

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMUNOSTİMULAN POLİMERLER İLE ATTENÜE EDİLMİŞ *LEISHMANIA*
PARAZİTLERİNİN AŞI OLARAK ETKİNLİĞİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO*
İNCELENMESİ

SERHAT ELÇİÇEK

DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. MELAHAT BAĞIROVA

İSTANBUL, 2013

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İMMUNOSTİMULAN POLİMERLER İLE ATTENÜE EDİLMİŞ *LEISHMANIA*
PARAZİTLERİNİN AŞI OLARAK ETKİNLİĞİNİN *IN VİTRO* VE *IN VİVO*
İNCELENMESİ**

Serhat ELÇİÇEK tarafından hazırlanan tez çalışması 27.02.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

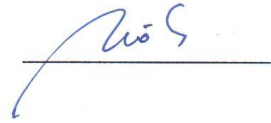
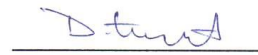
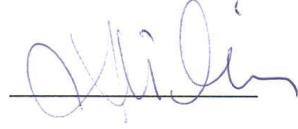
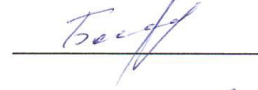
Yrd. Doç.. Dr. Melahat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Yaşar Ali ÖNER
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Murat HÖKELEK
İstanbul Üniversitesi



ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca akademik bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen çok değerli danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya, çalışmalarım boyunca aynı ilgi ve desteği gösteren değerli Hocam Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e, teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca kendisi ile tanışmamış olsamda polimerler konusundaki engin bilgileri ile dünyada önemli bir yere sahip olan ve çalışmalarımızda polimerleri kullanmamızı sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü kurucusu Sayın Prof. Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE'ye

Bu çalışmanın yerine getirilmesine imkan sağlayan Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına, Fen Bilimleri Enstitüsüne, Biyomühendislik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK'a ve bölümümüzün değerli öğretim üyelerine

Çalışmalarım boyunca her türlü yardım ve desteğini benden esirgemeyen İstanbul Çapa Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Yaşar Ali ÖNER ve Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. H.Soner ALTUNDOĞAN'a

Değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK ve Prof. Dr. Murat HÖKELEK'e

SEM analizleri için verdiği destekten dolayı Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Nanobiyoteknoloji Laboratuvarı sorumlusu Sayın Prof. Dr. Mustafa ÇULHA ve Araş. Gör. Zehra YILMAZ'a.

Son olarak deneysel çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ, Serkan YAMAN, Arş. Gör. Murat TOPUZOĞULLARI, Araş. Gör. Emrah Şefik ABAMOR, Serap YEŞİLKIR BAYDAR, Dr. Sezen CANIM Ateş ve Gökçe ÜNAL'a teşekkürü borç bilirim.

Şubat, 2013

Serhat ELÇİÇEK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	x
KISALTMA LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiv
ÇİZELGE LİSTESİ	xvii
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xx
BÖLÜM 1.....	22
GİRİŞ.....	22
1.1 Literatür Özeti	22
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Hipotez	4
BÖLÜM 2.....	6
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 <i>Leishmania</i> Parazitleri	6
2.2 Parazitlerin Morfolojisi	7
2.3 Parazitlerin Hayat Döngüsü	9
2.4 Leishmaniasis	11
2.4.1 Kutanöz Leishmaniasis.....	13
2.4.2 Mukokutanöz Leishmaniasis	13
2.4.3 Visseral Leishmaniasis	14
2.5 İmmunoloji.....	15
2.5.1 <i>Leishmania</i> Parazitlerinin Konak Hücre İçindeki Yaşamı	16
2.6 Mononükleer Fagositik Sistem Hücrelerinin Gelişimi.....	20
2.6.1 J774 Hücre Hattı	22
2.6.2 Makrofajların Aktivasyonu ve Fonksiyonları	22
2.6.2.1 Fagositöz	23

2.6.2.2	Salgılama	24
2.6.2.3	Antijen Sunma	24
2.7	Nitrik oksit (NO)	24
2.8	Leishmaniasise karşı aşı adaylar	25
2.8.1	Birinci Jenerasyon Aşılar	26
2.8.1.1	Zayıflatılmış Canlı <i>Leishmania</i> Aşıları	26
2.8.1.2	Ölü <i>Leishmania</i> Aşıları	27
2.8.2	İkinci Jenerasyon Aşılar	28
2.8.2.1	Gp63	28
2.8.2.2	PSA-2/gp46/M-2	29
2.8.2.3	LACK	30
2.8.2.4	FML	30
2.8.2.5	LIESA-MDP	31
2.8.2.6	Sistein Proteinaz (CPs)	31
2.8.2.7	Glucose-regulated protein 78 (GRP78)	32
2.8.2.8	Amastigot Antijenleri (P4, P8,A2)	32
2.8.2.9	HASPB1	33
2.8.2.10	LCR1	33
2.8.2.11	H1 (Histon 1)	33
2.8.2.12	ORFF	34
2.8.2.13	dp72	34
2.8.2.14	P0	34
2.8.2.15	KMP-11	34
2.8.2.16	PFR-2	35
2.8.2.17	Poliprotein aşıları	35
2.8.3	Üçüncü Jenerasyon <i>Leishmania</i> Aşıları: DNA Aşıları	36
2.8.4	Heterolog prime-boost aşı	37
2.9	<i>Leishmania</i> Aşı Adaylarında Test Edilen Adjuvanlar	38
2.9.1	İnterlökin-12 (IL-12)	38
2.9.2	Granülösit makrofaj-koloni stimulating faktör (GM-CSF)	38
2.9.3	Bacille Calmette Guerin (BCG)	39
2.9.4	Montanide ISA 720	39
2.9.5	Alüminyum tuzları	39
2.9.6	CPG Oligodeoksinükleotit (CpG ODN)	40
2.9.7	Lipozomlar	40
2.9.8	Glukan	40
2.9.9	<i>Corynebacterium parvum</i> (<i>C. parvum</i>)	40
2.9.10	Saponinler (Quil-A, ISCOM and QS-21)	40
2.9.11	Freund's adjuvants	41
2.10	Adjuvan Olarak Kullanılan ilk Sentetik Polimer: Polioksidonyum (POX)	41
2.11	Polimerler	43
2.11.1	Polimerlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılmaları	43
2.11.2	Polielektrolitler	44
2.11.2.1	Homopolielektrolitler	45
2.11.2.2	Poliamfolitler	46
2.12	Poliakrilik Asit	46

BÖLÜM 3.....	49
DENEYSEL ÇALIŞMALAR	49
3. MATERYAL.....	49
3.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler	49
3.2 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri	52
3.3 Çözeltilerin Hazırlanması	55
3.3.1 1x PBS Tampon Hazırlanması	55
3.3.2 1x Tripsin solusyonu	55
3.3.3 RPMI 1640 Medyumunun Hazırlanması.....	55
3.3.4 Hücre Dondurma Medyumunun Hazırlanması.....	55
3.3.5 MTT Solüsyonunun Hazırlanması	55
3.3.6 MTT Reaksiyon Sonlandırıcı Solüsyonun Hazırlanması	55
3.3.7 Poliakrilik Asit (50 mg/ml, MA: 100,000 dalton) Çözeltisinin Hazırlanması.....	56
3.3.8 Poliakrilik Asit (50 mg/ml, MA: 30,000) Çözeltisinin Hazırlanması ...	56
3.3.9 Polioksidonyum Çözeltisinin Hazırlanması	56
3.3.10 ELISA için Kaplama Çözeltisi (Coating buffer)	57
3.3.11 ELISA için Substrat Tamponu (pH:10,4)	57
3.3.12 ELISA için Substrat Çözeltisi	57
3.3.13 ELISA için PBS/Tween20 Çözeltisi	57
3.3.14 ELISA için PBS/Tween20/milk Çözeltisi	57
3.3.15 İnterlökin 2 (IL2) , İnterlökin 4 (IL4), İnterlökin 10 (IL10) ve γ - interferon (INF- γ) için Solüsyonlar	57
3.4 METOD	58
3.4.1 Hücrelerin Kriyobanktan Çıkarılması	58
3.4.1.1 J774 Hücre Hattının Kriyobanktan Çıkarılması.....	58
3.4.1.2 MCAN/TR / 2005 / EP126 <i>L. infantum</i> Suşlarının Kriyobanktan Çıkarılması.....	58
3.4.2 Hücre Hatlarının Kültürü.....	58
3.4.2.1 J774 Hücre Hattının Kültürü	58
3.4.2.2 Tripan Mavisi (TM) ile J774 Hücre Canlılığının Tayin Edilmesi ve Hücre Sayımı	59
3.4.2.3 MCAN/TR / 2005 / EP126 <i>Leishmania</i> Promastigot Kültürünün Yapılması	60
3.4.2.4 Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı	60
3.4.3 Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması.....	60
3.4.3.1 J774 Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması	60
3.4.3.2 MCAN/TR / 2005 / EP126 Promastigotlarının Dondurulması ve Saklanması	61
3.4.4 Balb/c türü Farelerden Peritoneal Makrofaj Hücrelerinin İzolasyonu	61
3.4.5 POX ve PAA'nın Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi	61
3.4.5.1 POX ve PAA'nın Fare Periton Makrofajları ve J774 Hücrelerindeki 48 Saatlik Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi	62
3.4.5.2 POX ve PAA'nın MCAN/TR / 2005 / EP126 Promastigotlarına 48 Saatlik Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi	63

3.4.6	Promastigotların PAA ve POX'a Maruz Tutulduktan Sonra Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) Ultrayapı Analizi.....	63
3.4.7	Promastigotların PAA ve POX'a Maruz Tutulduktan Sonra Enfektiflik Özelliklerinin İncelenmesi	64
3.4.7.1	Makrofajların Enfekte Edilmesi	64
3.4.7.2	Enfekte Olmuş Makrofajların Giemsa ile Boyanması.....	65
3.4.7.3	Enfektifliğin Hesaplanması	66
3.4.8	PAA ve POX'a Maruz Tutulan Promastigotların Makrofaj Kültüründe Nitrik Oksit Üretimine Etkisi.....	66
3.4.8.1	Griess Reaktifi'nin Hazırlanması:.....	66
3.4.8.2	Standartların Hazırlanması:.....	67
3.4.9	PAA ve POX'un Antileishmanial Etkisinin Amastigot-Makrofaj Kültüründe İncelenmesi	68
3.4.9.1	Amastigot-Makrofaj Kültürünün Elde edilmesi	69
3.4.9.2	PAA ve POX'un Antileishmanial Etkisinin Amastigot-Makrofaj Kültüründe MTT Yöntemiyle Belirlenmesi.....	69
3.4.9.3	PAA ve POX'un Antileishmanial Etkisinin Amastigot-Promastigot Dönüşümüne Göre Belirlenmesi.....	70
3.5	IN VIVO HAYVAN ÇALIŞMALARI	71
3.5.1	Çeşitli Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması.....	71
3.5.2	PAA ve POX'a Maruz Kalmış Promastigotların <i>Balb/C</i> Farelere Enjekte Edilmesi	71
3.5.3	<i>BALB/C</i> Farelerden Serum Örneklerinin Alınması	71
3.5.4	ELISA Yöntemi ile Serumdaki İmmünoglobulin Miktarlarının Tayini. 72	
3.5.4.1	Antijen Hazırlama	72
3.5.4.2	ELISA Plate'lerin Tam Parazit Antijeni ile Kaplanması.....	72
3.5.4.3	Plate'lere Fare Serum Örneklerinin Eklenmesi	73
3.5.4.4	Enzim Bağlı Anti-Mouse IgG (Fc) Antikorlarının Eklenmesi	73
3.5.4.5	Substrat Eklenmesi ve ELISA Cihazında Okuma	73
3.5.5	Deney Hayvanlarının PAA ve POX'a Maruz Kalmış Parazitlerde İmmünizasyonundan Sonra <i>Leishmania</i> Parazitleriyle Enfekte Edilmesi	74
3.5.5.1	İmmünize Edilen Farelerin <i>L.infantum</i> Parazitleri ile Efekte Edilmesi 74	
3.5.6	Giemsa Boyama ve Mikro Kültür Yöntemi (MKY) ile Fare Periferik Kanında Parazit Varlığının ve Miktarının Tespit Edilmesi	74
3.5.7	Farelerin Sakrifiye Edilmesi ve Organlarının Ayrılması.....	75
3.5.8	Peritonal Makrofaj Hücrelerinin İzolasyonu ve <i>Leishmania</i> Promastigotları ile <i>In Vitro</i> Enfeksiyonu	76
3.5.8.1	Enfekte Olmuş Periton Makrofajların Giemsa ile Boyanması.....	77
3.5.8.2	Enfektifliğin Hesaplanması	77
3.5.9	Karaciğer ve Dalaktan Simir Hazırlanması ve Enfeksiyonun Değerlendirilmesi.....	77
3.5.10	Gecikmiş Tip Aşırıduyarlılık (DTH) Testi	78
3.5.11	Aşı Tarafından İndüklenen Sitokin Üretiminin Belirlenmesi	79
3.5.11.1	İnterlökin 2 (IL-2) Üretiminin ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi	79
	IL-2 için ELISA Plate'in Hazırlanması	79

IL-2 için Örnek ve Standartların Eklenecek Ölçümün Yapılması	79
3.5.11.2 İnterferon- γ (IFN- γ) Üretiminin ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi .	80
IFN- γ için ELISA Plate'in Hazırlanması	80
IFN- γ için Örnek ve Standartların Eklenecek Ölçümün Yapılması	81
3.5.11.3 İnterlökin 4 (IL-4) Üretiminin ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi	81
IL-4 için ELISA Plate'in Hazırlanması	82
IL-4 için Örnek ve Standartların Eklenecek Ölçümün Yapılması	82
3.5.11.4 İnterlökin 4 (IL-4) Üretiminin ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi	82
IL-10 için ELISA Plate'in Hazırlanması	83
IL-10 için Örnek ve Standartların Eklenecek Ölçümün Yapılması	83
3.6 İstatistik Analiz	84
BÖLÜM 4	85
DENEYSEL SONUÇLAR	85
4. IN VİTRO ÇALIŞMA SONUÇLARI	85
4.1 POX ve PAA'nın J774 Fare Makrofaj Hücre Hattı ve Primer Fare Periton Makrofajlarında Toksik Etkisinin İncelenmesi	85
4.2 POX ve PAA'nın <i>L.infantum</i> Promastigotları Üzerine Toksik Etkisinin İncelenmesi	88
4.3 Promastigotların PAA ve POX'a Maruz Tutulduktan Sonra Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) Ultrayapı Analiz Sonuçları	91
4.4 PAA'ya Maruz Kalmış <i>L.infantum</i> Promastigotlarının J774 Hücreleri ile Etkileşimi ve Enfektifliğinin İncelenmesi	95
4.5 POX'a Maruz Kalmış <i>L.infantum</i> Promastigotlarının J774 Hücreleri ile Etkileşimi ve Enfektifliğinin İncelenmesi	104
4.6 PAA ve POX'un Makrofaj Kültüründe Nitrik Oksit Üretimine Etki Sonuçları	111
4.7 PAA ve POX'a Maruz Tutulan Promastigotların Makrofaj Kültüründe Nitrik Oksit Üretimine Etki Sonuçları	112
4.8 PAA ve POX'un Antileishmanial Etkisinin Amastigot-Makrofaj Kültüründe İnceleme Sonuçları	115
5. IN VIVO ÇALIŞMA SONUÇLARI	120
5.1 PAA ve POX'a Maruz Tutulan Promastigotların Fare Serumlarında Antileishmanial Antikor Seviyelerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi	120
5.2 Giemsa Boyama ve Mikro Kültür Yöntemi (MKY) ile Fare Periferik Kanında Parazit Varlığının Belirlenmesi	124
5.3 Periton Makrofajların <i>In Vitro</i> Enfektiflik Sonuçları	124
5.4 Gecikmiş Tip Aşırıduyarlılık (DTH) Yanıtı	125
5.5 Dalak ve Karaciğer Ağırlıklarının Belirlenmesi	126
5.6 Karaciğer ve Dalaktan Simir Hazırlanması ve Enfeksiyonun Değerlendirilmesi	128
5.7 POX ve PAA'ya Maruz Kalmış Fare Grupları Ve Kontrol Grubunun Sitokin Yanıtları	130
BÖLÜM 5	137

SONUÇ VE ÖNERİLER	137
KAYNAKLAR.....	146
EK-A.....	174
ETİK KURUL TUTANAĞI	174
ÖZGEÇMİŞ.....	175

SİMGE LİSTESİ

A ₂₆₀	260 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri
A ₂₈₀	280 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri
cc	Santimetre küp
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
J774	Fare tümör monosit hücre hattı
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
Sb	Antimon
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
°C	Santigrat Derece

KISALTMA LİSTESİ

AP	Alkalın Fosfataz
BSA	Siğır Serum Albumin (Bovine Serum Albümine)
CD4 ⁺	CD4 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit
CD8 ⁺	CD8 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit
CFA	Complete Freund's Adjuvan
CO ₂	Karbondioksit
COOH	Karboksilik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Test
Fc	Fragment crystallizable (kristalize olabilen bölge)
FBS	Siğır Fetal Serum (Fetal Bovine Serum)
Gp63	Leishmania yüzey membran metaloproteazı
H ₂ O	Su
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
IgA	İmmünoglobulin A
IgD	İmmünoglobulin D
IgE	İmmünoglobulin E
IgG	İmmünoglobulin G
IgM	İmmünoglobulin M
IMP	İnozin monofosfat
K ₂ HPO ₄	Potasyum fosfat (di)
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat (mono)
MACS	Manyetik Aktive Hücre Ayırımı (Magnetic Activated Cell Sorting)
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MHC	Major Histocompatibility Complex
MKL	Mukokütönöz leishmaniasis
MKY	Mikro kültür yöntemi
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MW	Moleküler Ağırlık (Molecular Weight)
Na ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat

NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	Monosodyum fosfat
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NaN ₃	Sodyum azid
NH ₂	Amin
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
NK	Doğal öldürücü hücreler (Natural Killer cells)
NO	Azot monoksit (Nitrik Oksit)
OD	Optik Yoğunluk (Optical Density)
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate buffered saline)
PEG	Polietilen Glikol
pH	Potansiyel hidrojen
PNNP	Para-Nitrofenilfosfat
RNA	Ribonükleik asit
RPM	Bir dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
SDS	Sodium Dödesil Sülfat
TEMED	Tetrametil etilen diamin
TGF-β	Transforming growth factor P (transforme büyüme faktörü beta)
Th ₁	T helper 1 (Yardımcı T hücre yanıtı alt sınıf 1)
Th ₂	T helper 2 (Yardımcı T hücre yanıtı alt sınıf 2)
TMP	Timidin monofosfat
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa
UV	Ultraviyole
ZnCl ₂	Çinko klorür
AIDS	Edinilmiş bağışık yetersizliği hastalığı
EP126	<i>Leishmania infantum</i> suşu
FCS	Fetal calf serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDS	Fetal dana serum
HCl	Hidrojen klorür
HEPA	Yüksek etkili partikül yakalayıcı
HEPES	N-2-hidroksi etilpiperazin N-2 etansulfonik asit
HPMA	N-(2-hidroksipropil) metakrilamid
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid
NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ HPO ₄	Di sodyum hidrojen fosfat
NIPAA	N-izopropil akril amid
NNN	Novy-MacNeal ve Nicole medyum
PEG	Polietilen glikol
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
UV	Ultraviyole
PAA	Poliakrilik asit

POX	Polioksidonyum
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
LPG	Lipofosfoglikan
VL	Viseral leishmaniasis
KL	Kütanöz leishmaniasis
MKL	Mukokütanöz leishmaniasis
IL-2	İnterlökin 2
IL-4	İnterlökin 4
IL-10	İnterlökin 10
IFN- γ	Gama interferon
APC	Antijen sunan hücreler
DC	Dendritik hücreler
CFU-M	makrofaj koloni sitimüle edici faktör
MHC	major histokompabilite kompleks
INOS	İndüklenebilir Nitrik oksit sentaz

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Leishmania parazitlerinin formları[21], [22]	9
Şekil 2.2 Leishmania parazitlerinin hayat döngüsü [25], [26].	11
Şekil 2.3 Leishmania enfeksiyonlarının immunopatogenesi [67]	20
Şekil 2.4 Makrofaj aktivasyonu [84]	22
Şekil 2.5 POX'un moleküler yapısı	42
Şekil 2.6 Polielektrolitlerin sınıflandırılması a.polikasyon b.polianyon c.poliampolit[252]	44
Şekil 2.7 Poliakrilik asitin sulu çözeltideki dissosiyasyonu	46
Şekil 2.8 Poliakrilik asitin yapısı	47
Şekil 4.1 J774 hücrelerinin 30 ve 100 kDa PAA ile 48 saat inkübasyon sonrası MTT yöntemiyle sitotoksik etkisi	86
Şekil 4.2 Primer fare periton makrofajlarında 30 ve 100 kDa PAA ile 48 saat inkübasyon sonrası MTT yöntemiyle sitotoksik etkisi	87
Şekil 4.3 J774 fare makrofaj hücre hattı ve primer fare periton makrofajlarında POX'un MTT yöntemiyle sitotoksik etkisi	88
Şekil 4.4 Leishmania infantum promastigotlarında 30 ve 100 kDa PAA ile 48 saat inkübasyon sonrası MTT yöntemiyle sitotoksik etkisi	89
Şekil 4.5 Leishmania infantum promastigotlarında POX ile 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası MTT yöntemiyle sitotoksik etkisi.....	90
Şekil 4.6 Leishmania infantum promastigotlarında POX ile 120 saat inkübasyon sonrası sitotoksik etkisi	91
Şekil 4.7 L.infantum promastigotlarının morfolojik görüntüsü (SEM, 3000x)	92
Şekil 4.8 L.infantum promastigotlarının morfolojik görüntüsü (SEM, 15000x)	92
Şekil 4.9 L.infantum promastigotlarının PAA'ya bir saat maruz tutulduktan sonra morfolojik görüntüsü (SEM, 5000x).....	93
Şekil 4.10 L.infantum promastigotlarının PAA'ya bir saat maruz tutulduktan sonra morfolojik görüntüsü (SEM, 15000x).....	94
Şekil 4.11 L.infantum promastigotlarının POX'a bir saat maruz tutulduktan sonra morfolojik görüntüsü (SEM, 5000x).....	95
Şekil 4.12 L.infantum promastigotlarının POX'a bir saat maruz tutulduktan sonra morfolojik görüntüsü (SEM, 15000x).....	95
Şekil 4.13 L.infantum ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Kontrol, Giemsa boyama, 48 saat sonra, 100x).....	96
Şekil 4.14 Giemsa boyama ile PAA'ya maruz kalmış önemli olan konsantrasyonlardaki morfolojik sonuçlar görülmektedir.	103

Şekil 4.15	50 µg/ml POX'a bir saat maruz kalmış L.infantum promastigotları ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Giemsa boyama, 24 saat sonra, 100x)	108
Şekil 4.16	250 µg/ml POX'a bir saat maruz kalmış L.infantum promastigotları ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Giemsa boyama, 24 saat sonra, 100x)	108
Şekil 4.17	1000 µg/ml POX'a bir saat maruz kalmış L.infantum promastigotları ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Giemsa boyama, 24 saat sonra, 100x)	109
Şekil 4.18	2000 µg/ml POX'a bir saat maruz kalmış L.infantum promastigotları ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Giemsa boyama, 24 saat sonra, 100x)	109
Şekil 4.19	6000 µg/ml POX'a bir saat maruz kalmış L.infantum promastigotları ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Giemsa boyama, 24 saat sonra, 100x)	110
Şekil 4.20	12000 µg/ml POX'a bir saat maruz kalmış L.infantum promastigotları ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Giemsa boyama, 24 saat sonra, 100x)	110
Şekil 4.21	PAA'nın farklı makrofaj hücrelerinde NO üretimine etkisi	111
Şekil 4.22	POX'un farklı makrofaj hücrelerinde NO üretimine etkisi	112
Şekil 4.23	PAA'ya maruz kalan L.infantum promastigotlarının J774 makrofaj hücrelerinde NO üretimine etkisi	113
Şekil 4.24	Farklı konsantrasyonlarda polioksidonyuma bir saat maruz kalmış L.infantum promastigotlarının makrofaj hücrelerinde NO üretimi üzerine etkisi	114
Şekil 4.25	Farklı konsantrasyonlarda polioksidonyuma 24 saat maruz kalmış L.infantum promastigotlarının makrofaj hücrelerinde NO üretimi üzerine etkisi	114
Şekil 4.26	Farklı konsantrasyonlarda polioksidonyuma 1 ve 24 saat maruz kalmış L.infantum promastigotlarının makrofaj hücrelerinde NO üretimi üzerine etkisi	115
Şekil 4.27	Glucantim'in hücre içi amastigot kültüründe antileishmanial etkisi	116
Şekil 4.28	Glucantim'in hücre içi amastigot kültüründe NO üretimine etkisi	116
Şekil 4.29	PAA'nın hücre içi amastigot kültüründe antileishmanial etkisi	117
Şekil 4.30	PAA'nın hücre içi amastigot kültüründe NO üretimine etkisi	118
Şekil 4.31	POX'un hücre içi amastigot kültüründe antileishmanial etkisi	119
Şekil 5.1	PAA ve POX'a maruz tutulan promastigotların fare serumlarında antileishmanial antikor seviyeleri	121
Şekil 5.2	İlk 3 hafta boyunca farelerde oluşan antikor şiddeti	122
Şekil 5.3	1. ve 2. hafta antileishmanial antikor seviyesi	122
Şekil 5.4	Haftalara göre antileishmanial antikor seviyesi	123
Şekil 5.5	POX ve PAA'ya maruz kalmış fare gruplarında kontrole göre enfeksiyon yüzdesindeki düşüş	125
Şekil 5.6	DTH yanıtına bağlı olarak POX ve PAA'ya maruz kalmış fare grupları ve kontrolde ayaktaki yüzde kalınlık artışı	126

Şekil 5.7	POX ve PAA'ya maruz kalmış fare grupları ve kontrol grubunun dalak ağırlığı (mg)	127
Şekil 5.8	POX ve PAA'ya maruz kalmış fare grupları ve kontrol grubunun karaciğer ağırlığı (mg)	127
Şekil 5.9	POX ve PAA'ya maruz kalmış fare grupları ve kontrol grubunun karaciğer parazit yükü (LDU)	128
Şekil 5.10	POX ve PAA'ya maruz kalmış fare grupları ve kontrol grubunun dalak parazit yükü (LDU)	129
Şekil 5.11	POX ve PAA'ya maruz kalmış fare grupları ve kontrol grubunun dalak ve karaciğere ait parazit yükündeki azalma yüzdeleri.....	129
Şekil 5.12	IFN- γ üretimine ait standart eğri	130
Şekil 5.13	IL-2 üretimine ait standart eğri	131
Şekil 5.14	IL-4 üretimine ait standart eğri	131
Şekil 5.15	IL-10 üretimine ait standart eğri	132
Şekil 5.16	POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IFN- γ sitokin yanıtları.....	132
Şekil 5.17	POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IFN- γ sitokin yanıt ortalaması (enfeksiyondan 45 gün sonra)	133
Şekil 5.18	POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-2 sitokin yanıtları	133
Şekil 5.19	POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-2 sitokin yanıt ortalaması (enfeksiyondan 45 gün sonra)	134
Şekil 5.20	POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-4 sitokin yanıtları	134
Şekil 5.21	POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-4 sitokin yanıt ortalaması (enfeksiyondan 45 gün sonra)	135
Şekil 5.22	POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-10 sitokin yanıtları	135
Şekil 5.23	POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-10 sitokin yanıt ortalaması (enfeksiyondan 45 gün sonra)	136

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1	<i>Leishmania</i> parazitlerinin sınıflandırılması [17] 7
Çizelge 2.2	Önemli <i>Leishmania</i> türleri ve coğrafik dağılımları [14]..... 11
Çizelge 2.3	Önemli <i>Leishmania</i> türleri ve coğrafik dağılımları (devamı)..... 12
Çizelge 2.4	Akrilik asitin bazı özellikleri [258]..... 47
Çizelge 3.1	Ekipman ve sarf malzemeler 49
Çizelge 3.2	Kimyasal ve besiyerleri 52
Çizelge 3.3	SEM analizi öncesi hücreleri hazırlama protokolü 64
Çizelge 3.4	Örneklerin Plate Üzerindeki Yerleşimi 68
Çizelge 3.5	Giemsa ve Mikrokültür yöntemi ile fare periferik kanında parazitlerin değerlendirilmesi 75
Çizelge 4.1	Molekül ağırlığı 30 ve 100 kDa olan 1 mg PAA'ya maruz kalmış <i>L.infantum</i> promastigotlarının enfektifliği..... 98
Çizelge 4.2	Molekül ağırlığı 30 ve 100 kDa olan 2,5 mg PAA'ya maruz kalmış <i>L.infantum</i> promastigotlarının enfektifliği..... 99
Çizelge 4.3	Molekül ağırlığı 30 ve 100 kDa olan 5 mg PAA'ya maruz kalmış <i>L.infantum</i> promastigotlarının enfektifliği..... 101
Çizelge 4.4	Molekül ağırlığı 30 ve 100 kDa olan 10 mg PAA'ya maruz kalmış <i>L.infantum</i> promastigotlarının enfektifliği..... 102
Çizelge 4.5	25, 50 ve 100 µg/ml POX'a maruz kalmış <i>L.infantum</i> enfektifliği..... 105
Çizelge 4.6	250, 500 ve 1000 µg/ml POX'a maruz kalmış <i>L.infantum</i> promastigotlarının enfektifliği 106
Çizelge 4.7	2000, 6000 ve 12000 µg/ml POX'a maruz kalmış <i>L.infantum</i> promastigotlarının enfektifliği 107
Çizelge 5.1	Giemsa ve Mikrokültür yöntemi ile fare periferik kanında parazit derecelendirme sonuçları 124

**İMMUNOSTİMULAN POLİMERLER İLE ATTENÜE EDİLMİŞ *LEISHMANIA*
PARAZİTLERİNİN AŞI OLARAK ETKİNLİĞİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO*
İNCELENMESİ**

Serhat ELÇİÇEK

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA

Türkiye'nin ve dünyanın önemli halk sağlığı problemlerinden birisi olan leishmaniasis, dünya genelinde 98 ülkede yaygın olarak görülmekte olup, 350 milyon insan bu hastalığın tehdidi altında bulunmaktadır. Dünyada 12 milyon kişinin leishmaniasis ile enfekte olduğu ve her yıl bunlara 2 milyon yeni olgunun (1.5 milyon KL, 500.000 VL) eklendiği tahmin edilmektedir. Türkiye'de ise yaklaşık 20 milyon kişi bu enfeksiyona yakalanma riski altındadır. Hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar oldukça toksik olup, son yıllarda hastalık etkenlerinde kullanılan ilaçlara, vektörlerinde ise insektisitlere karşı direnç geliştiği, ayrıca küresel iklim değişikliği ile hastalığın giderek yaygınlaştığı bilinmektedir. Bununla birlikte çeşitli çalışmalar yapılmasına rağmen, şimdiye kadar *Leishmania*'ya karşı etkin bir aşı geliştirilmesi mümkün olmamıştır. Günümüze kadar Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesinde farklı yaklaşımlar denenmiştir. Bu yaklaşımlardan biri de zayıflatılmış canlı aşılarıdır. Ancak şimdiye kadar elde edilen zayıflatılmış aşılar da diğer aşı yaklaşımları gibi yeterli etkinlik gösterememiştir. Bunun esas nedenlerinden birisi, parazitlerin uzun süreli kültür ortamında avirulent hale getirilmesi sırasında parazitlerin önemli immunojen moleküllerinin (LPG ve gp63 gibi) giderek azalması veya bu moleküllere ait genlerden sorumlu bölgelerin susturulmasıdır. Buna göre de, etkinliği yüksek olan zayıflatılmış canlı aşıların elde edilebilmesi için bu dezavantajları barındırmayan yeni yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda polielektrolitlerin *in vivo* koşullarda immun cevabı artırdığı, özellikle

Poliakrilik asit (PAA) ve Polioksidonyum (POX)'un yüksek adjuvant etkisi olduğu bilinmektedir. Ancak, adjuvant özelliği olan polielektrolitlerin canlı *Leishmania* parazit molekülleri ile etkileşimi sonucunda *in vitro* (makrofaj hücre kültüründe) ve *in vivo* koşullarda oluşacak immün yanıt ve enfektiflik konusunda hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Buna göre de, bu tez çalışmasının amacı ilk kez olarak immünostümölan özelliği olan pozitif ve negatif yüklü polielektrolitlere (PAA ve POX) maruz kalan VL etkeni *L.infantum* promastigotlarının *in vitro* makrofaj kültürlerindeki enfektifliklerinin ve oluşturdıkları hücre yanıtlarının, *in vivo* olarak ise parazite karşı oluşan humoral ve hücrel immün yanıtın incelenmesi sonucunda leishmaniasise karşı attenüe aşı modelinin oluşturulmasında yeni bir yaklaşımın geliştirilmesi olmuştur.

Kullanılan Yöntemler: Hedefe ulaşmak için çalışmalarda Giemsa boyama ile enfektiflik tayini, Griess Reaktifi ile Nitrik Oksit Tayini, MTT ile hücre canlılık belirleme yöntemi ve morfolojik incelemeler için taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. *In vivo* çalışmalarda ise, fare serumundaki total IgG miktarı ve sitokin (IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN- γ) miktarları ELISA yöntemi kullanılarak, karaciğer ve dalaktaki parazit yükü LDU birimi olarak, periton makrofajlardaki % enfektiflik düşüşü ise giemsa boyama ile hesaplanmıştır. Ayrıca fare periferik kanındaki parazit varlığı giemsa boyama ve mikro kültür yöntemi (MKY) ile, gecikmiş tip aşırı duyarlılık ise DTH testi ile belirlenmiştir. Veriler, SPSS version 19.0 for Windows programı ile belirlenmiş ve $p < 0,05$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Sonuçlar: *In vitro* makrofaj kültürü incelendiğinde, polimere maruz kalmış parazitlerin enfektifliğini kaybetmiş olmasına rağmen, makrofajların NO üretimini indüklediği gösterilmiştir. *In vivo* fare modellerinde ise PAA'ya maruz kalmış parazitlerle enfekte olmuş fare gruplarında IgG antikor seviyesinin kontrole göre anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. Kontrole göre parazit yükündeki azalma yüzdeleri ise PAA'ya maruz kalan parazitler ile enfekte olmuş farelerin dalakları için $84,27 \pm 2,98$, karaciğerleri için $89,75 \pm 2,12$ olduğu belirlenmiştir. POX'a maruz kalan parazitlerle enfekte olmuş farelerin dalakları için $76,92 \pm 1,88$ ve karaciğerleri için ise $80,02 \pm 3,11$ oranında parazit yükünde düşüş olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Özellikle PAA'ya maruz kalan promastigotların immün sistemi Th1 tip hücre proliferasyonu yönünde uyararak, *L.infantum* enfeksiyonlarında koruyucu rolü olan IFN- γ sitokinlerinin üretimini indüklediği ve kontrole göre 7 kat artış olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Ayrıca POX ile yapılan deney sonuçları ise POX'un 6000 $\mu\text{g/ml}$ ve üzerindeki dozlarının hücre içi parazitlerin proliferasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir. Böylece bu çalışmada ilk kez olarak PAA ve POX kullanılarak leishmaniasise karşı attenüe olmuş aşı modelinin geliştirilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçların ileride leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde önemli bir rol oynayabileceği ve aynı zamanda immünoterapi açısından yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin temelini oluşturabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: POX, PAA, J774, *L.infantum*, toksisite, MTT, hücre kültürü, amastigot, Nitrik Oksit, Aşı

ABSTRACT

***IN VITRO AND IN VIVO* INVESTIGATION OF EFFECTIVENESS OF ATTENUATED *LEISHMANIA* PARASITES BY IMMUNOSTIMULANT POLYMERS AS A VACCINE**

Serhat ELÇİÇEK

Department of Biongeneering

PhD. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Melahat BAĞIROVA

Leishmaniasis, which is one of the important public health problems for both Turkey and the world, commonly occurs in 98 countries around the world and 350 million people are under the threat of this disease. Furthermore, 12 million people are currently infected with Leishmaniasis at worldwide and it is estimated that 2 million new cases are being added each year (1.5 million CL, 500,000 VL). Also in Turkey, approximately 20 million people are at the risk of the infection. At the same time, drugs that are used for the treatment, are highly toxic, besides the disease pathogens and vectors have developed resistance to the antileishmanial drugs and insecticides. Furthermore, it is known that the disease is spreading all around the world by the effect of global warming. However, although there are several studies to develop an effective vaccine against *Leishmania*, these endeavors have not reached to a success. Up to the present, different approaches have been tried to develop a vaccine against Leishmaniasis. One of these approaches is live attenuated vaccines approach. However, obtained attenuated vaccines could not demonstrate sufficient effectiveness, just like other vaccine approaches so far. One of the main reasons for this failure is gradually decrease of important immunogenic molecules of the parasites (such as LPG and gp63) during the avirulation process in long term culture or silencing of genes of these molecules. In order to obtain highly effective attenuated live

vaccines which alter these disadvantages, there is a great need to develop new approaches. Accordingly, it is known that polyelectrolytes increase the immune response, especially polyacrylic acid (PAA) and polyoxidonium (POX) shows high adjuvant effect *in vivo*. On the other hand, there is no study about the effects of the polyelectrolytes those have adjuvant properties and interacted with live *Leishmania* parasites related to immune response and infectivity *in vivo* and *in vitro* (macrophage cell cultures). According to this, the aim of this thesis study, as a first time, is to determine influence of immunostimulant negative and positive charged polyelectrolytes (PAA and POX) exposed VL agent *L. infantum* parasites to infectivity rates, resultant cell response effects *in vitro* and humoral and cellular immune responses *in vivo* and according to this to develop an approach in generating attenuate vaccine models against *Leishmania*.

Methods: To reach this target, Infectivity determination with Giemsa staining studies, determination of Nitric Oxide with Griess reagent, MTT method to determine cell viability and scanning electron microscopy for morphological studies were used in this thesis. On the other hand, in the *in vivo* studies total IgG and cytokine (IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- γ) amounts in the mouse serum was determined by ELISA method while liver and spleen parasite amount in LDU units, % infectivity decrease in peritoneal macrophages was calculated by Giemsa staining method. In addition, presence of parasites in the mouse peripheral blood was determined with Giemsa staining and micro culture method (MCM) while delayed-type hypersensitivity was determined by the DTH test. The data was performed with SPSS version 19.0 for Windows program and $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results: In the *in vitro* macrophage cells, it has been shown that parasites exposed to the polymer both lost infectivity and induced the production of NO. In *in vivo* mouse models PAA subjected mouse groups IgG antibody levels significantly increased compared to the control group, while the percentage of reduction in parasite burden compared to the control for PAA spleen 84.27 ± 2.98 , for PAA liver 89.75 ± 2.12 , for POX spleen 76.92 ± 1.88 and finally for POX liver 80.02 ± 3.11 has been found ($p < 0.05$). In particular PAA exposed promastigotes induces the immune system to Th1 type of cell proliferation, induce the production of IFN- γ cytokines that have protective role in *L. infantum* infections and 7-fold increase compared to control ($p < 0.05$). In addition, results of tests carried out with POX has shown for the first time that Pox doses that are above 6000 $\mu\text{g} / \text{ml}$, inhibits the proliferation of intracellular parasites. Thus, for the first time in this study it was shown that by using POX and PAA it is possible to develop a attenuated vaccine against leishmaniasis. The obtained results may constitute a basis for the development of a vaccine against leishmaniasis in the future or immunotherapy methods to be developed.

Keywords: POX, PAA, J774, *L. infantum* , toxicity, MTT, cell culture, amastigot, Nitric Oxide, vaccine

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Türkiye'nin ve dünyanın önemli halk sağlığı problemlerinden birisi olan leishmaniasis, *Leishmania* türündeki zorunlu hücre içi parazitlerin neden olduğu tropikal bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı en önemli tropikal hastalıklar listesinde Leishmaniasis, sıtmanın ardından ikinci sırada bulunmaktadır. Leishmaniasis, Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) 2010 raporuna göre , dünya genelinde 98 ülkede yaygın olarak görülmekte ve bu ülkelerden yalnızca 32'sinde bildirim zorunluluğu olduğu için olguların gerçek sayısı tam olarak kayıt edilememektedir ve 350 milyon insan risk altında bulunmaktadır [1]. Dünyada 12 milyon kişinin leishmaniasis ile enfekte olduğu ve her yıl bunlara 2 milyon yeni olgunun (1.5 milyon KL, 500.000 VL) eklendiği tahmin edilmektedir [2]. Türkiyede ise yaklaşık 20 milyon kişi bu enfeksiyonun tehditi altındadır. Ülkenin değişik bölgelerinde hastalığın visseral ve özellikle de kutanöz formlarına rastlanmaktadır [3]. Ülkemizde ise sadece Çukurova Bölgesi'nde her yıl yaklaşık 5000 kişinin Kutanöz Leishmaniasis'e yakalandığı tahmin edilmektedir.

Hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar oldukça toksik olup son yıllarda hastalık etkenlerinde kullanılan ilaçlara, vektörlerinde ise insektisitlere karşı dirençli olduğu bilinmektedir [4]. Ayrıca birçok çalışma yapılmasına rağmen şimdiye kadar *Leishmania*'ya karşı etkin bir aşı geliştirilememiştir. Ancak bu hastalığa karşı aşı geliştirilmesine DSÖ tarafından oldukça büyük önem verilmektedir [1]. Uzun yıllardan beri leishmaniasise karşı açt çalışmaları arasında çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir.

Leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde birçok yaklaşım bulunmaktadır [5]. Bunların en önemlilerinden biride zayıflatılmış canlı aşılaradır. Leishmaniasise karşı zayıflatılmış canlı aşı elde etmenin temel prensibi kullanılacak yönteme bağlı olarak parazitlerin virulans olmayan forma dönüşmesidir. Parazitlerin virulans olup olmadığı ise iki şekilde değerlendirilir. Bunlardan birincisi virulans olmayan ve zayıflatılmış olan promastigotların *in vitro* makrofaj kültürlerinde enfektif özelliklerinin değerlendirilmesine dayanır. Eğer zayıflatılmış promastigotlar makrofajlar tarafından fagosite edildikten sonra amastigot formunda yaşamlarını sürdürebiliyorsa, kullanılan zayıflatılmış canlı aşı geliştirme yöntemi başarısız kabul edilir. İkinci değerlendirme yöntemi ise zayıflatılmış promastigotların *in vivo* hayvan modellerinde kullanılmasıdır [6]. Bu amaçla günümüze kadar leishmaniasise karşı zayıflatılmış canlı aşı elde etmek amacı ile uzun süreli *in vitro* kültürden elde edilen *Leishmania* promastigotlarının kullanılması, sıcaklığın arttırılması, gama ışınlama, kimyasal mutajenez veya gentamisinli ortamda kültürün devam ettirilmesi gibi işlemlerin yapılması ve son zamanlarda ise parazitlerde gen eklenmesi ve silinmesine dayanan genetik yöntemler kullanılmıştır [7].

Yapılan çalışmalarda leishmaniasisli hastalardan yada hayvan modellerinden izole edilen parazitlerin *in vitro* kültürlerde yapılan pasaj sayısına bağlı olarak enfektif özelliklerini kaybettiği belirlenmiştir. *Leishmania* promastigotları kültür ortamında prosiklik (non-enfektif) ve metasiklik (enfektif) olmak üzere iki formda bulunurlar. Parazitlerin enfektik olduğu metasiklik promastigot formu özellikle kültürün stasyoner fazında daha fazla oranda bulunduğu saptanmıştır. Fakat yapılan uzun süreli kültürlerde stasyoner fazda bulunan metasiklik parazit sayısında bile önemli oranda düşüş meydana gelmiştir. Bu nedenle uzun süreli kültür promastigotları virulans özelliklerini kaybettikleri için zayıflatılmış aşı olarak kullanılmıştır. Yapılan bir çalışmada uzun süreli kültürden edilen *L.tropica* ve *L.major* parazitleri ile aşılanan Balb/c farelerde oldukça düşük seviyede latent parazitlerden dolayı kısmi koruma meydana gelmiştir [8].

Gentamisin, *Leishmania* kültürlerinde bakteri kontaminasyonlarını önlemek için kullanılır. Parazitler kültür ortamında 20 pasaj boyunca 20 µg/ml gentamisine maruz bırakılarak attenüe edilmiştir. Gentamisin ile attenuasyon *L.mexicana*, *L.major*,

L.donovani ve *L.infantum* promastigotlarında denenmiştir. Sonuçlar uzun süreli kültür parazitlerine benzer olarak kısmi koruma sağlamıştır [6].

Bir diğer yöntemde virulans *L.major* promastigotları kimyasal bir mutajen madde olan N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) ile maruz tutularak virulans olmayan parazitler elde edilmiştir. Bu parazitler ile yapılan aşılama lezyon bölgesinde kısmi bir koruma sağlansa da etkin bir koruma sağlanamamıştır. Ayrıca MNNG'ye maruz kalmış parazitlerin 19 °C'de kültürü yapılarak hem kimyasal mutajenez hem de ısı işlem ile attenuasyon yapılmıştır. Karsinojen olan MNNG letal ve mutajen etkisini DNA metilasyonu ile gösterir. MNNG zararlı etkisinden dolayı kullanımı uygun değildir [9].

Leishmaniasise karşı zayıflatılmış canlı aşı elde etmede kullanılan yöntemlerden biride radyo-attenuasyondur. Bu yöntemde *Leishmania* promastigotları 150 krad dozunda ışımaya maruz tutularak attenüe edilmiştir. Gama ışımaya maruz tutularak *L.major* ile yapılan aşılama koruma sağlansada etkin bir koruma sağlanamamıştır [10].

Canlı parazitlerden belli bir genin uzaklaştırılması (knock out) veya eklenmesi (knock in) yolu ile elde edilen zayıflatılmış canlı aşılar bulunmaktadır. Birincisine dihidrofolat reduktaz, timidilat sentaz, sistein proteinaz veya biyoperitin transporter gibi önemli genleri uzaklaştırılmış yani "knock-out" olmuş *Leishmania* türlerine aittir. Bu tür canlı aşılar farelerde koruma sağlamasına rağmen maymunlarda başarısız olmuştur. İkincisine ise, Herpes-I virusunun ganciclovir-duyarlı timidin kinaz genleri veya *Saccharomyces cerevisiae* ait 5-florositazine duyarlı sitozin deaminaz geni gibi ilaç duyarlılık genlerinin *Leishmania* genomuna eklenmesi (knock in) ile elde edilen "suicidal cassettes"aşıları dahildir [11]. Şu anda bu konu ile ilgili çalışmalar ön klinik araştırma aşamasındadır.

Şimdiye kadar elde edilen zayıflatılmış aşıların yetersiz olmasının esas nedenlerinden birisi uzun süreli kültür ortamında parazitlerin önemli immunojen moleküllerinin giderek azalması veya bu moleküllere ait genlerden sorumlu bölgelerin susturulmasıdır. Buna göre de zayıflatılmış canlı aşıların geliştirilmesi için bu dezavantajları barındırmayan yeni yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalarda bazı sentetik polimerlerin immün sistemi uyararak immünostimülan özellik gösterdiği belirlenmiştir. İmmünostimülan bir polimer olan Poliakrilik Asit (PAA)

sulu ortamda polianyonlara ayrılmaktadır. Antijen olmayan PAA, koyun eritrositleri ile maruz tutulduktan sonra, Balb/c verildiğinde, zamanla immün yanıtın arttığı ve bu maddelerin immünostümölan olarak görev aldıkları belirlenmiştir. Diğer sentetik bir polimer olan Polioksidonyum (POX) ile influenza virüs proteinlerinin konjugasyonu ile elde edilen ilk sentetik polimer aşısı Rusya’da yedi yılda 50 milyon kişiye uygulanmış ve başarılı sonuç almıştır [12]. POX, N-oxidized polyethylene-piperazine türevi olup, suda çözünebilen 60–100 kDa molekül ağırlığında, sentetik immunomodölatör bir moleküldür. Polielektrolit antijen konjugatının hem hücresel hemde humoral immün yanıtı 10 ila 100 kat arasında artırdığı ve koruyucu özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir [12]. Bu konu ile ilgili ise protozoon etkenleri ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Ancak TÜBİTAK projesi kapsamında tamamladığımız çalışmada ilk kez olarak *Leishmania* parazitlerinin yüzey moleküllerinden olan Lipofosfoglikan’ın (LPG) polimer konjugatı veya karışımı ile *in vivo* modellerde önemli bir aşı adayı olduğu ortaya çıkmıştır. Literatürde aynı zamanda polielektrolitlerin canlı hücrelerin yüzeyinde bulunan moleküllerle etkileşimi konusunda bilgiler bulunmaktadır. Böylece polimerlerin ister hücre yüzey molekülleri isterse de virüslerle olan etkileşimi, parazitler ile de etkileşiminin mümkün olabileceğini göstermektedir.

1.2 Tezin Amacı

Buna göre de, bu tez çalışmasının amacı ilk kez olarak immünostümölan özelliği olan pozitif ve negatif yüklü polielektrolitlere (PAA ve POX) maruz kalan Visceral Leishmaniasis (VL) etkeni *L.infantum* promastigotlarının *in vitro* makrofaj kültürlerindeki enfektifliklerinin ve oluşturdukları hücre yanıtlarının, *in vivo* olarak ise parazite karşı oluşan humoral ve hücresel immün yanıtın incelenmesi sonucunda leishmaniasise karşı atenué aşı modelinin oluşturulmasında yeni bir yaklaşımın geliştirilmesi olmuştur.

1.3 Hipotez

Bu çalışmanın hipotezi şimdiye kadar immünostimölan özelliği bilinen polimerler (PAA ve POX) ile canlı *Leishmania* parazitlerinde bulunan moleküller arası etkileşim

sonucunda, parazitlerin enfektiflik özelliklerini kaybettirmekle, leishmaniasise karşı polimerlere dayalı zayıflatılmış yeni aşı modelini geliştirmektedir.

Hipotezin gerçekleştirilmesi için aşağıdakiler öngörülmektedir.

1.Farklı yüklere sahip polielektrolitlerin *Leishmania* parazitlerine maruz tutularak non-enfektif parazitlerin elde edilmesi

2.Yüzey molekülleri polimerler ile kaplanmış olan *Leishmania* parazitlerinin;

- In vitro* makrofaj hücre kültürlerinde, makrofajlar tarafından öldürülerek hücre yanıtının oluşması
- In vivo* fare modellerinde ise humoral ve hücresel immune yanıtın oluşması

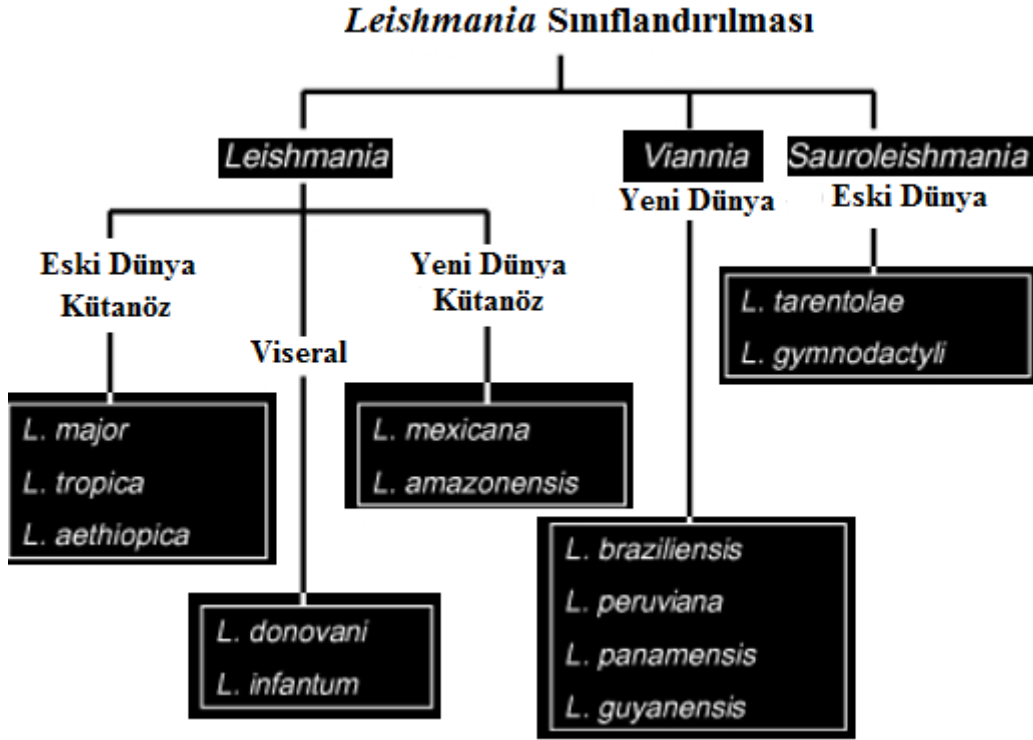
2. GENEL BİLGİLER *Leishmania* Parazitleri

Leishmania parazitlerinin neden olduğu *Leishmania* hastalığı (Leishmaniasis), klinik ve epidemiyolojik açıdan çok çeşitlilik gösteren ve ciddi bir halk sağlığı problemi olarak tüm dünyada önemini koruyan bir hastalıktır [13]. Zorunlu hücre içi parazit olan *Leishmania*, trypanozom ailesinin kinetoplastida sınıfına aittir. *Leishmania* parazitleri ile enfekte dişi tatarcıkların kan emmesi sırasında hastalığı bulaştırır [2].

Leishmania parazitleri ilk kez olarak Leishman tarafından 1900 yılında Hindistan'da dizanteriye yakalanan bir hastanın dalağında görülmüştür. Daha sonra Donovan Madras'ta VL'li hastaların dalağından elde ettiği örneklerde paraziti görmüş ve bulgularını 1903 yılında yayınlamıştır. Ross ise sonraki yıllarda paraziti *L. donovani* olarak adlandırmıştır. *Leishmania* parazitlerinin *in vitro* kültürü ilk kez Nicolle tarafından 1908 de yapılmış, tatarcıklardaki evrimi ise sonraki yıllarda çeşitli araştırmacılar tarafından açıklığa belirlenmiştir. Nicolle ve Compte köpeklerde *Leishmania* parazitlerini tespit edilmiştir. Nicole tarafından 1908 yılında bu parazite *L. infantum* adı verilmiştir [14].

Leishmania cinsi içinde farklı türler ve alt türler bulunur [15]. Işık mikroskobunda bütün türler morfolojik olarak aynı görünüme sahip olduğundan; neden oldukları hastalıklar, epidemiyolojik, coğrafik dağılım, serolojik, immunolojik, biyokimyasal ve biyolojik özelliklerine dayanarak sınıflandırma yapılmıştır. Son yıllarda sınıflandırmada izoenzimlerin araştırılması, monoklonal antikorlar ya da parazitin DNA yapısının incelenmesi de dikkate alınmıştır. Buna rağmen sınıflandırma da sorunlar devam etmektedir. [16].

Çizelge 2.1 *Leishmania* parazitlerinin sınıflandırılması [17]



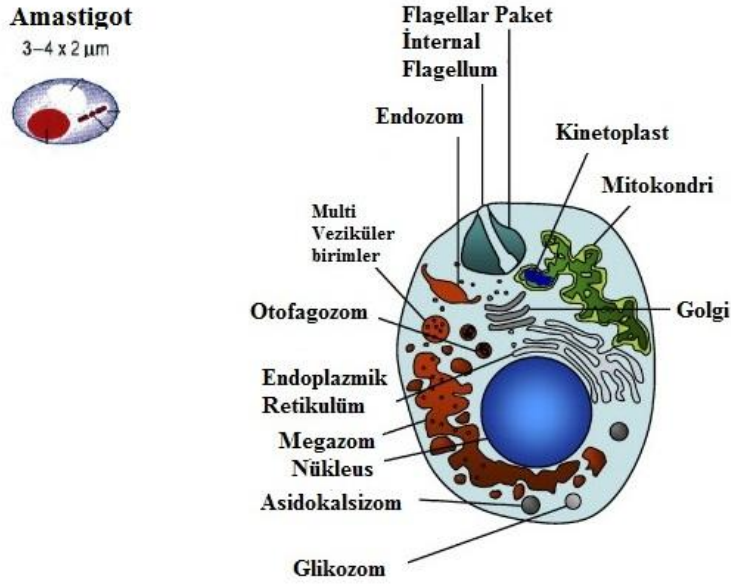
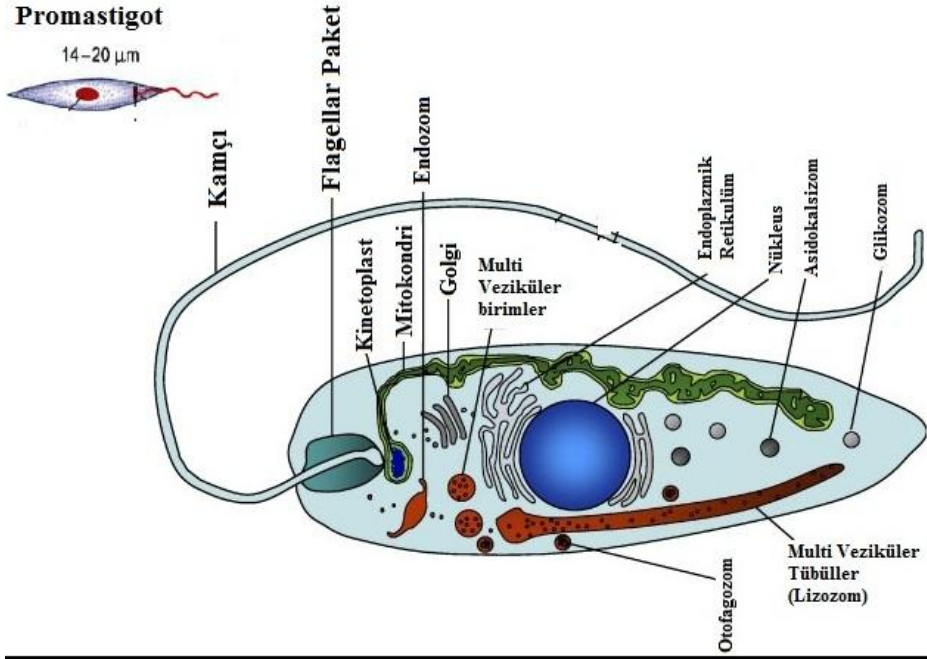
2.2 Parazitlerin Morfolojisi

Leishmania parazitleri insan ve diğer memelilerde amastigot, vektörlerde ise (sand fly, tatarcık, yakarca) promastigot olmak üzere iki farklı morfolojik şekilde bulunur.

Parazitlerin amastigot formu, 1–3 µm eninde, 2-5 µm boyunda, oval ve hareketsizdir. Sitoplazmada arka uca yakın büyük bir nukleus ve nukleusa yakın kinetoplast bulunur (Şekil 2.1). Kinetoplast elektron mikroskopunda disk biçiminde görülür ve boyutu 0,4–0,8 µm arasında değişir. Giemsa ile boyanan simirlerde amastigotun sitoplazması soluk mavi, çekirdeği ise koyu kırmızı renkte görülür. Kinetoplast çekirdeğin yanında parlak kırmızı veya mor renkte boyanır. Kinetoplast'ta çekirdekten farklı bir DNA bulunur [14]. Bu DNA'nın dizilimi türlere göre farklılık gösterdiği için tür belirlenmesinde kullanılır. Kinetoplastın genetik bir devamlılığı olduğu ve çekirdekten önce bölündüğü belirlenmiştir. Kinetoplast'ta koyu boyanan parabazal cisim ve yanında nokta şeklindeki blefaroplasttan çıkıp ön kısımda sonlanan bir aksonem vardır. Elektron mikroskobu ile yapılan gözlemlerde parazit plazma membranının tipik olarak üç katlı olduğu, hücreye destek görevi de yapan 2-4nm'lik bir yapı olan pelikül altı mikrotübülleri bulunmaktadır.

[18]. Makromoleküllerin hücre içine alınışında önemli rol oynayan bu mikrotübüllerin sayıları ve merkezden uzaklıkları *Leishmania* tür ayrımında kullanılmaktadır. Bütün *Leishmania* türlerinde sitoplazmada tek bir mitokondri bulunmaktadır. Lizozomların, suda erimeyen polifosfat asidinin, peroksizomların ve RNA içeren volutin taneciklerinin, parazitin beslenmesinden ve salgı kontrolünden sorumlu olduğu belirlenmiştir [14]. Amastigotlar, kamçı cebi içinde aktif ve serbest olmayan bir kamçıya sahiptir.

Tatarcıkların bağırsaklarında ve *in vitro* kültür ortamlarında bulunan ve parazitin hücre dışı formu olan promastigotların ise, 14-20 µm boyunda, 1,5-3 µm genişlikte ve ön uçtan çıkan serbest bir kamçısı bulunmaktadır (Şekil 2.1) [19]. Kamçının bir çift merkez ve dokuz çift periferik fibril çiftinden oluşan bir aksonemi vardır. Ön uçta yuvarlak veya at nalı şeklinde kinetoplast vardır. Kinetoplastın ön ve kamçının dip kısmında ise bleforablast bulunur. Çekirdek ve çekirdekçik merkezde bulunur ve çekirdek zarında porlar bulunur. Ayrıca sitoplazma içinde golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum gibi organeller vardır [20].



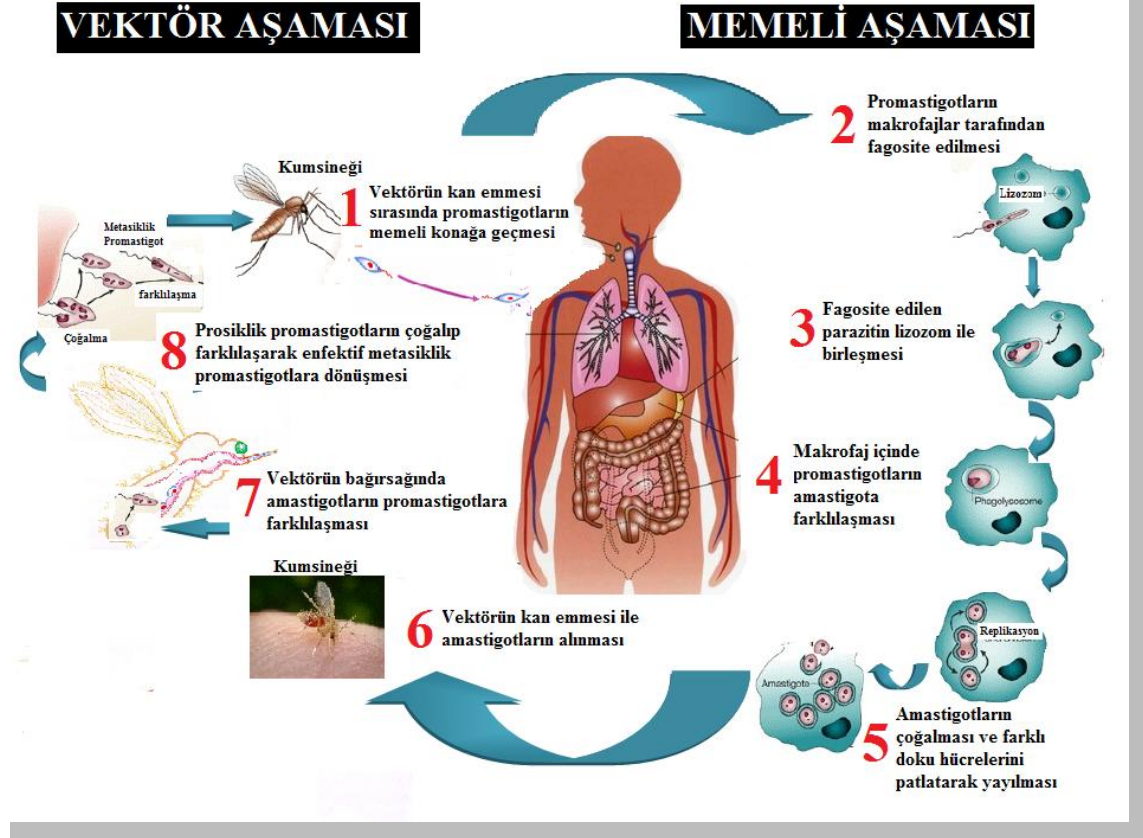
Şekil 2.1 *Leishmania* parazitlerinin formları[21], [22]

2.3 Parazitlerin Hayat Döngüsü

Dişi tatarcıklar enfekte konaktan kan emerken amastigotlar ile enfekte olurlar. Kan ile alınan amastigotların bir kısmı sindirilirken, bir kısmı da orta bağırsakta bölündükten sonra kamçı oluşturur ve metasiklik (enfektif) promastigot formuna dönüşürler.

Peritrofik membran içinde çoğaldıktan sonra, membranı eriten promastigotlar, torasik mideye geçerek kemotaksis ile özafagus ve farinkse tutunurlar. Özafagustan ayrılan daha küçük olan metasiklik promastigotlar 7. gününde ağız kısımlarında ve hortumda görülebilir [14].

Ağız kısmında bulunan enfektif promastigotlar, tatarcıkların kan emmesini düzenleyen kardiak kapağa zarar vererek, kan akımının tersi yönünde tatarcığın vücudundan omurgalı konağa geçerler. Makrofajların promastigotlarla 4–8 saat içinde enfekte olduğu ve 24 saat sonra amastigotların çoğaldığı belirlenmiştir [19]. Konağa geçen promastigotların bir kısmı, kan dolaşımına katılarak konak tarafından öldürülür. Ancak geri kalan promastigotlar deri makrofajları veya dendritik hücreler tarafından reseptör temelli fagositoz ile fagosit edilir. Fagosit edilen promastigotlar, amastigot formuna dönüşerek çoğalırlar ve hücreyi patlatarak serbest kalırlar. Hücreyi parçalayarak serbest hale geçen bu amastigotlar, yeniden makrofajları enfekte ederek dalak, karaciğer ve kemik iliği gibi retikuloendotelial sistem organlarına yerleşirler [23]. Enfekte olmuş konakların kan ve lezyonlarında hem serbest amastigotlar, hem de enfekte makrofajlar vardır. Tatarcık, enfekte konaktan tekrar kan emdiğinde, hem serbest amastigotları, hem de enfekte makrofajları alır. Amastigotlar tekrar tatarcığın mide kanalında gelişim sürecini geçirirerek, promastigot forma dönüşürler. Bu döngü tatarcığın beslenmek için bir başka konak bulmasıyla devam etmekte ve tüm bu döngü özellikle çevre ısısına bağlı olarak 4–25 gün sürmektedir [24].



Şekil 2.2 *Leishmania* parazitlerinin hayat döngüsü [25], [26].

2.4 Leishmaniasis

Dünya Sağlık Örgütü tarafından oluşturulan klinik tabloya göre, leishmaniasisin Visseral, Kutanöz, Mukokutanöz ve Diffüz-Kütanoz olmak üzere 4 farklı klinik formu vardır (Çizelge 2.2) [2].

Çizelge 2.2 Önemli *Leishmania* türleri ve coğrafik dağılımları [14]

Parazit	Hastalığın Formu	Rezervuar	Vektör	Hastalığın Dağılımı
Eski Dünya Leishmaniasis				
<i>L. (L.) major</i>	LCL	Çöl Kemirgenleri	<i>Phlebotomus papatasi</i>	Kuzey Afrika ve Orta doğu, Asyanın bir Bölümü Hindistan
<i>L. (L.) tropica</i>	LCL	Yaban faresi, insan	<i>P. sergenti</i>	Kuzey Afrika ve Orta doğu, Asya

Çizelge 2.3 Önemli *Leishmania* türleri ve coğrafik dağılımları (devamı)

<i>L. (L.) aethiopica</i>	LCL, DCL	Yaban Faresi	<i>P. pedifer</i>	Etiyopya, Kenya
			<i>P. longipes</i>	
<i>L. (L.) infantum</i>	VL, LCL	Köpekler	<i>P. perniciosus</i>	Akdeniz, Orta doğu ve Asya
<i>L. (L.) donovani</i>	VL	İnsanlar	<i>P. argentipes</i>	Kenya, Sudan, Hindistan, Pakistan ve Çin
Yeni Dünya Leishmaniasis				
<i>L. (L.) mexicana</i>	LCL, DCL	Orman Kemirgenleri	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	Meksika
			<i>Lu. cruciata</i>	Orta Amerika
<i>L. (L.) amazonensis</i>	LCL, DCL	Sıçan	<i>Lu. favipectus</i>	Güney Amerika
<i>L. (L.) pifanoi</i>	LCL, DCL	Kemirgen	<i>Unknown</i>	Venezuela
<i>L. (L.) garnhami</i>	LCL	Bilinmiyor	<i>Lu. youngi</i>	Venezuela
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	LCL	Bilinmiyor	<i>Lu. olmeca bicolor</i>	Venezuela
<i>L. (V.) braziliensis</i>	LCL, ML	Keseli sıçan, yakalı tembel hayvan ve orman kemirgenleri	<i>Psychodopygus wellcomei</i>	Güney Amerika
		Evcil Köpekler ve maymunlar	<i>and others</i>	Orta Amerika
<i>L. (V.) panamensis</i>	LCL, ML	yakalı tembel hayvan	<i>Lu. trapidoi</i>	Panama, Kosta Rika, Kolombiya
			<i>Lu. ylephiletor</i>	

2.4.1 Kutanöz Leishmaniasis

Kutanöz leishmaniasis (KL); Şark Çıbanı, Yıl yarası, Delhi ülseri, Aleppo, deri leishmaniasisi olarak adlandırılır. *Leishmania* cinsi parazitler, tatarcık tarafından kan emilen yerden derinin retikuloendotelial hücrelerine girererek amastigot formuna dönüşürler. Vektör tarafından ısırılan yerde küçük kırmızı bir papül meydana gelir, bu papül daha sonra nodül haline döner. Papüller 2 cm' den büyük çaplı, kaşıntılı lezyonlar oluştururlar ve daha sonra ülserleşerek kabuklanır. İnkübasyon periyodu 2 hafta kadar kısa (*L. major*) bir süre olabileceği gibi, birkaç aydan 3 yıla kadar uzun (*L. tropica*, *L. aethiopica*) da olabilir. KL'nin Türkiye'deki başlıca etkeni *L. tropica*'dır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda *L. infantum*'un da KL' ye neden olduğu ortaya çıkmıştır [27].

KL her yaşta görülebilir. Genellikle tatarcığın kan emdiği vücudun örtülmeyen kısımlarında oluşur. Örneğin yüz, ense ve kolda sıklıkla görülür. Ancak, gövdede, saçlı deride ve hatta peniste de olduğu bildirilmiştir. Parazit memeli konağa girdikten sonra ilk lezyonun tam olarak görülebilmesi için 2-12 haftalık bir sürenin geçmesi gerekmektedir. Daha uzun süren kuluçka süreleri de bildirilmiştir [14]. Ayrıca dünyanın çeşitli bölgelerinde KL'nin cinsiyete göre de farklılık gösterdiği bilinmektedir [28].

2.4.2 Mukokutanöz 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 (mukokutanöz) leishmaniasis olarak isimlendirilen klinik tablo ortaya çıkabilir [2]. 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 [1]. Burundaki lezyonlar sonucu doku kayıpları oluşur. Doku harabiyeti sonucunda burun, üst dudak ve alt göz kapağında ciddi patolojik değişiklikler gelişir [2].

2.4.3 Visseral Leishmaniasis

VL etkenlerinden *Leishmania donovani* Hindistan ve Afrika'da, *Leishmania infantum* Akdeniz Bölgesi'nde ve *Leishmania chagasi* ise Yeni Dünya'da görülmektedir . VL yetersiz beslenme, organ nakilleri sonucu oluşan immun depresyon ve AIDS gibi immun sistemin baskılandığı durumlarda kolaylıkla gelişebilmektedir . Kala-Azar olarak da bilinen VL, özellikle dalak, karaciğer, kemik iliği ve lenf nodlarında bulunan mononükleer fagositik sistem hücrelerinin enfekte olması sonucu görülen bir hastalıktır. Ancak, mononükleer fagositik sistem hücrelerinin bulunduğu akciğer ve bağırsaklarda da görülebilir [19]. Hastalığın kuluçka süresi genellikle 2 ila 4 ay arasındadır. Bu süre bir yıla kadar uzayabilir. Tatarcığın memeli konaktan kan emdiği yerde 2-3 mm büyüklüğünde bir nodül gelişir. Soluk pembe renkte olan bu nodülün ortası daha sonra kabuk tutmaktadır. Hastalık genellikle kendini gizleyerek sinsi başlar, immun sistemin baskılandığı durumlarda aniden ortaya çıkabilir. Başlangıçta baş ağrısı, zayıflama ve hafif ateş görülür. Daha sonra yüksek ateş ile birlikte dalak büyür. Hastalığın ilerlemesi ile ateş yükselip düşerek VL'ye spesifik bir eğri çizer. Bu durum, günde iki kez yükselen aralıklı bir ateştir. Genelde 39-40°C olmakla beraber bazen 40-40.5 °C'ye çıkabilir. Her aralıklı ateş yükselmesinden sonra dalağın biraz daha büyüdüğü belirlenmiştir. Erişkinlerde de görülen VL genellikle çocuklarda tedavi edilmez ise ciddi enfeksiyonlara ve hatta ölümlere neden olabilir [29]. Klinik olarak VL'in akut, subakut ve kronik olmak üzere 3 formu olduğu belirlenmiştir. Subakut form; klinik olarak en sık görülen form olup akut forma göre daha belirgindir. Klinik tablosu yükselen ateş ile karaciğer ve dalağın büyümesi, kanda eritrosit, lökosit ve trombosit sayısının normalin altına düşmesi ile kendini göstermektedir. Günde 2 kez yükselip düşen ateş tipiktir, fakat hastalık sinsi olduğundan hasta genelde kendisini iyi hissedebilir. Ateş yükselişleri ile başlangıçta yumuşak olan dalağın, daha sonra sertleşip büyüdüğü gözlenmektedir. Karaciğer ilk ayın sonundan itibaren büyümeye başlar. Hastalık ilerledikçe kilo kaybı ve anemi belirgin bir hal almaktadır, fakat tüm bunlar hastanın normal hayatını etkileyecek seviyede olmamaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalarda, hastalığın tedavi edilmesine rağmen % 1 ile % 11 arasında ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir. Ölüm nedenleri olarak gastrointestinal sistem kanamaları, anemiye bağlı gelişen kalp yetmezliği ve karaciğer yetmezliği rapor edilmiştir. Akut form; şiddetli diş eti, burun,

bağırsak kanamaları ile kemik iliği baskılanmasına bağlı oluşan kanda eritrosit, lökosit ve trombosit sayısının normalin altına düşmesi sonucu hastalık daha da ağırlaşarak ilerlemekte ve özellikle ishal şikayetlerinin eklenmesi ile hastanın genel durumu bozulmakta, hasta 2-3 ay içinde hayatını kaybetmektedir. Kronik vakalarda zayıflama, karaciğer ve dalak büyüklüğü dışında genelde hastalarda bir şikayet olmayıp, hastanın yaşamını normal olarak devam ettirdiği bildirilmiştir [30].

2.5 İmmunoloji

Leishmania parazit enfeksiyonlarında hücresel immün yanıt ile beraber, parazitin virulans özellikleri, hastalığın gelişimi ve konağın genetik özelliklerine bağlı olarak geliştirdiği immün cevap rol almaktadır [31]. Parazitler humoral immün cevabın oluşmasından kaçmak için, konak hücre içinde bulundukları fagolizozomlarda antijenik özellikte olan bölgelerini değiştirerek konağı taklit etmektedirler. Enfekte makrofajlar *Leishmania* parazitlerine karşı nitrik oksit üretmelerine rağmen bu sistem fagolizozomlardaki parazitler tarafından inhibe edilir. fagolizozomlarda çoğalan amastigotlar konak hücreyi dağıtarak yeni fagositik hücreleri enfekte edecek olan amastigotların serbest kalmasına neden olurlar. Makrofajlar ve dentritik hücreler *Leishmania* antijenlerini T hücrelerine sunarlar. Sonuçta, ya hücresel ya da humoral immün yanıt oluşur. Leishmaniasis enfeksiyonuna olan direnç, Th1 hücreleri ile meydana gelirken, hassasiyet Th2 hücreleri ile olmaktadır. İmmunolojik çalışmalarda parazitlerin öldürülmesinde uyarılmış makrofaj ve lenfositlerin humoral antikorlarla birlikte etkili olduğu gösterilmiştir [32]. Ayrıca hücresel immün yanıtın, Makrofaj içindeki *Leishmania* parazitlerinin memeli konaktaki bağışıklığı düzenleyebileceği belirtilmiştir. İlk olarak makrofajlar *Leishmania* promastigotlarını fagosit ederler, daha sonra parazitler fagolizozom içinde çoğalırken ürettikleri metabolitler antijen özelliği göstererek lenfositleri uyarırlar. Bu durumda enfekte makrofajlara öldürücü etki yaparlar. Ölerек parçalanan makrofajlardan *Leishmania* parazitleri serbest kalır. Parazitler antikorlarla yok edilirler [33].

KL'de hücresel immün yanıt görülmekte ve bu deri duyarlılığı ile belirlenmektedir. Kendiliğinden iyileşme sonucu devamlı bağışıklık gelişir. Yapılan çalışmalarda kendiliğinden bağışıklık oluşturan hastalarda IL-2 ve IFN- γ düzeyinin arttığı, şiddetli

enfeksiyonu olan olgularda ise IL-4 ve IL-10 düzeyinin arttığı gösterilmiştir [31]. Deri duyarlık testi negatif olan VL'de ve bazı KL olgularında, kendiliğinden iyileşme olmamaktadır. Bağışıklık türe özgü olduğundan VL etkeni *L.donovani* enfeksiyonu, KL etkeni *L.tropica* enfeksiyonuna karşı bağışıklık oluşturmaz [34]. Bu farklı klinik spektrum, konağın Th1, Th2, CD4 T hücrelerinin farklı cevap oluşturmamasından kaynaklanmaktadır [31].

Leishmaniasise karşı tedavinin izlenmesi açısından IFN- γ , TNF- α ve IL-6 sitokinlerinin önemli olduğu belirlenmiştir. Tedavide IFN- γ kullanılabileceği, anti-IL-10 ya da inhibitor sitokinleri baskılayıp aynı zamanda da IFN- γ sentezleten IL-12 gibi sitokinlerin kullanılabileceği düşünülmektedir. Aşı çalışmalarında ise, IL-12 gibi immun sistemi güçlendirecek, sitokinlerin sentezini uyaracak antijenik özellikteki parazit proteinlerinin kullanılması ile etkili sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir [35].

Akut VL'de ilk 4 hafta IL-2 ve IFN- γ sentezlenmediği, ancak tedaviden sonra salgılandığı gösterilmiştir. Subakut VL'de ise IFN- γ sentezinin çok az olduğu görülmüştür. Akut VL'li hastalarda IL-2 reseptörü, kanda serbest olarak bulunan IL-2 ile birleşerek hedef hücreye ulaşmasını engellemektedir [36]. Akut VL'li hastaların lenf nodüllerinde çok yüksek oranda IL-10 mRNA sentezi olduğu ancak tedavi edilen hastalarda sentezin durduğu belirlenmiştir. *L.mexicana*'nın neden olduğu KL hastalarında, IL-10 ve TGF- α ' da dördüncü aydan itibaren belirgin bir artış görülür ve makrofajlar üzerine inhibitör etki yaparak enfeksiyonun kronikleşmesine neden olur [37]. Bazı *Leishmania* türlerinde makrofaj fonksiyonlarını inaktive eden TGF- α ve IL-10 gibi sitokinler, hastalığın patogeneğinde önemli rol oynamaktadır.

Parazitin antijenik yapısı üzerinde yapılan çalışmalarda, genelde somatik yapıda olan 30 kadar antijenin olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak parazitin antijenik yapısı ve bu antijenlere karşı oluşan hücresel ve humoral immun cevaplara yönelik çalışmalar ile leishmaniasise karşı aşı geliştirme çalışmaları hala devam etmektedir.

2.5.1 *Leishmania* Parazitlerinin Konak Hücre İçindeki Yaşamı

Makrofajlar, *Leishmania* parazitlerinin konak hücreleri, antijen-sunan hücreler (APC) ve efektör hücreler olarak leishmaniasiste oldukça önemli bir rol oynar [38]. *Leishmania*

parazitleri, konak hücre içinde: LPG molekülleri tarafından fagozom-endozom birleşmesinin inhibisyonu ile , LPG ve gp63 sayesinde fagolizozom içindeki hidrolitik enzimlerin inhibisyonu, kalsiyum mobilizasyonunu değiştirerek engellenen sinyal iletimi ile, çeşitli konak sinyalizasyon yollarının inhibisyonu ile; amastigot yüzeyindeki GPIs (glycosylinositolphospholipids) tarafından nitrik oksit üretiminin inhibisyonu ile, LPG ve gp63 tarafından oksidatif solunum metabolitlerinin inhibisyonu ve makrofaj sitokin üretiminin modülasyonu ile hayatta kalır [39], [40], [41], [42], [43], [44], [45], [46], [47].

Aktif hastalık esnasında, *Leishmania* antijenlerine karşı negatif gecikmiş tip aşırı duyarlılık ve non-proliferatif yanıtlar ile tanımlanan immunbaskılama (*Leishmania* antijenlerine özgü), deneysel çalışmalar ile gösterilmiştir [48]. Yardımcı T hücreleri koruyucu ya da ilerleyici bağışıklık yanıt kuşağında önemli bir rol oynamaktadır. Th1 hücrelerinin çoğalması, IL-12, IFN- γ ve TNF- α gibi leishmaniasidal sitokinler yoluyla koruma sağlarken, Th2 hücre genişlemesi hastalığı şiddetlendirir. Diğer hücreler de sırasıyla IL-12 ve IFN- γ üreten dendritik hücreler (DC) ve doğal katil (NK) hücreleri ile sitokin üretiminde (koruma dahil) sorumlu tutulmaktadır [49], [50], [51].

Leishmaniasise karşı koruyucu bir bağışıklık yanıtı oluşturmada önemli bir adım antijen sunan hücreler (APC) tarafından uygun antijenlerin sunumudur. Ancak, *Leishmania* parazitleri, antijenlerin (özellikle amastigote antijen) CD4⁺ T hücrelerine sunumunu inhibe eder [52]. *Leishmania*'nın, major histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II gen ekspresyonu bastırarak [52] veya antijenlerin MHC sınıf II moleküllerine sunumunu engelleyerek inhibe ettiği düşünülmektedir [53], [54]. MHC sınıf II antijen sunumu T hücre yanıtları uyarmak için yeterli değildir. Yardımcı-uyarıcı moleküllerin ligasyonu, sırasıyla APC'de B7-1/B7-2 ve CD40 ile T hücrelerinde CD28 ve CD40L moleküllerinin birleşmesi gerekmektedir [55]. CD40/CD40L ligasyonu APC tarafından IL-12 üretimini indükleyerek, T hücrelerinin IFN- γ gibi leishmaniasidal sitokinler üretmek için aktive olmasını sağlar [56].

heterodimerik immunoregülatör sitokin olan IL-12, T hücreleri, doğal öldürücü hücreler ve makrofajlar da dahil olmak üzere çeşitli efektör hücrelerin aktivitesini artırır ve IFN- γ gibi sitokinlerin üretimini indükleyerek, Th1 yanıtlarının indüksiyonunu stimüle

edilebilmektedir [57]. Bazı çalışmalarda, IL-12'nin aynı zamanda Th2 immun cevap aktivasyonunu engellediğini rapor etmiştir [58]. Th1 hücre popülasyonunun bakımından IL-12'nin rolü oldukça önemlidir ve IL-12 yokluğunda, Th1 hücrelerinin bir enfeksiyon sırasında elimine olduğu gözlenmektedir [59]. Hem dirençli hem de duyarlı *Leishmania* promastigotları konak makrofajların istilası sırasında IL-12 indüksiyonundan kaçarak [60]. *Leishmania*'ya yanıt olarak makrofajlar çok az IL-12 üretirler ve enfekte makrofajlar çeşitli uyarılara yanıt olarak IL-12 üretiminde azalmaya neden olmaktadır [60]. Yapılan çalışmalarda DC'lerin erken enfeksiyon sırasında, IL-12 kaynağı olduğunu göstermiştir [61]. Ayrıca, IL-12 üretiminin DC'ler tarafından uyarılması muhtemelen birden fazla sinyal gerektirir ve IL-12 yanıtına katkıda bulunabilen birkaç konak bileşeni vardır [62]. Örneğin, CD40-CD40L etkileşimleri IL-12 üretimini artırır ve bu yoldan yoksun fareler Kütanöz leishmaniasise duyarlıdırlar. Dirençli farelerden IL-12 geni çıkarılması ile farelerin enfeksiyona karşı duyarlı olduğu, duyarlı farelere ise IL-12 verildiğinde farelerin enfeksiyona dirençli hale geldiği gösterilmiştir [63]. Enfekte olmuş fareleri iyileştirmek için eksojen IL-12'nin kapasitesi ve IL-4'ün baskılanması, IL-12'nin güçlü etkisi ile ilişkilidir. Bu nedenle BALB/c'lerde koruyucu Th1 yanıtı eksikliği, IL-12 reseptöründe IL-4'nin inhibitör etkisi nedeniyle olabilir [64].

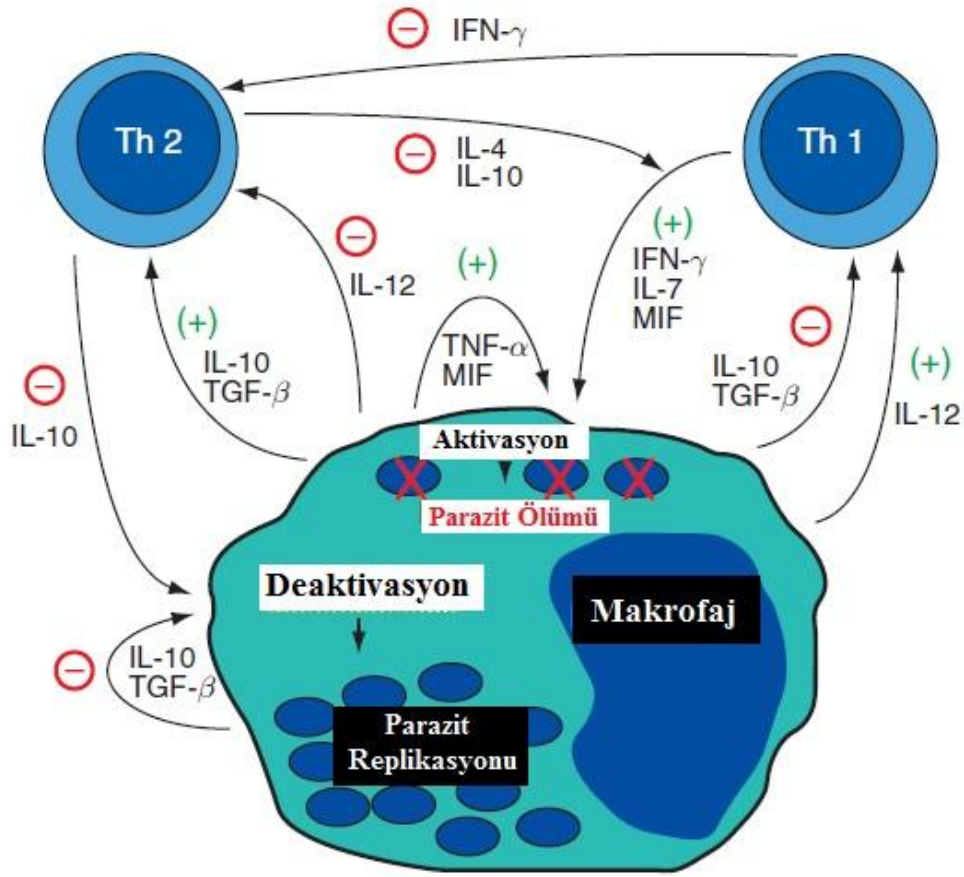
Th1 hücreleri tarafından salgılanan IFN- γ , makrofajlarda nitrik oksit (NO) sentaz enzimini indükleyerek NO-aracılı öldürme indüksiyonu yoluyla *Leishmania* enfeksiyona karşı direnç kazandırır [65]. Bu nedenle IFN- γ sentezleyemeyen farelerde enfeksiyonu tedavi etmek başarısızdır [66]. IFN- γ 'nın etkisi ile Th2 immun yanıt sitokini olan IL-4 miktarıda büyük ölçüde azalır [67]. Ayrıca, anti-IFN- γ antikoru ile IFN- γ nötralizasyonun da dirençli farelerin duyarlı olmasına neden olmuştur [68]. Bir başka sitokin, TNF- α , çeşitli hastalık formlarına karşı korunmada önemli bir rol oynar ve IFN- γ ile sinerji oluşturarak iNOS aracılı *Leishmania* öldürmeyi indüklemesi ve hücre içi patojen replikasyon kontrolünde görevlidir [69], [70], [71].

IL-10 başlangıçta Th2 immun yanıt sitokini olarak karakterize edilirdi ancak daha sonra, makrofajlar da dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinden salgılanan bir pleiotropik sitokin, olduğu kanıtlanmıştır [72]. IL-10, temel makrofaj-deaktive eden sitokin özelliği gösterir ve bu hücrelerin *Leishmania*'yı öldürme yeteneğini azaltır [73]. Bu nedenle,

hastalığın ilerlemesinde önemli bir düzenleyici olarak rol oynar. IL-10, *Leishmania* ile enfekte kişilerden lenfositler aracılığı ile çeşitli immünolojik yanıtları köreltir [74].

Th1 aktivasyonu ve sitotoksik yanıt sonucunda baskılanarak düzenlenen IL-12 ve IFN- γ üretiminin, IL-10 tarafından engellendiği gösterilmiştir [75]. IFN- γ 'nın makrofaj aracılı mikrobisidal aktivitesinin IL-10 tarafından baskılanabileceği aynı zamanda başka hastalıklar için de belirlenmiştir [76].

Yapılan çalışmalarda IL-10 ve IL-12'nin birbirine karşı bir mekanizma ile çalıştığı gösterilmiştir. IL-10; Makrofaj, B hücreleri ve dendritik hücreler tarafından IL-12 sentezi baskılayarak, IFN- γ üretimini inhibe eder [77]. IL-10, yardımcı uyarıların aktivitelerinin ve B7 ekspresyonunun indirgenmesini sağlar [78]. *L. donovani* ile enfekte BALB/c farelerde T hücreleri tarafından IFN- γ üretimi için B7/CD28 etkileşiminin gerekli olduğu gösterilmiştir [79]. Ancak, IL-12 eklenmesi veya IL-10'nun monoklonal antikorlar tarafından nötralizasyonunun IFN- γ üretimi ve lenfosit proliferasyonu tekrar düzenlemiştir [80].



Şekil 2.3 *Leishmania* enfeksiyonlarının immunopatogenesi [67]

2.6 Mononükleer Fagositik Sistem Hücrelerinin Gelişimi

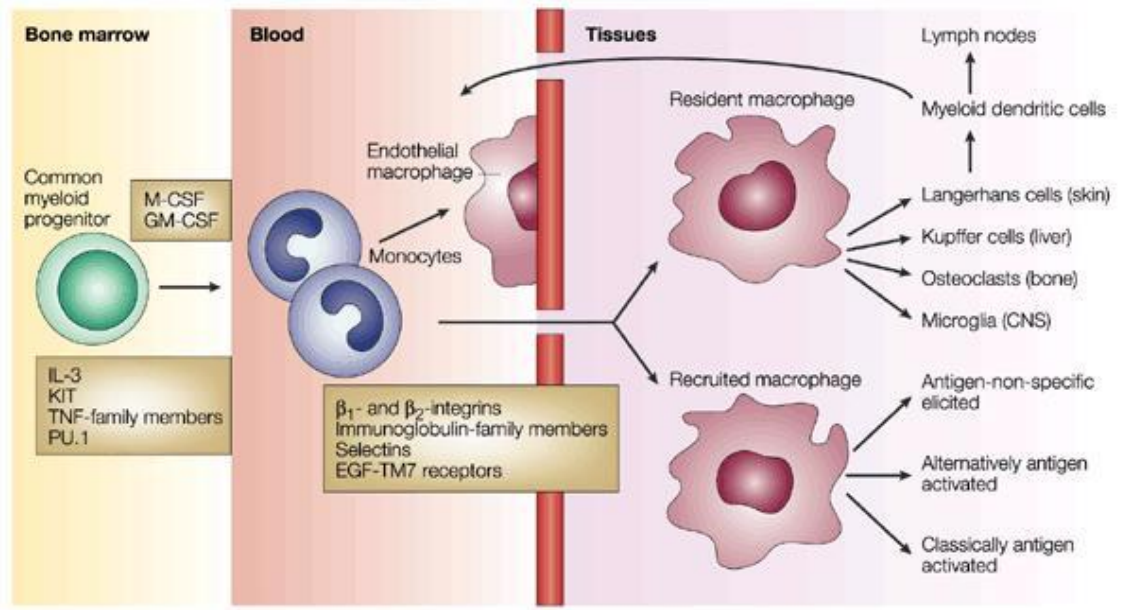
Mononükleer fagositik sistem, fonksiyonu fagositöz olan hücrelerden oluşmuş olup immun sistemin ikinci büyük hücre grubudur. Bu sistemin bütün hücreleri kemik iliğinden gelişir (Şekil 2.4) [81].

Kemik iliğinde bulunan öncü hücrelerden, multipotent miyeloid hücreler oluşur. Bu hücrelerden ise monosit colony forming unit (CFU-M) hücreleri meydana gelir. CFU-M hücreleri monoblastlara dönüşür. Monoblastlarda bölünerek promonositleri oluştururlar. Promonositler monositlerden daha küçük hücreler olup 15-20 µm'lik çapa sahiptirler. Kemik iliğinde bulunan promonositlerin yaklaşık yarısı hızlı bir şekilde bölünüp, küçülerek bölünebilme özelliğini kaybeden monositlere farklılaşırlar. Geriye

kalanlar promonositler ise gerektiği zaman monositlere dönüşürler. Kök hücreden monosite farklılaşma yaklaşık olarak 55 saat olup bu monositler kemik iliğinde 1-2 gün kaldıktan sonra kana geçerler [82], [83].

Monositlerin çapları yaklaşık 12-20 µm olup büyük bir çekirdeğe sahiptirler. Çekirdekleri merkezden içe doğru çöküntü oluşturarak böbreğe benzemektedir. Bir veya iki çekirdeğe sahip olabilirler. Monosit sitoplazmasının iyi gelişmiş Golgi kompleksi, ribozom ve poliribozomlar, çok sayıda küçük mitokondri içerdiği belirlenmiştir. Az sayıda granüllü endoplazmik retikulum içerirler. Hücrenin periferinde mikrotübül ve mikrofilamanlar, pinositik veziküller bulunur. Hücre yüzeyinde mikrovilluslar vardır. Monositler dolaşımda birkaç gün kalıp bağ dokuya geçerek makrofajları oluşturmaktadır [83].

Monosit ve endotel hücre membranlarındaki hücre adhezyon molekülleri monositlerin endotele tutunarak yavaşlamasını, durmasını ve endotel hücreleri arasından dokulara geçişini sağlar. Bu göç sırasında ilk adım kan damarlarında dolaşan monositin, endotel hücresinin yüzeyine tutunmasıdır. Daha sonra damar yüzeyinden yavaşça yuvarlanarak sürüklenir ve daha güçlü bir şekilde tutunarak durur. Bu olayda selektinler, β -1 integrin ve endotel yüzeyindeki VCAM-1 gibi adhezyon molekülleri ilk tutunmada görev alırken, lökosit β -2 integrin ile ICAM-1 ve 2 ise monositin durmasını sağlayan adhezyon molekülleri. Monositler daha sonra endotel hücreleri arasından, hem monosit hem endotel yüzeyinde bulunan PECAM-1 molekülleri aracılığı ile dokuya geçerler. Endotel bazal membranını geçen monositler makrofajlara dönüşecekleri bölgelere göç ederler [84].



Nature Reviews | Immunology

Şekil 2.4 Makrofaj aktivasyonu [84]

2.6.1 J774 Hücre Hattı

J774 fare makrofaj hücre hattı dişi bir BALB/c farede ortaya çıkan tümörden elde edilmiştir. Hücre hattının çoğalması dekstran sülfat, bakteriyel lipopolisakkaritler ile inhibe olur. J774 hücre hattı monosit-makrofajların fizyolojisini ve makrofaj koloni sitimüle edici faktörün (M-CSF) fonksiyonunu anlamak amacıyla birçok biyokimyasal çalışmada kullanılmıştır. Bu hücre hattı yüksek miktarda lizozim sentezler ve çok az sitoliz görülür. Fakat genellikle antikor bağımlı fagositoz meydana gelir. J774 hücreleri, IFN- γ çok düşük konsantrasyonlarında bakteriyel lipopolisakkarit (10 ng/ml) ile aktive olduğu zaman nitrik oksit sentaz enzimi yüksek seviyede aktive olduğu için büyük miktarlarda nitrik oksit üretir. IFN- γ , J774 hücrelerinde IL-12 'nin sentezlenmesini indükler. J774 hücre hattı hücre kültür ortamlarına sürekli olarak IL-1 salgılar [85].

2.6.2 Makrofajların Aktivasyonu ve Fonksiyonları

Monositler dokulara geçip makrofaja dönüştükten sonra yaklaşık 2-4 ay arasında yaşarlar. Bu süre içinde bazı makrofajlar dokuya tutunarak hareketsiz kalırlar. Bunlara sabit makrofaj denir. Genellikle matriksteki kollajen fibrillere tutunurlar. Geriye kalan makrofajlar ise ameboid hareketle sürekli yer değiştirirler. Bütün doku makrofajları

yüzeylerinde bulunan reseptörlerle ve pinositoz yaparak çevrelerini denetlerler. Eğer çevreden gelen herhangi bir sinyalle veya antijenle karşılaşırlarsa makrofaj aktivasyonu gerçekleşir. Bu süreçte makrofajların büyüklükleri, metabolik hızları, hareketlilikleri ve fagositik aktiviteleri hızla artar. Hücre Büyüklüğünün artması sitoplazmik hacmin artmasıyla olur. Aktivasyonla pek çok yeni madde sentezlenir [81]. Bunlar içinde en önemli olanlarından biri indüklenabilir nitrik oksit sentazdır (İNOS). Bu enzim ile L-arginin'den son olarak oluşan nitrik oksit (NO) çok düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmalar ve tümör hücreleri için sitotoksik etkiye sahiptir [86]. Makrofajların belli başlı önemli fonksiyonları şunlardır:

2.6.2.1 Fagositoz

Makrofajlar tümör hücreleri, parazit, bakteri, makromolekül, antijen gibi yabancı maddelerle, hasarlı, ölü hücre ve artıklarını fagosome ederler. Makrofajların hücre membranında farklı antijenik maddeler için spesifik reseptörler bulunur. Makrofajların yabancı partikülleri ve hasarlı dokuları tanımasında fosfolipid ve şeker reseptörlerinin önemli rolü vardır. Bunlar içinde mannoz reseptörü, membran CD 14 reseptörü, toll-like reseptör (TLR) ailesi sayılabilir [87]. Makrofajlar, antikorları ise yüzeylerinde bulunan Fc reseptörleri ile tanırlar. Fagosome edilecek madde yüzey reseptörlerine bağlanır ve bu bağlanma ile sindirilecek maddenin hücre içine alınmasıyla sitoplazmada fagozom oluşur. Fagozomlar hücre içerisinde bulunan lizozomlarla birleşerek fagolizozomu (sekonder lizozom) oluşturur. Lizozomal enzimler sindirilecek materyalin komponentlerinin katabolik reaksiyonlarla yıkılıp, sitoplazmaya verilmesini sağlar. Ayrıca makrofajlarda moleküler oksijen indirgenerek üretilen reaktif oksijen radikalleri ile hücre içi enfeksiyon ajanlarını öldürürler. Fagolizozom içinde oluşan komponentler ve artık maddeler ekzositoz yolu ile hücreden atılır veya sitoplazma içerisinde artık olarak birikir [88].

Sindirilecek materyalin fazla sayıda, büyük veya sindirilmeye dirençli olmasına bağlı olarak bölgeye çok sayıda makrofaj birikir. Ayrıca bu bölgelerde lenfositler, fibroblastlar ve diğer hücreler de birikir. Bu şekilde oluşan yapılara granüloma denir. Granülomadaki makrofajlara epiteloid hücreler denir. Bunun nedeni makrofajların epitel hücrelerine benzer olarak yan yana gelerek, hücre-hücre bağlantıları oluşturacak şekilde

birbirlerine uzantılar göndermeleridir. Böylece granüloma dışına madde geçişini engellenmiş olur [88].

Dokulara giren yabancı bir cismin fagositozla alınması tek bir hücre için çok zor olduğu zaman birçok makrofaj bir araya gelip birleşerek çok çekirdekli dev bir hücre yapısı oluştururlar. Buna yabancı-cisim dev hücresi denir. Böylece büyük zararlı-yabancı cisimler yakalanıp, sindirilebilir [89].

2.6.2.2 Salgılama

Makrofajlar biyolojik olarak aktif olan çok fazla madde salgıladığı ve bu salgılanan maddelerin bugüne kadar 100'den fazla çeşidi belirlenmiştir. Bunlardan lizozim, hidrojen peroksit gibi maddelerin antimikrobiyal aktiviteleri varken, elastaz ve kollajenazlar ekstrasellüler matriks döngüsünde görev alırlar. Makrofajlar ayrıca sitokin adı verilen sinyal molekülleri salgılayarak immun sistemi regüle ederler. Sitokinler, immun sistem hücreleri arasında iletişimi sağlayan küçük proteinlerdir. En önemlileri arasında TNF α , interlekin-1 β , interferon α , β , interlekin 6, 10, 12, fibroblast büyüme faktörü (FGF), prostoglandinler, kemokinler, nitrik oksit vb. bulunmaktadır [87].

2.6.2.3 Antijen Sunma

Makrofajlar antijenlerle birleşen ilk hücreler olup, antijen sunma özellikleri vardır. Yabancı maddelerle birleşerek onların lenfositler tarafından tanınmalarını ve lenfosit cevabı oluşmasını sağlarlar. Yüzeylerinde major histokompabilite kompleks II (MHC II) olarak adlandırılan spesifik proteinler içerirler. Bu moleküller antijene spesifik T-helper ($CD4^+$) lenfositler tarafından tanınır. Makrofajlar, yabancı bir hücreyi veya antijeni fagosit ettikten sonra elde ettikleri antijenler MHC II moleküllerinin yüzeyine tutunur. Eğer $CD4^+$ T lenfosit bu antijeni tanırorsa aktive olur ve immun reaksiyon başlar [88].

2.7 Nitrik oksit (NO)

Nitrik oksit (NO) yarı ömrü kısa ve gaz yapısında bir moleküldür [90]. Nitrik oksit, üzerinde yük taşınamaması, çiftleşmemiş elektron bulundurması ve lipofilik özellikte olması hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlar. Oksijensiz ortamda oldukça stabildir. Düşük konsantrasyonlardayken, ortamda oksijen

olsa bile oldukça kararlı olan NO, bilinen en düşük moleköl ağırlıklı, biyolojik olarak aktif memeli hücresi salgısıdır. Diğer serbest radikaller hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda bile önemli fizyolojik işlevlerde rol alır. NO bu özellikleri ile ideal bir fizyolojik haberci molekölü özelliğine sahiptir [91]. INF- γ veya bakteri lipopolisakkaritleri tarafından aktive edilen makrofajlarda, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-argininden sentezlenen NO, intrasellüler parazitlere karşı çok önemli bir savunma mekanizmasında rol oynar [92]. Nitrik oksit sentazın, nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere üç farklı izoenzimi vardır. İlk iki formu konstitif olup, kalsiyuma bağlı olarak endotelial NO'nun üretiminden sorumlu iken iNOS kalsiyumdan bağımsızdır ve büyük oranda makrofaj kökenli NO sentezinden sorumludur.

L-Arginin'e etki eden iki enzim vardır. Bunlardan birincisi Nitrik Oksit Sentaz-II (NOS-II) olup makrofajlar tarafından salgılanarak nitrik oksit (NO) üretilmesini sağlar. Diğer enzim ise arginaz olup görevi L-argininden L-ornitin ve üre oluşumunu sağlamaktır. NOS-II enziminin son ürünü olan NO, mikromolar konsantrasyonlarda bile mikrobik organizmalar ve tümör hücreleri için sitotoksik etkiye sahiptir. Arginaz enziminin son ürünü olan L-Ornitin ise özellikle parazit gelişimi için faydalı olduğu bildirilmiştir [93].

Makrofaj kaynaklı NO *Leishmania* parazitleri üzerinde sitotoksik etki yapar. Yüksek NO, bakterilerde DNA sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan ribonükleotid redüktazı bloke ederek hücre DNA'sının deaminasyonu ile sitotoksik etki yapar [94]. iNOS ekspresyonu normal fizyolojik şartlar altında gerçekleşmezken herhangi bir yabancı madde ya da hücrenin vücuda girmesi durumunda sitokinler veya endotoksinler tarafından indüklenir ve böylece uzun süre yüksek konsantrasyonlarda NO üretilir. iNOS başta makrofajlar olmak üzere polimorfonükleer lökositler, nötrofiller, hepatositler, düz kas hücreleri ve kondrositler gibi birçok hücrede uyarılabilir. iNOS tarafından üretilen NO makrofajlarda antileishmanial etkiye sahiptir ve bu nedenle nonspesifik konak savunma sisteminin önemli bir parçasıdır [93].

2.8 Leishmaniasis'e karşı aşı adaylar

Leishmaniasis için tedavi seçenekleri birinci hat ilaç olarak pentavalent antimonialler ve ikinci hat ilaç olarak da pentamidin, amfoterisin B kullanımı ile sınırlanmıştır. Birinci hat

ilaçlara karşı dirençliliğin artması ve ikinci hat ilaçların toksik etkileri nedeniyle hastalığa etkili bir aşı geliştirilmesi gerekmektedir. Aşıların kemