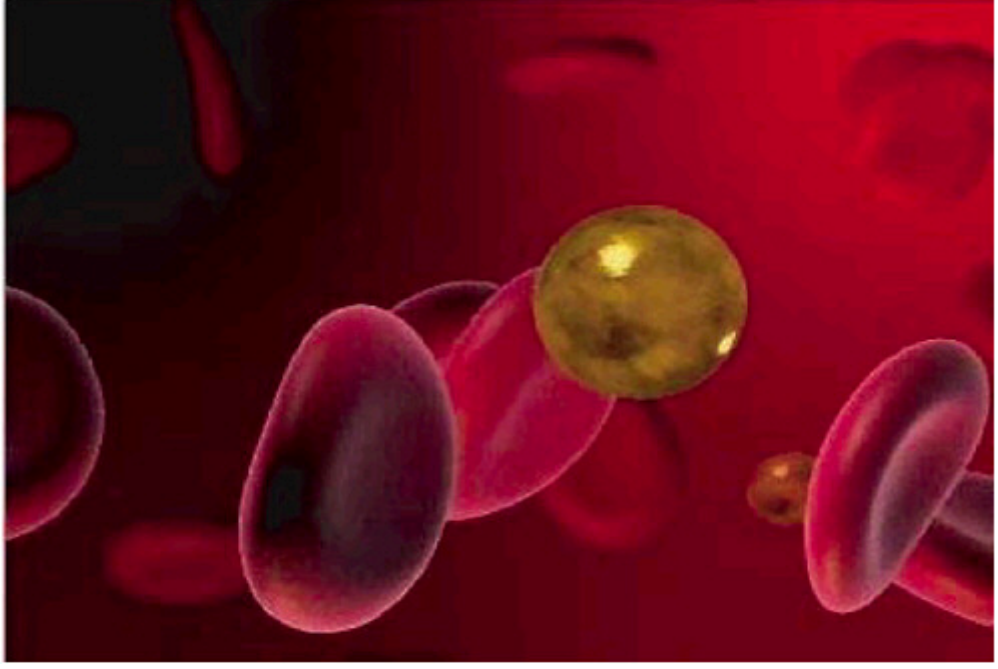
Şekil 3.2. Boyutlarına bağlı olarak renk değiştiren Kuantum Dotlar

dotlar çeşitli hayvan modellerinde *in vivo* lenfatik görüntüleme için düzenlenmiştir (Kim, 2004). Quantum dotların ağır metal kompozisyonlarına ve UV ışınlanmaya maruz kaldıktan sonra sitotoksik kadmiyumun serbest kalmasına bağlı olarak hayvanlar üzerinde potansiyel kullanımı fazla değildir. Bu yan etkileri quantum dotların polietilen glikol(PEG) ile kaplanması veya misellerden oluşan kapsüllerle sarılarak azaltılabilir (Moghimi, 2005).

3.4.2. Nanokabuklar

Quantum dotların sitotoksik etkisi silikadan yapılmış dielektrik bir çekirdek içeren ve ince bir metal kabuk ile çevrilen nanokabuklar kullanılarak da giderilebilir. Nanokabuklar 10-300 nm çapında quantum dotlardan daha büyük olan ancak ağır metal toksisitesi içermeyen yapılardır. Nanokabukların optik özellikleri elektrik enerjisinin ışık enerjisine dönüşmesine dayanır. Kabuk kalınlığına ya da çekirdek çapına bağlı olarak nanokabuklar yakın Infrared bölgesini de içeren geniş bir dalga boyunun üzerindeki ışığı ya etrafa saçarlar ya da absorblarlar. Nanokabuklar fotoakustik tomografi ya da optik eş evreli tomografide görüntüleme için kontrat ajanları olarak da kullanılırlar (Loo, 2005). Nanokabukların PEG ile kaplanmasının oral biyoyoumluluk ve yarılanma süresinin artırılması ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca tümöre-özgü molekülleri hedeflemek için immünopartiküllerle konjuge edilirler (Loo, 2004). Yapılan

alışmalar nanokabukları içeren biyokonjugatların insan meme kanserindeki HER-2'leri hedeflemek ve görüntülemek için kullanılabileceğini göstermiştir (Loo, 2005).



şekil 3.3. Nanokabuklar

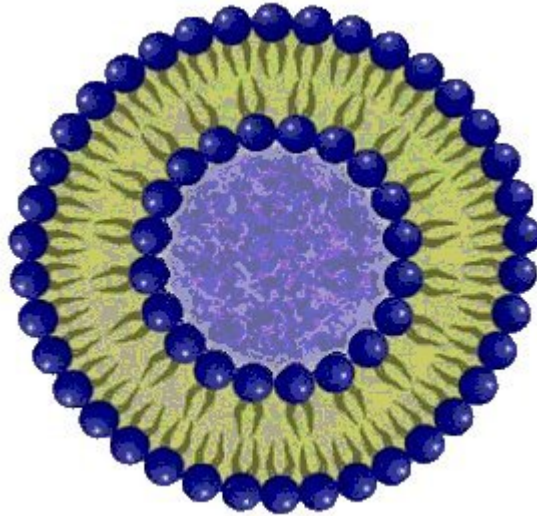
3.5. İlaçların Taşınmasında Nanopartiküller

Geleneksel olarak oral ya da parenteral yolla ilaç verilmesi değişmiş farmakokinetik parametreler ve geniş yayılım nedeniyle pek çok dezavantaja sahiptir. Ayrıca genetik polimorfizme bağlı olarak dirençliliğin gelişmesi ilaçların etkinliğinin azalmasına katkıda bulunmaktadır. Etkileşimin olması istenen bölgeye ilaç verilmesi için nano yapılar kullanılarak bu sorunun üstesinden gelinebileceği düşünülmektedir. Nano yapılara bağlı bu sistem ilacın istenen bölgede en az toksik etki ile spesifik olarak birikmesi için imkan sunmaktadır. İlaç taşınmasında kullanılan nanopartiküller lipozomları, dendrimerleri, miselleri ve karbon nanotüpleri içermektedir. Dendrimerleri, seramik nanopartikülleri ve karbon nanotüpleri içeren nano cihazlar kanser hücrelerini hedefleyebilirler. Kanser hücreleri yüzeylerinde bir monoklonal antikor veya hücre yüzey reseptör ligandı ile bağlanmış nanopartiküllerin hücre içerisine alınmasında kullanılabilecek pek çok reseptör bulundurmaktadırlar (Pison, 2006).

3.5.1. Lipozomlar

Lipozomlar lipid bilayer katmanı ile çevrili sulu bir iç kısımdan oluşan yapay fosfolipid vezikülleridir. Lipozomlar biyolojik olarak inert ve hiçbir toksik reaksiyon göstermeyen tamamen biyouyumlu yapılardır (Torchilin, 2007). Lipozomların suda çözünen ilaçlarla yüklenen içteki sıvı kısmı amfoterisin B gibi zayıf olarak absorblanan ilaçların biyolojik olarak kullanılabilirliğini arttırmak için kullanılır. Bu ilaçlar immünolojik olarak baskılanan bireylerde hayatı tehdit eden fungal enfeksiyonlara karşı kullanılırlar (Cagnoni, 2002). Benzer şekilde kanser hastalarının kemoterapisi için lipozomal doxorubicin formülasyonlarının daha az yan etki göstererek daha güçlü oldukları gösterilmiştir (Gabizon, 1997).

‘Gizli olmayan’ lipozomlar olarak isimlendirilen bu konvansiyonel lipozomlar retikulo-endotelyal sistem için yüksek afiniteye sahiptir ve kan dolaşımından hızlı bir şekilde çıkarlar. Bununla birlikte bu sorun ‘gizli’ lipozomlar ve akustik olarak aktif lipozomlar gibi lipozomların yeni formülasyonları kullanılarak giderilebilir (Fanciullino, 2005). Bu gizli lipozomlar makrofajlar tarafından hücre içerisine alınımını azaltan ve artan nüfuz ve birikme etkisi(EPR) olarak isimlendirilen bir sistem tarafından tümör hücrelerinin içerisinde konsantre olmasına izin veren PEG ile bağlanabilir (Greish, 2004). EPR etkisi tümör endotelinin artan geçirgenliği ve tümör hücrelerindeki lenfatik süzülmenin eksikliği ilişkilidir. Sonuç olarak ilacın tümörün etrafında bulunan damarlardan tümör hücresinin içerisine geçmesinde ve lenfatik süzülme eksikliğine bağlı olarak ilacın tümör hücrelerinde büyümesi artmıştır. Bu gelişmiş liposomal formülasyonların sürekli ilaç bırakım sistemleri olarak kullanılması beklenmektedir (Maeda, 2001).



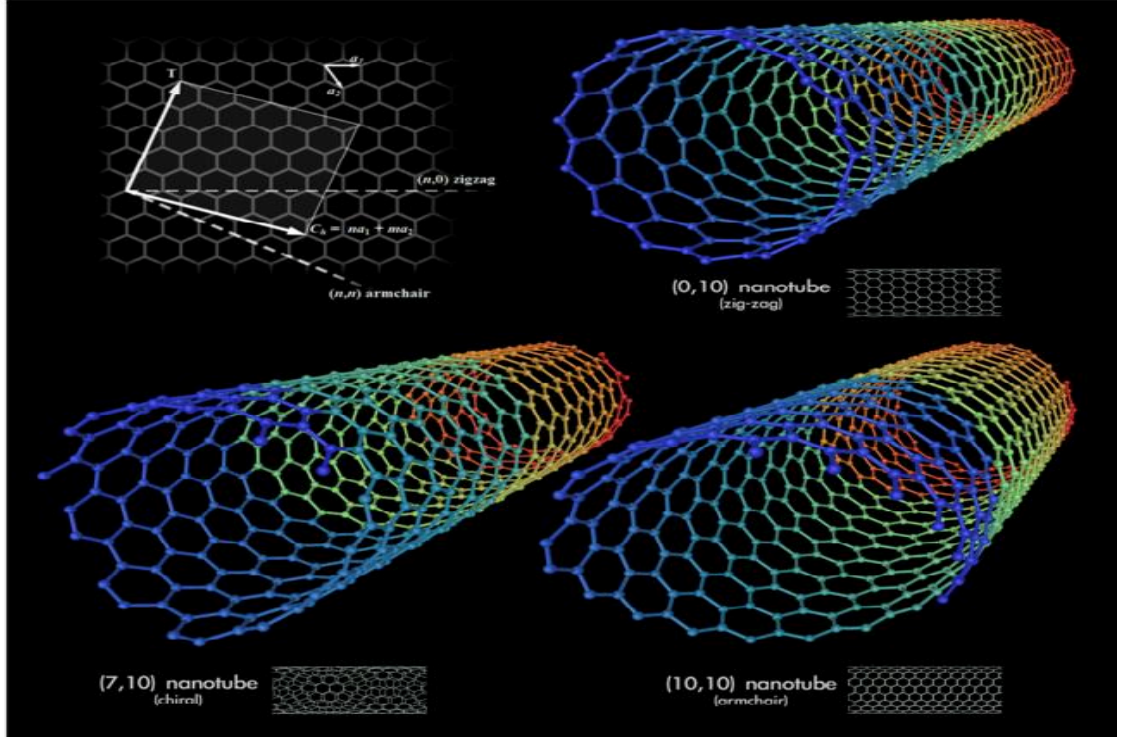
Şekil 3.4. Lipozom ve ikili fosfolipit tabaka

3.5.2. Miseller

Miseller zayıf olarak çözünen ilaçların çözünürlüğünü ve biyolojik olarak uygulanabilirliğini arttırmak için kullanılırlar. Küçük boyutlarına bağlı olarak miseller tümör hücrelerin içerisine doğrudan penetre olurlar ve EPR etkisine bağlı olarak aktivitelerini oldukça uzun süre sürdürebilirler. Yapılan çalışmalar misellerle birleştirilen adriamycin gibi antikanserojen ilaçların tümör hücrelerinde diğer hücrelere göre daha yoğun bir şekilde akümüle olduklarını göstermiştir (Yokoyama, 1999). Amerika Gıda ve İlaç Yönetimi(FDA)'nin meme kanserinin tedavisi için onayladığı Abraxane (ABI-007) paclitaxelin nanopartikül formülasyonu ile stabilize olan bir albumindir. Paclitaxel ilacı zayıf bir şekilde çözündüğü için ilacın çözünürlüğü hiper duyarlılık reaksiyonlarına neden olan misel oluşturucu cremophor ethoxylated castor oil (EL) ilavesi ile arttırılır. Abraxane'ın bulunmadığı cremophor EL 300 mg/m²/hafta doz ile verildiğinde meme kanseri hastalarında hiper duyarlılık reaksiyonlarına bağlı olarak herhangi bir infüzyon görülmemiştir (İbrahim, 2002). Benzer şekilde abraxane ve paclitaxel ile ayrı ayrı yapılan deneylerde paclitaxel verilen kanser hastalarında metataza verilen cevap oranı % 19 iken, abraxane ile birlikte bu oranın % 33'e çıktığı gözlenmiştir (Gradishar, 2005).

3.5.3. Karbon Nanotüpler

Karbon nanotüpler benzen halkalarından oluşan karbon silindirlerdir. Tüp formundaki atomların katmanlarıdır. Karbon nanotüpler farklı molekülleri ve antijenleri yüzeylerine adsorbe ederek spesifik tümör hücrelerini hedeflerler ve endositoz yoluyla hücre içerisine girerler. Nanotüplerin arasındaki genel konfigürasyon iki çeşittir: tek duvarlı nanotüpler(SWNT) ve çok duvarlı nanotüpler(MWNT). Tek duvarlı nanotüpler yakın Infrared ışığı absorblamak için tasarlanmıştır ve in vitro olarak fototermal kesip çıkarma uygulamalarında kullanılır. Ayrıca yüksek performanslı manyetik rezonans görüntüleme kontrast ajanı olarak kullanılmak üzere paramanyetik gadolinium partikülleri ile birleştirilen SWNT'ler de geliştirilmektedir (Li, 2006). SWNT'lerin fiziksel boyutları nükleik asitlere benzemektedir ve bu nedenle gen ve ilaç taşıma sistemleri için ümit verici bir yaklaşım vaad etmektedirler. Çok duvarlı nano tüpler ise daha genişirler ve çok sayıda tek duvarlı nano tüpün bir tanesinin içerisine kümlenmesi ile oluşturulmuşlardır. Çok duvarlı nano tüpler bakteri hücrelerinin içerisinde ilaçların spesifik olarak taşınmasında kullanılırlar (Prado, 2008).



Şekil 3.5. Karbon Nanotüpler

3.6. Hastalıkların Tedavisinde Nanopartiküller

Mikrobiyolojik açıdan incelendiğinde günümüzde fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olan nano boyuttaki ilaç partiküllerinin sentezlenmesi yeni farmasötik ürünlerin geliştirilmesinde ilgi çekici bir konuyu oluşturmaktadır. Nanopartiküllerin sahip olduğu eşsiz elektriksel, kimyasal, mekanik ve optik özellikleri, yüksek yüzey alanı / hacim oranları ve oldukça küçük boyutları sayesinde etkin antimikrobiyal özellik gösterdikleri gözlemlenmiştir (Morones, 2005). Özellikle yüksek kimyasal reaktivitelerine bağlı olarak serbest radikalleri de içeren reaktif oksijen türlerin(ROS) üretiminde büyük oranda artışa neden olması nanopartiküllerin enfeksiyon yapıcı ajanları öldürme mekanizmasını oluşturmaktadır (Nel, 2006). Son yıllarda yapılan çalışmalarda en çok kullanılan nanopartiküllerden biri olan gümüş nanopartiküllerinin 650'ye yakın enfeksiyona sebebiyet veren mikroorganizma üzerinde öldürücü etkisinin olduğu düşünülmektedir. Nanopartiküllerin ve nanopartiküller tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin sülfür ve fosfor gruplarını içeren bileşikler ile güçlü bir etkileşime girdikleri bilinmektedir. Bu nedenle nanopartiküllerle muamele edilen bakteri hücresinde sülfür ve fosfor gruplarını bulunduran DNA ve yaşamsal enzimler ciddi bir şekilde zarar görür (Asharini, 2008).

Nanopartiküller öncelikle bakteri hücre membranlarını bozarak, membran geçirgenliğini kayda değer biçimde artırırlar. Daha sonra hücre içerisine giren nanopartiküller yaşamsal enzimlerin inhibisyonuna ve DNA'nın replikasyon aktivitesini yitirmesine neden olurlar. Son olarak ATP sentezinin durması ve reaktif oksijen türlerinin oluşması sonucu meydana gelen oksidatif strese etkilenen hücre apoptoza yönelir (Asharini, 2008).

Aynı etki mekanizmasıyla yani gerek Reaktif Oksijen Türlerini(ROS) oluşturmak suretiyle gerekse de hücre içerisinde bulunan komponentlerde meydana getirdikleri değişimlere bağlı olarak nanopartiküllerin çeşitli kanser hücreleri üzerinde antikanserojen etki gösterdikleri ve bu hücrelerin proliferasyonlarını inhibe ettikleri de belirlenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda özellikle metal oksit nanopartiküllerinin funguslar ve virüsler üzerinde de etkili oldukları gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalar nanopartiküllerin hastalık yapıcı etkenleri inhibe edeceğini göstermesi açısından önemlidir. Ancak nanopartiküllerin bahsedilen hücreler üzerindeki etkileri bugüne kadar yalnızca *in vitro* olarak gösterilmiştir. Bununla birlikte *in vivo* uygulamalar için nanopartiküllerin kullanılması konusunda bazı şüpheler bulunmaktadır. Nanopartiküllerin tek başlarına insan vücuduna verildiklerinde sağlıklı insan hücreleri üzerinde de toksik etki oluşturabilecekleri düşünülmektedir. Bunun önlenmesi için nanopartiküllerin polimerler ile ya da başka bileşiklerle kompozit yapılar oluşturularak insan vücuduna verilmesi hedeflenmektedir. Bu sayede nanopartiküllerin sağlıklı insan hücrelerine zarar vermeden enfeksiyon yapıcı ajanları ya da kanser hücrelerini inhibe etmesi sağlanabilecektir.

3.6.1. Metal Oksit Nanopartikülleri

Metal nanopartikülleri genellikle ilgili metalin vakum içerisinde buharlaştırılması ya da lazer ile aşındırma gibi fiziksel metotlar ya da metal tuzların indirgenmesini kapsayan kimyasal metotlar kullanılarak hazırlanmaktadır (Rao, 2000). Bunun yanı sıra polimer konjugatlarını geliştiren Sambhy ve arkadaşları gümüş bromid – polimer kompozitlerini basit bir presipitasyon basamağını kullanarak sentezlemiştir (Sambhy, 2006). Nanopartiküllerin stabilizasyonu sıklıkla sürfaktan kullanılarak yapılmaktadır. Bu sayede kolloidal partiküllerin kümeleşmeye olan eğilimleri engellenmiş olur (Xu, 2006). Chen ve arkadaşları pH değiştirilerek gümüş nanopartiküllerin şekillerinin ve renklerinin kontrol edilebileceğini bildirmiştir. Nanopartiküllerin sentezlendiği tüm

durumlarda UV-görünür absorpsiyon spektrumu nanoyapıların gelişiminin gösterilmesi ve nanopartiküllerin boyutlarının görüntülenmesi için kullanılır (Chen, 2007).

Metal nanopartiküllerinin en önemli avantajları boyutları ile kıyaslandığında oldukça geniş olan yüzey alanları ve sahip oldukları eşsiz özelliklerdir. Bunun haricinde düşük maliyetli olmaları, kullanımlarının kolay olması ve oldukça kararlı olmaları metal nanopartiküllerinin diğer avantajlarını oluşturmaktadır. Ayrıca metal nanopartiküllerinin çevreye herhangi bir toksik etki göstermemesi, bu nanopartiküllerin gereken uygulamalarda kullanımı için ideal ortamı oluşturmaktadır (Shrivastava, 2007).

Çalışma yapılan tüm metal oksit nanopartiküllerinin antimikrobiyal etki gösterdikleri bilinse de; enfeksiyon yapıcı ajanlar üzerinde en büyük etkinin çok iyi bir fotokatalist olarak bilinen titanyum dioksit ve gümüş nanopartikülleri tarafından elde edildiği gözlenmiştir.

4. TiO₂ NANOPARTİKÜLLERİ

4.1. TiO₂ Nanopartiküllerinin Genel Özellikleri

Anataz ve rutil gibi doğal minerallerden oluşmuş TiO₂ nanopartikülleri yanıcı olmayan , tatsız beyaz bir toz halinde bulunur . Mikro boyutlarda hayvanlar ve insanlar için toksik olmayan TiO₂, biyolojik olarak hareketsizdir. Yüksek oranda fotokatalitik etki gösteren TiO₂ nanopartiküllerinin üretiminin oldukça kolay ve ucuz olması, fiziksel ve kimyasal kararlılığı, ve son olarak elektronik ve optik özellikleri TiO₂' i diğer metal oksit fotokatalistlere oranla daha fazla ön plana çıkarmaktadır. Günümüzde TiO₂ boyadan yiyecek renklendiricilerine, kozmetik ürünlerden ilaçlara kadar endüstrinin pek çok alanında kullanılmaktadır. TiO₂ kozmetik alanda en sık güneş kremlerinde kullanılır. UV radyasyona karşı sahip oldukları yüksek absorpsiyon sayesinde güneş kremlerinde bulunan koruyucu faktörlerin sayısını artırır. Aynı şekilde yiyecekleri UV ışınlarından koruyup raf ömrünü uzattığı için TiO₂ yiyeceklerin paketlenmesi konusunda da önemli bir bileşendir.

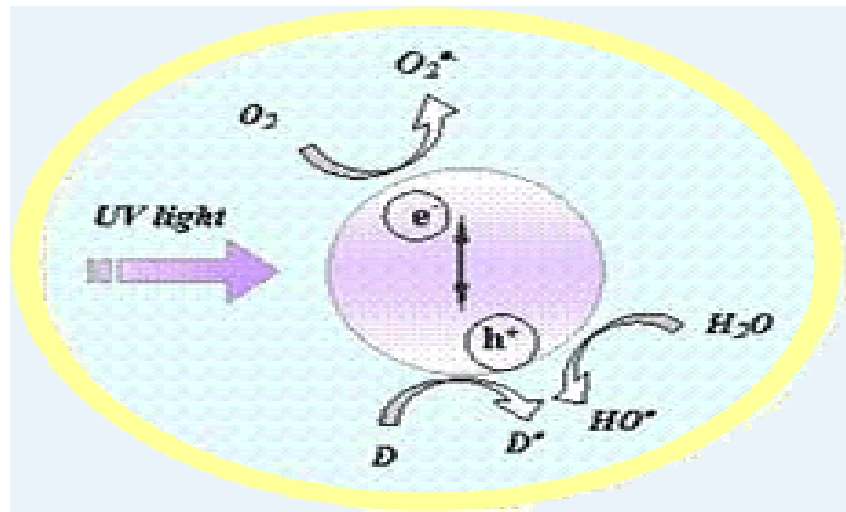
4.2. Fotokatalizm

Fotokatalizm (photocatalysis) “Bir katalist varlığı ile bir fotoreaksiyonun hızlandırılması” olarak tanımlanabilir. Fotokatalizmin bu tanımı “fotosensitizasyon (photosensitization)” prosesini de içermektedir. Fotosensitizasyon prosesi “fotosensitizör (photosensitizer) olarak adlandırılan kimyasal türün gelen radyasyonu

absorplaması sonucu başka bir türde meydana gelen fotokimyasal değişim olarak tanımlanabilir (Mills ve LeHunte, 1997). Yarıiletkenler (ZnO , TiO_2 , Fe_2O_3 , ZnS , CdS vb.), elektronik yapılarına bağlı olarak, fotokatalitik aktivite uygulamalarında sensitizer olarak davranabilirler (Hoffmann vd., 1995). Yarıiletkenler arasında TiO_2 'in anataz formu, en yüksek fotokatalitik aktivite özelliğini göstermektedir (Fujishima vd., 2000a)

4.3. TiO_2 Nanopartiküllerinin Etki Mekanizmaları

Son yıllarda tıp ve mikrobiyoloji alanında en çok kullanılan metal nanopartiküllerden birisi TiO_2 'dir. Mikro boyutlarda biyolojik açıdan inert ve non-toksik olarak bilinen TiO_2 diğer nanopartiküllerden farklı olarak UV ışımının ardından fotokatalitik özellik kazanırlar (Hesterberg, 1998). Bir yarı iletken olan TiO_2 elektronlar ile dolu bir değerlik bandı (DB)'na ve boş enerji düzeylerini içeren bir iletkenlik bandına (CB) sahiptir. Bir enerji boşluğu bu bantları birbirinden ayırır. Değerlik bandından iletkenlik bandına elektron transferi için yarı iletken tarafından absorblanan fotonun enerjisi, yarı iletkenin değerlik bandı ile iletkenlik bandı arasındaki bu boşluğun enerji değerinden büyük olmalıdır. TiO_2 nanopartiküllerinin 385 nm'den daha düşük dalga boyuna sahip olan ultraviyole ışık altında ısınlanması sonucunda elektronlar değerlik bandından iletim bandına doğru hareket ederler ve pozitif yükle yüklenmiş bir boşluk oluştururlar (Fujishima, 1999). Valens bandında oluşan boşluk yüzey tarafından emilen H_2O ve hidroksit iyonlarıyla reaksiyona girerek hidroksil radikallerini, iletim bandındaki elektronlar ise O_2 'i indirgeyerek süperoksit iyonlarını oluştururlar. Bu nanopartiküllerin fotokatalitik oksidasyonu ile birlikte hidroksil radikalleri, süper oksit radikallerinin yanı sıra hidrojen peroksit ve singlet oksijen de meydana gelmektedir (Fujishima, 1999).



Şekil 4.1. TiO_2 nanopartiküllerinden UV ışık altında serbest radikallerin oluşma prosesi

Oluşan tüm radikallerin oldukça reaktif oldukları bilinmektedir. Bu nedenle Fujishima ve Honda (1972) tarafından TiO_2 'in fotokatalitik aktivite özelliği ortaya atıldıktan sonra, dünya için ciddi bir problem haline gelen çevre kirliliği sorunlarına karşı çözüm yaratabileceği düşüncesiyle bu konu üzerinde yoğun olarak çalışılmaya başlanmıştır. Çevresel arıtma konusundaki ilk çalışma TiO_2 tozları ile su içerisindeki siyanürün parçalanması ile gerçekleştirilmiştir (Frank ve Bard, 1977). Bu tarihten günümüze kadar, nanopartiküller kullanılarak organik ve inorganik su kirlerinin arıtılması üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

UV ışık altında TiO_2 fotokatalistinin, organik maddeleri parçalama özelliğinin dışında bir başka özelliği de anti-bakteriyel etkiye sahip olmasıdır. Matsunaga vd. (1985), TiO_2 -Pt katalistlerini, UV ışık ile aktive etmek suretiyle, su içerisindeki mikrobiyal hücreleri 1 ila 2 saat arasında değişen sürelerde öldürerek bu konudaki ilk çalışmayı gerçekleştirmiştir. Bu çalışmanın ardından TiO_2 fotokatalistinin bakteriler üzerindeki etkisi üzerine pek çok çalışma yapılmış ve nanopartiküllerin etki mekanizmaları için farklı yaklaşımlar ortaya atılmıştır. Maness ve diğerleri (1999), TiO_2 yüzeyinde oluşan reaktif oksijen türlerinin, hücre membranının yapısını bozarak lipid peroksidasyon reaksiyonunu gerçekleştirdiğini ve bu sayede *E.coli* K-12 hücrelerinin ölümüne sebep olduğunu kaydetmiştir. Huang ve diğerleri (2000), fotokatalitik reaksiyonların, hücre geçirgenliğini arttırdığını ve hücre bileşenlerinin bozulan hücre membranlarından dışarıya akması sonucunda hücre ölümünün gerçekleştiğini kaydetmişlerdir. Sunada ve diğerleri (2003), TiO_2 filmlerin yüzeylerini, nispeten güçlü bir UV ışığı şiddetiyle ışınlamışlar ($1mW/cm^2$) ve *E. coli* hücrelerinin ölümünün iki basamakta gerçekleştiğini öne sürmüşlerdir. Birinci basamakta, UV ışığa maruz kalan TiO_2 film yüzeylerinde oluşan reaktif oksijen türleri ($\bullet OH$, $HO_2\bullet$, H_2O_2), *E. coli* hücresinin dıştaki membranını, kısmen parçalar. Oluşan bu radikaller hücre membranının permeabilitesini bozarlar (Sunada, 2003). Hücre membranının geçirgen hale gelmesiyle intraselüler bileşikler hücrenin dışına yönelir. Bu arada TiO_2 nanopartikülleri de hücre içine girerek halen hücrede bulunan komponentlere sıkı bir biçimde bağlanırlar ve hücrenin ölümüne öncülük ederler (Jacoby, 1998, Kimberley, 2008). O_2 'nin veya uygun elektron alıcısının yokluğunda ultraviyole ışıkla temasın ardından herhangi bir fotokatalitik oksidasyon meydana gelmez.

Zhang vd. (2003), saf TiO_2 nanopartiküllerinin ve farklı konsantrasyonlarda Ag ile kaplanmış TiO_2 numunelerinin, *Micrococcus lylae* (*M. Lylae*) bakterilerine karşı olan bakteriyel etkilerini araştırmıştır. *M. lylae*'nin UV'ye dayanıklı bir bakteri soyu

olduğunu kaydetmişler ve 1 saat boyunca 365 nm UV ışığı altında aydınlatılan bakterilerin hiçbir hücre hasarına uğramadıklarını öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte karanlıkta, ne saf TiO_2 'in ne de Ag ile kaplı TiO_2 'in, *M. lylae*'ye karşı bakteriyel etki göstermediğini kaydetmişlerdir. *E. coli* hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada da (Coleman vd., 2005), Ag/ TiO_2 fotokatalistin, karanlıkta antibakteriyel etki göstermediği kaydedilmiştir. Bununla birlikte, UV ışığı altında, Ag ile kaplı TiO_2 'in, TiO_2 'e göre, çok daha fazla miktarda anti-bakteriyel etki gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

UV ışığın insan doku ve hücreleri üzerinde zararlı oldukları dikkate alınarak, TiO_2 nanopartiküllerinin ışık absorpsiyon aralığını görünür aralığa çekebilmek için günümüzde çok sayıda çalışma yürütülmektedir. Bu çalışmalar soy metallerin depozisyonunu ve metal iyonlarının TiO_2 kafesinin içerisine doplanmasını içerir.

Machida vd. (2005), medikal seramikler üzerlerini TiO_2 filmler ile kaplamış, bu filmlerin üzerlerine de ışık ile biriktirme yöntemini kullanarak Ag iyonlarını uygulamışlardır. *E. coli* (IFO 3301) bakterileri TiO_2/Ag filmlerinin yüzeylerine ekildikten sonra kaplamalar beyaz floresan lamba (0.02 mW/cm²) ile aydınlatılmıştır. Machida vd. (2005), TiO_2/Ag filmlerinin kalınlığının ve ışık yardımı ile yüzeyde biriktirilen Ag miktarının artması ile birlikte filmlerin anti-bakteriyel aktivitelerinin de arttığını tespit etmiştir. TiO_2/Ag filmlerinin, anataz ve rutil fazlarını birlikte içerdikleri ve sinterleme sıcaklığının artmasına bağlı olarak film içerisindeki rutil miktarının da arttığı kaydedilmiştir. Artan sinterleme sıcaklığı ile filmdeki anataz miktarının azalmasının anti-bakteriyel aktiviteyi azalttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, filmlerdeki anataz miktarının antibakteriyel aktiviteyi güçlü bir biçimde etkilediği vurgulanmıştır (Machida, 2005).

Işık absorpsiyonunu görünür ışık aralığına uzatmak için son yıllarda kullanılmaya başlanan bir başka yöntem de geçiş iyonları ile doplama yapmaktır. Bu tarz metaller ile doplama sayesinde sub-band boşluk enerjisinde görünür ışığın absorpsiyonunu indükleyen yalıtım ve valens bandlarının hemen yakınında intra-band boşluğu oluşur. Doplanmış maddeler yük değiş tokuşunu inhibe ederek fotokatalitik aktiviteyi artırır. Hsin-Hou Chang ve arkadaşları 2008 yılında yapmış oldukları çalışmalarda bu yaklaşımı kullanarak karbon içeren TiO_2 nanopartiküllerinin görünür ışık altında da fotokatalitik etki gösterdiklerini bulmuşlardır. 150 ° C ve 200 ° C' de toz haline getirilmiş karbon içeren TiO_2 partiküllerinin görünür ışık altında, ticari olarak satılan ve

UV ışık altında aktif hale gelen TiO_2 nanopartiküllerinden çok daha fazla antimikrobiyal özellik gösterdikleri gösterilmiştir.

Günümüze kadar gelen süreçte TiO_2 nanopartiküllerinin fotokatalitik etkilerinin kanser hücreleri üzerinde de görüldüğünü gösteren çalışmalar da yapılmıştır (Xu, 1998). TiO_2 nanopartiküllerinin tek başlarına ve UV ışıma ile birlikte Ls-174-t insan kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkileri incelendiğinde tek başına TiO_2 'in ve tek başına UV ışımının hücreler üzerinde benzer etkiler gösterdikleri ve ikisinin birden ayrı ayrı 30 dakikalık muamelenin ardından çok az miktarda kanser hücresinin(% 20) ölümüne neden olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık aynı süre boyunca UV ışıma ile aktiveleştirilen TiO_2 nanopartiküllerinin ise kanser hücrelerinin %80'inden daha fazlasının ölümüne yol açtığı keşfedilmiştir (Zhang, 2004). Bu sonuçlar ışınlamanın ardından TiO_2 nanopartiküllerinin ne denli toksik özellik gösterdiklerini göz önüne sermektedir.

Aynı şekilde Juan Xu ve arkadaşları TiO_2 nanopartikülleri ile hücreye spesifik antikorların oluşturduğu biyokonjugatların UV ışınlamanın ardından LoVo kanser hücreleri ve TE353.Sk normal hücreleri üzerindeki etkisini incelemiştir. Yapılan çalışma sonucunda LoVo kanser hücreleri için spesifik olan antikorların TiO_2 nanopartikülleri ile yaptıkları konjugatların kanser hücrelerinin sayısını ciddi oranda azalttığı ancak normal hücreler üzerinde bu denli etkin olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışma TiO_2 nanopartiküllerinin belirli antikorlar ile hedefleme yapılarak çevresindeki hücrelere en az zararı verecek şekilde çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılabileceğini göstermesi açısından önemlidir (Xu, 2007).

5. GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİ

5.1. Gümüş Nanopartiküllerin Genel Özellikleri

Gümüş antik çağlardan beri yanıkların ve kronik yaraların tedavisi için kullanılmaktadır. Gümüşün, gümüş iyonlarının ve gümüş içeren bileşiklerin antibakteriyal ve antiviral davranışları da uzun zamandır araştırılmaktadır (Takumaru, 1984, Oka, 1994, Oloffs, 1994) . Epidemiyolojik tarihine bakıldığı zaman normal kullanımda gümüşün insanlar için toksik olmayan özellikler içerdiği gözlenmektedir. Metalik gümüşün neden olduğu katalitik oksidasyon ve çözünmeyen tek değerlikli gümüş iyonu ile reaksiyonun bakterisidal etkilerine katkıda bulundukları düşünülmektedir (James, 1971). 1700'lü yıllarda cinsel yolla bulaşan hastalıkların, çıbanların ve kemik veya vücudun başka bölgelerinde oluşan abselerin tedavisinde gümüş nitrat kullanılmıştır (Klasen, 2000). 19.

yüzyılda epitel dokuların oluşması ve yara bölgelerinde kabuk oluşturulması için dokuların içerisinde anormal bir şekilde meydana gelmiş olan ufak kitlelerin ortadan kaldırılmasında gümüş nitrat kullanılmıştır. Taze yaraların tedavi edilmesi için gümüş nitratin farklı konsantrasyonları denenmiştir. 1881’de Carl S.F. Crede gümüş nitrat içeren göz damlalarını kullanarak göz iltihaplanmasını tedavi etmiştir (Klasen, 2000, Landsdown, 2002). 1940’lı yıllarda tıp dünyasının penisilin ile tanışmasının ardından bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için gümüşün kullanımı oldukça azalmıştır (Hugo ve Russell, 1982; Demling ve DeSanti, 2001; Chopra, 2007). Ancak 1960’lı yıllarda Moyer’ in yanıkların tedavisi için %0.5’lik gümüş nitrat solüsyonunu sunmasının ardından gümüş tekrardan gündeme geldi. Moyer bu solüsyonun epidermal proliferasyona engel olduğunu ve *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*’e karşı antibakteriyel özelliğe sahip olduğunu önerdi (Moyer, 1965). 1968 yılında gümüş nitrat sülfanomid ile birleştirildi ve gümüş sülfadazin kremleri oluşturuldu. Bu kremlerin geniş bir aralıkta antibakteriyel ajanlar olarak görev yaptığı ve yanıkların tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Gümüş sülfadazin *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.* gibi bakterilere karşı etkindir.

Ancak son zamanlarda mikroplar geleneksel antibiyotik uygulamalarına direnç gösterdikleri gibi gümüş bileşiklerine karşı da direnç göstermeye başlamışlardır. Gümüşe karşı oluşturulan bu direncin nedeni, metalin organizma içerisinde geniş aralıklı bir hedef grubuna saldırması sonucunda bakterilerin kendilerini koruyabilmesi için mikroorganizmada spontan mutasyonların meydana gelmesidir (Gemmell, 2006 ; Chopra, 2007). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda gümüş nanopartiküllerinin tek başlarına veya bir kompozit içerisindeki antimikrobiyal davranışları hususunda ümit verici sonuçlar rapor edilmiştir (Sondi, 2004 ; Li, 2005).

5.2. Gümüş Nanopartikülleri ve Etki Mekanizmaları

Sondi ve arkadaşları (2004) ilk kez olarak gümüş nanopartiküllerinin bir gram bakteri modeli olan *E.coli*’ye karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini rapor etmiştir. SEM’den alınan görüntülerde gümüş nanopartiküllerini içeren agregatların oluşumu ve ölü bakteri hücreleri gözlenmiştir. Ayrıca gümüş nanopartiküllerinin bakteri membranının yapısal elemanlarıyla etkileşime girdiği ve hücrelere zarar verdiği de gözlenmiştir. Transmission elektron mikroskobu (TEM) analizleri de hücre yüzeyinde girinti çıkıntıların oluşmasına bağlı olarak nanopartiküllerinin hücre içerisine dahil olduğunu doğrulamıştır (Sondi, 2004). Butkus ve arkadaşları UV ışınlamanın herhangi bir etki göstermediği bir RNA

virüsü üzerinde gümüş iyonlarının ve UV ışınlamanın sinerjistik etkisini araştırmıştır. Gümüş iyonlarının UV ışığın etkinliğini arttırdığı gözlenmiştir. Bu artan ışınlama etkisinin ayrıca poliovirüs, norovirüs ve enterik adeno gibi patojenik virüslerin inaktivasyonunda kullanılabileceği düşünülmektedir (Butkus, 2004) .

Morones ve arkadaşları gümüş nanopartiküllerinin 1 ila 100 nm aralığında değişen boyutlarının Gram negatif bakteriler üzerindeki etkilerini Yüksek Açılı Dairesel Karanlık Alan Mikroskobu(HAADF) veya TEM kullanarak araştırmıştır. Nanopartiküllerin karakterizasyonu TEM aracılığıyla yapılmıştır. Gümüş nanopartiküllerinin bakterilerle olan etkileşimini araştırabilmek için gümüş nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarını içeren (0,25,50,75,100 µg/ml) Luria Bertoni (LB) besiyerleri hazırlanmıştır ve 10 µl bakteri kültürü bu besiyerlerinin içerisine inoküle edilmiştir. TEM analizi nanopartiküllerin boyut aralığının 16 nm olduğunu göstermiştir. Gümüşün farklı konsantrasyonlarının bakterilerin büyümesi üzerine etkisi incelendiğinde 75 µg/ml' in üzerindeki konsantrasyonlarda herhangi bir bakteri üremesi gözlenmemiştir. Taramalı Transmisyon Elektron Mikroskobu (TTEM) analizi de hücre membranının içinde ve bakteri içerisinde gümüşün varlığını doğrulamıştır. HAADF görüntüleri de küçük boyuttaki nanopartiküllerin (yaklaşık 5 nm) etkin bir biçimde antibakteriyal özellik gösterdiklerini bu nedenle de gümüş nanopartiküllerin aktivitesinin boyuta bağlı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Morones, 2005). Gümüş nanopartiküllerinin etki mekanizmasının 3 aşamalı olduğu tahmin edilmektedir. Birinci aşamada bakteri hücreleri ile etkileşim halinde olan gümüş nanopartikülleri hücre içine girerek bakterinin yaşamı için oldukça önemli olan solunum ve permeabilite gibi fonksiyonları bozarlar. Zayıf asit özellikteki gümüşün R-S-R, R-SH, RS-, PR3 gibi kükürt ve fosfor içeren zayıf bazlarla yüksek oranda reaksiyona girme eğilimi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle membrandaki ve hücre içerisindeki sülfür içeren proteinler ve fosfor içeren DNA gibi elementler gümüş nanopartiküllerinin bağlanması için öncelikli bölgeleri oluşturmaktadır (McDonnell, 1999). Bu sebeplerden ötürü ikinci aşama olarak nanopartiküller DNA ve proteinlere bağlanarak onların da yapılarını bozarlar. Son aşamada ise nanopartiküller gümüş iyonlarını serbest bırakarak ve reaktif oksijen türlerini oluşturarak hücre ölümüne katkıda bulunurlar. Membran morfolojisinin bozulmasıyla membran geçirgenliğinin artması kontrolsüz transporta ve ardından hücre ölümüne neden olmaktadır (Sondi, 2004). Ayrıca bir grup araştırmacı gümüş nanopartiküllerinin bakterilerde sinyal iletimini bozduğunu ve bu sayede hücre

büyümesini inhibe ederek bakteriyal ölüme öncülük ettiğini rapor etmişlerdir (Deutscher, 2005 ; Kirstein, 2005) .

Panacek ve arkadaşları gümüş nanopartiküllerinin metisiline dirençli *S.aureus* gibi çoklu dirençli suşları da içeren Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı yüksek miktarda antimikrobiyal ve bakterisidal etki gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Nanopartiküllerin antibakteriyal aktivitelerinin boyuta bağlı olduğu ve 25 nm boyutundaki nanopartiküllerin en yüksek antibakteriyal etkiyi gösterdikleri keşfedilmiştir (Panacek, 2006). Shahverdi ve arkadaşları gümüş nanopartiküllerinin antibiyotiklerle birlikte etkilerini incelemiştir. Gümüş nanopartikülleri *Klebsiella pneumoniae* kullanılarak sentezlenir ve *S. aureus* ve *E. coli*' e karşı antimikrobiyal etkileri hesaplanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda penisilin G, amoksisilin, eritromisin, klindamisin ve vankomisin gibi antibiyotiklerin *S. aureus* ve *E. coli*'e karşı antibakteriyal aktivitelerinin gümüş nanopartiküllerinin varlığında arttığı gözlenmiştir. En yüksek sinerjistik etkinin *S.aureus*'a karşı eritromisin tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir (Shahverdi, 2007).

Elechiguerra ve arkadaşları gümüş nanopartiküllerin boyutlarına bağlı olarak HIV (human immunodeficiency virus) tip I virüsünün gp120 glikoprotein başlıklarıyla etkileşim içine girdiklerini bulmuşlardır. Texas, Austin ve Mexico Üniversitelerinin birlikte yürüttüğü çalışmada nanopartiküllerin virüslerle etkileşiminin virüslerin konak hücrelere bağlanmasını engellediği anlaşılmıştır. Nano granüller virüslerle hemen hemen aynı çapa sahiptir. Hatta bazen virüslerden bile daha küçük olabilirler. Bu yönleriyle virüsün içine girip replikasyonlarını durdurma özelliğine sahiptirler. Nanopartiküllerin geniş yüzey alanına sahip olması nedeniyle büyük bir adsorblama özelliğine de sahiptirler. Bu özelliklerini kullanarak virüsleri, metabolik ürünleri ve duplikasyonu sağlayan bölgeleri adsorbe ederler (Elechiguerra, 2005). Ayrıca literatürde nanopartiküllerin hepatit B virüsleri üzerindeki etkilerinin anlatıldığı yayınlar da bulunmaktadır (Lu, 2008).

6. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

6.1. Süper Oksit Radikalleri

Süperoksit radikalleri ($O_2^{\cdot-}$), hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının otooksidasyonu ile üretilmektedirler. Süperoksit oluşumu; ortamdaki oksijen derişimine ve elektron taşıyıcısının redoks durumuna bağlıdır. Zayıf bir oksidan olan süperoksit radikalının

kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Ancak süperoksit radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyon başlatabilir. Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyonda O_2 ve H_2O_2 demir varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan $HO^\bullet$ radikallerini oluşturmaktadır. Üretilen bu $OH^\bullet$ radikalleri oldukça reaktif olup DNA gibi yapılarla reaksiyonlara girerek önemli hasarlara yol açabilmektedir. $O_2^\bullet$ radikalleri, hücre içi demir depolarından demiri serbest hale getirir. Serbest hale geçen demir iyonu Haber-Weiss gibi radikal üreten reaksiyonlarda veya diğer serbest radikal aracılıklı hücre hasarında rol oynayabilir. Superoksit radikalleri çok kısa bir yarı ömre sahip olup dismutasyon reaksiyonu ile H_2O_2 ve oksijen üretirler. Dismutasyon reaksiyonu spontan olarak meydana gelmekte ve reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile katalizlenmektedir.

6.2. Hidrojen Radikalleri

Hidroksil radikalının ($HO^\bullet$), biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikal olduğu bildirilmiştir. Dokular radyasyona maruz kaldıklarında, enerjinin çoğu hücre içindeki su tarafından absorblanır ve radyasyon oksijen-hidrojen arasında kovalent bağa neden olur. Sonuçta iki farklı radikal meydana gelir. Bu radikallerden biri hidrojen ($H^\bullet$) ve diğeri ise hidroksil radikalidir ($OH^\bullet$).

Hidrojen peroksitin (H_2O_2) Fe^{+2} veya Cu^{+2} ile reaksiyona girmesiyle de $OH^\bullet$ oluşmaktadır. H_2O_2 toksisitesinin büyük çoğunluğunun temelinde bu oluşan $OH^\bullet$ olduğu düşünülmektedir. Bu reaksiyon ilk defa 1894 yılında Fenton tarafından gözlenmiş ve günümüzde de Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir.

$OH^\bullet$ radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücresel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. $OH^\bullet$ Radikalının DNA da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve bu oluşan ürünlerin bazılarının mutajenik oldukları görülmüştür. Yine $OH^\bullet$ radikalleri aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiklerinden DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşumuna neden olurlar. Örneğin: Timine katılarak timin radikalini oluşturur ve bu radikal oksijenle reaksiyona girerek son derece reaktif olan timin peroksil-radikaline dönüşmektedir. Bu gibi bir dizi reaksiyona katılabilen $OH^\bullet$ Radikali DNA'nın baz ve şekerlerinde ciddi hasarlar oluşturarak DNA iplik kırılmalarına neden olurlar. Hasar çok kapsamlı olursa hücrel

koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelir. Bu radikaller DNA'nın pürin ve pirimidin bazıları ile etkileşmenin yanı sıra tiyol grubu içeren biyolojik moleküllerden H atomu da koparabilmektedir.

Sonuçta oluşan sülfür radikalleri ilginç kimyasal özelliklere sahiptir. Sülfür radikalleri, O_2 ile kombine olabilir ve oksı-sülfür radikallerini oluşturur. Bu radikaller biyolojik moleküllerde hasara neden olurlar. $OH^\bullet$ 'ın sebep olduğu en iyi karakterize edilmiş olan biyolojik hasar lipid peroksidasyon olayıdır. $OH^\bullet$ membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerine hücum eder. Bu özellikle arasıdonik asit gibi doymamış yağ asit yan zincirlerinden -C atomunun birinden H atomunun çıkartılması ve su oluşumu şeklinde gerçekleşir

Bu reaksiyon sonunda membranda - C - radikali kalır. Bu - C - radikali oksijen ile kombine olarak peroksil radikalini oluşturur.

6.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Leishmania Parazitlerinin Üzerindeki Etkisi

Yapılan pek çok araştırmada Leishmania parazitlerinin reaktif oksijen türlerine karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir. Örneğin Channon ve Blackwell (1985) H_2O_2 'nin parazitin hem promastigot hem de amastigot formları üzerinde öldürücü etkisinin olduğunu göstermiştir. Promastigotların fagositoz sırasında H_2O_2 'ye maruz kaldıklarında ya da H_2O_2 ekzogenik olarak in vitro ortama eklendiğinde ölebilecekleri anlaşılmıştır. Mauell ve arkadaşları antiparazitik ajanlar veya makrofajlar tarafından üretilen H_2O_2 'yi de içeren reaktif oksijen türlerinin intraselüler parazitleri öldürebileceğini ve bu nedenle protozoal enfeksiyonların önemli bir regülatörü olduğunu keşfetmişlerdir.

Basu ve arkadaşları (2006) reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve nitrik oksit (NO) iki temel mikrobiosidal molekül olduğunu göz önünde bulundurarak, leishmaniasis tedavisinde en çok kullanılan ilaçlardan biri olan sodyum antimon glukonat'ın (SAG) antileishmanial etkisinin bu iki serbest radikal türüne bağlı olup olmadığını araştırmıştır. 24 saatlik inkübasyonun ardından enfekte edilmiş ancak SAG ile muamele edilmemiş Mφs hücrelerine göre SAG ile muamele edilmiş Mφs hücrelerinde amastigot sayısında azalma görülmüştür.

In vitro pentavalent antimon tedavisi insan polimorfonükleer hücrelerinde ROS oluşumunu indüklediği için Basu ve arkadaşları SAG ile muamelenin enfekte olmuş ve olmamış Mφs hücrelerinde ROS oluşumunu indükleme kabiliyetini araştırmışlardır. Enfekte olmayan hücrelerde SAG ile muamelenin ardından ROS üretiminin 3 saat boyunca arttığı daha sonra ise kademeli bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Aynı şekilde aynı zaman aralığında NO miktarında da kayda değer bir artış görülmüştür. Aynı şekilde enfekte edilmiş Mφs hücrelerinde enfekte olmamış hücrelerle kıyaslanır şekilde erken dönemde ROS ve daha sonraki dönemde NO üretimi görüldü. Ayrıca enfekte edilmiş hücreler ROS'nin inhibitörü olan Nac ile muamele edildiğinde ROS üretiminin en yüksek olduğu muamelenin 6.saatinde L.donovani parazitlerinde SAG'a bağlı hücre içi parazitlerin ölümünün inhibe olduğu gözlenmiştir. Bu durum L.donovani'nin ROS türlerine karşı duyarlı olduğunu göstermektedir.

7. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

7.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

7.1.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Deneyisel çalışmalarda aşağıdaki cihazlar kullanılmıştır:

- Laminar-hava akıslı kabin
- Soğutmalı Etüv (Friocell)
- İnkübatör (37 °C %5 CO₂)
- Ters mikroskop
- ELISA reader
- Magnetik karıştırıcı (Heidolp MR 3001)
- pH metre (İnolab WTW level 1)
- Hassas terazi (Precisa XB 220A)
- Kaba terazi (Precisa BJ 6100D)
- Santrifüj (Hettich Zentrifugen-EBA20)
- Vorteks (Heidolp REAX top)
- Bidistile su cihazı
- Buzdolabı
- - 45°C derin dondurucu
- Sıvı azot tankı
- Otoklav
- Flow Sitometri (Beckman Coulter- Cell Lab Quanta)
- Sonikatör
- Atomik Force Mikroskobu (Shimadzu, SPM-9600)

7.1.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

Çizelge 7.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

MADDE ADI	ÜRETİCİ FİRMA	KATALOG NO
Sodyum hidroksit	Riedel De Haen	062303
Hidroklorik asit	Merck	100314
RPMI 1640 with L glutamin	Biological Industries	01-100-1B
L-glutamin	Biological Industries	03-020-IC
Penisilin streptomisin	Biological Industries	03-031-IC
Gentamicin	Sigma	G1397
Fetal sığır serumu	Seromed	S0115
Tripsin EDTA	Biological Industries	03-051-5B
DMSO	Sigma	D26650
Sodyum klorür	Atabay	AT091-950
Potasyum klorür	Carlo Erba	360107
Disodyum hidrojen fosfat	Riedel De Haen	81890
Potasyum dihidrojen fosfat	Riedel De Haen	8210A
Tripsin	Biochrom	L2103
EDTA	Merck	1132780
Thiazoly blue tetrazolium bromide (MTT)	Sigma	M5655-1G
Formaldehit (%37)	Applichem	A0877
2-propanol	Applichem	A03928
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck	S95310-811
Annexin-V	Invitrogen	A1310
7-AAD	Invitrogen	527016A

7.1.3. Çözeltilerin Hazırlanması

7.1.3.1. PBS Tampon Hazırlanması

PBS çözeltisinin hazırlanması için 8 g NaCl, 1,44 gr Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl tozları tartılarak erlenin içerisine aktarıldı. Daha sonra erlenin içine 500 ml. distile

su döküldü ve tuzlar çözünene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Tuzlar tam olarak çözündükten sonra solüsyon cam şişelere aktarıldı ve bu şişeler 121 ° C’de 1 atm basınç altında otoklav cihazında 20 dakika sterilize edildi.

7.1.3.2. 1X Tripsin solusyonu

Hassas terazide 62,5 mg tripsin tartıldı ve üzerine daha önce steril edilen 50 ml’lik 1x PBS eklenerek çözünmesi sağlandı. Daha sonra ise önce 0,45’lik ve ardından 0,22’lik filtreler kullanılarak tripsin solusyonu steril edildi.

7.1.3.3. RPMI 1640 Medyumun Hazırlanması

500 ml’lik RPMI 1640 besiyerinin içerisine 5 ml L-glutamin ve 0.5 ml Gentamisin eklenir. Leishmania parazitlerinin kültürü yapılırken stok besiyerinden 45 ml alınarak 50 ml’lik Falcon tüplere aktarılır. Ardından 5 ml Fetal Dana Serum (FDS) Falcon tüplerde bulunan besiyerinin içerisine ilave edilir ve böylelikle % 10 FDS içeren besiyeri hazırlanmış olur. Daha sonra besiyerinin pH’ı ölçülür ve eğer istenen düzeyde değilse 100 ml HEPES tamponu ilave edilerek pH istenen düzeye getirilir.

7.1.3.4. Hücre Dondurma Medyumunun Hazırlanması

1,5 ml’lik eppendorf tüplerinin içerisine steril olacak şekilde 0.8 ml FBS ve 0.2 ml DMSO eklenerek hazırlanır.

7.1.3.5. MTT Solüsyonunun Hazırlanması

Toz halinde bulunan MTT’ den 10 mg/ml’ lik solüsyon hazırlanır. Örneğin 10 ml’lik bir solüsyonu için 100 mg MTT tozu hassas terazide tartılır ve üzerine 10 ml steril PBS eklenir. Daha sonra MTT tozunun PBS içerisinde tam olarak çözünmesi için solüsyon 1-2 dakika vortekslenir. Ardından solüsyon önce 0,45’lik ve daha sonra 0,22’lik filtrelerden geçirilerek steril hale getirilir.

7.1.3.6. TiO₂ Nanopartiküllerini İçeren Çözeltinin Hazırlanması

Toz halinde bulunan TiO₂ nanopartikülleri Sayın Doç. Dr. Cengiz Kaya tarafından temin edilmiştir. TiO₂ nanopartiküllerinin 1 mg/ml’ lik solüsyonu hazırlanır. TiO₂ tozundan 0,01 gr tartılarak boş bir penisilin şişesinin içerisine konur. Ardından şişenin içerisine 10 ml distile su ilave edilir. Daha sonra solüsyon 1-2 dakika vortekslenir. Solüsyon içindeki agregatların parçalanması ve TiO₂ nanopartiküllerinin ortaya çıkması için solüsyon 30 dakika sonikatörde bekletilir. Sonikasyon işleminin ardından TiO₂

nanopartiküllerini içeren solüsyon 121 ° C' de 1,1 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Her kullanımdan önce TiO₂ nanopartiküllerini içeren solüsyon 1-2 dakika vortekslenir.

7.1.3.7. Gümüş Nanopartiküllerini İçeren Çözeltinin Hazırlanması

Toz halinde bulunan TiO₂ nanopartikülleri Sayın Doç. Dr. Cengiz Kaya tarafından temin edilmiştir. TiO₂ nanopartiküllerinin 1 mg/ml' lik solüsyonu hazırlanır. Gümüş tozundan 0,01 gr hassas terazide tartılarak boş bir penisilin şişesinin içerisine konur. Ardından şişenin içerisine 10 ml distile su ilave edilir. Daha sonra solüsyon 1-2 dakika vortekslenir. Solüsyon içindeki agregatların parçalanması ve gümüş nanopartiküllerinin ortaya çıkması için solüsyon 30 dakika sonikatörde bekletilir. Sonikasyon işleminin ardından gümüş nanopartiküllerini içeren solüsyon 121 ° C' de 1,1 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Her kullanımdan önce gümüş nanopartiküllerini içeren solüsyon 1-2 dakika vortekslenir.

7.1.3.8. Bağlayıcı Tampon (Binding Buffer) Çözeltisi Hazırlanması

50 ml distile su içinde son konsantrasyon 10 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ ve 1.8 mM CaCl₂ olacak şekilde pH 7.4'e ayarlandıktan sonra +4°C'de saklandı.

7.1.3.9. Annexin V-FITC Solüsyonu Hazırlanması

1 mg/ml olan Annexin V stok çözeltisinden 10 µl alınıp 90 µl bağlayıcı tampona (Binding Buffer) eklenir. 100 µl çalışma solusyonundan her örnek için 10 µl kullanılır.

7.1.3.10. AAD Çalışma Solüsyonu Hazırlanması

1 mg/ml olan 7-AAD (Sigma) stok çözeltisinden 20 µl alınıp 980 µl PBS'ye eklenir. 1000 µl çalışma solusyonundan her örnek için 5 µl kullanılır.

7.2. Hücre Kültürü Teknikleri

7.2.1. MONI/Ep 39 *L.tropica* Suşu

7.2.1.1. MONI/EP39 *L. tropica* Suşlarının Kriyobanktan Çıkarılması

Kriyobanktan çıkarılan kriyotüplerin içerisinde bulunan *L.tropica* promastigotları 37 ° C'lik su banyosunda çözündürülür. Ardından çözündürülen solüsyon 7 ml RPMI 1640 besiyeri bulunduran flaska ekilir.

7.2.1.2. Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı

Parazitlerin sayımında thoma lamı kullanılır. Hareketli olan parazitlerin sayımının yapılması oldukça zordur. Bunun için parazitlerin fikse edilmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda daha rahat sayım yapılabilmesi için flastaki parazitlerin yoğunluğuna bağlı olarak parazit kültürü 1:1, 1:5 veya 1:10 oranlarında formalin ile sulandırıldı. Thoma lamının her iki bölmesine de parazitlerin fikse edilmesini sağlayan formalin ile parazit kültürünü içeren solüsyondan birer damla damlatıldı ve invert mikroskopta sayıma geçildi.

Millitredeki parazit sayısının bulunabilmesi için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Parazit sayısı} = \text{Ortalama Hücre Sayısı} \times \text{Sulandırma Katsayısı} \times \text{Thoma Lamı Sabiti}$$

Parazit sayısı : 1 ml'deki parazit sayısı

Thoma Lamındaki Ortalama Hücre Sayısı: Thoma lamının her iki bölmesindeki karelerin içerisinde bulunan parazit sayısının aritmetik ortalaması

Thoma Lamı Sabiti : 10000' dir.

7.2.1.3. Moni/Ep39 *L. Tropica* Promastigotlarının Kültürü

L.tropica parazitlerinin kültürü şekilde L-Glutamine ile zenginleştirilmiş % 10 FBS içeren RPMI 1640 besiyeri içerisinde 27 ° C'lik soğutmalı etüvde gerçekleştirilir. Parazitlerin pasajı önceki kültürden 3×10^5 promastigot/ml alınarak 7,5 ml RPMI besiyeri içeren yeni bir flaska aktarılmak suretiyle haftada bir kez yapıldı.

7.2.1.4. Moni/Ep39 *L. Tropica* Promastigotlarının Dondurulması

Kültürü yapılan parazitlerin morfolojileri, proliferasyonları ve hareketlilikleri günlük olarak invert mikroskop altında incelendi. Bu parametrelere bağlı olarak genel durumu iyi olan parazitlerin dondurma işkemi gerçekleştirildi. Bu işlem için parazit kültüründen 1,8 ml alınarak kriyotüpe aktarıldı. Ardından 0.2 ml DMSO kriyotüpün cidarından parazit hücrelerine zarar vermeyecek biçimde yavaş yavaş kriyotüpe eklendi. Kapağı iyice kapatılan kriyotüpler 1 saat 4°C'de, 24 saat -40°C'de bekletildikten sonra kriyobankın oluşturulması için sıvı azot tankına transfer edildi.

7.2.2. J774 Hücre Hattı

7.2.2.1. J774 Makrofaj Hücrelerinin Kriyobanktan Çıkarılması

Öncelikle kriyobanktan çıkarılan ve kriyotüpler içerisinde bulunan J774 makrofaj hücreleri su banyosunda 37 ° C’de hücreler çözünene kadar bekletilir. Daha sonra hücreler içerisinde 5 ml RPMI 1640 besiyeri bulunduran falcon tüplerine aktarılır ve ardından 1000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenir. Santrifüjün ardından üst fazda bulunan besiyeri uzaklaştırılır ve dipteki hücre pelletinin sayımına geçilir.

7.2.2.2. J774 Makrofaj Hücrelerinin Sayımı

J774 makrofaj hücrelerinin sayımı Tripan Mavisi boyasıyla boyandıktan sonra thoma lamı aracılığıyla yapılır. Öncelikle 1,5 ml’lik eppendorf tüplerinin içerisine 50 µl Tripan Mavisi eklenir. Daha sonra ise boyanın üzerine 48 µl RPMI 1640 besiyeri ilave edilir. En son aşamada ise santrifüjün ardından dibe çöken yaklaşık 250 µl’lik hücre pelletinden 2 µl alınarak Tripan Mavisi + besiyeri karışımının içerisine eklenir. Böylece hücreler 50 kat sulandırılmış olur. Daha sonra iyice bir pipetaj yapılarak hücre + boya süspansiyonundan birer damla thoma lamına aktarılır ve invert mikroskop altında sayım gerçekleştirilir.

$$\text{Hücre Sayısı} = \frac{\text{Ortalama Hücre Sayısı} \times \text{Sulandırma Katsayısı} \times \text{Thoma Lamı Sabiti}}{4}$$

Hücre Sayısı : 1 ml’de bulunan J774 makrofaj hücre sayısı

Ortalama Hücre Sayısı : Thoma lamının iki bölmesinde de bulunan toplam 16 adet karenin içerisindeki hücre sayılarının aritmetik ortalaması

Thoma Lamı Sabiti : 10000’dir.

Hücre sayımı 250 µl’ lik hücre pelletinden yapıldığı için 1 ml’deki hücre sayısını bulabilmek için Thoma lamındaki ortalama hücre sayısının sulandırma katsayısı ve thoma lamı sabiti ile çarpımı 4’e bölünür.

7.2.2.3. J774 Makrofaj Hücrelerinin Kültürünün Yapılması

Sayım işleminin ardından 5 ml RPMI 1640 besiyeri bulunan flaskın içerisine 5×10^5 /ml miktarında makrofaj hücresi ilave edilir ve flask 37°C 'lik etüvde kapağı yarı açık bir biçimde inkübasyona bırakılır. J774 makrofaj hücrelerinin pasajı haftada bir kez gerçekleştirilir. Yeterince çoğalan ve flask yüzeyini kaplayan hücrelerin pasajı yapılır. Pasaj sırasında öncelikle flastaki besiyeri dökülür ve flaskın yüzeyine tutunmuş halde bulunan hücreler pastör pipetleri kullanılarak 1,0 -1,5 ml PBS ile iki-üç kez yıkanır. Daha sonra hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması için hücrelerin üzerine 2 ml kadar Tripsin-EDTA ilave edildi ve 37°C 'de 5 dakika inkübe edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları invert mikroskop yardımıyla tespit edildikten sonra hücreler 7 ml kadar RPMI 1640 besiyeri ile yıkanır ve ardından 15 ml'lik falcon tüplere aktarılır. Daha sonra bu falcon tüpler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir. Santrifüjün ardından üst fazda bulunan besiyeri uzaklaştırılır ve dipteki hücre pelletinin sayımına geçilir. Sayımın ardından 5×10^5 makrofaj hücresi flask içerisinde bulunan 5 ml RPMI 1640 besiyeri üzerine aktarılır. Ardından flasklar 37°C 'de inkübasyona bırakılır. Flasklara ekimi yapılmayan hücreler ise kriyoprezervasyon yapılarak kriyobanka konuldu.

7.2.2.5. J774 Hücrelerinin Kriyoprezervasyonu

Kriyoprezervasyonu yapılacak hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması ve santrifüjün ardından geriye kalan 250 μl hücre pelleti 1:1 oranında %20 DMSO içeren dondurma solusyonu ile karıştırılarak kriyotüplere aktarılır. Daha sonra kriyotüpler $+4^\circ\text{C}$ ' de 1 saat, -20°C ' de 2 saat kaldıktan sonra, -40°C derin dondurucuda 24 saat bekletildi, kriyobankın oluşturulması için sıvı nitrojen tankına konuldu.

7.3. TiO_2 Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

TiO_2 nanopartiküllerinin boyutlarının ölçümü Atomik Force Mikroskopta (AFM) gerçekleştirildi. Öncelikle stok TiO_2 solüsyonundan 1/100 oranında seyreltme yapıldı. Daha sonra seyreltme yapılan solüsyondan 2 μl "mica" üzerine damlatıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu sürenin ardından oda sıcaklığında ultra saf su kullanılarak yıkama yapıldı ve örnek kurumaya bırakıldı. Örnek kuruduktan sonra tarayıcının olduğu bölgeye yerleştirildi. Boyut ölçümleri "Phase Mode" da elde edildi. Cantilevel (Nanoworld, NCHR-10) kullanılarak yükseklik sinyaline ait görüntüler elde edildi.

7.4. TiO₂ Nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Proliferasyonuna ve Enfektifliğine Etkisi

7.4.1. TiO₂ Nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisi

TiO₂ nanopartiküllerinin Leishmania promastigotlarının proliferasyonu üzerindeki etkisi yapılan parazit sayımları ve hücre canlılık testi (MTT) ile belirlenmiştir.

7.4.1.1. TiO₂ Nanopartiküllerinin Farklı Ortam Koşullarında (Karanlık ve UV Işık) Leishmania Promastigotları Üzerindeki Etkisinin Tayini

Bu deneyde TiO₂ nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının karanlıkta ve UV ışık altında Leishmania promastigotları üzerindeki etkisi incelendi. 8 adet 2 ml'lik deney tüpünün her birisine başlangıç miktarı olarak $1,0 \times 10^5$ /ml *L.tropica* promastigotları ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyonun ardından tüplerden 2 tanesi 25 µg/ml, 2 tanesi 50 µg/ml ve 2 tanesi de 100 µg/ml TiO₂ nanopartiküllerini içeren solüsyona maruz bırakıldı. Geriye kalan iki tüp ise herhangi bir nanopartikül muamelesine maruz bırakılmayarak kontrol grubu olarak kullanıldı. Ardından kontrol grubu ve 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda nanopartiküllere maruz bırakılan ikişer tüpten birer tanesi 15 dakikalık süreyle UV ışığa maruz bırakılmıştır. Geride kalan tüpler ise aynı süreyle karanlık ortamda bekletilmiştir. 15 dakikanın ardından bütün tüpler bir araya getirilmiş ve 27 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. TiO₂ nanopartiküllerine maruz bırakıldıktan sonra inkübasyonun 48. ve 96. saatinde tüpler de bulunan promastigotlar hemositometre yardımıyla sayılmıştır. Böylece TiO₂ nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının karanlık ve UV ışıklı ortamda *L.tropica* promastigotları üzerindeki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

7.4.1.2. Farklı Sürelerde UV Işığa Maruz Kalan Sabit Konsantrasyondaki TiO₂ Nanopartiküllerinin *L.tropica* Promastigotları Üzerindeki Etkisinin Tayini

Bu deneyde karanlık ortam koşullarında bekletilen ve farklı sürelerde UV ışığa maruz bırakılan TiO₂ nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının proliferasyonu üzerine olan etkisi incelendi. Bu amaç doğrultusunda 8 adet 2ml'lik deney tüpünün her birisinin içerisine 1×10^5 / ml *L.tropica* promastigotları ekildi ve tüm tüpler 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından 8 deney tüpü dörderli iki gruba ayrıldı. Birinci grupta bulunan tüplerden her birisinin içerisine 100 µg/ml konsantrasyonunda TiO₂

nanopartikülleri ilave edildi. Daha sonra bu tüplerden bir tanesi 30 dakika, diğeri 45 dakika, üçüncüsü ise 60 dakika UV ışığa maruz tutuldu. Dördüncü tüp ise karanlık ortamda bekletilir ve kontrol grubu olarak kullanıldı. İkinci grupta bulunan tüpler ise TiO₂ nanopartiküllerine maruz bırakılmaksızın aynı şekilde birinci tüp 30 dakika, ikinci tüp 45 dakika ve üçüncü tüp 60 dakika UV ışık ile muamele edildi. Son tüp ise karanlık ortam koşullarında bekletildi. Deney tüplerinde bulunan promastigotlar 24 saatlik aralıklarla inkübasyonun 24., 48., 72. ve 96. saatlerinde hemositometre yardımıyla sayıldı.

7.4.1.3. Farklı Ortam Koşullarında (Karanlık ve UV ışık) TiO₂ Nanopartiküllerinin Parazitlerin Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Tayini

Karanlıkta ve UV ışık altında TiO₂ nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının *Leishmania* parazitlerinin canlılığı üzerindeki etkisini tespit edebilmek için MTT yönteminden yararlanıldı. Bu deney için 96 kuyucuklu plak kullanıldı. Deneyde *L.tropica* promastigotları üzerinde TiO₂ nanopartiküllerinin 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml ve 200 µg/ml gibi farklı konsantrasyonları denendi. Başlangıç olarak mikroplağın birinci sırasında yukarıdan aşağıya 3 kuyucuk kontrol grubu olarak kullanıldı ve bu kuyucuklara parazit ve besiyeri eklenmesi dışında herhangi bir nanopartikül muamelesi yapılmadı. Deneyin birinci gününde plağın yukarıdan aşağıya ilk üç kuyucuğuna, sağdan sola ise ilk 6 kuyucuğuna yani toplamda 18 kuyucuğuna parazit ekimi gerçekleştirildi. Bu 18 kuyucuğun her birisinin içerisine 3×10^4 parazit içeren 100 µl parazit kültürü + besiyeri karışımından eklendi. Aynı işlem TiO₂ nanopartiküllerinin UV ışık altında parazitlerin canlılığına etkisinin incelenebilmesi için ikinci bir mikroplakta da gerçekleştirildi. Ardından mikroplakların yukarıdan aşağıya 4. , 5. ve 6. kuyucuklarına ve aşağıdan yukarıya 4. kuyucuktan itibaren sağa doğru ilk 6 kuyucuğa yani toplamda yine 18 kuyucuğa kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde yalnızca besiyeri eklendi. Yapılan bu ikinci işlemin amacı nanopartiküllerin ve besiyerinin MTT solüsyonu ile olası reaksiyonlarının belirlenmesi için her bir konsantrasyon için nanopartikül kontrol gruplarının oluşturulmasıydı. Deneyin ikinci gününde mikroplaklara TiO₂ nanopartiküllerini ekleme işlemine geçildi. Her iki mikroplakta da parazit kontrol olarak kullanılan gruplara nanopartikül eklenmezken yalnızca 20 µl distile su eklendi. Distile su eklenmesinin nedeni nanopartikül içeren gruplarla aynı hacmin sağlanmasıdır. Ayrıca ELISA reader'da okuma esnasında herhangi bir problem oluşmaması için nanopartiküllerin çözündükleri distile su kontrol

gruplarına eklenmelidir. Nanopartiküllerin 25 µg/ml konsantrasyondaki TiO₂ için 1 mg/ml'lik stok süspansiyondan 2,5 µl TiO₂ nanopartikül çözeltisi ve 17,5 µl distile su, 50 µg/ml konsantrasyon için 5 µl TiO₂ nanopartikül çözeltisi ve 15 µl distile su, 100 µg/ml konsantrasyon için 10 µl TiO₂ nanopartikül çözeltisi ve 10 µl distile su, 150 µg/ml konsantrasyon için 15 µl TiO₂ nanopartikül çözeltisi ve 5 µl distile su ve son olarak 200 µg/ml konsantrasyon için 20 µl TiO₂ nanopartikül çözeltisi hem karanlıkta hem de UV ışıktaki bekletilecek mikroplaklarda parazitlerin bulunduğu kuyucuklara eklendi. Aynı değerler nanopartikül kontrol gruplarına da eklendi. Ancak aynı yukarıda anlatıldığı gibi birinci sütundaki 4. , 5. ve 6. kuyucuklara yalnızca 20 µl distile su ilave edildi. Daha sonra iki mikroplaktan bir tanesi 1 saat süreyle karanlık ortam koşullarında, diğeri ise UV ışık altında bekletildi ve bir saatlik sürenin ardından mikroplaklar 27 °C'de 48 saat inkübe edildi. 48 saatlik inkübasyonun ardından iki mikroplakta da tüm kuyucuklara 10 mg/ml'lik MTT solüsyonundan 100'er mikrolitre ilave edildi. Bu sayede canlı hücrelerde formazan kristallerinin oluşması sağlandı. Mikroplaklar 3-4 saat kadar daha 27 °C'de inkübe edildikten sonra MTT reaksiyonunun durması için tüm kuyucuklara 100'er mikrolitre DMSO ilave edildi. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilen mikroplaklardaki hücrelerin canlılığı 570 nm'de ELISA reader tarafından ölçüldü.

7.4.2.TiO₂ nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Enfektifliğine

Etkisinin Tayini

Bu deneyde 18 adet deney tüpü kullanıldı. Deney tüplerinden 9 tanesinin içerisinde TiO₂ nanopartiküllerini içeren kaplamalar bulunurken diğerlerinde kaplama bulunmamaktaydı. Deney tüplerinden kaplama içeren 3 tanesi karanlık ortam koşullarında bekletilecek Karanlık-Nanopartikül grubunu oluştururken, kaplama içermeyen 3 deney tüpü ise bu gruba karşılık gelen Karanlık-Kontrol grubunu oluşturmaktadır. Geriye kalan deney tüplerinden kaplama içeren 3 tanesi görünür ışıktaki bekletilecek Görünür ışık-nanopartikül grubunu oluştururken, 3 tane kaplama içermeyen deney tüpü bu gruba karşılık gelen Görünür Işık-Kontrol grubunu oluşturmuştur. Geriye kalan 6 deney tüpü ise aynı şekilde kaplama içeren ve içermeyen olacak şekilde 3'erli 2 gruba ayrılmıştır ve kaplama içeren deney grubu UV-nanopartikül, içermeyen deney grubu ise UV-Kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Böylece her bir deney grubu için 3 adet deney tüpü ayrılmıştır. Deneyin birinci gününde kaplama içeren veya içermeyen bütün deney gruplarının içerisine 3 ml 1 x 10⁶/ml *L.tropica* promastigotu ekilmiştir. Daha sonra Görünür ışık-nanopartikül ve Görünür Işık-Kontrol grupları 1 saat süreyle

görünür ışığa, UV-nanopartikül ve UV-Kontrol grupları 1 saat süreyle UV ışığa maruz bırakılırken, Karanlık-nanopartikül ve Karanlık-Kontrol grupları 1 saat süreyle karanlık ortam koşullarında bekletilmiştir. Bir saatlik sürenin ardından bütün deney tüpleri 27 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik aralıklarla inkübasyonun 24. , 48. , 72. ve 96. saatlerinde tüm deney gruplarındaki parazitlerin sayısı hemositometrede sayılmıştır. İnkübasyonun 24. saatinde daha önceden içerisine lamel koyulan 6’lı plağın her bir kuyusuna $2,5 \times 10^4$ J774 makrofaj hücresi ekildi. Protokol gereği makrofajların enfekte edilmesi 1 makrofaj başına 10 parazit düşecek şekilde olmalıdır. Bunun için 6 adet deney grubunun her birinin içerisinde bulunan 3 tane deney grubundan birisi seçilerek, o şişeden 5×10^5 parazite karşılık gelecek miktarda parazit alınarak makrofajları bulunduran plağın içerisine aktarıldı. Böylece Karanlık-nanopartikül, Karanlık-Kontrol, Görünür ışık-nanopartikül, Görünür Işık-Kontrol, UV-nanopartikül ve UV-Kontrol gruplarından ayrı ayrı alınan promastigotlar 6’lı plağın kendilerine ayrılan bölümlerine aktarılarak bu grupların makrofajlar üzerindeki enfektifliği incelenmeye çalışıldı. Enfeksiyonun ardından 6’lı plak 37 °C’de 3-4 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin ardından etüvden çıkarılan plağın her bir kuyucuğunda bulunan besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1-2 kez PBS ile yıkandı. Bu sayede makrofajları enfekte etmemiş olan promastigotlar ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Ardından tüm kuyucuklardaki makrofaj hücrelerinin üzerine 3 ml besiyeri konuldu ve plak bir gecelik inkübasyon için tekrardan etüve kaldırıldı.

Parazitlerle enfekte edilmiş makrofaj hücrelerini bulunduran 6’lı plak 24 saatlik inkübasyonun ardından etüvden çıkarıldı ve her kuyucuğun üzerinde bulunan besiyeri döküldü. Daha sonra her bir kuyucuk 1 ml PBS ile yıkandı. PBS boşaltıldıktan sonra kuyucukların içindeki lamellere tutunmuş halde bulunan makrofaj hücreleri bir sefer de 500 µl PBS – metanol solüsyonu ile yıkandı. Bu işlemin ardından her bir kuyucuktaki makrofaj hücrelerinin lamellere tam olarak fikse edilmesi için her kuyucuğa 250 µl metanol eklendi ve 6’lı plak 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu. 10 dakika sonra metanolün de kuyucuklardan uzaklaştırılmasının ardından kuyucuklara lamellerin üzerini örtecek kadar (yaklaşık 800 µl) giemsa boyası eklendi. 5 dakika boyunca giemsa boyasına maruz kalan 6’lı plaktaki kuyucuklar bu sürenin ardından çeşme suyu altında yıkandı. Boyanın tam olarak uzaklaştırıldığından emin olunduktan sonra her bir kuyucukta bulunan lameller çıkarılarak ters bir şekilde lamaların konuldu. Daha sonra lamaların üzerine immersiyon yağı dökülerek makrofajların parazitler tarafından enfekteliği invert mikroskopta 100X büyütmede tayin edildi.

7.4.2.1. Makrofaj Hücrelerinin TiO₂ Nanopartiküllerine Maruz Kalmış Parazitlerle Enfektifliğinin Hesaplanması

İnvert mikroskop altında 6 preparatın tümü incelendi. Preparatların herbiri için tek tek enfeksiyon indeksi hesaplandı. Bunun için öncelikle preparatlardaki makrofajlardan 200 tanesi sayıldı ve bunların içinde enfekte olanlar belirlendi. Böylelikle o preparat için yüzde enfektiflik sayısı (% enfektiflik) belirlenmiş oldu. Ardından enfekte olmuş parazitlerdeki toplam amastigot sayısı hesaplandı ve bu sayede bir makrofaja düşen amastigot sayısı belirlenmiş oldu. Son olarak her bir preparatın enfeksiyon indeksini belirlemek için yüzde enfektiflik sayısı ile makrofaj başına düşen ortalama amastigot sayısı çarpıldı.

7.4.3. TiO₂ Nanopartiküllerini İçeren Kaplamalara Maruz Kalmış *L.tropica* Promastigotlarının J774 Makrofaj Hücrelerini Enfektifliğinin Mikro Kültür Yöntemi ile Tayini

TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan ve kalmayan parazitlerin enfekte edebilmesi için 6'lı plağın her bir kuyucuğuna $2,5 \times 10^4$ miktarında J774 makrofaj hücresi ekildi. Plak bir gece 37 ° C'de inkübe edildi. Ertesi gün TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan ve kalmayan parazitler kuyucuk başına 25×10^4 parazit olacak şekilde makrofajların bulunduğu 6'lı plağa ilave edildi. 6'lı plak parazitlerin makrofajları enfekte etmesi için 4 saat boyunca 37 ° C'de inkübe edildi. Daha sonra plaktaki kuyucuklar PBS ile yıkanarak makrofajları enfekte edemeyen parazitler ortamdan uzaklaştırıldı. Bir günlük inkübasyonun ardından makrofaj hücreleri kuyucukların yüzeyinden kaldırıldı ve besiyeri ile birlikte 10-20 µl hücre kapillerlere aktarıldı. Kapillerin iki ucu mum ile kapatıldı. Ardından kapillerler 27 °C'ye kaldırılarak makrofajların parçalanması ve amastigotların ortaya çıkması sağlandı. Hazırlanan mikrokültürlerin takibi 1-4 gün süresince 20X büyütmede ters mikroskopta yapıldı.

7.5. TiO₂ nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Tayini

Yalnızca TiO₂ kaplamaya, TiO₂ kaplama ile birlikte görünür ve UV ışığa maruz kalan deney gruplarından ve bunlara karşılık gelen kontrol gruplarından birer adet deney tüpü seçilerek bu deney tüplerinin her birinden 1×10^6 /ml Leishmania paraziti alınarak 15 ml' lik falcon tüplere koyuldu. Daha sonra her bir tüpteki hacim PBS ile 2 ml' e tamamlandı ve her bir tüp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Daha sonra dibe çöken

parazitlerin üzerindeki süpernatantlar atılarak fiksasyon için tüplere 2 ml kadar metanol eklendi ve tüpler 1 saat boyunca -20°C 'de bekletildi. Daha sonra flow sitometride analiz işlemine geçildi

7.6. Gümüş Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Gümüş nanopartiküllerinin boyutlarının ölçümü Atomik Force Mikroskopta (AFM) gerçekleştirildi. Öncelikle stok gümüş solüsyonundan 1/100 oranında seyreltme yapıldı. Daha sonra seyreltme yapılan solüsyondan 2 μl "mica" üzerine damlatıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu sürenin ardından oda sıcaklığında ultra saf su kullanılarak yıkama yapıldı ve örnek kurumaya bırakıldı. Örnek kuruduktan sonra tarayıcının olduğu bölgeye yerleştirildi. Boyut ölçümleri "Phase Mode" da elde edildi. Cantilevel (Nanoworld, NCHR-10) kullanılarak yükseklik sinyaline ait görüntüler elde edildi.

7.7. Gümüş Nanopartiküllerin Leishmania Promastigotlarının Proliferasyonuna ve Enfektifliğine Etkisi

7.7.1. Gümüş nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisi

Gümüş nanopartiküllerinin Leishmania promastigotlarının proliferasyonu üzerindeki etkisi yapılan parazit sayımları ve hücre canlılık testi (MTT) ile belirlenmiştir.

7.7.1.1. UV Işığa Maruz Kalan Gümüş Nanopartiküllerini İçeren Kaplamaların *L.tropica* Promastigotları Üzerindeki Etkisinin Tayini

Bu deneyde 2 adet deney tüpü kullanıldı. Öncelikle deney tüplerinden birisinin içerisine gümüş nanopartiküllerini içeren kaplama ilave edilirken diğer deney tüpüne kaplama ilave edilmedi ve kontrol grubu olarak bırakıldı Her iki deney tüpünün içerisine $3 \times 10^5/\text{ml}$ *L.tropica* promastigotlarını içeren 2 ml RPMI 1640 besiyeri eklendi. Daha sonra her iki deney tüpü de 1 saat süreyle UV ışığa maruz bırakıldı. Tüplerde bulunan *L.tropica* promastigotları 24 saatlik aralıklarla inkübasyonun 24. , 48. ve 72. saatlerinde hemositometrede sayıldı.

7.7.1.2. Gümüş Kaplamaların Görünür Işık ve UV Işık Altında *L.tropica* Promastigotları Üzerinde Etkisinin Tayini

Bu deneyde 6 adet deney tüpü kullanıldı. Deney tüplerinin 3 tanesinin içerisine gümüş nanopartiküllerini içeren kaplamalar ilave edildi. Diğer 3 deney tüpünün içerisine kaplama konulmadı ve bu şişeler kontrol grubu olarak kullanıldı. İlk gün deneyde kullanılacak *L.tropica* promastigotlarının flaska ekimi gerçekleştirildi. Deneyde 6 adet deney tüpünün her birisinin içerisine 1×10^6 /ml parazit içeren 3 ml besiyeri ekleneceği için toplamda 18×10^6 / 18 ml parazite ihtiyaç vardı. Stok Leishmania kültüründen yapılan sayımın ardından 18×10^6 promastigota karşılık gelen 1,8 ml parazit kültürü 16,2 ml RPMI 1640 besiyeri içeren flaska ekildi. Böylelikle flaskın içerisinde 18 ml'lik parazit kültürü + besiyeri karışımı oluşturuldu. Ardından flask bir geceliğine 27 °C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün parazit kültürü flasktan deney tüperine aktarılmaya başlandı. Her bir deney tüpünün içerisine 3 ml parazit kültürü ilave edildi. Daha sonra deney tüpleri bir tanesi gümüş nanopartiküllerini içeren kaplamaları bulunduran diğeri bulundurmayan ikişerli 3 gruba ayrıldı. Birinci grup bir saat süreyle UV ışığa, ikinci grup bir saat süreyle görünür ışığa maruz bırakılırken, üçüncü grup aynı süreyle karanlık ortam koşullarında bekletildi. Bir saatin ardından bütün deney tüpleri 27 °C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra penisilin şişelerindeki promastigotların sayımı 24 saatlik aralıklarla inkübasyonun 24. ,48. ve 72. saatlerinde hemositometre yardımıyla yapıldı.

7.7.1.3. Gümüş Nanopartiküllerinin Farklı Konsantrasyonlarının Karanlık ve UV'li Ortamda Parazitlerin Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Tayini

Bu deney için 2 adet 96 kuyucuklu mikrolak kullanıldı. 2 adet mikrolak kullanılmasının sebebi plaklardan birisinin UV ışığa maruz bırakılıp diğerinin karanlık ortam koşullarında bekletilecek olmasıdır. Deneyin birinci gününde mikrolakların her ikisinin de üst taraflarında bulunan soldan sağa 6, yukarıdan aşağıya ise 3 kuyucuğa yani toplamda 18 kuyucuğa parazit ekimi gerçekleştirildi. Parazit ekimi yapılan kuyucukların hemen altındaki aşağıdan yukarıya 4. , 5. ve 6. kuyucuğa, soldan sağa ise ilk 6 kuyucuğa yani toplamda 18 kuyucuğa yalnızca besiyeri ilave edildi. Deneyin ikinci günü kuyucuklara nanopartikül ekleme işlemine geçildi. Deneyin yapılışı sırasında MTT solüsyonunun gümüş nanopartikülleri ile reaksiyona girdiği göz önüne alınarak gümüş nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonları hem parazitlerin bulundukları kuyucuklara hem de parazitlerin bulunmadıkları kuyucuklara eklendi. Yalnızca mikrolağın en

solundaki sütunun aşağıdan yukarıya ilk üç kuyucuğunu oluşturan parazit kontrol grubuna ve hemen onun altındaki 3 kuyucuğu oluşturan nanopartikül kontrol grubuna yani toplamda 6 kuyucuğa nanopartikül eklenmedi. Kontrol gruplarının hemen yanındaki sütundaki 6 kuyucuğa 25 µg/ml gümüş solüsyonuna karşılık gelen 2,5 µl gümüş nanopartikül solüsyonu ve 17,5 µl distile su, 50 µg/ml konsantrasyon için 5 µl gümüş nanopartikül çözeltisi ve 15 µl distile su, 100 µg/ml konsantrasyon için 10 µl gümüş nanopartikül çözeltisi ve 10 µl distile su, 150 µg/ml konsantrasyon için 15 µl gümüş nanopartikül çözeltisi ve 5 µl distile su ve son olarak 200 µg/ml konsantrasyon için yalnızca 20 µl gümüş nanopartikül çözeltisi eklendi. Nanopartikül eklenmesi işleminin ardından mikroplaklardan birisi 1 saat süreyle UV ışık altında tutulurken, diğer mikroplak karanlık ortam koşullarında bekletildi. Bir saatlik muamelenin ardından iki mikroplak da 27 °C’de inkübasyona bırakıldı. Nanopartikül ilavesinin 48. saatinde MTT uygulamasına geçildi. Etüvden alınan mikroplaklardaki her bir kuyucuğa 0,45’lik filtreden geçirilen 10 mg/ml stok MTT solüsyonundan 100’er µl ilave edildi ve ardından plaklar yeniden etüve kaldırıldı. 3-4 saatlik inkübasyonun ardından etüvden çıkarılan mikroplaklardaki her bir kuyucuğa MTT reaksiyonunun durması için 100’er µl DMSO ilave edildi. Bu işlemin ardından oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dakika bekletilen mikroplaklar ELISA reader’da 570 nm’de okutuldu. ELISA reader’da kuyucuklardaki canlılık hesaplandıktan sonra parazitlerin bulunduğu kuyucuklardaki değerler parazitlerin bulunmadığı kuyucuklardaki değerlerden çıkartıldı ve sonuçlar değerlendirildi. Böylece gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının canlılığına olan etkisi belirlenmiş oldu.

7.8. Gümüş nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Enfektifliğine Etkisi

7.8.1. Gümüş Nanopartiküllerini İçeren Kaplamalara Maruz Kalmış *L.tropica* Promastigotlarının J774 Makrofaj Hücrelerini Enfektifliğinin GIEMSA Boyama ile Tayini

Gümüş nanopartiküllerini içeren kaplamalara maruz bırakılan *L.tropica* promastigotlarının makrofaj hücreleri üzerindeki enfektifliğinin incelenmesi için içinde lamel bulunan 6 kuyucuklu plağın her birisinin içerisine 5×10^4 J774 makrofaj hücreleri ekildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından penisilin şişelerindeki promastigotların sayısına bağlı olarak her bir penisilin şişesinden 5×10^5 promastigota karşılık gelen parazit kültür alındı ve 6’lı plağın kendilerine ayrılan kuyucuğuna eklendi. Böylece her

bir kuyucukta bir makrofaj başına 10 parazit düşecek şekilde bir oranlama yapılmış oldu. Ardından 6'lı plak 37 °C'de 3-4 saat inkübe edildi. Bu 3-4 saatlik sürenin ardından etüvden çıkarılan 6'lı plağın her bir kuyucuğu 2 kez 1-2 ml PBS ile yıkandı ve böylece makrofajları enfekte etmeyen parazitler ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Bu işlemin ardından 6'lı plak tekrardan etüve kondu ve bir gece boyunca 27 °C'de inkübe edildi. Parazitlerle enfekte edilmiş makrofaj hücrelerini bulunduran 6'lı plak 24 saatlik inkübasyonun ardından etüvden çıkarıldı ve her kuyucuğun üzerinde bulunan besiyeri döküldü. Daha sonra her bir kuyucuk 1 ml PBS ile yıkandı. PBS boşaltıldıktan sonra kuyucukların içindeki lamellere tutunmuş halde bulunan makrofaj hücreleri bir sefer de 1-1,5 ml PBS – metanol solüsyonu ile yıkandı. Bu işlemin ardından her bir kuyucuktaki makrofaj hücrelerinin lamellere tam olarak fikse edilmesi için her kuyucuğa 1 ml metanol eklenir ve 6'lı plak 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu. 10 dakika sonra metanolün de kuyucuklardan uzaklaştırılmasının ardından kuyucuklara lamellerin üzerini örtecek kadar (yaklaşık 800 µl) giemsa boyası eklendi. 5 dakika boyunca giemsa boyasına maruz kalan 6'lı plaktaki kuyucuklar bu sürenin ardından çeşme suyu altında yıkandı. Boyanın tam olarak uzaklaştırıldığından emin olunduktan sonra her bir kuyucukta bulunan lameller çıkarılarak ters bir şekilde lamaların üzerine konuldu. Daha sonra lamaların üzerine immersiye yağı dökülerek parazitlerin makrofajlar üzerindeki enfektifliği invert mikroskopta 100X büyütmede tayin edildi.

İnvert mikroskop altında 6 preparatın tümü incelendi. Preparatların herbiri için tek tek enfeksiyon indeksi hesaplandı. Bunun için öncelikle preparatlardaki makrofajlardan 200 tanesi sayıldı ve bunların içinde enfekte olanlar belirlendi. Böylelikle o preparat için yüzde enfektiflik sayısı (% enfektiflik) belirlenmiş oldu. Ardından enfekte olmuş parazitlerdeki toplam amastigot sayısı hesaplandı ve bu sayede bir makrofaja düşen amastigot sayısı belirlenmiş oldu. Son olarak her bir preparatın enfeksiyon indeksini belirlemek için yüzde enfektiflik sayısı ile makrofaj başına düşen ortalama amastigot sayısı çarpıldı.

7.8.2. Gümüş Nanopartiküllerini İçeren Kaplamalara Maruz Kalmış *L.tropica* Promastigotlarının J774 Makrofaj Hücrelerini Enfektifliğinin Mikro Kültür Yöntemi ile Tayini

Gümüş nanopartiküllerine maruz kalan ve kalmayan parazitlerin enfekte edebilmesi için 6'lı plağın her bir kuyucuğuna $2,5 \times 10^4$ miktarında J774 makrofaj hücresi ekildi. Plak bir gece 37 ° C'de inkübe edildi. Ertesi gün gümüş nanopartiküllerine maruz kalan ve

kalmayan parazitler kuyucuk başına 25×10^4 parazit olacak şekilde makrofajların bulunduğu 6'lı plağa ilave edildi. 6'lı plak parazitlerin makrofajları enfekte etmesi için 4 saat boyunca 37°C 'de inkübe edildi. Daha sonra plaktaki kuyucuklar PBS ile yıkanarak makrofajları enfekte edemeyen parazitler ortamdan uzaklaştırıldı. Bir günlük inkübasyonun ardından makrofaj hücreleri kuyucukların yüzeyinden kaldırıldı ve besiyeri ile birlikte 10-20 µl hücre kapillerlere aktarıldı. Kapillerin iki ucu mum ile kapatıldı. Ardından kapillerler 27°C 'ye kaldırılarak makrofajların parçalanması ve amastigotların ortaya çıkması sağlandı. Hazırlanan mikrokültürlerin takibi 1-4 gün süresince 20X büyütmede ters mikroskopta yapıldı.

7.9. Gümüş nanopartiküllerinin Leishmania Promastigotlarının Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Tayini

Yalnızca gümüş nanopartiküllerini içeren kaplamaya, gümüş kaplama ile birlikte görünür ve UV ışığa maruz kalan deney gruplarından ve bunlara karşılık gelen kontrol gruplarından birer adet deney tüpü seçilerek bu deney tüplerinin her birinden $1 \times 10^6/\text{ml}$ Leishmania paraziti alınarak 15 ml' lik falcon tüplere koyuldu. Daha sonra her bir tüpteki hacim PBS ile 2 ml' e tamamlandı ve her bir tüp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Daha sonra dibe çöken parazitlerin üzerindeki süpernatantlar atılarak fiksasyon için tüplere 2 ml kadar metanol eklendi ve tüpler 1 saat boyunca -20°C 'de bekletildi. Daha sonra flow sitometride analiz işlemine geçildi.

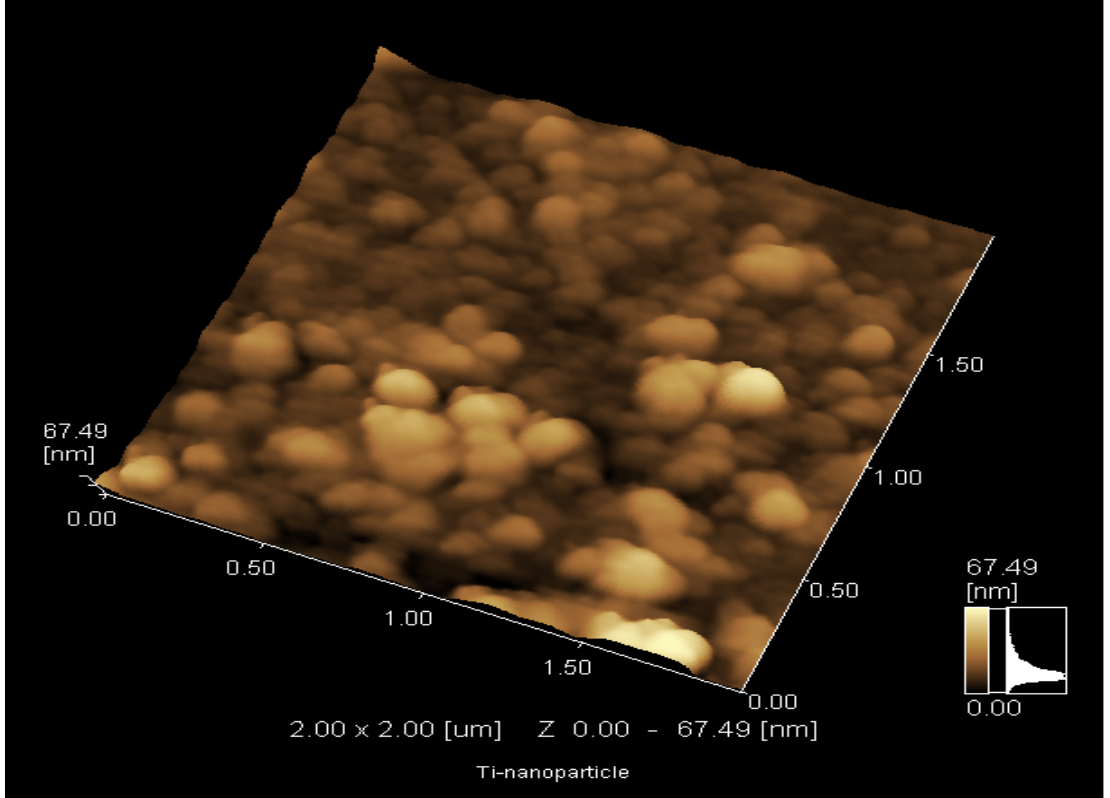
7.10. İstatistik Analiz

Deneyler en az 3 kez tekrarlandı. Varyansların homojenitesi Levene's test ile belirlendi. Tüm veriler Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 16.0 for Windows) programı ile yapıldı ve $p < 0,05$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

8. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMALAR

8.1. Titanyum Dioksit (TiO₂) Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

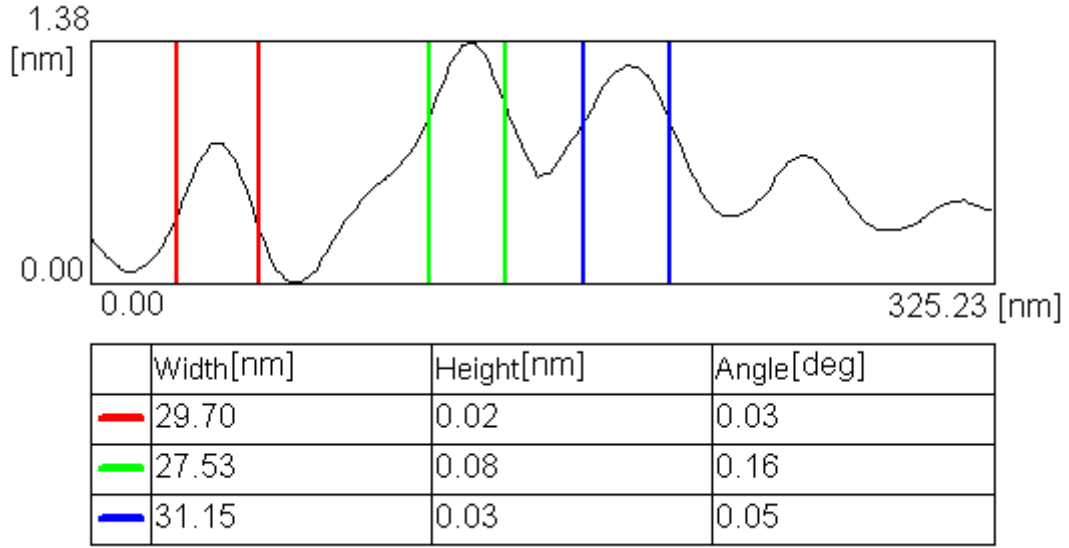
Bu bölümde deneylerde kullanılacak TiO₂ nanopartiküllerinin karakterizasyonu ve boyutlarının ölçümü için Atomik Force Mikroskop kullanılmıştır. Şekil 8.1’de Atomik Force Mikroskop altında TiO₂ nanopartiküllerinin üç boyutlu görüntüsü, Çizelge 8.1’de ise TiO₂ nanopartiküllerinin ortalama boyutları verilmiştir.



Şekil 8.1. Atomik Force Mikroskop altında TiO₂ nanopartiküllerinin üç boyutlu görüntüsü

Şekil 8.1’de 4 μm²’lik alanda bulunan TiO₂ nanopartiküllerinin yuvarlak ve oval şekilli oldukları ve bir arada bulunmaya meyilli oldukları için bir yığın halinde bulundukları belirlenmiştir.

Çizelge 8.1. TiO₂ nanopartiküllerinin Atomik Force Mikroskop altında boyut ölçümü değerleri



Çizelge 8.1’de Atomik Force Mikroskop altında TiO₂ nanopartiküllerinin ortalama boyutları belirlenmiştir. Buna göre görüntü alanının farklı bölgelerinden yapılan boyut analizine göre TiO₂ nanopartiküllerinin ortalama olarak 29.46 nm boyutunda olduğu tespit edildi.

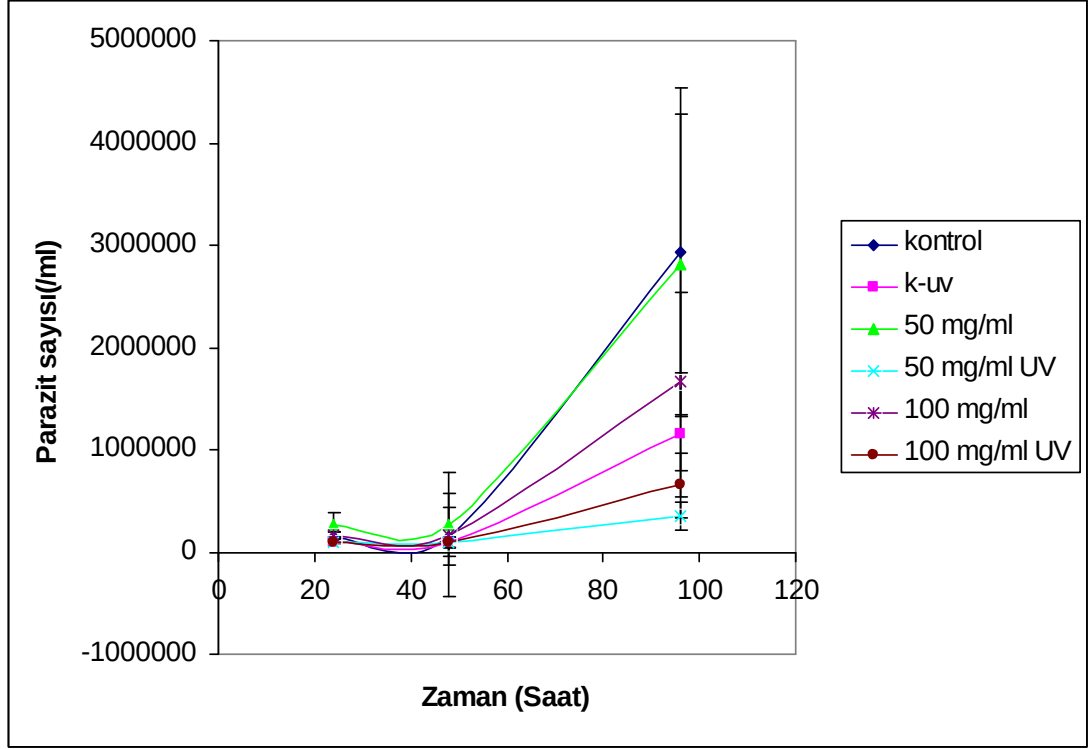
8.2. Titanyum Dioksit (TiO₂) Nanopartiküllerinin Farklı Konsantrasyonlarının *L.tropica* Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

TiO₂ nanopartiküllerinin karanlık ve UV ışıklı ortamda farklı konsantrasyonlarının (50 ve 100 µg/ml) *L.tropica* promastigotlarının proliferasyonuna farklı inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 96. saat) etkisi kantitatif olarak incelendi.

Çizelge 8.2’de 100 µg/ml konsantrasyonda TiO₂ nanopartikülleri bulunan ortamda parazit canlılığının kontrole nazaran oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu etki 96. saatte ve UV ışık bulunan ortamda daha da belirgindir.

Karanlık ortamda 100 µg/ml konsantrasyonda TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan deney grubundaki parazit sayısının, 50 µg/ml konsantrasyonda TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan deney grubuna göre daha az olduğu ve her iki konsantrasyonda da TiO₂ bulunan ortamdaki parazit sayısının sadece UV ışığa maruz kalan kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. (p < 0.05)

Çizelge 8.2. TiO_2 nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının karanlıkta ve UV ışık altında *L.tropica* parazitlerinin proliferasyonuna etkisi



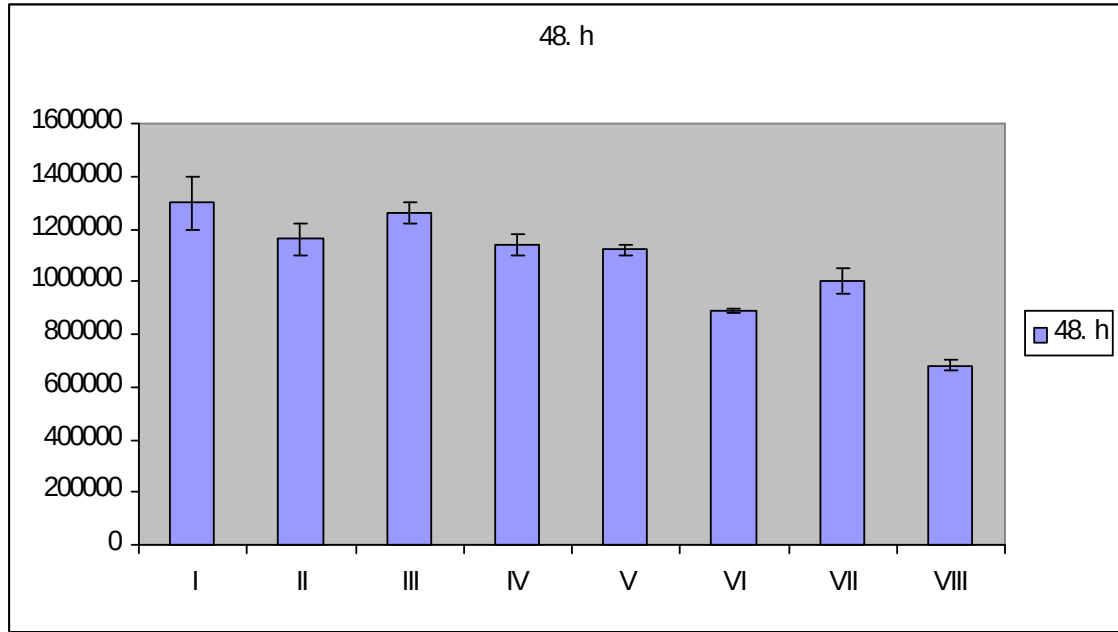
Bu sonuçlar TiO_2 nanopartiküllerinin karanlık ortamda *L.tropica* promastigotlarının canlılığına etki gösterdiklerini, bu etkinin özellikle 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda daha da belirgin olduğunu göstermiştir. Ayrıca UV ışık ile birlikte 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda TiO_2 'e maruz kalan deney gruplarında da parazit sayısının oldukça düşük olması, UV ışığın TiO_2 nanopartiküllerinin etkinliğini arttırdığını göstermektedir.

8.3. Farklı Sürelerde UV Işığa Maruz Kalan Titanyum Dioksit (TiO_2) Nanopartiküllerinin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) *L.tropica* Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

TiO_2 nanopartiküllerinin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda bulunduğu ortamda 30, 45 ve 60 dakika süreyle UV ışınlamanın *L.tropica* promastigotlarının canlılığı üzerine etkisi kantitatif olarak incelendi.

Çizelge 8.3'de görüldüğü gibi karanlıkta 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TiO_2 bulunan ortamda parazit sayısı kontrole nazaran daha düşüktür. Bununla birlikte UV ışık bulunan ortamdaki parazit sayısının da karanlıktakine göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum özellikle UV ışığa maruz kalma süresi arttıkça belirginleşmektedir.

Çizelge 8.3. 100 µg/ml konsantrasyonda TiO₂ nanopartiküllerinin farklı sürelerde UV ışık altında ve karanlıkta *L.tropica* promastigotlarının proliferasyonuna etkisi (48. saat)



- (I- Karanlık ,
 II- Karanlık + TiO₂,
 III- UV 30 dakika,
 IV- UV 30 dakika + TiO₂,
 V- UV 45 dakika,
 VI- UV 45 dakika + TiO₂,
 VII- UV 60 dakika,
 VIII- UV 60 dakika + TiO₂)

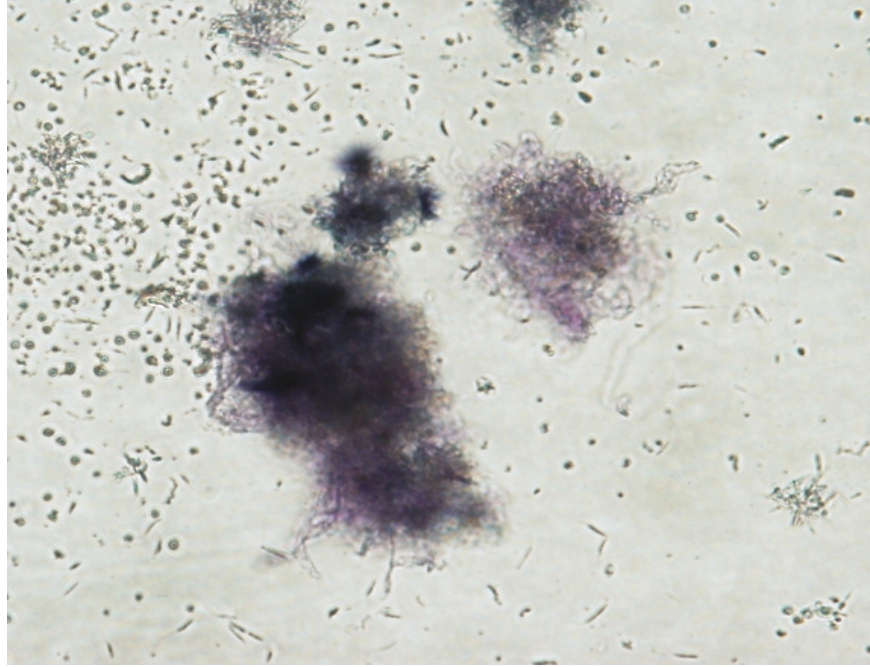
TiO₂ nanopartikülleri ile birlikte 30 dakika UV ışığa maruz kalan deney grubunda promastigotların sayısında kontrol grubuna nazaran bir azalma meydana gelmiştir. Ancak promastigotlar üzerindeki bu etki TiO₂ nanopartikülleri ile birlikte 45 ve 60 dakikalık sürelerle UV ışığa maruz bırakılmış deney gruplarında daha belirgindir (çizelge 8.3). TiO₂ nanopartikülleri ile birlikte 60 dakika boyunca UV ışığa maruz kalan deney grubunda tek başına 60 dakika boyunca UV ışığa maruz kalan deney grubu ile kıyaslandığında belirgin bir etki olduğu görülmektedir. Sonuç olarak bu deney TiO₂ nanopartiküllerinin karanlık ortamda promastigot canlılığı üzerine etki gösterse de UV ışığa maruz kaldıklarında ısınanma süresine bağlı olarak parazitler üzerindeki etkinliklerini arttırdıklarını ortaya çıkarmıştır. TiO₂ nanopartiküllerinin UV ışığa daha uzun süre maruz kalmasının, daha fazla miktarda Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS)

oluşmasına neden olduğu ve böylece TiO_2 nanopartiküllerinin *L.tropica* parazitleri üzerindeki etkinliklerini arttırdığını düşündürmektedir.

8.4. TiO_2 Nanopartiküllerinin Farklı Konsantrasyonlarının *L.tropica* Promastigotlarının Metabolik Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi

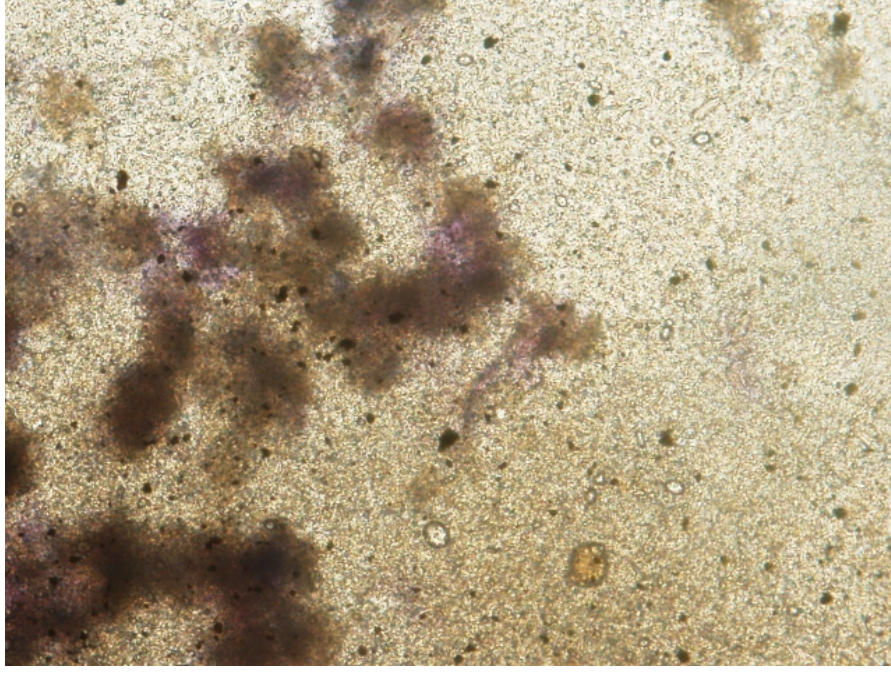
TiO_2 nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının karanlıkta ve UV ışık altında *L.tropica* promastigotlarının metabolik aktiviteleri üzerine etkisi mikroskopik olarak ve MTT yöntemi ile incelendi.

Şekil 8.2’de MTT reaktanı ile inkübasyon sonrası kontrol grubunda *L.tropica* promastigotlarında formazan kristallerinin oluştuğu görülmektedir.

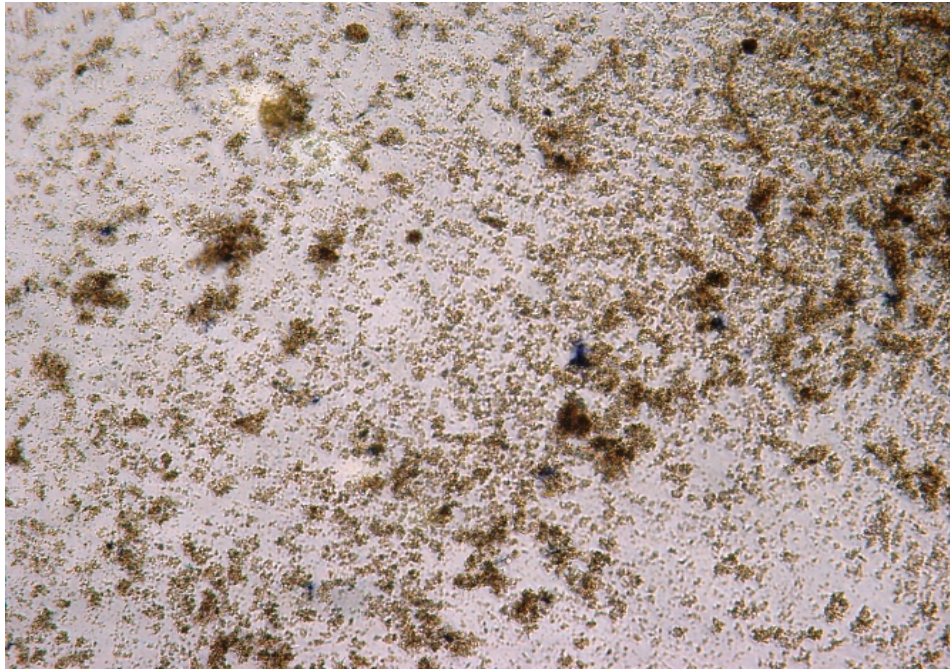


Şekil 8.2. *L.tropica* promastigotlarında formazan kristallerinin oluşumu (40 X)

TiO_2 nanopartiküllerinin bulunduğu ortamda ise nanopartikül konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan formazan kristallerinin miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Şekil 8.3’de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve Şekil 8.4’de 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda TiO_2 nanopartiküllerine maruz kalan deney gruplarında formazan kristallerinin miktarında kontrole göre büyük bir azalma olduğu görülmektedir.



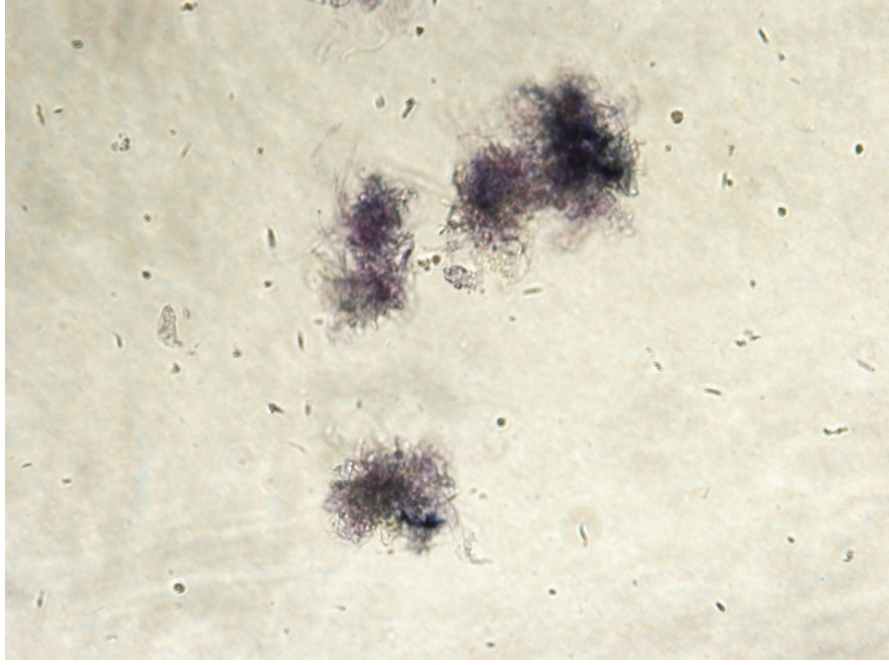
Şekil 8.3 TiO₂ nanopartiküllerinin 100 µg/ml konsantrasyonunun karanlık ortamda *L.tropica* promastigotlarına sitopatik etkisi (40 X)



Şekil 8.4. TiO₂ nanopartiküllerinin 150 µg/ml konsantrasyonunun karanlık ortamda *L.tropica* promastigotlarına sitopatik etkisi (40 X)

Şekil 8.5’de UV ışık altında TiO₂ nanopartiküllerinin bulunmadığı kontrol grubunda MTT reaktanı ile inkübasyon sonrası formazan kristallerinin oluştuğu gözlenmektedir. UV ışık altında TiO₂ nanopartiküllerinin bulunduğu deney gruplarında ise nanopartikül konsantrasyonunun artması ile birlikte formazan kristallerinin azaldığı belirlenmiştir.

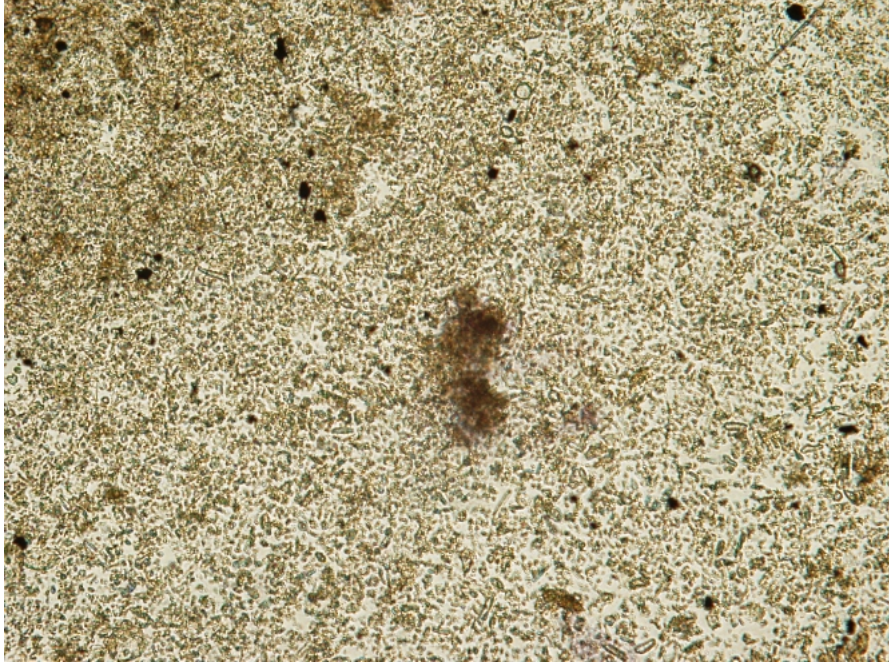
UV ışık altında 100 µg/ml (Şekil 8.6.) ve 150 µg/ml konsantrasyonda (Şekil 8.7) TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan deney gruplarında formazan kristalleri miktarında kontrole göre büyük bir azalma olduğu görülmektedir.



Şekil 8.5. UV ışığa maruz kalan *L.tropica* promastigotlarında formazan kristallerinin oluşumu (40 X)



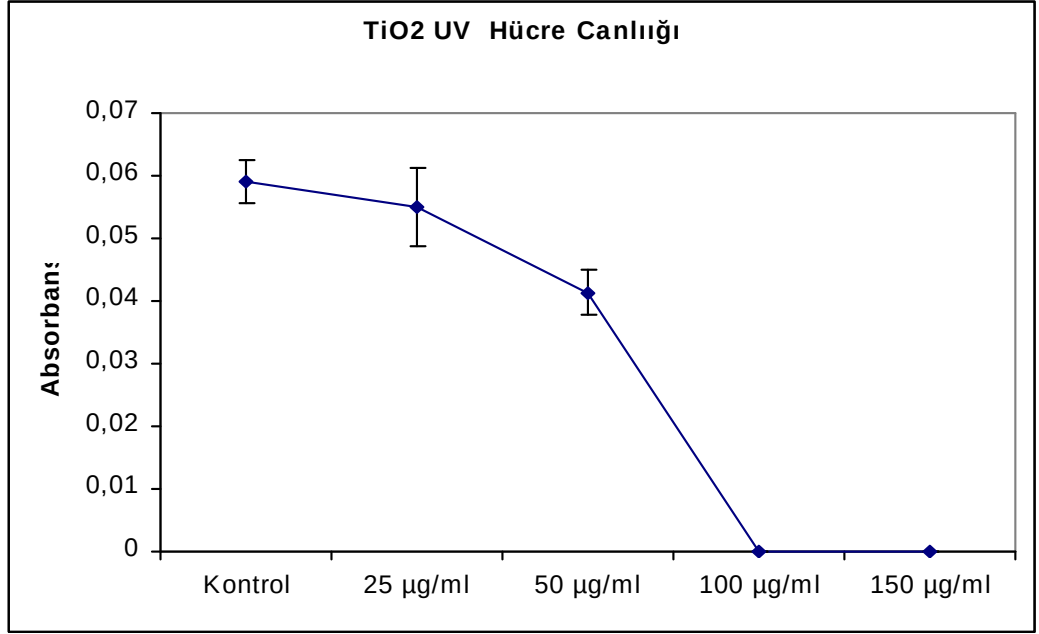
Şekil 8.6. TiO₂ nanopartiküllerinin 100 µg/ml konsantrasyonunun UV ışık altında *L.tropica* promastigotlarına sitopatik etkisi (40 X)



Şekil 8.7. TiO₂ nanopartiküllerinin 150 µg/ml konsantrasyonunun UV ışık altında *L.tropica* promastigotlarına sitopatik etkisi (40 X)

Çizelge 8.4’de farklı konsantrasyonlardaki TiO₂ nanopartiküllerinin UV ışık altında *L.tropica* promastigotlarının metabolik aktiviteleri üzerine etkisi görülmektedir. UV ışık altında 25 µg/ml konsantrasyonunda TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan Leishmania parazitlerinin metabolik aktivitelerinin kontrole nazaran arttığı gözlenirse de, UV ışık ile birlikte 50 µg/ml konsantrasyonda TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan deney gruplarında parazitlerin metabolik aktivitesinin azaldığı belirgin bir biçimde görülmektedir.

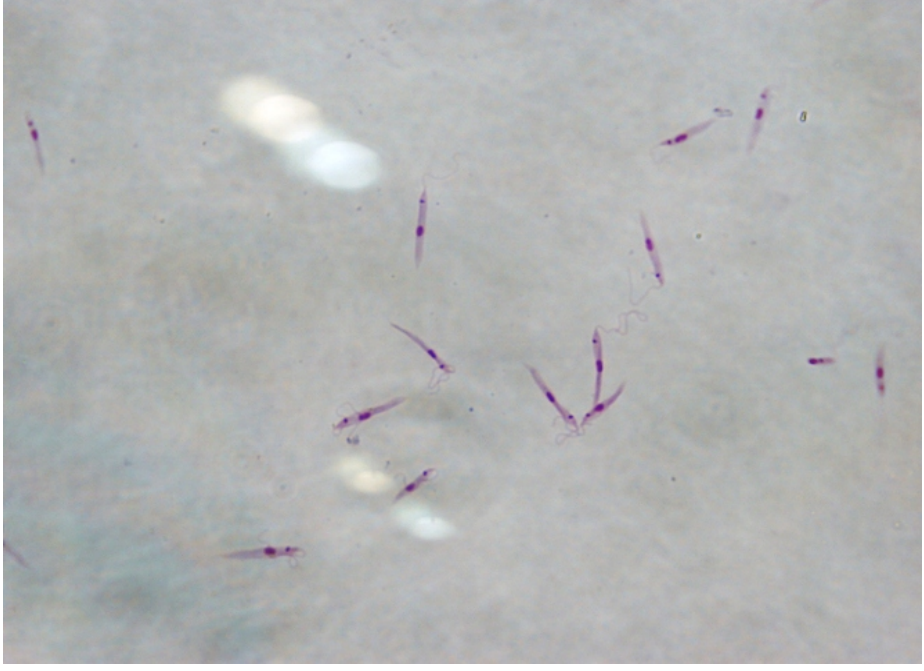
Çizelge 8.4. TiO₂ nanopartiküllerinin UV Işıktaki konsantrasyona bağlı olarak *L.tropica* promastigotlarının metabolik aktivitesine etkisi



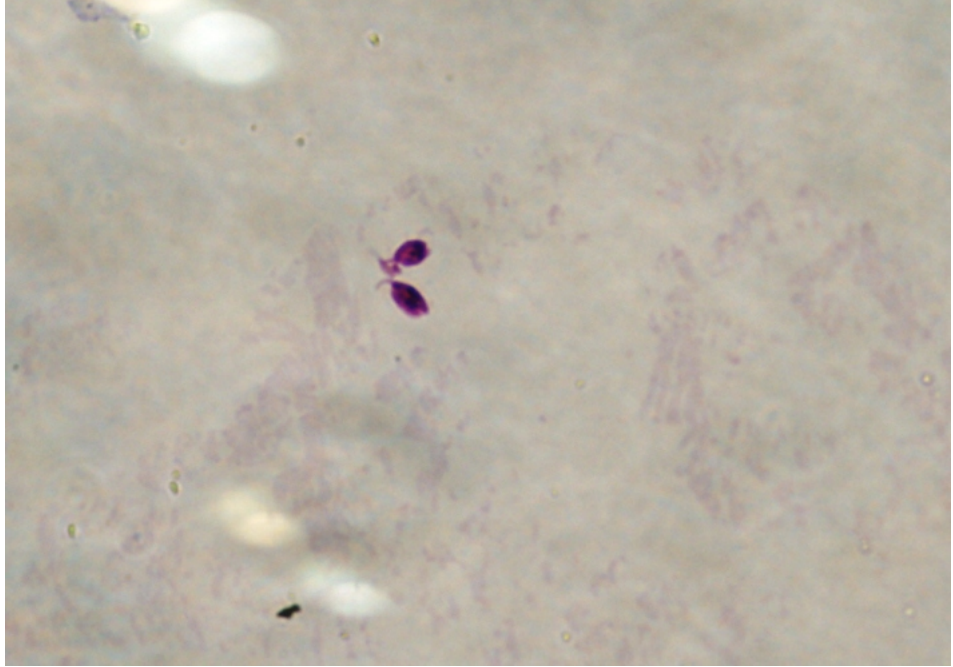
UV ışık ile birlikte 100 ve 150 µg/ml TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan deney gruplarında ise hücrelerin metabolik aktivitelerini kaybettiği tespit edilmiştir.

8.5. Karanlıkta ve UV Işık Altında TiO₂ Nanopartiküllerinin *L.tropica* Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi

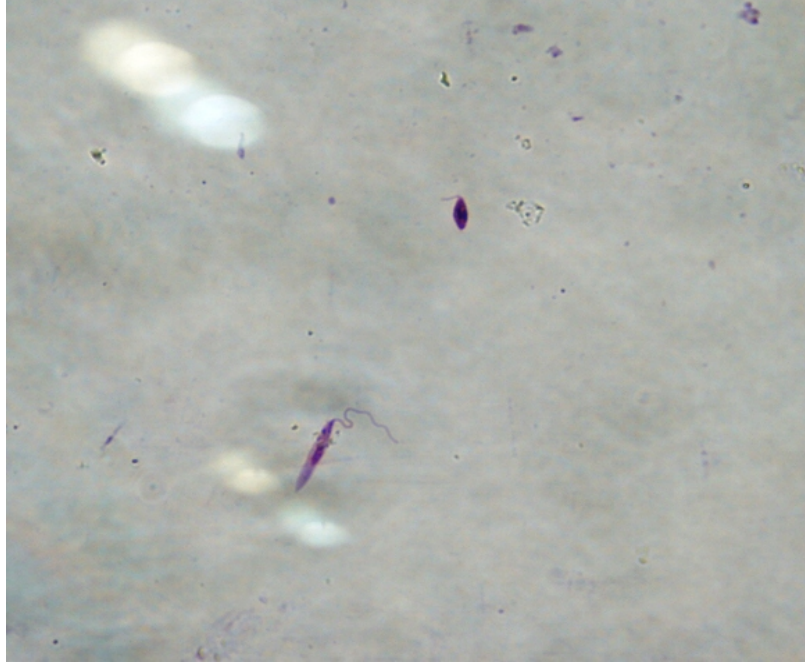
Şekil 8.8 'de herhangi bir nanopartikül veya UV ışığa maruz kalmayan kontrol grubundaki parazitlerin Giemsa boyama sonrası mikroskopik görüntüsü verilmiştir. Kontrol grubunda bulunan parazitlerin morfolojik yapılarını korudukları ve çekirdek, kinetoplast ve kamçıların net bir biçimde fark edilebildikleri gözlemlendi. Buna karşın karanlıkta (Şekil 8.9) ve UV ışık altında (Şekil 8.10) TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan promastigotların morfolojik yapılarını kaybettikleri belirlendi. Her iki grupta da parazitlerin çekirdeklerinin ve kinetoplastlarının birbirinden ayırt edilemeyecek hale geldikleri ve hücre membranlarının bozulmasıyla parazitlerin atipik bir form aldıkları tespit edildi.



Şekil 8.8. Karanlıkta kontrol grubunda bulunan parazitlerin mikroskopik görüntüsü (Giemsa, 100X)



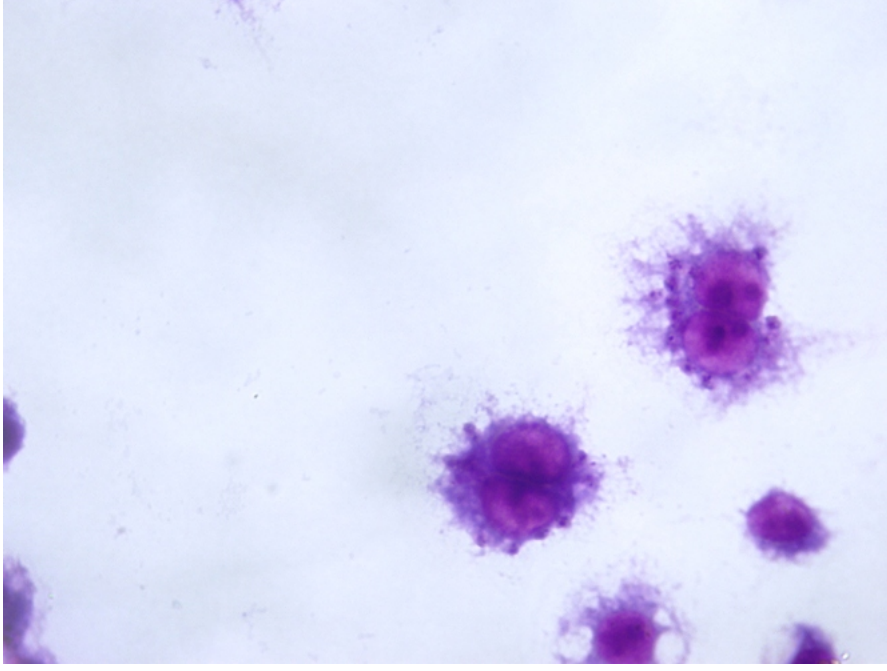
Şekil 8.9. Karanlıkta TiO_2 nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerin mikroskopik görüntüsü (Giemsa, 100X)



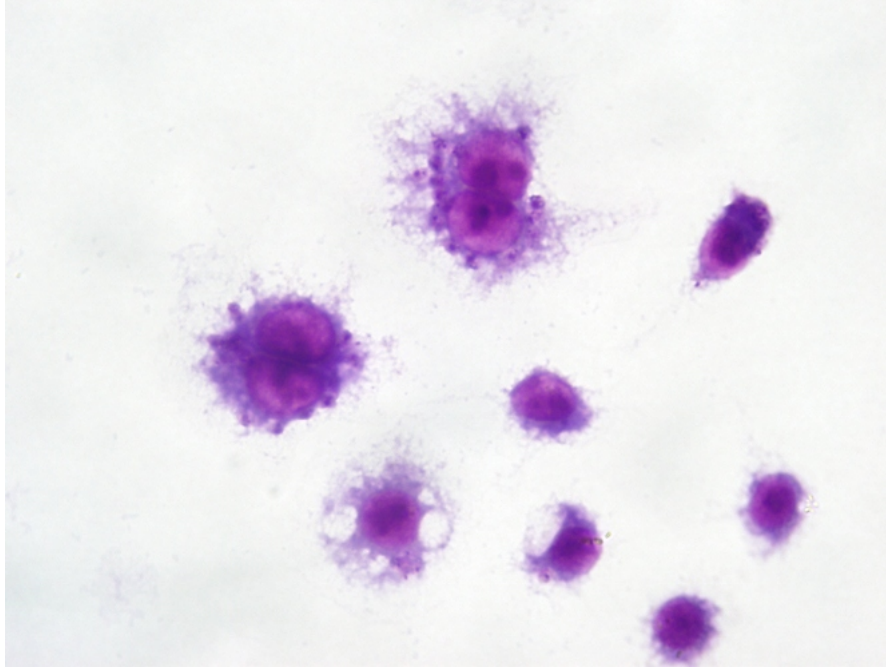
Şekil 8.10. UV ışık altında TiO_2 nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerin mikroskopik görüntüsü (Giemsa, 100X)

8.6. Klasik Kültürde TiO_2 Nanopartiküllerinin Leishmania Parazitlerinin Enfektifliğine Etkisinin İncelenmesi

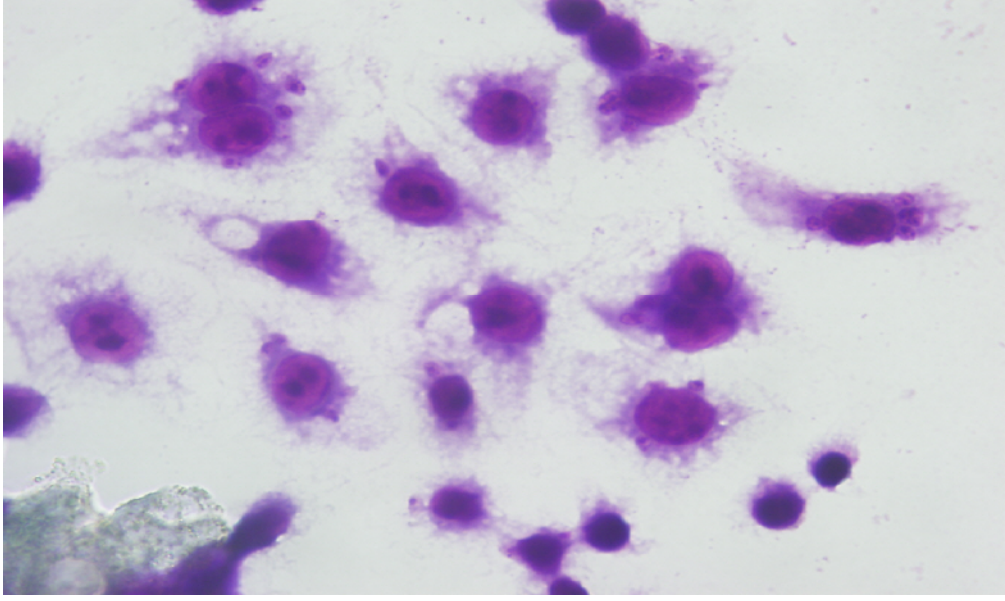
Deneyler karanlık, görünür ışık ve UV ışık olmak üzere üç farklı ortamda yapıldı. Nanopartikül içermeyen kontrol grubundaki ve deney gruplarındaki parazitler karanlık, görünür ışık ve UV ışığa maruz bırakıldı. Şekil 8.11’de karanlık, Şekil 8.12’de görünür ışık ve Şekil 8.13’de UV ışık kontrol grupları sunulmuştur. Farklı ortam koşullarında olmalarına rağmen UV dahil kontrol gruplarının tamamındaki parazitlerin makrofajları enfekte ettikleri tespit edilmiştir.



Şekil 8.11. *L.tropica* promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri (Giemsa, 100X)

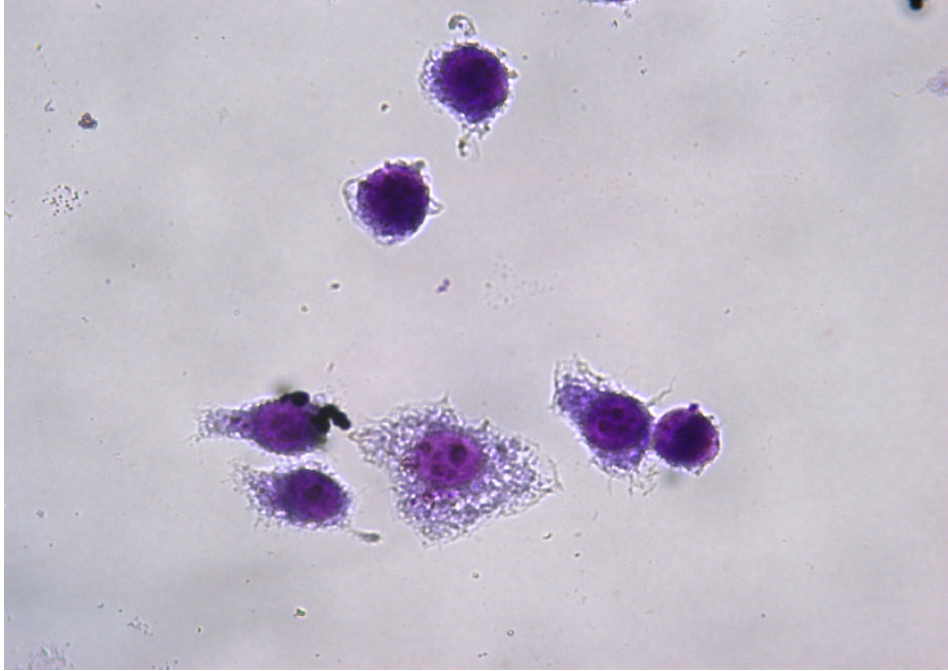


Şekil 8.12. Görünür ışığa tutulan *L.tropica* promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri (Giemsa, 100X)

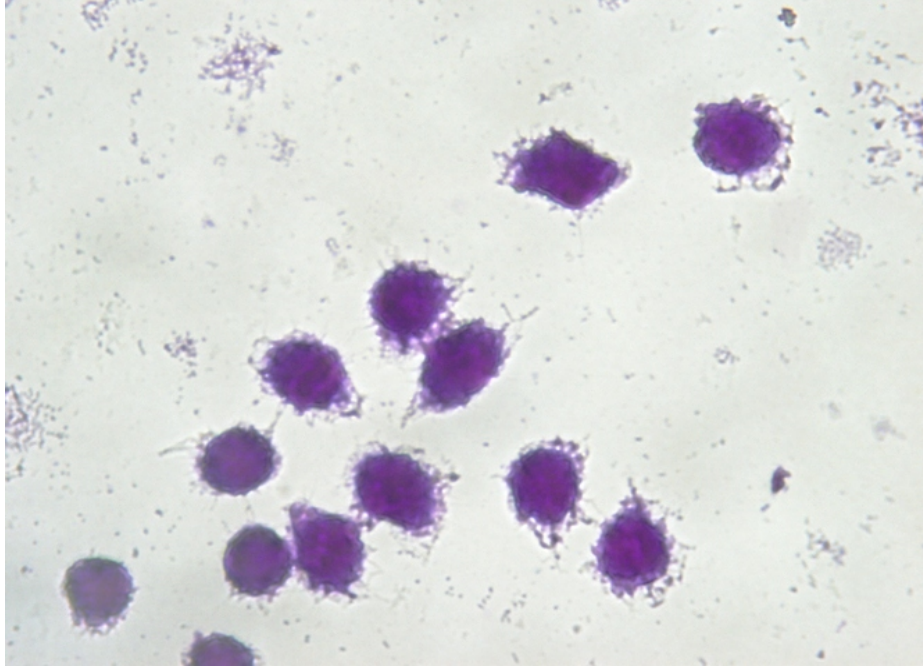


Şekil 8.13. UV ışıklı ortamda tutulan *L.tropica* promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri (Giemsa, 100X)

Buna karşılık karanlık (Şekil 8.14), görünür ışık (Şekil 8.15) veya UV ışık altında (Şekil 8.16) TiO_2 nanopartiküllerine maruz kalmış parazitlerin makrofajları enfekte edemediği gözlenmiştir. Bununla birlikte özellikle parazitlerin yüzeylerine yapışan nanopartiküllerin makrofajların hücre zarında patolojik değişikliklerin meydana geldiği tespit edilmiştir.

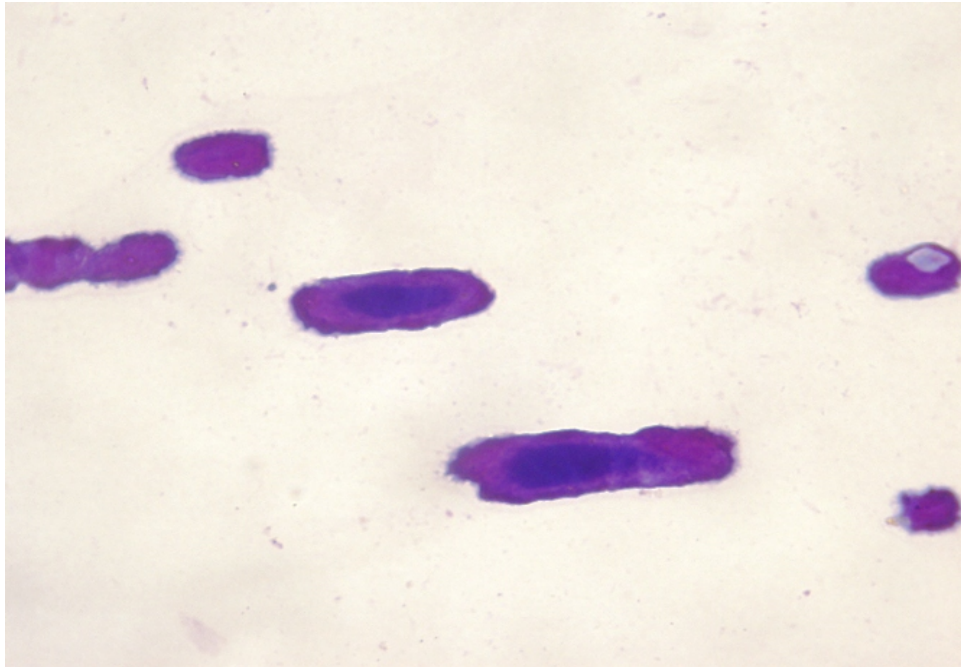


Şekil 8.14. Karanlık ortamda TiO_2 nanopartiküllere maruz kalan *L.tropica* promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri (Giemsa, 100X)



Şekil 8.15. Görünür ışık altında TiO_2 nanopartiküllerine maruz kalan *L.tropica* promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri (Giemsa, 100X)

TiO_2 nanopartiküllerine maruz kalmış promastigotlar ile enfekte edilen makrofajların kontrol grubundan farklı olarak atipik bir form aldıkları ve morfolojik özelliklerini kaybettikleri görülmektedir.(Şekil 8.14)



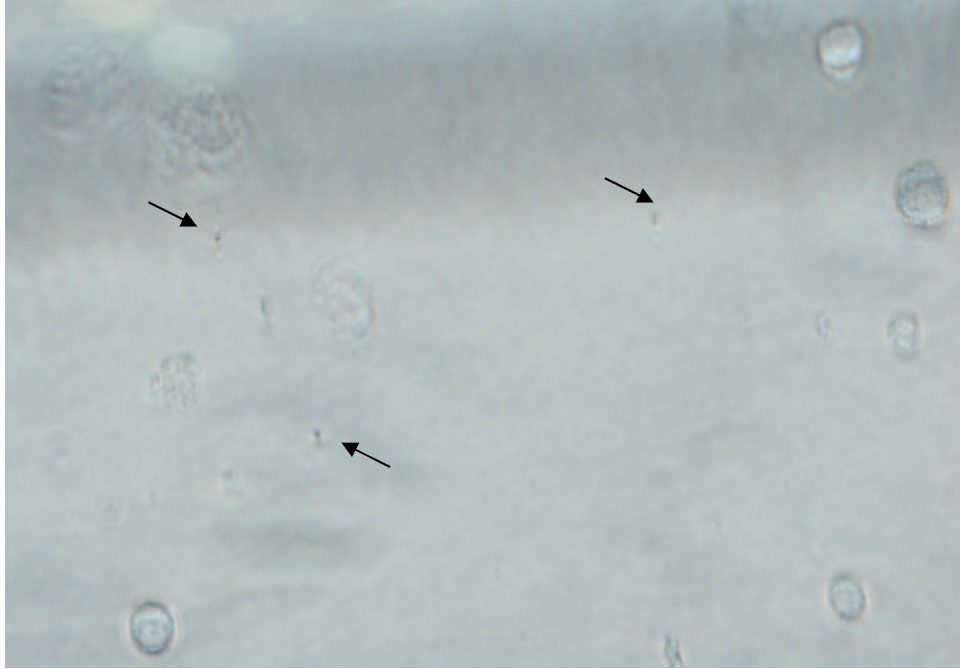
Şekil 8.16. UV ışıklı ortamda TiO_2 nanopartiküllere maruz kalan *L.tropica* promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri (Giemsa, 100X)

Şekil 8.15 ve Şekil 8.16 'de görüldüğü gibi görünür ışık ve UV ışık altında tutulan parazitlerin yüzeyinde bulunan nanopartiküllerle temas eden makrofajlardaki morfolojik değişimler karanlık ortama göre daha da belirginleşmiştir. Özellikle UV ortamda tutulan nanopartiküllere maruz kalan makrofajların boylarının uzadığı ve morfolojik özelliklerinde önemli değişiklikler olduğu görülmektedir (Şekil 8.16).

8.7. Mikrokültür Yöntemi ile TiO₂ Nanopartiküllerinin Leishmania Parazitlerinin Enfektifliğine Etkisinin İncelenmesi

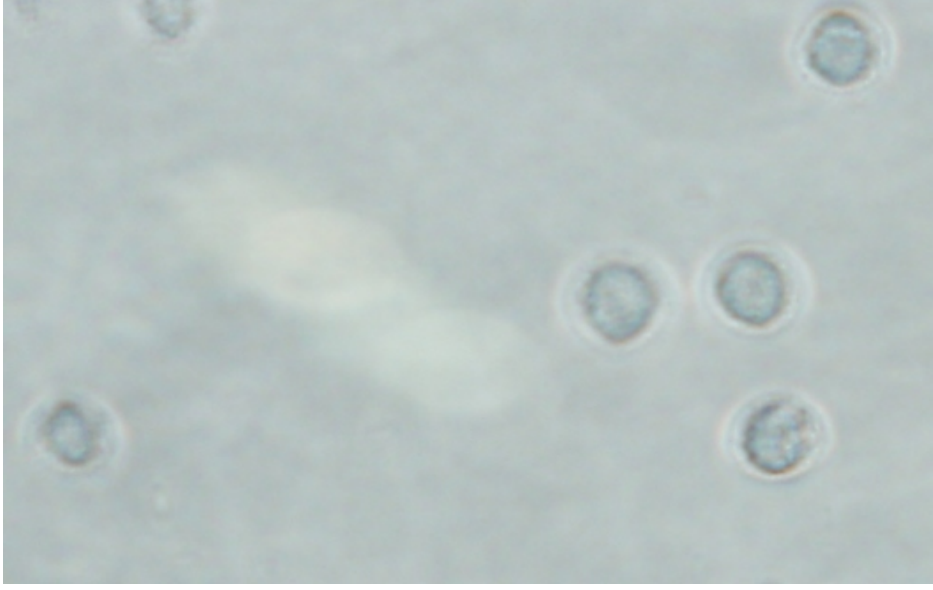
TiO₂ nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının makrofajları enfektifliği üzerindeki etkisi Mikrokültür Yöntemi (MCM) ile de incelenmiştir.

Şekil 8.17'de kontrol grubunda makrofajları enfekte eden ancak kapilerin 27 ° C'de tutulması sonucu makrofajların parçalanması ile birlikte hücre dışına çıkan ve hareketli durumda bulunan parazitlerin amastigot formları görülmektedir.



Şekil 8.17. Kontrol grubunda amastigotların kapilerdeki görüntüsü (Mikrokültür Yöntemi, 20X)

Buna karşın TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan deney grubunda makrofajların parçalanması sonucunda kapiler içerisinde parazitlerin amastigot formlarının bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 8.18).



Şekil 8.18. TiO_2 nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerle enfekte olan makrofajların kapilerdeki görüntüsü (Mikrokültür Yöntemi, 20X)

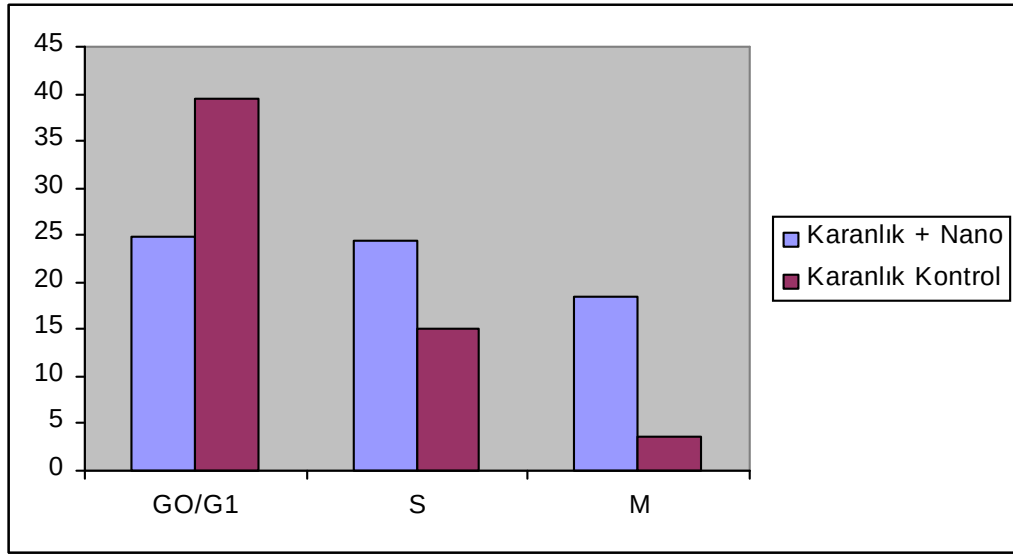
Bu sonuçlar kontrol grubunda bulunan parazitlerin makrofajları enfekte ettiğini ancak TiO_2 nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerin konak makrofaj hücrelerini enfekte edemediğini göstermektedir.

8.8. Karanlıkta, Görünür ve UV Işık Altında Titanyum Dioksit (TiO_2) Nanopartiküllerinin *L.tropica* Promastigotlarının Hücre Döngüsüne Etkisi

Deneylerde *L.tropica* promastigotları karanlıkta, görünür ve UV ışık altında TiO_2 nanopartiküllerine maruz bırakıldı. Kontrol ve deney gruplarındaki parazitlerin hücre döngüsü flow sitometrik olarak incelendi.

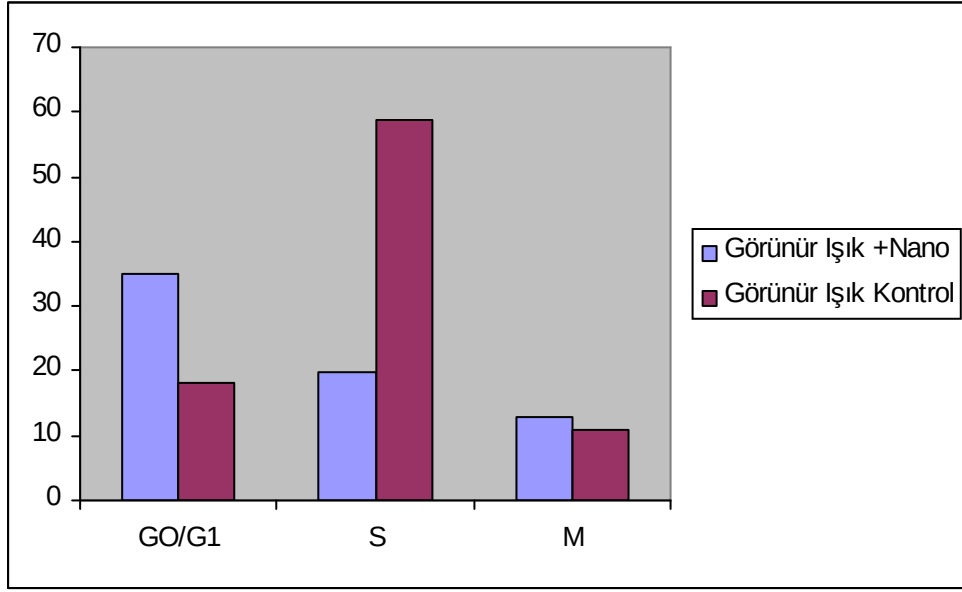
Çizelge 8.5’de karanlıkta nanopartiküllere maruz kalan *L.tropica* promastigotlarının kontrole nazaran daha az miktarda G0/G1 evresinde bulunduklarını ve çok sayıda parazitin S evresinde olduğu görülmektedir. TiO_2 bulunan ortamdaki promastigotların kontrole göre daha fazla miktarda M evresinde bulunduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 8.5 Karanlıkta TiO₂ nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının hücre döngüsüne etkisi



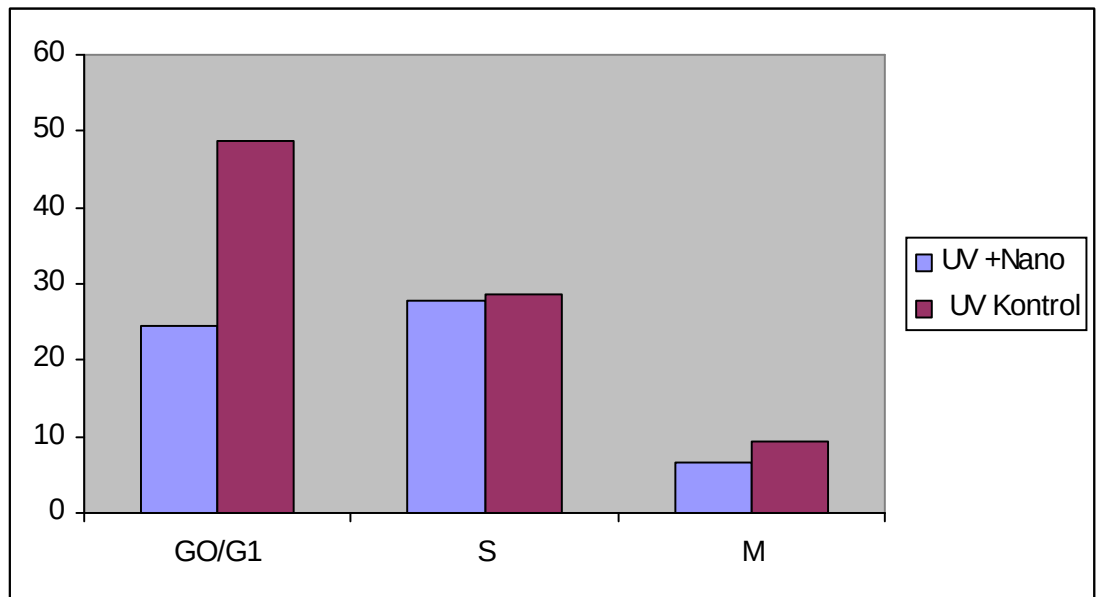
Çizelge 8.6’da ise görünür ışık altında nanopartiküllere maruz kalan *L.tropica* promastigotlarının kontrole nazaran daha fazla G0/G1 evresinde bulundukları ve az miktarda parazitin S evresine geçerek DNA sentezini gerçekleştirdikleri görülmüştür. Buna karşın kontrol grubunda G0/G1 evresinde bulunan parazitlerin sayısının oldukça az olduğu ve parazitlerin çoğunun S evresine geçerek DNA sentezine başladıkları tespit edilmiştir. M evresinde ise iki grup arasında büyük bir farklılık gözlenmemekle birlikte nanopartiküllere maruz kalan deney grubundaki parazitlerin kontrol grubuna göre daha fazla miktarda mitoz evresinde bulundukları belirlenmiştir.

Çizelge 8.6. Görünür ışıktaki TiO_2 nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının hücre döngüsüne etkisi



Çizelge 8.7’de ise UV ışık altında TiO_2 nanopartiküllerine maruz kalan deney grubundaki parazitlerin kontrole nazaran daha az miktarda G0/G1 evresinde kaldıkları görülmektedir. Bununla birlikte S evresinde her iki grup için anlamlı bir fark görülmezken M evresinde nanopartiküllere maruz kalan deney grubunda parazit sayısında belirgin bir azalma meydana gelmiştir.

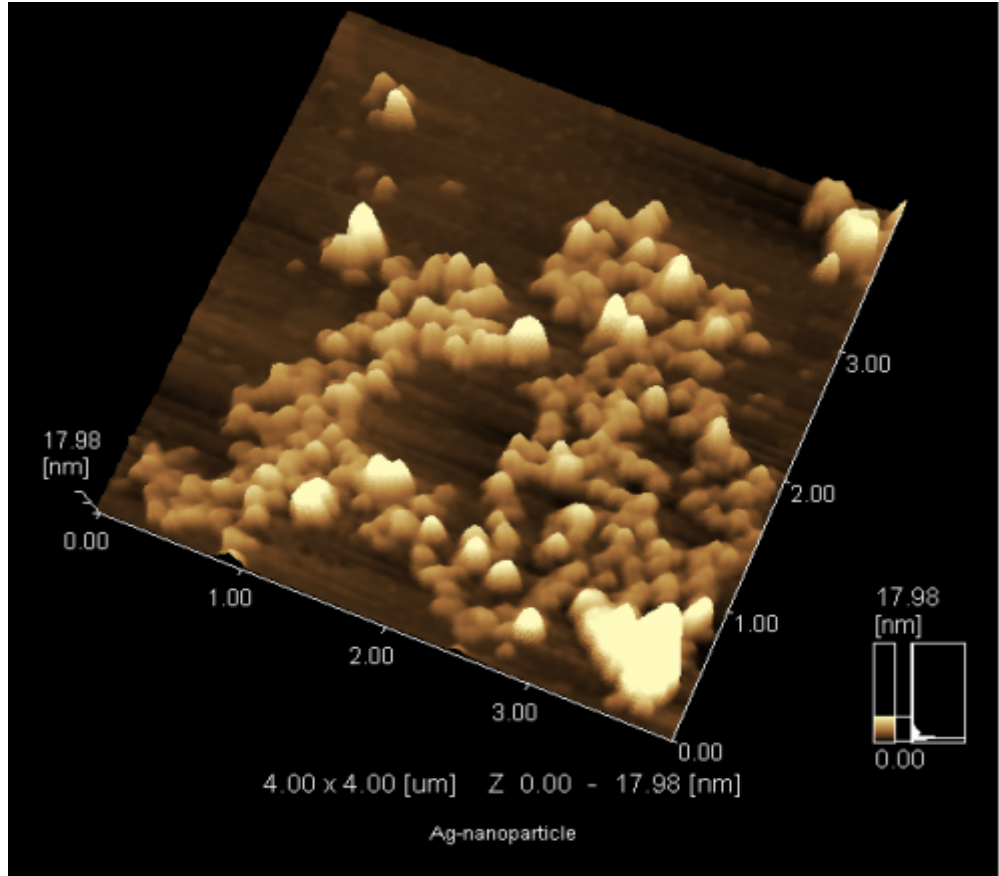
Çizelge 8.7. Görünür ışıktaki TiO_2 nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının hücre döngüsü üzerine etkisi



Böylece TiO₂ nanopartiküllerinin karanlıkta, görünür ışıktaki ve UV ışık altında *L.tropica* promastigotlarının hücre döngüsüne etkisinin incelenmesi sonucunda özellikle görünür ve UV ışık altında TiO₂ nanopartiküllerinin parazitlerin hücre döngüsüne etki gösterdiği tespit edilmiştir. Görünür ışık altında TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerde DNA sentezinin, UV ışık altında TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerde ise hücre bölünmesinin kontrol gruplarına göre anlamlı bir şekilde azaldıkları belirlenmiştir.

8.9. Gümüş Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

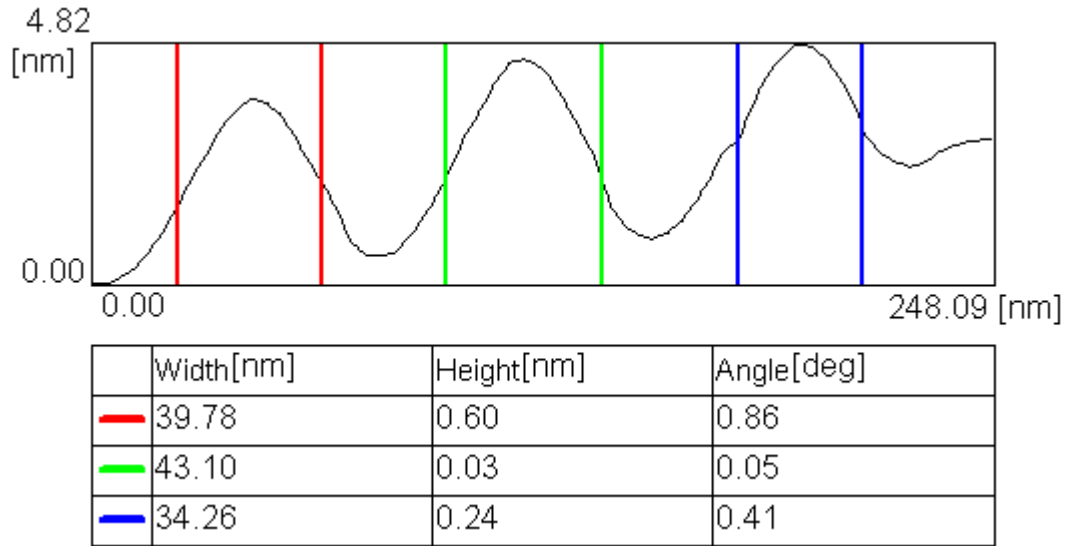
Bu bölümde deneylerde kullanılacak gümüş nanopartiküllerinin karakterizasyonu ve boyutlarının ölçümü için Atomik Force Mikroskop kullanılmıştır. Şekil 8.19'da Atomik Force Mikroskop altında gümüş nanopartiküllerinin üç boyutlu görüntüsü, Çizelge 8.8'de ise gümüş nanopartiküllerinin ortalama boyutları verilmiştir.



Şekil 8.19. Atomik Force Mikroskop altında gümüş nanopartiküllerinin üç boyutlu görüntüsü

Şekil 8.19'da $16 \mu\text{m}^2$ 'lik alanda bulunan gümüş nanopartiküllerinin yuvarlak ve oval şekilli oldukları ve bir arada bulunmaya meyilli oldukları için bir yığın halinde bulundukları belirlenmiştir.

Çizelge 8.8. Gümüş nanopartiküllerinin Atomik Force Mikroskop altında boyut ölçümü değerleri

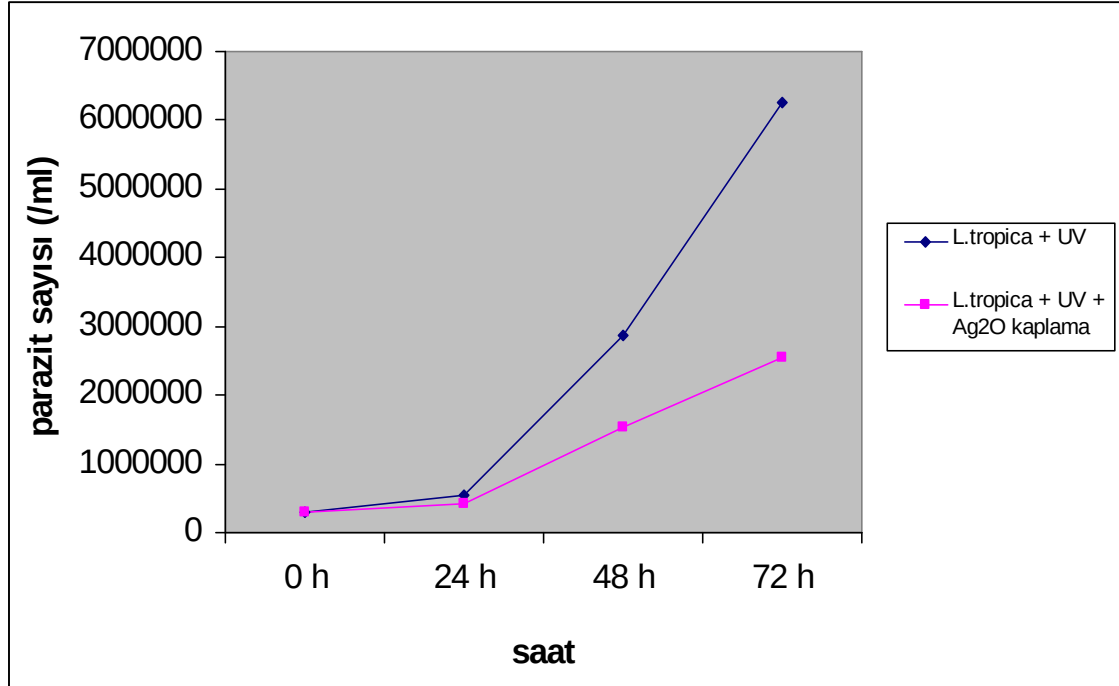


Çizelge 8.8'de Atomik Force Mikroskop altında gümüş nanopartiküllerinin ortalama boyutları belirlenmiştir. Buna göre görüntü alanının farklı bölgelerinden yapılan boyut analizine göre gümüş nanopartiküllerinin ortalama olarak 39.06 nm boyutunda olduğu tespit edildi.

8.10. Gümüş Nanopartiküllerini İçeren Kaplamaların UV Işık Altında *L.tropica* Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

Çizelge 8.9'da UV ışık altında gümüş nanopartiküllerinin 24, 48 ve 72 saat sonunda *L.tropica* promastigotlarının proliferasyonuna etkisi verilmiştir. Kontrol grubuna nazaran gümüş nanopartiküllerini bulunduran deney grubunda tüm zaman dilimlerinde parazit sayısında anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Bununla birlikte 72. saatin sonunda UV ışık altında gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotları üzerindeki etkisi daha da belirginleşmiştir.

Çizelge 8.9. Gümüş nanopartiküllerini içeren kaplamaların UV ışık altında *L.tropica* promastigotları üzerindeki etkisi



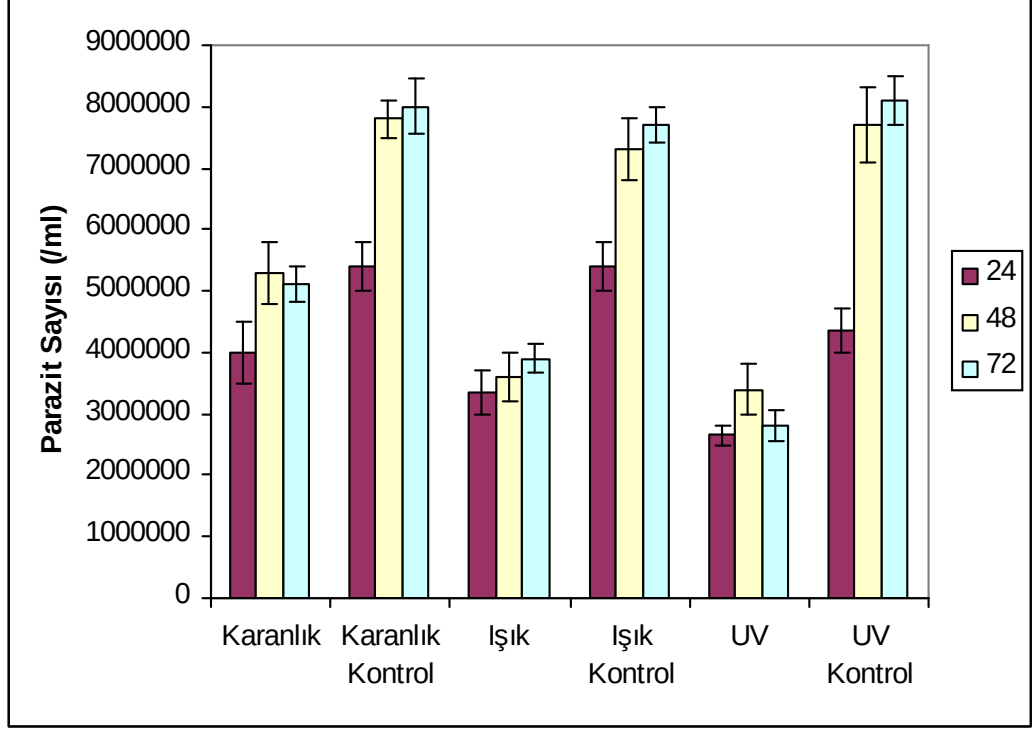
Görüldüğü üzere 72 saatin sonunda UV ışık ile aktive edilen gümüş nanopartikülleri, tek başına UV ışık muamelesine oranla *L.tropica* promastigotlarının proliferasyonuna yaklaşık 2,5 kat daha fazla etki göstermiştir. Deney sonucu inkübasyon süresinin artması ile birlikte UV ışık altında gümüş nanopartiküllerine maruz kalan grupta promastigot sayısında belirgin bir azalmanın olduğunu ortaya çıkarmıştır.

8.11. Gümüş Nanopartiküllerini İçeren Kaplamaların *L.tropica* Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

Gümüş nanopartiküllerini içeren kaplamaların, *L.tropica* promastigotlarının proliferasyonuna etkisi, karanlıkta, görünür ışık ve UV ışık altında incelendi. Kaplamaların 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu ile promastigotların proliferasyonları üzerine etkisi kantitatif olarak belirlendi.

Çizelge 8.10'da kontrol ile kıyaslandığında gümüş nanopartiküllerine maruz kalan deney gruplarının tümünde parazit sayısında anlamlı bir azalma meydana geldiği görülmektedir. Bu etkinin incelenen tüm inkübasyon sürelerinde belirgin bir şekilde devam ettiği tespit edilmiştir.

Çizelge 8.10. Gümüş nanopartiküllerini içeren kaplamaların karanlıkta, görünür ve UV ışık altında *L.tropica* promastigotlarının proliferasyonuna etkisi



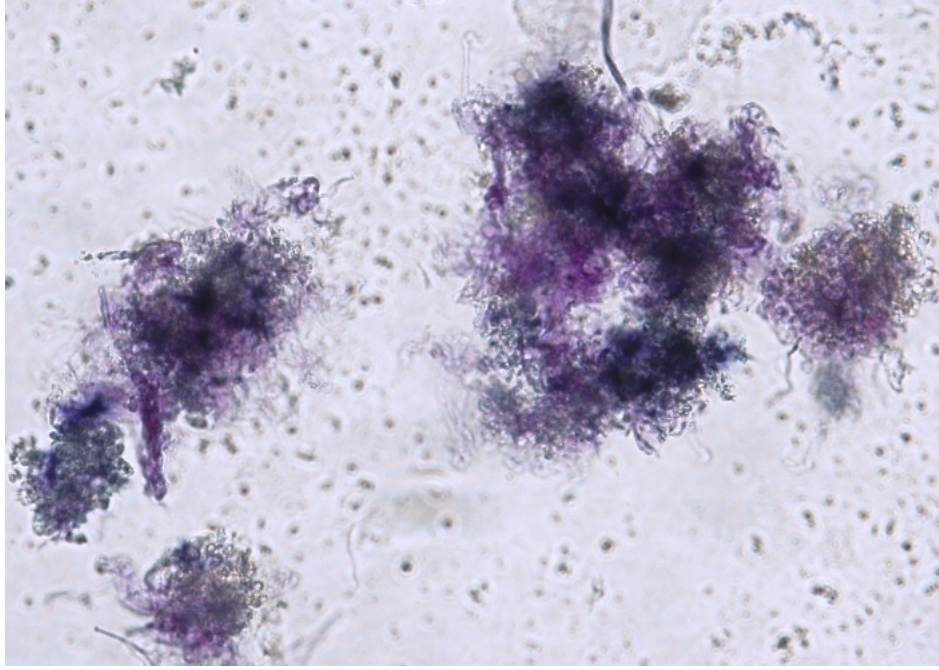
Çizelge 8.10’da görüldüğü gibi, gümüş nanopartiküllerini içeren kaplamaların promastigotların proliferasyonu üzerine etkisi görünür ışık ve UV ışık altındaki ortamda, karanlık ortama göre oldukça fazladır. *L.tropica* promastigotlarını proliferasyonuna etki en fazla UV ışık altında gümüş nanopartikülleri ile inkübasyon sonucunda tespit edilmiştir.

Gümüş nanopartikülleri bulunmayan UV ışık altındaki deney grubuna nazaran UV ışık altında gümüş nanopartiküllerine maruz kalan parazit sayısında yaklaşık 2,5-3 kat azalma olduğu tespit edilmiştir.

8.12. Gümüş Nanopartiküllerinin Farklı Konsantrasyonlarının *L.tropica* Promastigotlarının Metabolik Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi

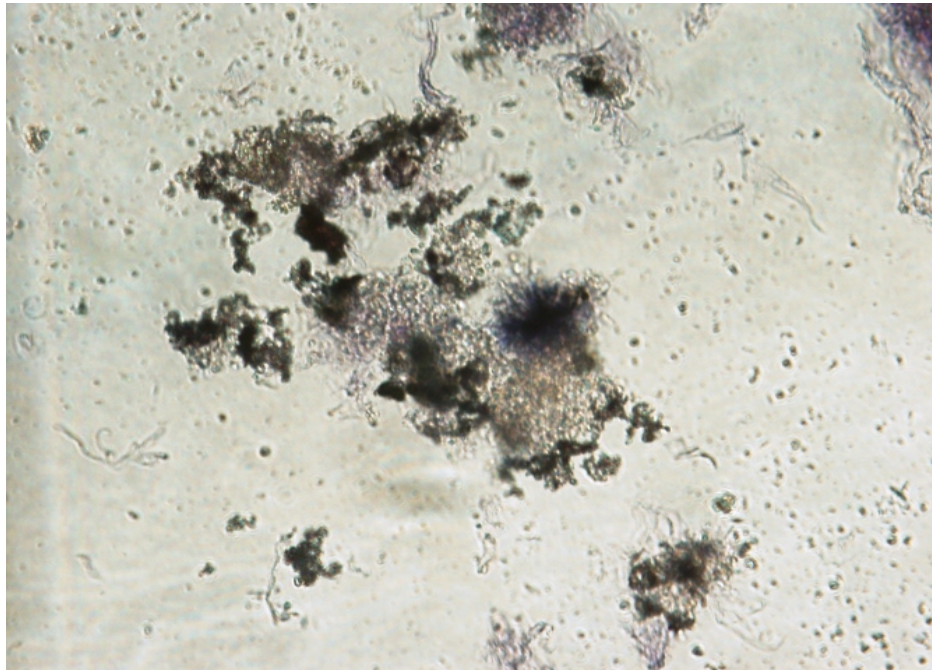
Gümüş nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının karanlıkta ve UV ışık altında *L.tropica* promastigotlarının metabolik aktivitesine etkisi mikroskopik olarak ve MTT yöntemi ile incelenmiştir.

Şekil 8.20’de karanlık ve nanopartikül bulunmayan ortamda (kontrol grubu) *L.tropica* promastigotlarındaki formazan kristali oluşumu görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi promastigotlarının canlılığının yüksek olmasına bağlı olarak formazan kristali oluşumu oldukça yoğundur.



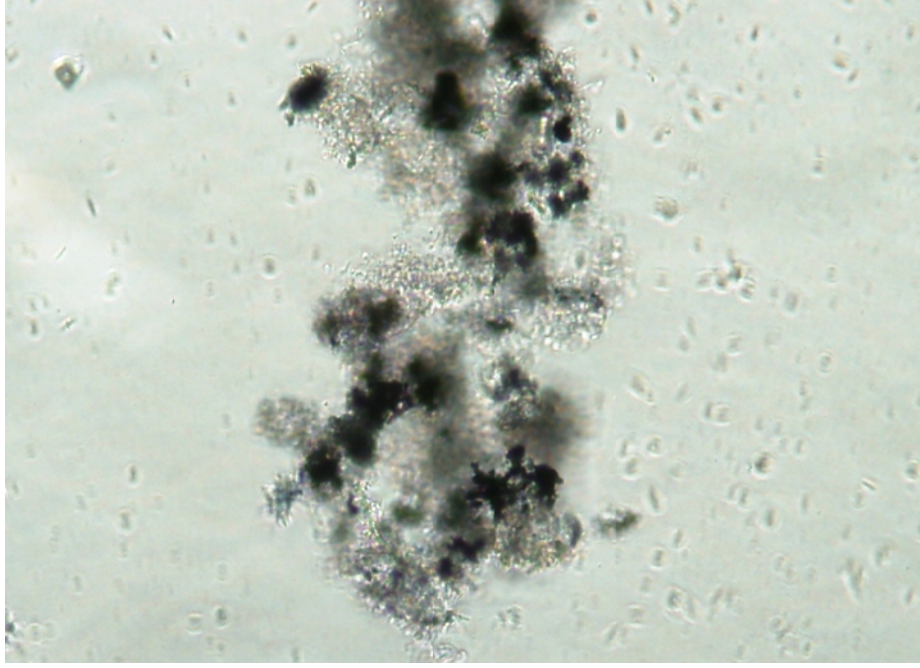
Şekil 8.20. *L.tropica* promastigotlarında formazan kristallerinin oluşumu (40 X)

Gümüş nanopartiküllerinin bulunduğu deney gruplarında ise konsantrasyonunun artması ile birlikte formazan kristallerinin oluşumunun azaldığı gözlenmiştir. Özellikle 150 $\mu\text{g/ml}$ (Şekil 8.21) ve 200 $\mu\text{g/ml}$ (Şekil 8.22) konsantrasyonda formazan kristallerinin oldukça az miktarda oluştukları tespit edilmiştir.



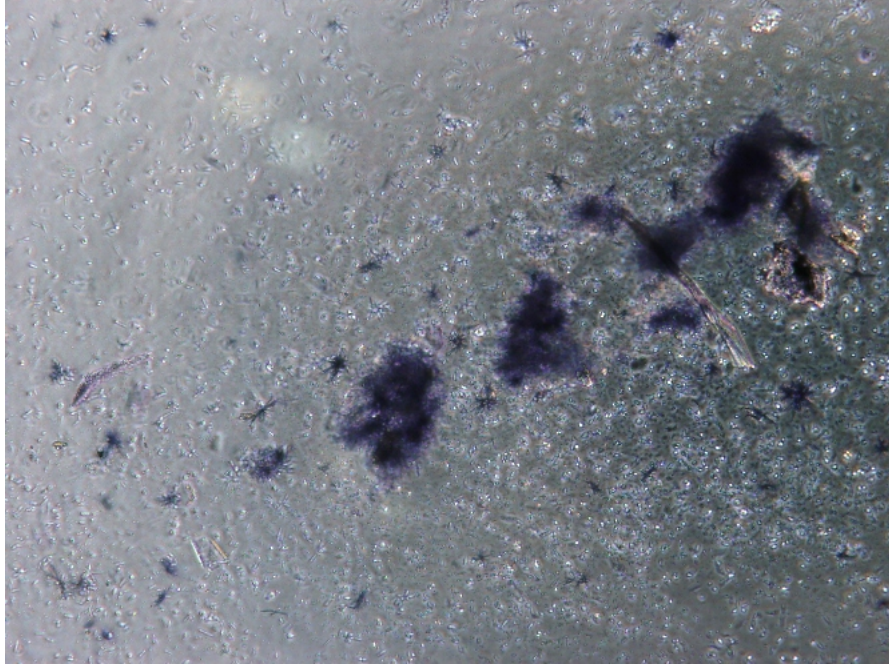
Şekil 8.21. Gümüş nanopartiküllerinin (150 $\mu\text{g/ml}$) karanlık ortamda *L.tropica* promastigotlarına sitopatik etkisi (40 X)

Şekil 8.21 ve 8.22’de yüksek konsantrasyonlarda (150 ve 200 µg/ml) gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının metabolik aktivitesine etkisi net bir biçimde görülmektedir.

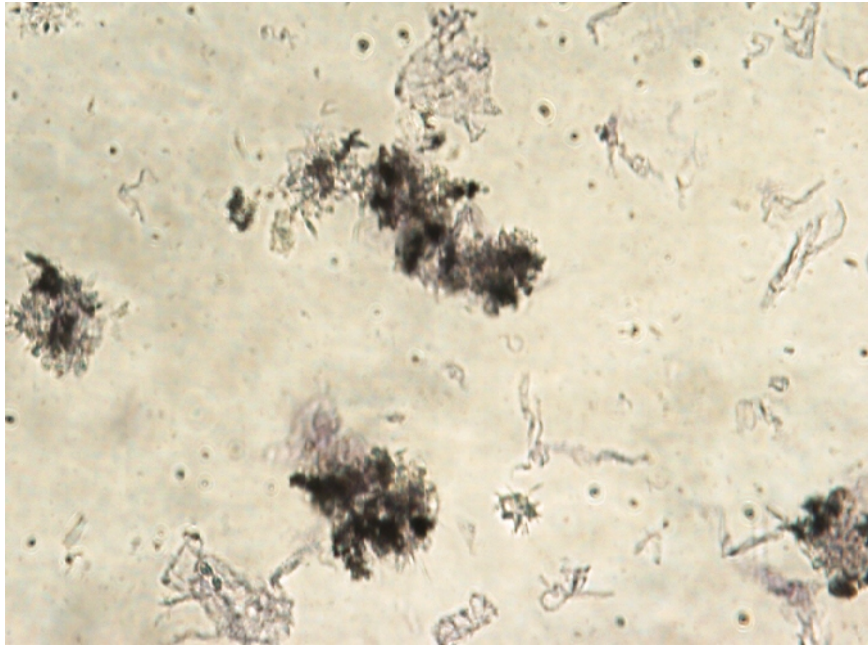


Şekil 8.22. Gümüş nanopartiküllerinin (200 µg/ml) karanlık ortamda *L.tropica* promastigotlarına sitopatik etkisi (40 X)

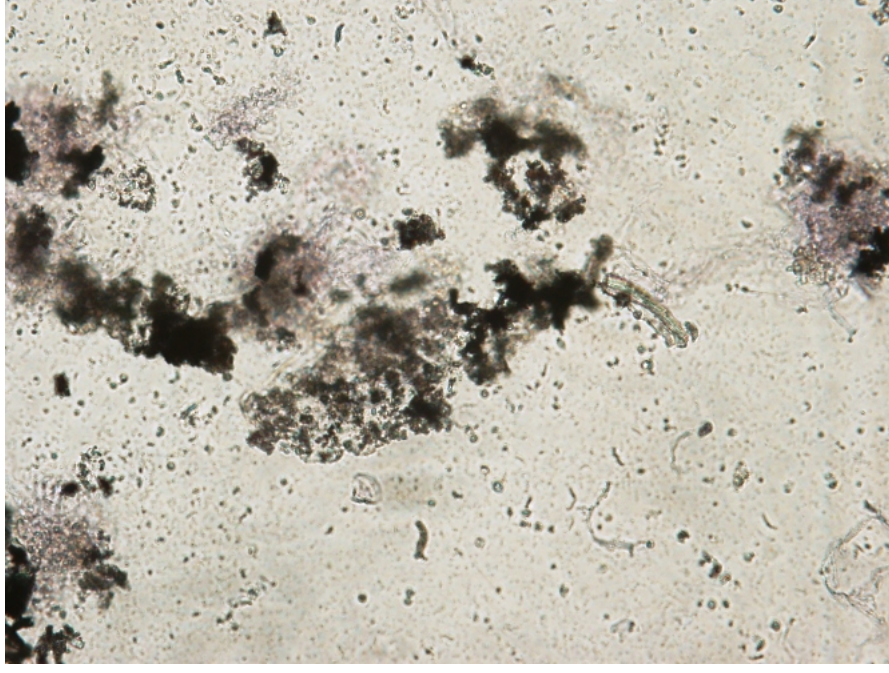
Karanlıkta elde edilen sonuçlara benzer şekilde UV ışık altında da yüksek konsantrasyonlarda gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının metabolik aktivitesini azalttıkları mikroskopik olarak tespit edilmiştir. Şekil 8.23’de nanopartikül bulunmayan UV ışıklı ortamda formazan kristallerinin oluştuğu görülmektedir. Buna karşın 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonda gümüş nanopartiküllerine maruz kalan deney gruplarında formazan kristallerinin çok az miktarda oldukları görülmüştür.(Şekil 8.24 ve Şekil 8.25)



Şekil 8.23. UV ışık bulunan ortamda *L.tropica* promastigotlarında formazan kristallerinin oluşumu (40 X)



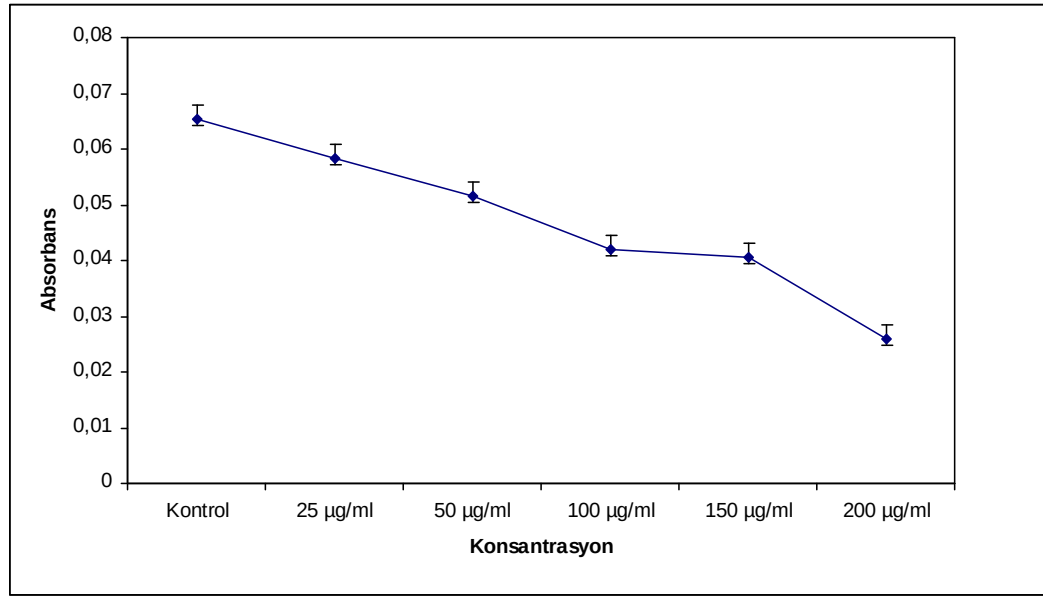
Şekil 8.24. Gümüş nanopartiküllerinin (150 $\mu\text{g/ml}$) UV ışıklı ortamda *L.tropica* promastigotlarına sitopatik etkisi(40 X)



Şekil 8.25. Gümüş nanopartiküllerinin (200 µg/ml) UV ışıklı ortamda *L.tropica* promastigotlarına sitopatik etkisi (40X)

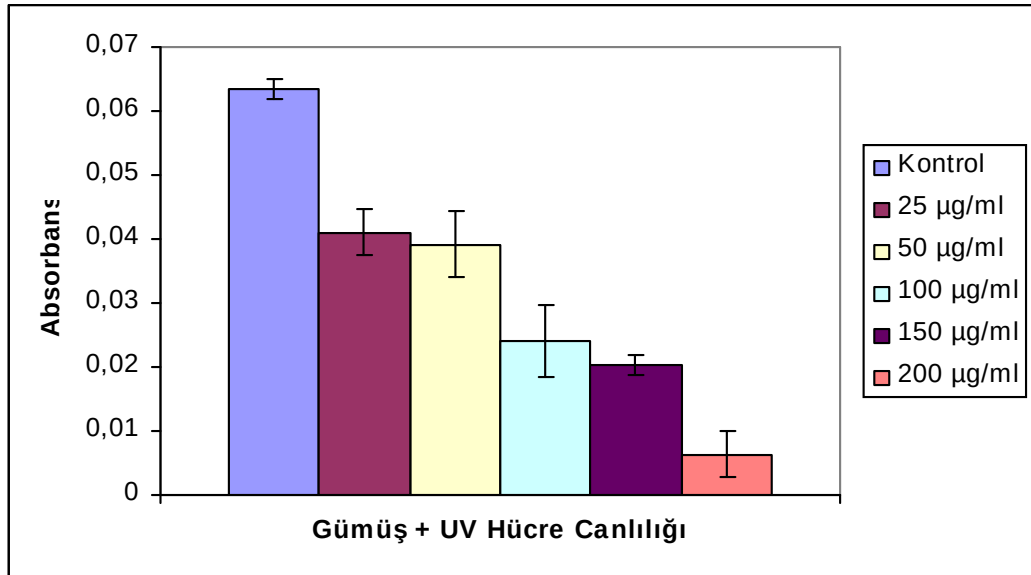
Daha sonraki deney gruplarında gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının metabolik aktivitesine etkisi MTT yöntemi ile incelenmiştir. Çizelge 8.11’de gümüş nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının karanlıkta *L.tropica* promastigotlarının metabolik aktivitesine etkisi MTT yöntemi ile gösterilmektedir. Çizelge 8.11’de görüldüğü üzere gümüş nanopartiküllerinin konsantrasyonu artmasıyla birlikte *L.tropica* promastigotlarının metabolik aktivitesi azalmaktadır. Kontrol ile kıyaslandığında 25 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonunda gümüş nanopartiküllerine maruz kalan *L.tropica* promastigotlarında metabolik aktivite değeri anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak gümüş nanopartiküllerine 100 µg/ml konsantrasyonundan itibaren maruz kalan *L.tropica* promastigotlarının metabolik aktivite değeri kontrole göre yaklaşık 4 kata kadar azalmıştır.

Çizelge 8.11. Gümüş nanopartiküllerinin karanlıkta konsantrasyona bağlı olarak *L.tropica* promastigotlarının metabolik aktivitesine etkisi



Gümüş nanopartiküllerinin UV ışık altında Leishmania parazitlerinin canlılığı üzerine etkisi incelendiğinde nanopartikül konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak deney gruplarındaki hücre canlılık miktarının giderek azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 8.12). Deney grupları içerisinde parazitler üzerindeki en büyük etkiyi UV ışık ile birlikte 200 µg/ml konsantrasyonda gümüş nanopartikülleri göstermiştir.

Çizelge 8.12. Gümüş nanopartiküllerinin UV ışık altında konsantrasyona bağlı olarak *L.tropica* promastigotlarının metabolik aktivitesine etkisi

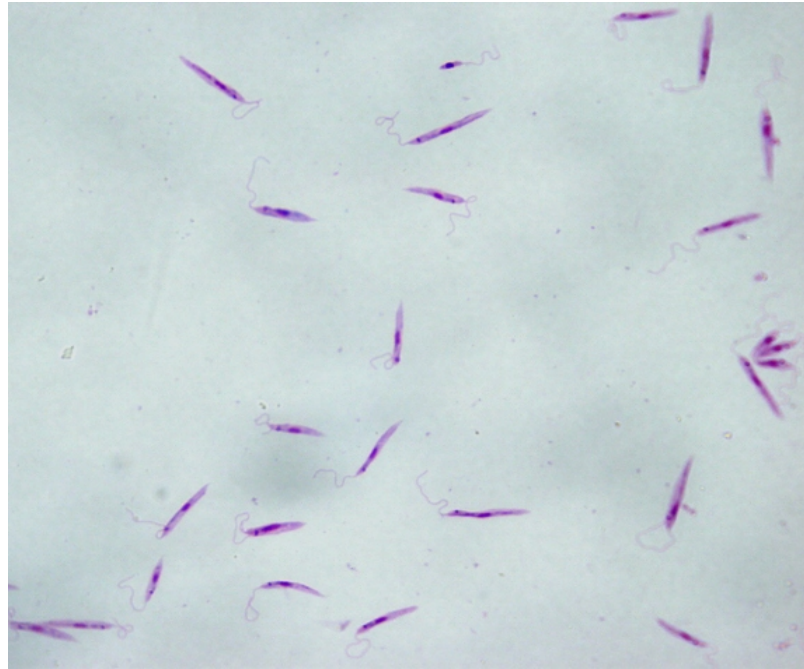


Deney sonuçları gümüş nanopartiküllerinin hem karanlık ortam koşullarında hem de UV ışık altında *L.tropica* parazitleri üzerinde etki ettiğini göstermiştir. Karanlık ortam

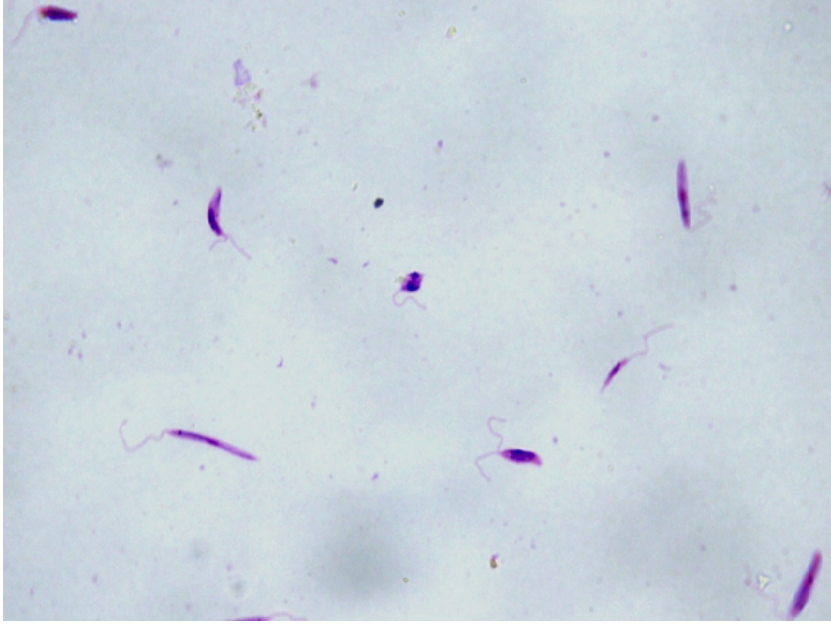
koşullarında kontrol ile kıyaslandığında parazitlerin metabolik aktivite değerinin yüksek konsantrasyonlarda yaklaşık 2,5 kat, UV ışık altında ise yaklaşık 6,5 kat azaldığı belirlenmiştir.

8.13. Karanlıkta ve UV Işık Altında Gümüş Nanopartiküllerine Maruz Kalan *L.tropica* Promastigotlarının Morfolojilerinin İncelenmesi

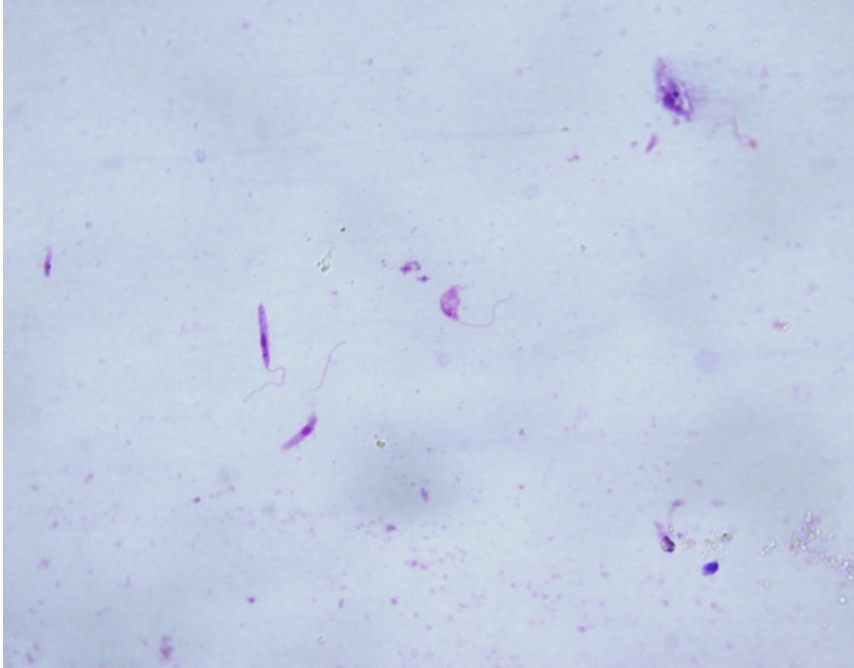
Şekil 8.26'da gümüş nanopartiküllerine ve UV ışığa maruz kalmayan kontrol grubundaki promastigotların giemsa boyama sonrasında morfolojilerini korudukları ve hücre organellerinin (nukleus, kinetoplast ve kamçı) net bir biçimde ayırt edilebildiği görülmektedir. Buna karşın karanlıkta gümüş nanopartiküllerine maruz kalan *L.tropica* promastigotlarının morfolojilerini kaybettikleri ve organellerinin net bir biçimde ayırt edilemediği tespit edilmiştir. (Şekil 8.27) Benzer şekilde gümüş nanopartikülleri ile birlikte UV ışığa maruz kalan deney gruplarında da promastigotların hücre membranlarının bozulmasıyla parazitlerin atipik bir form aldıkları belirlenmiştir.(Şekil 8.28)



Şekil 8.26. Karanlıkta gümüş nanopartiküllerini içermeyen ortamda (kontrol grubunda) bulunan parazitlerin mikroskopik görüntüsü (Giemsa, 100X)



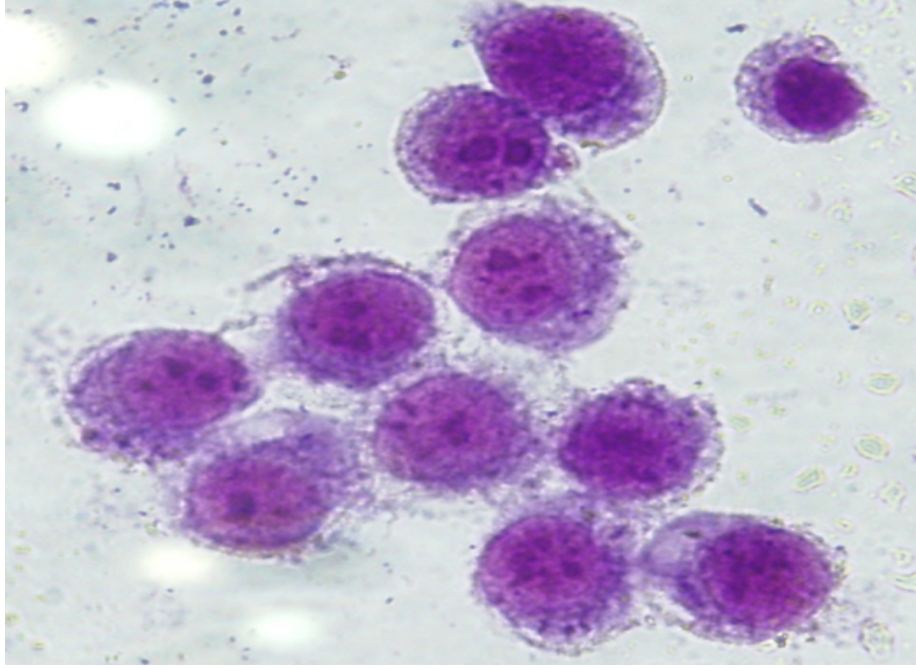
Şekil 8.27. Karanlıkta gümüş nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerin mikroskopik görüntüsü (Giemsa, 100X)



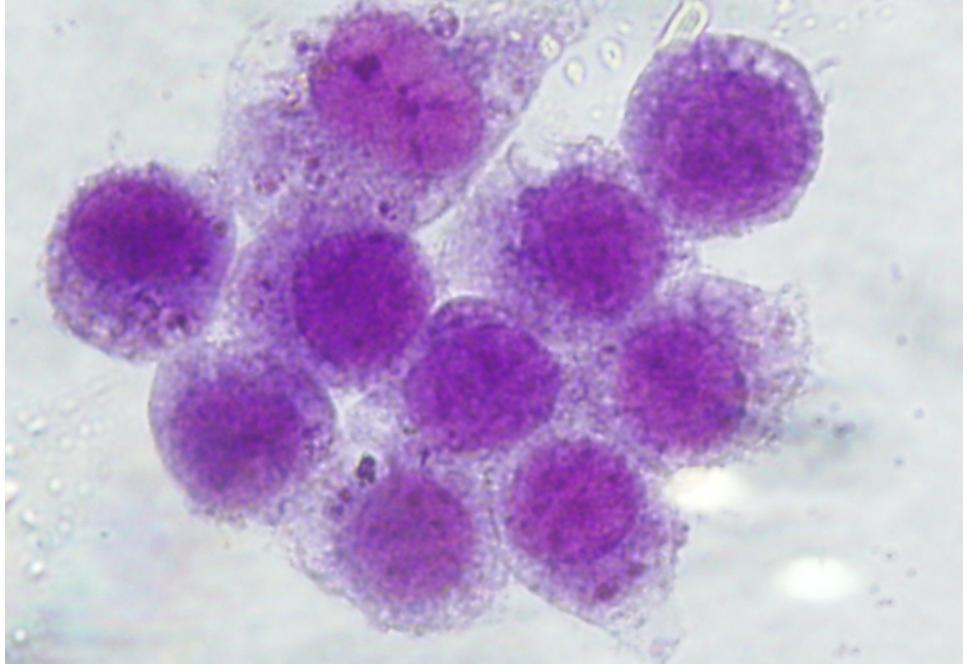
Şekil 8.28. UV ışık altında gümüş nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerin mikroskopik görüntüsü (Giemsa, 100X)

8.14. Gümüş Nanopartiküllerinin Leishmania Parazitlerinin Enfektifliğine Etkisinin İncelenmesi

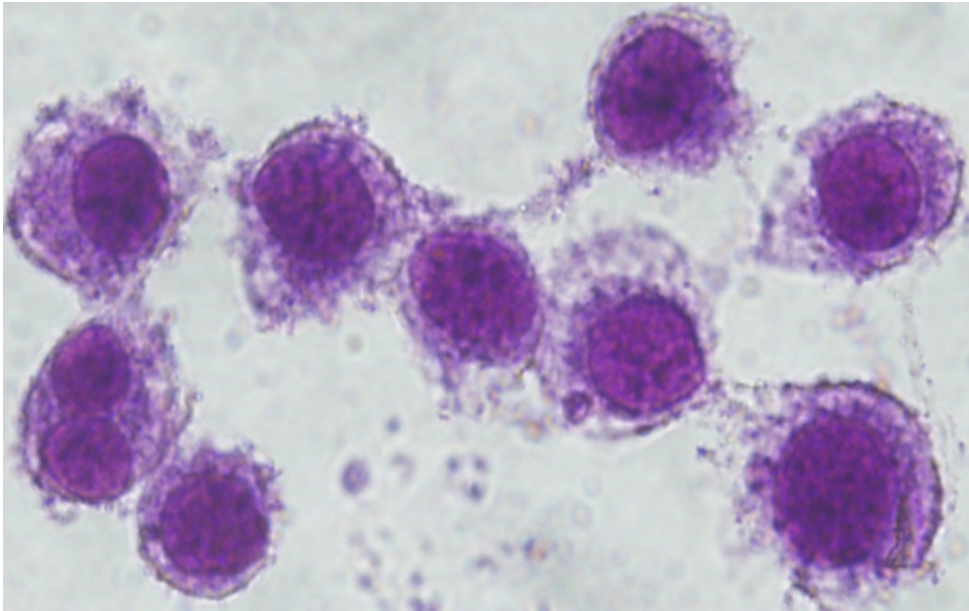
Şekil 8.29’da herhangi bir ışık ve nanopartikül uygulamasına maruz kalmamış kontrol grubundaki promastigotların makrofajları enfekte ederek amastigot formuna dönüştükleri gözlenmiştir. Benzer şekilde yalnızca görünür (Şekil 8.30) ve UV ışığa (Şekil 8.31) maruz kalan deney gruplarındaki promastigotların da makrofajları enfekte ettikleri tespit edilmiştir. Ayrıca her 3 grupta da makrofajların morfolojilerinin düzgün olduğu, hücrelerin intaktlığını koruduğu tespit edilmiştir.



Şekil 8.29. *L.tropica* promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri



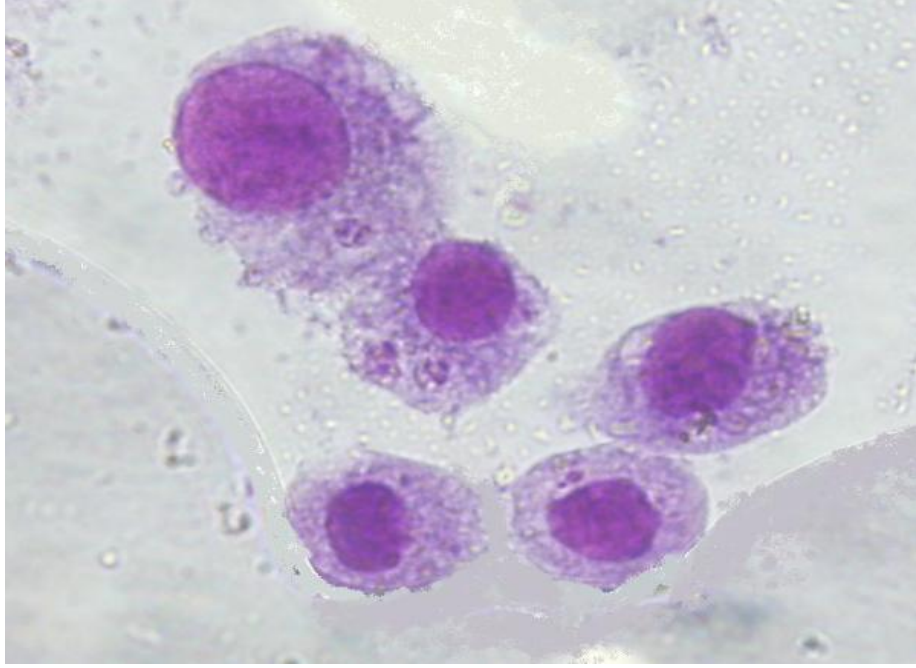
Şekil 8.30. Görünür ışığa maruz bırakılan *L. tropica* promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri



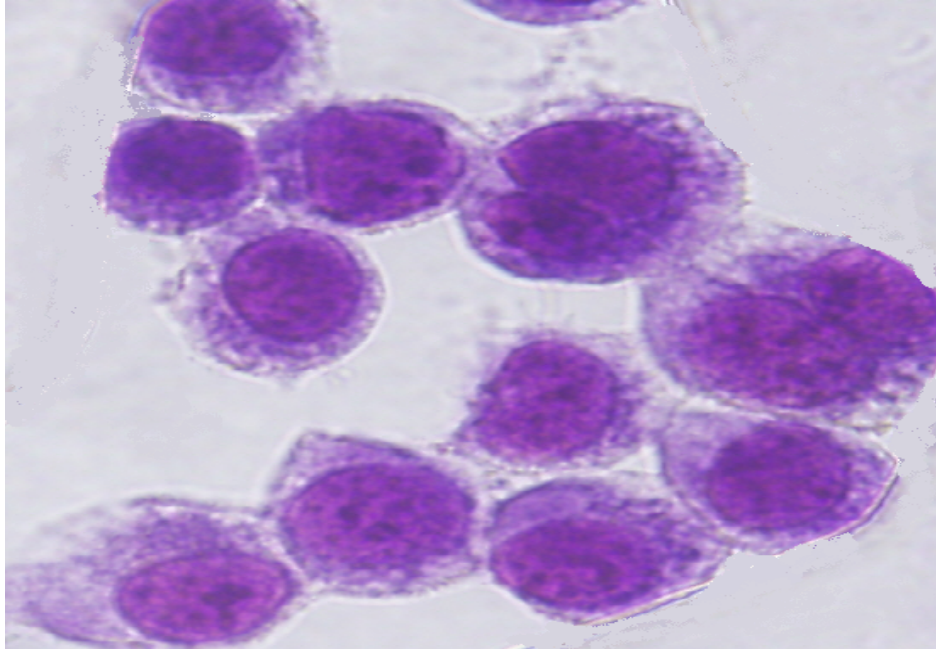
8.31. UV ışığa maruz bırakılan *L. tropica* promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri

Şekil 8.32’de karanlıkta gümüş nanopartiküllerine maruz kalan *L. tropica* promastigotlarının kontrol grupları ile kıyaslandığında daha az miktarda da olsa makrofajları enfekte ettikleri gösterilmiştir. Ancak gümüş nanopartikülleri ile birlikte görünür ışığa maruz kalan promastigotların (Şekil 8.33) ve gümüş nanopartikülleri ile

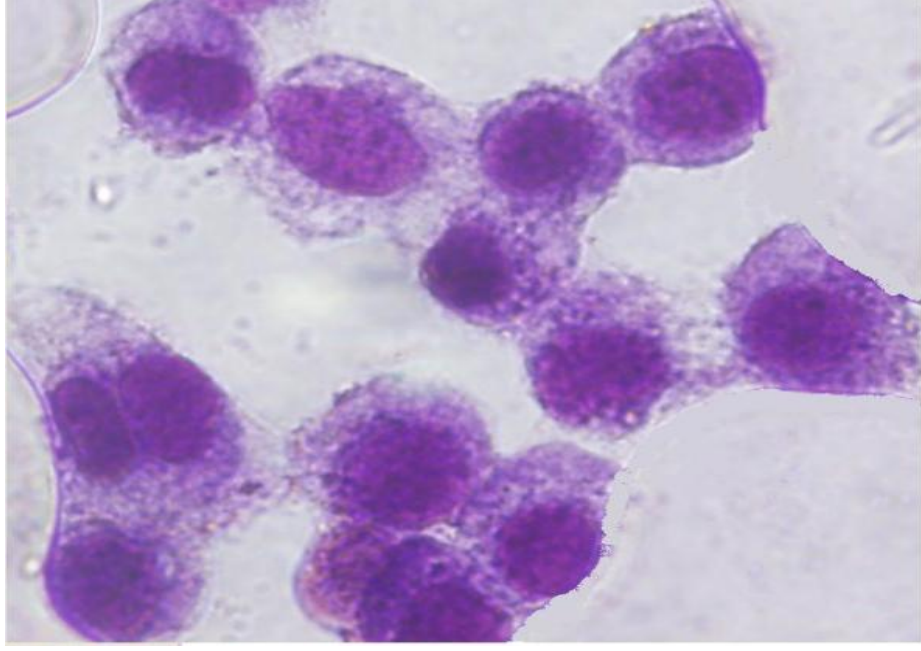
birlikte UV ışığa maruz kalan promastigotların (Şekil 8.34) makrofajları enfekte edemedikleri belirlenmiştir.



8.32. Karanlık ortamda nanopartiküllere maruz kalan *L.tropica* promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri



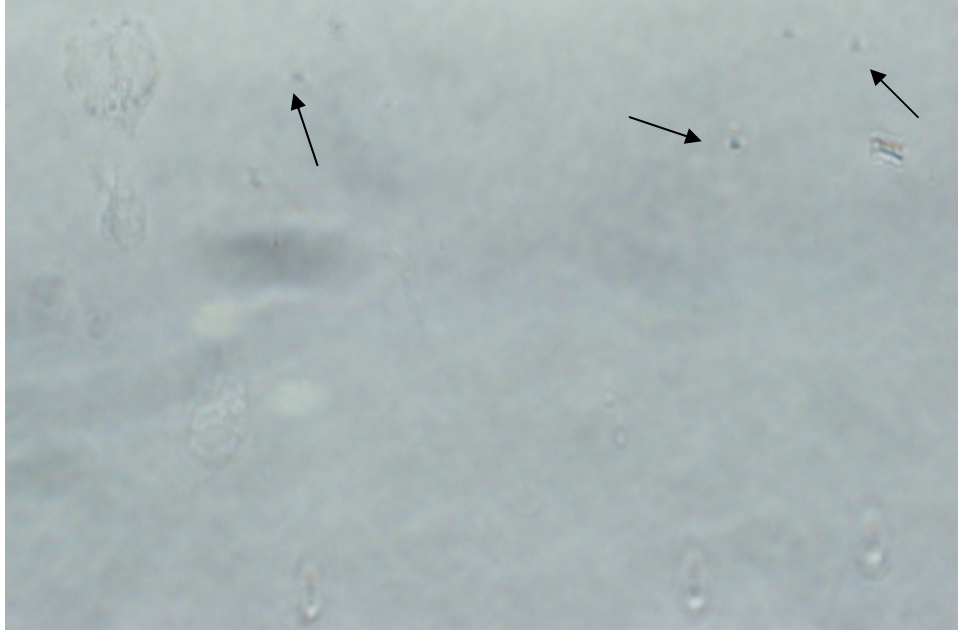
Şekil 8.33. Görünür Işık altında nanopartiküllere maruz kalan *L.tropica* promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri



Şekil 8.34. UV ışık altında nanopartiküllere maruz kalan *L.tropica* promastigotları ile enfekte olmuş makrofaj hücreleri

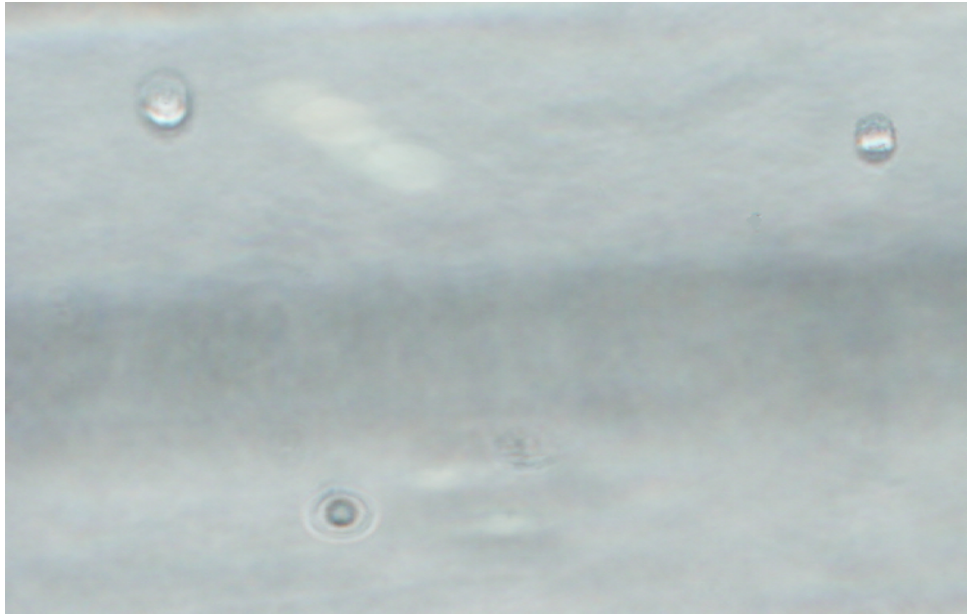
8.15. Mikrokültür Yöntemi ile Gümüş Nanopartiküllerinin Leishmania Parazitlerinin Enfektifliği Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının makrofajları enfektifliği üzerindeki etkisi Mikrokültür Yöntemi (MCM) ile de incelenmiştir. Şekil 8.35’de kontrol grubunda makrofajları enfekte eden ancak kapilerin 27 ° C’de tutulması sonucu makrofajların parçalanması ile birlikte hücre dışına çıkan ve hareketli durumda bulunan parazitlerin amastigot formları görülmektedir.



Şekil 8.35. Kontrol grubunda amastigotların kapilerdeki görüntüsü (Mikrokültür Yöntemi, 20X)

Buna karşın gümüş nanopartiküllerine maruz kalan deney grubunda makrofajların parçalanması sonucunda kapiler içerisinde parazitlerin amastigot formlarının bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 8.36)



Şekil 8.36. Gümüş nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerle enfekte olan makrofajların kapilerdeki görüntüsü (Mikrokültür Yöntemi, 20X)

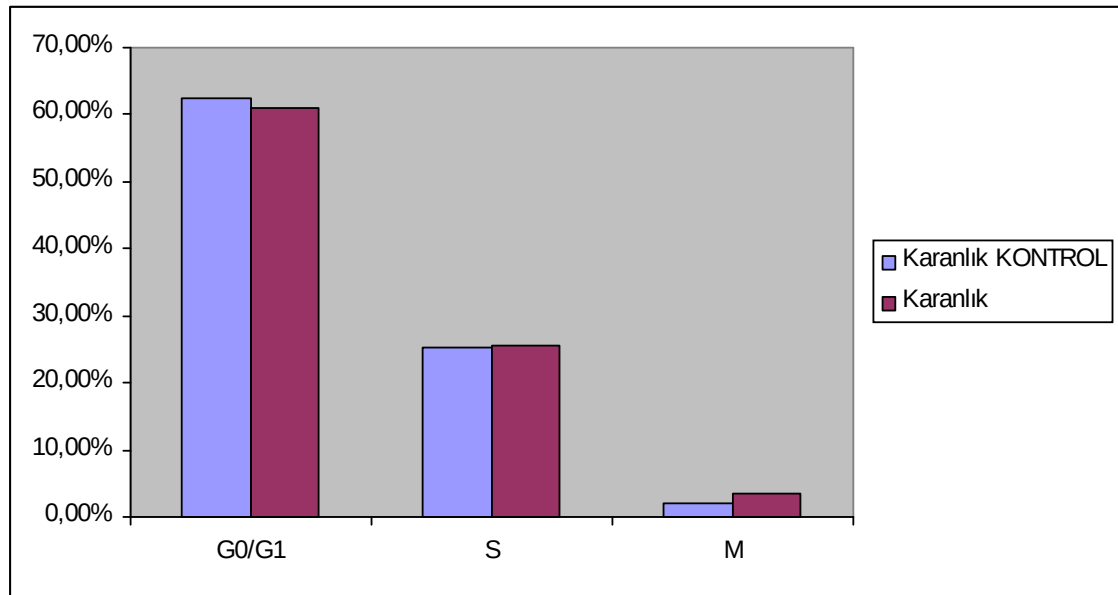
Bu sonuçlar kontrol grubunda bulunan parazitlerin makrofajları enfekte ettiğini ancak gümüş nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerin konak makrofaj hücrelerini enfekte edemediğini göstermektedir.

8.16. Gümüş Nanopartiküllerinin *L.tropica* Promastigotlarının Hücre Döngüsüne Etkisi

Karanlıkta, görünür ve UV ışık altında gümüş nanopartiküllerine maruz kalan *L.tropica* promastigotlarının hücre döngüsü flow sitometrik olarak incelenmiştir.

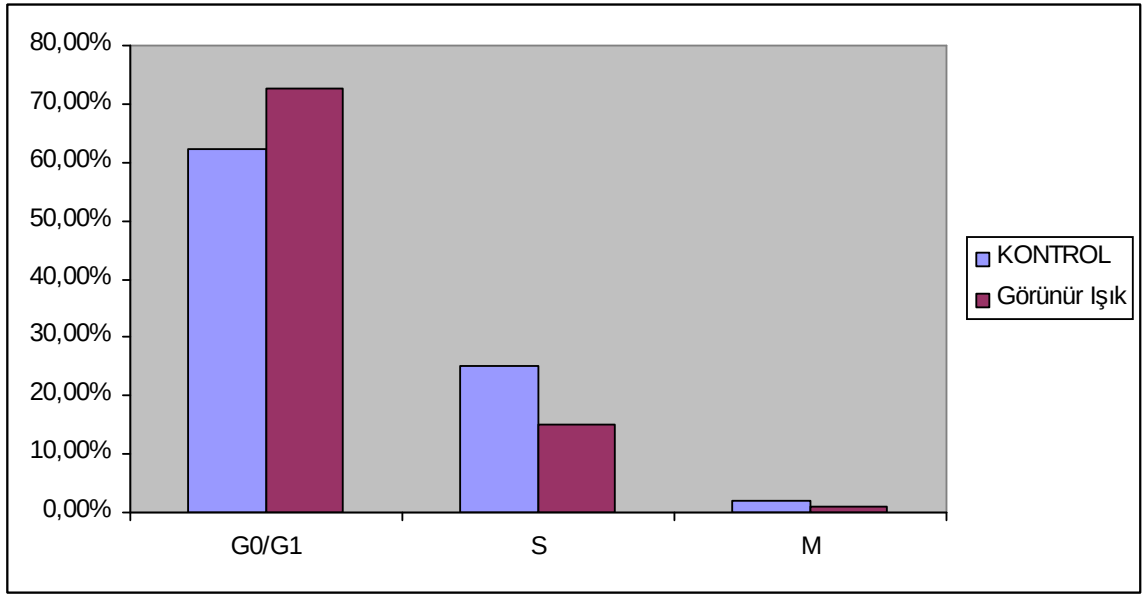
Çizelge 8.13’de karanlıkta nanopartiküllerin kontrol ile kıyaslandığında *L.tropica* promastigotlarının hücre döngüsü üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

Çizelge 8.13. Karanlıkta gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının hücre döngüsüne etkisi



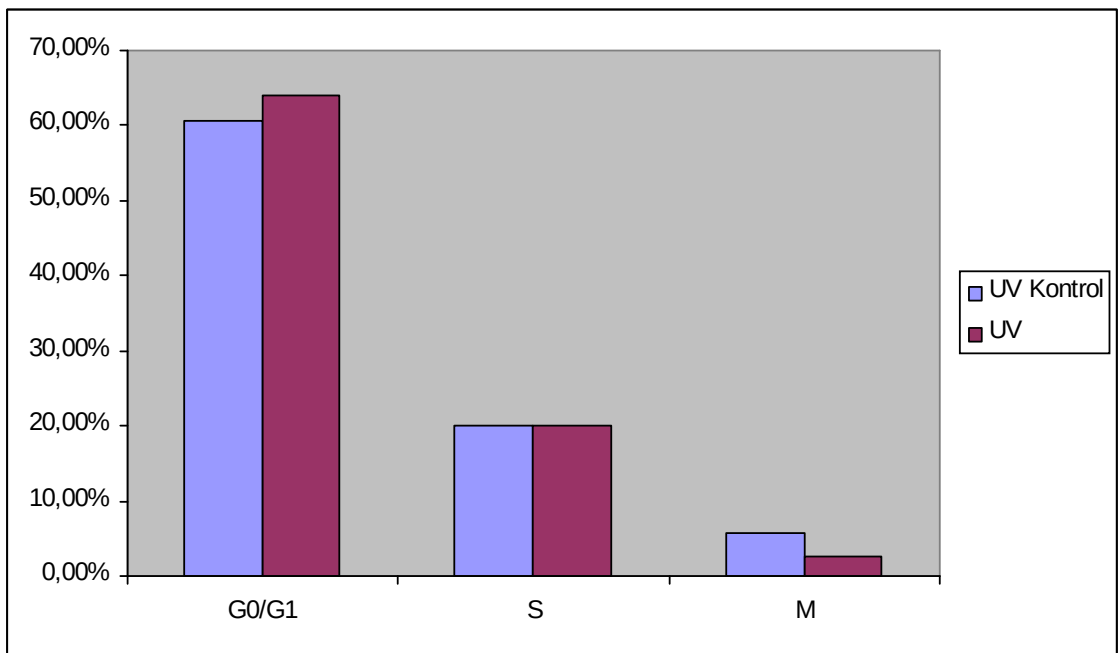
Çizelge 8.14’de görünür ışık altında nanopartiküllere maruz kalan *L.tropica* promastigotlarının kontrole nazaran daha fazla G0/G1 evresinde bulundukları ve az miktarda parazitin S evresine geçerek DNA sentezini gerçekleştirdikleri görülmüştür. Benzer şekilde nanopartiküllere maruz kalan çok az miktarda parazitin S evresinden M evresine geçerek hücre bölünmesini başlattıkları belirlenmiştir.

Çizelge 8.14. Görünür Işık Altında gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının hücre döngüsüne etkisi



Çizelge 8.15’de ise UV ışık altında nanopartiküllere maruz kalan *L.tropica* promastigotlarının kontrole nazaran daha fazla G0/G1 evresinde bulundukları ve her iki grupta S aşamasına geçen parazit miktarının hemen hemen aynı olduğu tespit edildi. Buna rağmen kontrol ile kıyaslandığında çok az miktarda parazitin S aşamasından M aşamasına geçerek hücre bölünmesini başlattığı belirlendi.

Çizelge 8.15. UV Işık Altında gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının hücre döngüsüne etkisi



TARTIŞMA

Leishmaniasis dünyanın en önemli sağlık sorunlarından bir tanesidir. *Leishmania* parazitlerinin neden olduğu bu hastalık Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınladığı en önemli tropikal hastalıklar listesinde sıtmanın ardından ikinci sırada bulunmaktadır. Hastalığın önlenmesinde halen etkin bir aşının bulunmaması ile birlikte hastalığa yakalanan kişilerde tedavi oldukça zordur. Kullanılan ilaçların oldukça pahalı olmaları, kullanımlarının zor olması ve özellikle de hastalar üzerinde belirgin toksik yan etkilere neden olmaları, bu ilaçların hastalığın tedavisindeki etkinliklerini sınırlandırmaktadır. Bunun dışında son yıllarda parazitlerde antileishmanial ilaçlara karşı dirençlilik olduğu da gözlenmektedir. Ayrıca Kütanöz Leishmaniasis'e yakalanan hastalarda tedavinin ardından deride geniş yara izlerinin kalıyor olması da tedavideki bir diğer problemi oluşturmaktadır. Bu nedenlerden ötürü Leishmaniasis'in tedavisi için yeni yöntemlerin geliştirilmesine duyulan ihtiyaç artmaktadır.

Bu çalışmada *L.tropica* parazitleri üzerinde gümüş ve TiO_2 nanopartiküllerinin kullanılmasının nedeni; metal oksit nanopartiküllerinin boyutlarına bağlı olarak kendilerine özgü eşsiz özellikler göstermeleri ve bu nanopartiküllerin daha önce bakteriler, funguslar ve kanser hücreleri gibi farklı hücre modelleri üzerinde toksik özelliklere sahip olduklarının gösterilmiş olmasıdır. Hem TiO_2 hem de gümüş nanopartiküllerinin sahip oldukları geniş yüzey alanları sayesinde çevrelerinde bulunan yüzeylerle ciddi bir biçimde etkileşime girdikleri bildirilmiştir. Belirli bir ışımanın ardından aktif hale gelen TiO_2 nanopartikülleri ve kendi başlarına aktif halde bulunan gümüş nanopartikülleri çevrelerinde bulundukları yüzeylerle etkileşime girdiklerinde reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmaktadır. Bu nedenle bu tür nanopartiküllerle etkileşime giren hücre membranları hasar görmekte ve membran geçirgenliği kayda değer bir biçimde artmaktadır. Ayrıca küçük boyutlarına bağlı olarak hücre içerisine kolay bir şekilde giren metal oksit nanopartikülleri gerek yaşamsal enzimlerin tiyol gruplarına gerekse de hücrenin DNA'sına sıkı bir biçimde bağlanarak bu tür makromoleküllerin zarar görmesine de neden olurlar. Metal nanopartiküllerin hem reaktif oksijen türlerini oluşturması hem de hücre içerisindeki komponentlere verdiği zarar, bu nanopartiküllerin enfeksiyon yapıcı ajanları öldürme mekanizmasını oluşturmaktadır.

Yapılan literatür araştırması *Leishmania* parazitlerinin de ROS'a karşı duyarlı olduklarını ortaya çıkarmıştır. Her ne kadar *Leishmania* parazitlerinin konak hücre

olarak kullandıkları makrofajların yabancı molekülleri ROS' u da içeren serbest radikalleri oluşturarak parçaladıkları bilinse de, *Leishmania* parazitlerinin sahip oldukları enzimlerin makrofajlarda ROS oluşum yol izini inhibe ettikleri ve bu sayede ROS oluşumunu engelleyerek makrofajlar içerisindeki yaşamlarını sürdürdükleri bildirilmiştir. Ancak ROS türlerini de içeren serbest radikallerin enzimler aracılığı ile biyolojik bir yol yerine nanopartiküllere bağlı olarak fiziksel yol ile oluşturulması sonrasında *Leishmania* parazitlerinin oluşan bu serbest radikallerin toksik etkilerinden etkileneceği düşünülmektedir. Bunun nedeni parazitler tarafından sentezlenen enzimlerin makrofajlardaki mekanizmanın aksine, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyememesidir. Bunun yanı sıra tıpkı bakterilerde olduğu gibi nanopartiküllerin küçük boyutları sayesinde hücre içerisine girerek hücrenin yaşamsal enzimlerini, DNA'sını ve diğer makromoleküllerini etkileyerek hücreye ciddi hasar vereceği düşünülmektedir.

Bu amaç doğrultusunda çalışmanın deneysel aşamasında öncelikle TiO_2 nanopartiküllerinin ve gümüş nanopartiküllerini içeren kaplamaların Kütanöz Leishmaniasis etkeni *L.tropica* parazitlerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. TiO_2 nanopartikülleri ile yapılan çalışmada öncelikle nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlarının karanlık ve UV ışıklı ortamda parazitler üzerindeki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Deney sonuçlarına göre 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda kontrol gruplarına nazaran karanlık ortam koşullarında TiO_2 nanopartiküllerinin parazitler üzerinde etkin olmadığı gözlenmişse de, aynı konsantrasyonda UV ışık altında büyük bir antileishmanial özellik kazandıkları ve herhangi bir nanopartikül veya UV ışık uygulamasına maruz kalmamış olan kontrol gruplarına göre parazit sayısının yaklaşık olarak 10 kat daha az olduğu belirlenmiştir. 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki TiO_2 nanopartiküllerinin ise hem karanlık ortam koşullarında hem de UV ışık altında kontrollerle kıyaslandığında belirgin bir antileishmanial etki gösterdikleri gözlenmiştir. Bu sonuç TiO_2 nanopartiküllerinin konsantrasyonun artması ile birlikte daha düşük konsantrasyonlarda görülmeyen bir biçimde hem karanlıkta hem de UV ışık altında *L.tropica* parazitleri üzerinde etkili olduğunu göstermesi açısından önemlidir. Bu durum TiO_2 nanopartiküllerinin yüksek konsantrasyonlarda ve UV ışık ile muameleye maruz kalmadıkları durumlarda parazitlerin hücre içerisine girerek buradaki yaşamsal molekülleri bozmak suretiyle, UV ışığa maruz kaldıklarında ise hem ısıma ile birlikte ROS oluşturup hücre membranına hem de hücre içerisindeki moleküllere zarar vererek parazitler üzerinde etkili oldukları şeklinde yorumlanabilir. Bu nedenle aynı

konsantrasyonda UV ışık ile aktive olan TiO₂ nanopartiküllerinin karanlık ortam koşullarına göre daha büyük bir antileishmanial etki gösterdikleri düşünülmektedir.

Bu deneyde 100 µg/ml konsantrasyondaki TiO₂ nanopartiküllerinin yukarıda bahsedilen her iki ortam koşulunda da etkin bir biçimde antileishmanial etki göstermesi üzerine, TiO₂ nanopartikülleri ile yapılan bir sonraki deneyde 100 µg/ml konsantrasyon sabit olarak kullanılmıştır. Bir önceki çalışmada parazitler sabit olarak 15 dakika UV ışığa maruz bırakılmışken bu çalışmada UV ışığa maruz kalma süreleri değişmektedir. Kontrol gruplarından farklı olarak TiO₂ nanopartikülleri ile birlikte 30 dakika, 45 dakika ve 60 dakika UV ışığa maruz kalan deney grupları içerisinde parazitler üzerindeki en büyük etki 60 dakika boyunca UV ışık altında tutulan deney gruplarında görülmüştür. Ancak diğer deney gruplarında da UV ışığa maruz kalma süresinin artması ile birlikte, parazit sayısının azaldığı görülmüştür.

Bir önceki deneyde TiO₂ nanopartiküllerinin konsantrasyona bağlı olarak *L.tropica* parazitleri üzerinde etkili oldukları görülmüştü. Bu deneyde de antileishmanial etkinin UV ışığa maruz kalma süresinin artmasına bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Bunun nedeni UV ışığa maruz kalma süresinin artması ile birlikte TiO₂ nanopartiküllerinin yüzeylerinde oluşturdukları ROS miktarının artması olabilir. Ayrıca tüm deney gruplarında TiO₂ nanopartiküllerinin aynı konsantrasyonları denenmiş olmasına rağmen UV ışığın süresine göre antileishmanial etkinin değişiyor olması, bu deneyde parazitler üzerinde etki gösteren faktörün reaktif oksijen türleri olduğunu düşündürmektedir.

TiO₂ nanopartiküllerinin karanlıkta ve UV ışık altında *L.tropica* promastigotlarının hücre canlılığına etkisi ise MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Hücre canlılığı MTT solüsyonunun deney grupları üzerinde uygulanmasının ardından gruplarda oluşan formazan kristallerinin miktarının ELISA reader'da okunması sonucu hesaplanmaktadır. Mikroskopik inceleme sonucunda hem karanlıkta hem de UV'li ortamda nanopartiküllerin bulunmadığı kontrol grubunda yoğun olarak formazan kristallerinin oluştuğu tespit edilmiştir. Buna rağmen nanopartikül ile muamele edilen deney gruplarında konsantrasyona bağlı olarak oluşan formazan kristallerinin oluşumunda belirgin bir azalma görülmüştür. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda (100 µg/ml ve 150 µg/ml) TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan deney gruplarında formazan kristallerinin miktarının daha da azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar TiO₂

nanopartiküllerinin gerek karanlıkta gerekse de UV ışık altında parazitlerin metabolik aktivitelerini bozduklarını göstermektedir.

TiO₂ nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının konak hücreleri enfektifliği üzerine etkisi incelendiğinde karanlık ortamda, görünür ışık altında ve UV ışık altında tutulan kontrol gruplarında bulunan parazitlerin yoğun bir biçimde makrofajları enfekte ettikleri ve makrofajların içerisinde amastigot formlara dönüştükleri tespit edilmiştir. Buna karşın karanlık ortamda, görünür ışık altında ve UV ışık altında TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerin makrofajları oldukça az miktarda enfekte edebildiği veya hiç enfekte edemediği görülmüştür. Bunun yanında parazitlerin yüzeyine yapışan nanopartiküllerin makrofajlar üzerinde ciddi bir hasara yol açtıkları belirlenmiştir. Nanopartiküllere maruz kalan makrofajların hücre membranlarının hasar gördüğü, hücrelerin morfolojik yapılarının değiştiği ve uzayarak atipik bir form aldıkları mikroskopik olarak tayin edilmiştir. Bu tür morfolojisi değişen makrofajların parazitler tarafından enfekte edilemediği gözlenmiştir. Bunun nedeninin nanopartiküllere maruz kalan parazitlerin ya da makrofajların membran yüzeylerinde bulunan reseptörlerinin zarar görmesi olduğu düşünülmektedir. Zarar gören reseptörler nedeniyle parazit ve konak birbirini tanıyamamış ve bu nedenle de parazitler makrofajları enfekte edememiş olabilir.

TiO₂ nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının hücre döngüsü üzerine etkisi incelendiğinde nanopartiküllerin özellikle görünür ışık ve UV ışık altında parazitler üzerinde etkili oldukları görülmüştür. TiO₂ nanopartikülleri *L.tropica* promastigotlarının hücre döngüsünü görünür ışık altında DNA sentezi aşamasında, UV ışık altında ise hücre bölünmesi aşamasında baskılamıştır.

Tıpkı TiO₂ nanopartikülleri ile olduğu gibi gümüş nanopartikülleri ile yapılan çalışmalarda da bu nanopartiküllerin *Leishmania* parazitleri üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. İlk olarak gümüş nanopartiküllerinin tek başlarına *L.tropica* parazitlerinin canlılığı üzerine etkisi incelendiğinde, gümüş nanopartiküllerinin artan konsantrasyonlarıyla ters orantılı olarak parazitlerin canlılığının azaldığı ve en yüksek konsantrasyonlarda en büyük antileishmanial etkinin gözlemlendiği belirlenmiştir. Yapılan literatür araştırması gümüş nanopartiküllerinin UV ışık ile birlikte hücreler üzerinde sinerjik bir etki yarattığını göstermiştir. Bu nedenle gümüş nanopartiküllerinin UV ışık ile birlikte parazitler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Yapılan deneyin sonucuna göre gümüş nanopartiküllerini içeren kaplamaların UV ışık altında *L.tropica* promastigotları üzerinde yalnızca UV ışık muamelesine kıyasla 48.saatin sonundaki sayıma göre 2 kat,

72. saatin sonundaki sayıma göre ise 3 kat daha fazla antileishmanial etki gösterdikleri gözlenmiştir. Deney grupları içerisinde en büyük etkinin hem UV'ye hem de gümüş nanopartiküllerine maruz kalan deney grubunda görülmesi, bu iki faktörün sinerjik etkisine bağlanmıştır.

Ardından gümüş nanopartiküllerini içeren kaplamaların karanlıkta, görünür ve UV ışık altında *L.tropica* parazitleri üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiş, sayım yapılan tüm inkübasyon sürelerinde kontrolleri ile kıyaslandığında gümüş nanopartiküllerinin hem karanlık ortam koşullarında hem görünür ışık altında hem de UV ışık altında parazitler üzerinde belirgin bir antileishmanial özellik kazandıkları gözlenmiştir. Deney grupları içerisinde en büyük etkinin ise gümüş nanopartikülleri ile birlikte UV ışığa maruz kalmış parazitler üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte gümüş nanopartikülleri ile birlikte görünür ışığa maruz kalmış deney gruplarındaki parazitlerin sayısının da tüm inkübasyon sürelerinde gümüş nanopartikülleri ile birlikte UV ışığa maruz bırakılmış deney gruplarındaki parazit sayısına yakın değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte 48. saatin sonunda yapılan parazit sayımına göre görünür ışık altında bekletilen gümüş nanopartikülleri ile, UV ışığa maruz bırakılan gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* parazitleri üzerinde hemen hemen aynı etkiyi gösterdiği görülmüştür.

Gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının metabolik aktivitesine etkisi incelendiğinde gerek karanlıkta gerekse de UV ışık altında herhangi bir nanopartikül muamelesine maruz kalmayan kontrol gruplarında yoğun olarak formazan kristallerinin olduğu gözlenmiştir. Buna karşın nanopartiküllere maruz kalan gruplarda konsantrasyona bağlı olarak formazan kristallerinin oluşumunun giderek azaldığı belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda ise formazan kristalleri miktarının daha da azaldığı mikroskopik olarak tespit edilmiştir. Hücre canlılığının ELISA reader'da okunmasının ardından da benzer sonuçlar çıkmış, hem karanlıkta hem de UV ışık altında gümüş nanopartiküllerinin konsantrasyonlarının artması ile birlikte kontrol gruplarına nazaran parazit canlılığına yüksek miktarda etki göstermiştir. Karanlıkta ve UV ışık altında özellikle 150 ve 200 µg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda gümüş nanopartiküllerine maruz kalan deney gruplarında bu etki daha da belirginleşmiştir. Bunun yanı sıra gümüş nanopartiküllerinin UV ışıkta parazitler üzerindeki etkisinin karanlık ortama göre daha fazla olduğu da tespit edilmiştir. UV ışık ile birlikte gümüş nanopartikülleri parazitler üzerinde sinerjik bir etki göstermiş ve bu durum nanopartiküllerin daha da aktif hale gelerek daha fazla miktarda ROS oluşturmaya

neden olmuştur. Gümüş nanopartikülleri bu sayede hem hücre içerisine girerek yaşamsal moleküllere etki etmek suretiyle hem de yoğun bir biçimde oluşturdıkları ROS'a bağlı olarak hücre membranlarına zarar vererek parazitler üzerinde daha büyük bir etkiye neden olduğu düşünülmektedir.

Karanlık ortam koşullarında, görünür ve UV ışık altında gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının enfektifliğine etkisi incelendiğinde ise karanlık ortam koşullarında gümüş nanopartiküllerine maruz kalan deney grubundaki parazitlerin makrofajları enfekte ettikleri ancak kontrol grupları ile kıyaslandığında enfektiflik yüzdelерinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Görünür ve UV ışık altında gümüş nanopartiküllerine maruz kalan deney gruplarında ise parazitlerin makrofajları enfekte edemediği tespit edilmiştir. UV ışığa maruz kalan kontrol grubu dahil kontrol gruplarının tamamında parazitlerin konak hücre olarak kullandıkları makrofajları enfekte ettikleri göz önüne alındığında; gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının enfektifliği üzerindeki etkisi daha iyi anlaşılmış olur.

Ayrıca yapılan çalışmalarda gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının hücre döngüsü üzerinde de etkili oldukları ortaya çıkmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında karanlık ortam koşullarında gümüş nanopartiküllerine maruz kalan promastigotların hücre döngüsünde herhangi bir farklılık tespit edilmemiş olmasına rağmen, görünür ışık maruz kalan deney gruplarındaki parazitlerin hücre döngüsünün DNA sentezi ve mitoz evrelerinde baskılandığı tespit edilmiştir. UV ışığa maruz kalan deney grubundaki parazitlerin ise kontrol ile kıyaslandığında hücre döngülerinin özellikle mitoz evresinde inhibe olduğu belirlenmiştir.

Yapılan tüm deneysel çalışmalarda her iki metal oksit nanopartikülünün de konsantrasyonlarına bağlı olarak parazitlerin çoğalmasını ve canlılıklarını azaltarak antileishmanial etki gösterdikleri görülmüştür. Ayrıca nanopartiküllerin özellikle de TiO_2 nanopartiküllerinin parazitler üzerindeki etkinliğinde UV ışığın oldukça önemli bir rolü olduğu da ortaya çıkmıştır. Nanopartiküllerin tek başlarına belirgin bir şekilde antileishmanial etki gösterdikleri bulunsa da; bu etkinin UV ışık ile birlikte daha da fazlalaştığı belirlenmiştir. Bu durumun esas nedeni UV ışığın nanopartiküllerin yüzeylerinde meydana getirdikleri reaktif oksijen türleridir. Her ne kadar nanopartiküllerin tek başlarına hücre membranlarından kolay bir şekilde geçerek hücre içi komponentler üzerinde zarara yol açtıkları bilinse de; parazitlerin üzerinde nanopartiküllerin gerçek etkisinin *Leishmania* türlerinin oldukça hassas oldukları ROS'u

da içeren serbest radikalleri meydana getirmeleri olduğu söylenebilir. Bu nedenle reaktif oksijen türlerini oluşturmak için herhangi bir ışımaya gerek duymayan gümüş nanopartiküllerinin belirli bir ışımanın ardından reaktif oksijen türlerini oluşturan TiO_2 nanopartiküllerine kıyasla karanlık ortam koşullarında daha etkili oldukları düşünülmektedir. Bununla birlikte deney sonuçları UV ışığa maruz kalan gümüş nanopartiküllerinin de karanlık ortam koşullarına göre daha büyük miktarda antileishmanial etkiye neden olduklarını göstermektedir.

Deney sonuçları içerisinde en ilginç olanı görünür ışığın TiO_2 ve gümüş nanopartikülleri üzerinde hemen hemen UV ışık kadar etkili olması ve nanopartikülleri bu denli aktive etmesidir. UV ışığın insan doku ve hücreleri üzerinde hasara yol açtığı göz önünde bulundurulduğunda, görünür ışık ile birlikte nanopartiküllerin *L.tropica* parazitleri üzerinde UV ışıkla birlikte nanopartiküllerin gösterdiği etkinin hemen hemen aynısını göstermiş olması ileride Kütanöz Leishmaniasis'in tedavisinde bu yöntemin kullanılmasının daha ümit verici olacağını düşündürmektedir.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak 'Gümüş ve TiO_2 Nanopartiküllerinin Kütanöz Leishmaniasis Etkeni *L.tropica* Parazitleri Üzerindeki Antileishmanial Etkilerinin İncelenmesi' başlıklı tezin amacına uygun olarak; farklı kültür modelleri, MTT, flow sitometri, AFM kullanılarak, TiO_2 ve gümüş nanopartiküllerinin *L.tropica* promastigotlarının proliferasyonuna, morfolojisine, metabolik aktivitesine, enfektifliğine ve hücre döngüsüne (G0,G1,S,M) etkisinin incelenmesi sonucunda ilk kez olarak;

- 1- TiO_2 ve gümüş nanopartiküllerine maruz kalan parazitlerin proliferasyonunun nanopartikül konsantrasyonuna bağlı olarak inhibe olduğu,
- 2- Nanopartiküllerin parazitlerin metabolik aktivitesi üzerinde etkili oldukları ve UV ışık altında nanopartiküllerin parazitlerin hücre canlılığını tamamen inhibe ettiği,
- 3- TiO_2 ve gümüş nanopartiküllerinin gerek karanlıkta gerekse de görünür ve UV ışık altında parazitlerin enfektifliklerini etkiledikleri ve nanopartiküllere maruz kalan parazitlerin konak makrofaj hücrelerini enfekte edemedikleri,
- 4- Özellikle görünür ve UV ışık altında nanopartiküllere maruz kalan parazitlerin hücre döngülerinin DNA sentezi ve mitoz aşamalarında inhibe olduğu,

5- İncelenen tüm parametrelerde nanopartiküllerin karanlık ortam koşullarında etkili oldukları gözlemlense de; görünür ışık ve UV ışık altında nanopartiküllerin daha da aktifleşerek parazitler üzerindeki etkinliklerini arttırdıkları tespit edildi.

Titanyum dioksit (TiO₂) ve gümüş nanopartiküllerinin *in vitro* kültür ortamında Kütanöz Leishmaniasis etkeni olan *L.tropica* parazitlerinin proliferasyonu, morfolojisi, metabolik aktivitesi, enfektifliği ve hücre döngüsü üzerindeki etkisinin incelenmesi sonucunda Türkiye’de ve Dünya’da ilk kez olarak elde edilen bu yeni bilgiler, Leishmaniasis’in tedavisinde nanopartiküllere dayalı yeni bir tedavi yaklaşımının geliştirilmesinin temelini oluşturmuştur.

İleride bu çalışmaların *in vivo* ortam koşullarında Kütanöz Leishmaniasis ile enfekte olmuş deney hayvanları üzerinde de gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Akkafa F, Tascı S, 1999. Sanliurfa'nın Phlebotomus faunası. Türkiye Parazitol Derg, 23: 417-422.

Allahverdiyev AM, Uzun S, Bagirova M, Durdu M, Memisoglu HR. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2004 Mar;70(3):294-7.

Alrajhi, A. A., Ibrahim, E. A., De Vol, E. B. et al. (2002). Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. New England Journal of Medicine 346, 891–5.

Amato, V., Amato, J., Nicodemo, A. et al. (1998). Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate. Annales de Dermatologie et de Venereologie 125, 492–5.

A.Nel, T. Xia, L. Madler, N. Li, Science 311 (5761): 622 (2006)

Arana, B. A., Mendoza, C. E., Rizzo, N. R. et al. (2001). Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 65, 466–70.

Armstrong TC, Patterson JL, 1994. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. J Parasitol 80: 1030–1032.

Arnold HL, Odom RB, James WD: Parasitic infestations, stings and bites. In: Andrews' Diseases of the Skin, 8th Ed. Philadelphia W.B. Saunders Company, 1990, pp: 486-533.

Aronson, N. E., Wortmann, G. W., Johnson, S. C. et al. (1998). Safety and efficacy of intravenous sodium stibogluconate in the treatment of leishmaniasis: recent U.S. military experience. Clinical Infectious Diseases 27, 1457–64.

Asharani, P. V.; Wu, Y. L.; Gong, Z.; Valiyaveetil, S. , 2008, ' Toxicity of Silver Nanoparticles in Zebrafish Models '. Nanotechnology, 19, 1–8.

Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. Acta Trop 2001;78:11-6.

Berenguer J, Moreno S, Cerdenaro E, Bernaldo de Quiros JCL, Garcia de la Fuente A, Visceral Leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV), Ann.Intern. Med. ,11, 129, 1989

Berens RL , Brun R, Krassner SM, 1976. A simple monophasic medium for axenic culture of hemoflagellates. J Parasitol 62: 360–365.

Bryceson, A. D., Murphy, A. & Moody, A. H. (1994). Treatment of 'Old World' cutaneous leishmaniasis with aminosidine ointment: results of an open study in London. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88, 226–8.

Cai RX, Hashimoto K, Itoh K, Kubota Y, Fujishima A. , 1991 , ' Photokilling of malignant cells with Ultrafine TiO₂ powder '. *Bull Chem Soc Jpn*; 64: 1268-1273

Cagnoni P.J. Liposomal amphotericin B versus conventional amphotericin B in the empirical treatment of persistently febrile neutropenic patients. *J. Antimicrob. Chemother.* (2002) 49 81–86.

Castellani O, Ribeiro LV, Fernandes JF, 1967. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J Protozool* 14: 447–451.

Chakraborty, A.K.; Majumder, H.K. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 152, 605-611.

Chance ML, Peters W, Shchoryl L, 1974. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observations on DNA. *Ann Trop Med Parasitol* 68: 307–316.

Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J Antimicrob Chemother* 2007;59:587–90.

C.Petit, V.Yardley, F.Gaboriau, J.Bolard, and S.L.Croft. Activity of a Heat-Induced Reformulation of Amphotericin B Deoxycholate (Fungizone) against *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:390-2.

Cuenca A.G., Jiang H., Hochwald S.N., Delano M., Cance W.G., Grobmyer S.R. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer* (2006) 107 459– 466.

Davidson RN. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs* 1998;56:1009-18.

Demicheli, C.; Frézard, F.; Lecouvey, M.; Garnier-Suillerot, A. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1570, 192-198.

Demling RH, DeSanti L. Effects of silver on wound management. *Wounds* 2001;13:4. Deutscher J., Saier M. H., *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 9 125 (2005).

Desjeux, P., (2004) "Leishmaniasis: Current Situation and New Perspectives", *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 27(5):305-18.

Di Martino L, Vajro P, Nocerrino A et al, Fulminant hepatitis in an Italian infant with visceral leishmaniasis, *Trans R. Soc Trop. Med Hyg.* 1992,86,34.

D'Oliveira, J. A., Machado, P. R. & Carvalho, E. M. (1997). Evaluating the efficacy of allopurinol for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology* 36, 938–40.

Dogra, J. (1991). A double-blind study on the efficacy of oral dapsone in cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 212–3.

Duffin, J.; René, P. “Anti-moine; Anti-biotique”: The public fortunes of the secret properties of antimony potassium tartrate (tartar emetic). *J. Hist. Med. Allied Sci.* 1991, 46, 440–456.

El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH, et al. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp Parasitol* 2001;97,35–44.

Evans DA, Rebelo ME, 1996. *Hand Book of Visceral-Cutaneous Leishmaniasis in the Domestic Dog*. Instituto de Proteccao da Producao Agro-Alimentar Centro Nacional de Proteccao e Controlo Zoo-Sanitario.

Fairlamb, A.H.; Cerami, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 1992, 46, 695–729.

Fanciullino R., Giacometti S., Aubert C. et al. Development of stealth liposome formulation of 2¢-deoxyinosine as 5-fluorouracil modulator: in vitro and in vivo study. *Pharm. Res.* (2005) 22 2051–2057.

Fox CL, Modak SM. Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1974;5(6):582–8.

Frank, S.N. ve Bard, A.J., (1977). Heterogeneous Photocatalytic Oxidation of Cyanide Ion In Aqueous Solution at TiO₂ Powder. *Journal of American Chemical Society*, 99, 1, 303- 304.

Freitas R.A. Jr What is nanomedicine? *Nanomedicine* (2005) 12–9.

Fujishima, A., Hashimoto, K. ve Watanabe, T., (1999). *TiO₂ Photocatalysis, Fundamentals and Applications*, BKC, Inc Publishers, Japan.

Gabizon A., Martin F. Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs* (1997) 54(Suppl 4) 15–21.

Gaughan PLZ, Krassner SM, 1971. Hemin deprivation in culture stages of the hemoflagellate *Leishmania tarentolae*. *Comp Biochem Physiol* 39 : 5–18.

Gemmell CG, Edwards DI, Frainse AP. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:589–608.

Greish K., Sawa T., Fang J., Akaike T., Maeda H. SMAdoxorubicin, a new polymeric micellar drug for effective targeting to solid tumours. *J. Control. Release.* (2004) 97 219–230.

Gurel MS, Ulukanlıgil M, Ozbilge H, 2002. Cutaneous leishmaniasis in Şanlıurfa. Epidemiologic and clinical features of last four years (1997-2000). *Int J Dermatol*, 2002;41:32-37.

Harisinghani M.G., Barentsz J., Hahn P.F. et al. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* (2003) 348 2491–2499.

Henry W Murray. Clinical and Experimental Advances in Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45: 2185-97.

Howard MK, Pharoah MM, Ashall F, Miles MA, 1991. Human urine stimulates growth of *Leishmania* in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 477–479.

Huang, Z., Maness, P-C., Blake, D.M., Wolfrum, E.J., Smolinski, S.L. ve Jacoby, W.A., (2000). Bactericidal Mode of Titanium Dioxide Photocatalysis, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 130, 2-3, 163-170.

Hugo WB, Russell AD. Types of antimicrobial agents. In: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications; 1982. p. 106. 8.

Jacoby, W. A., P. C. Maness, E. J. Wolfrum, D. M. Blake, and J. A. Fennel. 1998. ‘ Mineralization of bacterial cell mass on a photocatalytic surface in air ’. *Environ. Sci. Technol.* 32:2650-2653.

Jadin J, We’ry M, 1963. La culture de Trypanosomatidae. *Ann Soc Belg Med Trop* 43: 831–842.

Jadin J, Le Ray D, 1969. Acquisitions récentes dans les techniques de culture des trypanosomes africains. *Ann Soc Belg Med Trop* 49: 331–340.

Jain KK. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. *Med Princ Pract.* 2008;17(2):89-101.

James, G. V. 1971. Water treatment, 4th ed., p. 38. CRC Press, Cleveland, OH

Jensen AT, Gasim S, Moller T, Ismail A, Gaafar A, Kemp M. el Hassan AM, et al. Serodiagnosis of *Leishmania donovani* infections: assessment of enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant *L. donovani* gene B protein (GBP) and a peptide sequence of *L. donovani* GBP. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93:157-60.

Kim S., Lim Y.T., Soltesz E.G. et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat. Biotechnol.* (2004) 22 93–97.

Kimberley A. Zimmerman, Karl P. Fischer, Michael A. Joyce, and D. Lorne J. Tyrrell, Zinc Finger Proteins Designed To Specifically Target Duck Hepatitis B Virus

Covalently Closed Circular DNA Inhibit Viral Transcription in Tissue Culture , J Virol. 2008 August; 82(16): 8013–8021

Kirstein J., Turgay K., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 9 182 (2005).

Klasen HJ. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. Part I early uses. Burns 2000;30:1–9.

Kochar, D. K., Aseri, S., Sharma, B. V. et al. (2000). The role of rifampicin in the management of cutaneous leishmaniasis. Quarterly Journal of Medicine 93, 733–7.

Landsdown ABG. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. JWound Care 2002;11:125–38.

Lawyer PG, Ngumbi PM, Anjili CO, Odongo SO, Mebrahtu YB, Githure JI, Koech DK, Roberts CR, 1990. Development of *Leishmaniamajor* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Pshycodidae). *Am J Trop Med Hyg* ., 43(1):31-43.

Lee E.S., Gao Z., Bae Y.H. Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology. J. Control. Release. (2008) 132 164–170.

Legrini, O., E. Oliveros, and A. M. Braun. 1993. ‘ Photochemical processes for water treatment. Chem. Rev ’. 93:671-698.

Leon, O.; Roth, M. Zinc fingers: DNA binding and protein-protein interactions. Biol. Res. 2000, 33, 21-30.

Lepage M., Jiang J., Babin J., Qi B., Tremblay L., Zhao Y. MRI observation of the light-induced release of a contrast agent from photo-controllable polymer micelles. Phys. Med. Biol. (2007) 52 N249–N255.

Li, P., J. Li, C. Wu, Q. Wu, and J. Li. 2005. Synergistic antibacterial effects of - lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. Nanotechnology 16:1912–1917.

Loo C., Lin A., Hirsch L. et al. Nanoshell-enabled photonicsbased imaging and therapy of cancer. Technol. Cancer. Res.Treat. (2004) 3 33–40.

Loo C., Hirsch L., Lee M.H. et al. Gold nanoshell bioconjugates for molecular imaging in living cells. Opt. Lett. (2005) 301012–1014.

Loo C., Lowery A., Halas N., West J., Drezek R. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. Nano Lett. (2005) 5 709–711.

Lu L, Sun RW, Chen R, Hui CK, Ho CM, Luk JM, Lau GK, Che CM, Silver Nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. Antivir Ther. 2008;13(2):253-62

Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. Adv. Enzyme Regul. (2001) 41 189– 207.

- Maness, P-C., Smolinski, S., Blake, D., Huang, Z., Wolfrum, E.J., Jacoby, W.A., (1999). Bactericidal Activity of Photocatalytic TiO₂ Reaction: Toward an Understanding of its Killing Mechanism, *Applied and Environment Microbiology*, 65, 9, 4094-4098.214.
- Mansour NS, Hady J, McConnell E, 1973. A modified liquid medium for Leishmania. *J Parasitol* 59: 1088–1090.
- Markel EK, Voge M, John DT: *Medical Parasitology*, 7th Ed. WB Saunders, Philadelphia, 1992 pp: 148-156.
- Martin SK, Thuita-Harun L, Adoyo-Adoyo M, Wasunna KM. A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis, based on antigen from media conditioned by *Leishmania donovani* promastigotes. *Ann Trop Med Parasitol* 1998;92:571-7.
- Matsunaga, T., Tomada, R., Nakajima, T. ve Wake, H., (1985). Photochemical Sterilization of Microbial Cells by Semiconductor Powders, *FEMS Microbiology Letters*, 29, 1-2, 211–
- McDonnell, G., and A. D. Russell. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:147–179.
- Medintz I.L., Mattoussi H., Clapp A.R. Potential clinical applications of quantum dots. *Int. J. Nanomedicine*. (2008) 3 151–167.
- Memişoğlu HR, Kotogyan A, Acar MA, Özpoyraz M: Leishmaniosis. İçinde: *Dermatoloji*. Ed (s).Tüzün Y, Kotogyan A, Aydemir EH, Baransü O: Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul, 1994, s: 220-230.
- Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* (2005) 19 311–330.
- Montoya Y, Leon C, Talledo M, Nolasco O, Padilla C, Munoz-Najar U, et al. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997;91:674-6.
- Muniz-Junqueira, M.I.; Paula-Coelho, V.N. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. *Int. Immunopharmacol.* 2008, 8, 1633-1638.
- Morones, J. R. , J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez, M. J. Yacaman. 2005. ‘ The bactericidal effect of silver nanoparticles’. *Nanotechnology* 16:2346–2353.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005;366:1561-77
- Murray, H.W. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 2185-2197.

Moyer CA, Brentano L, Gravens DL, Margraf HW, Monafo WW. Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution. *Arch Surg* 1965;90:812–67.

Nacher, M., Carme, B., Sainte, M. D. et al. (2001). Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 95, 331–6.

Nicole CH, 1908. Culture du parasite du Bouton d'Orient. *CR Hebdomadaire Sci Acad Sci Paris* 146: 842–843.

Novy FG, MacNeal WJ, 1904. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J Infect Dis* 1: 1–30.

Ok ÜZ, Balcioğlu IC, Ozkan Taylan A, Ozensoy S, Ozbel Y, 2002. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Tropica*, 84: 43-48.

Oka, M., T. Tomioka, K. Tomita, A. Nishino, and S. Ueda. 1994. Inactivation of enveloped viruses by a silver-thiosulfate complex. *Metal-Based Drugs* 1:511.

Oloffs, A., C. Crosse-Siestrup, S. Bisson, M. Rinck, R. Rudolph, and U. Gross. 1994. Biocompatibility of silver-coated polyurethane catheters and silver-coated Dacron® material *Biomaterials* 15:753–758.

Ozcel, M.A., (1995), GAP'ı Tehdit Eden Parazit Hastalıkları, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

Ozensoy Toz S, Sakru N, Ertabaklar H, Demir S, Sengül M, Ozbel Y, 2009. Serological and Entomological Survey of Zoonotic Visceral Leishmaniasis in Denizli Province, Aegean Region, Turkey. *New Microbiologica*, 32(1): 93-100.

Panacek A, Kvitek L, Pucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem* 2006;110(33):16248–53.

Pathak, M.K.; Yi, T. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J. Immunol.* 2001, 167, 3391-3397.

Peterson AT, Shaw J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *Int J Parasitol.* 2003 Aug;33(9):919-31.

Pintado V, Martin Rabadan P, Rivera ML et al , Visceral Leishmaniasis in human immunodeficiency virus(HIV) - infected and non HIV - infected patients. A comparative study, *Medicine*, 2001; 80; 54-73

Pizzuto M, Piazza M, Senese D, Scalamogna C, Calattini S, Corsico L, et al. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients co-infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 2001;39:357-61.

Pradinaud, R. (1994). Le traitement de la leishmaniose tégumentaire par la pentamidine en Guyane française. *Medecine Tropicale* 54,418–22.

Rajasekariah GH, Ryan JR, Hillier SR, Yi LP, Stiteler JM, Cui L, et al. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *J Immunol Methods* 2001;252:105-19.

Rawat M., Singh D., Saraf S., Saraf S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biol. Pharm. Bull.* (2006) 29 1790–1798.

Rezai HR, Behforouz N, Amirhakimi GH, Konanteb J, 1977. Immunofluorescence and counter immunoelectrophoresis in the diagnosis of Kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71: 149–151.

Ribeiro JMC, 1989. Vector saliva and its role in parasite transmission. *Exp Parasitol.*, 69:104-106.

R. P. Feynman in *Nanotechnology: Research and Perspectives* (Ed.: J. Lewis), MIT Press, Boston, 1992, p. 347.

Sadigursky M, Brodskyn CI, 1986. A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates. *Am J Trop Med Hyg* 35: 942–944.

Santos-Gomes G, Gomes-Pereira S, Campino L, Araujo MD, Abranches P. Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral Leishmaniasis in human immunodeficiency virus-Leishmania sp-coinfected patients. *J Clin Microbiol* 2000;38:175-8.

Sassi A, Louzir H, Ben SA, Mokni M, Ben OA, Dellagi K. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic Leishmania major infection in Tunisia. *Clin Exp Immunol.* 1999;116:127-32

Schallig HD, Schoone GJ, Kroon CC, Hailu A, Chappuis F, Veecken H. Development and application of ‘simple’ diagnostic tools for visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2001;190:69-71.

Schoone GJ, Hailu A, Kroon CC, Nieuwenhuys JL, Schallig HD, Oskam L. A fast agglutination-screening test (FAST) for the detection of anti-Leishmania antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95:400-1.

Schubach, A., Haddad, F., Oliveira-Neto, M. P. et al. (1998). Detection of Leishmania DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *Journal of Infectious Diseases* 178, 911–4.

Scope, A., Trau, H., Andreas, G. et al. (2003). Experience with New World cutaneous leishmaniasis in Israeli travelers. *Journal of the American Academy of Dermatology* 49, 672–8.

Seaton, R. A., Morrison, J., Man, I. et al. (1999). Out-patientparenteral antimicrobial therapy—a viable option for the management of cutaneous leishmaniasis. *Quarterly Journal of Medicine* 92, 659–67.

Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomed: Nanotechnol. Biol Med* 2007;3 (2):168–71.

Shaked-Mishan, P.; Ulrich, N.; Ephros, M.; Zilberstein, D. Novel intracellular Sb(V) reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 3971-3976.

Sharquie, K. E., Najim, R. A., Farjou, I. B. et al. (2001). Oral zinc sulphate in the treatment of acute cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology* 26, 21–6.

Singh RK, Pandey HP, Sundar S. Visceral leishmaniasis (kala-azar): Challenges ahead. *Indian J Med Res* 2006;123:331-44.

Singh S, McGwire BS, Chang KP. Kinetoplast and nuclear DNA polymorphism of visceral *Leishmania* isolates from North-eastern India. *J Protozool Res* 1995;5:27-32.

Sondi, I. , and B. Salopek-Sondi. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* 275:177–182.

Sondi L. , Sondi B.S. , *Journal of colloid and interface science* 275,177 (2004)
Soto, J., Toledo, J., Gutierrez, P. et al. (2001). Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clinical Infectious Diseases* 33, E57–61.

Sunada, K., Watanabe, T. ve Hashimoto, K., (2003). Studies on Photokilling of Bacteria on TiO₂ Thin Film, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 156, 227-233.

Suri S.S., Fenniri H., Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J. Occup. Med. Toxicol.* (2007) 2 16.

Taylor PL, Ussher AL, *Biomaterials* 26, 7221(2005)

Tokumaru, T., Y. Shimizu, and C. L. Fox. 1984. Antiviral activities of silver sulfadiazine and ocular infection. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 8:151–158.

Tomkins, A. & Bryceson, A. (1972). Ocular leishmaniasis and pentamidine diabetes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 66, 948–50.

Torchilin V.P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS. J.* (2007) 9 E128–E147.

Uzun S, Uslular C, Yücel A. Acar MA, Ozpoyraz M, Memisoğlu HR, 1999. Cutaneous leishmaniasis: evaluation of 3074 cases in the Cukurova Region of Turkey. *Br J Dermatol*, 140: 347-350.

Vigervani G.M. , Galli M., Rizzadini G., Antinori S., Almaviya M., Coen M. , Visceral Leishmaniasis in HIV infection, a report of three cases, *AIDS*, 3, 674, 1989.

Wang Y.X., Hussain S.M., Krestin G.P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur. Radiol.* (2001) 11 2319–2331.

Wargburg A, Schlein Y, 1986. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg.*, 35(5):926-930.

Wei, C., W.-Y. Lin, Z. Zaina, N. E. Williams, K. Zhu, A. P. Kruzic, R. L. Smith, and K. Rajeshwar , 1994 , ‘Bactericidal activity of TiO₂ photocatalyst in aqueous media: toward a solar-assisted water disinfection system’ . *Environ. Sci. Technol.* 28:934-938.

Xu J, Sun Y, Huang J, Chen C, Liu G, Jiang Y, Zhao Y, Jiang Z. Photokilling cancer cells using highly cell-specific antibody-TiO₂ bioconjugates and electroporation. *Bioelectrochemistry*. 2007 Nov;71(2):217-22.

Xu MH, Huang NP, Xiao ZD, Lu ZH. , 1998 , ‘ Photoexcited TiO₂ nanoparticles through OH-radicals induced malignant cells to necrosis’ . *Supramole Sci*; 5: 449-451

Yang JY, Yang MQ, Arabnia HR, Deng Y. Genomics, molecular imaging, bioinformatics, and bio-nano-info integration are synergistic components of translational medicine and personalized healthcare research. *BMC Genomics*. 2008 Sep 16.

Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., Fukushima S., Okamoto K., Kataoka K. Selective delivery of adriamycin to a solid tumor using a polymeric micelle carrier system. *J. Drug Target.* (1999) 7 171–186.

Zhang AP, Sun YP. Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World J Gastroenterol*. 2004;10(21):3191-3

Zuckerman A, Lainson R, 1977. Leishmania. Kreier JP, eds, 1977. *Parasitic Protozoa*. Vol 1:Chapt 3, Academic Press New York, San Francisco, London. 57-133.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	09.07.1985
Doğum yeri	İstanbul
Lise 2000-2003	Üsküdar Çağrıbey Anadolu Lisesi
Lisans 2004-2008	Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans 2008-2010	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı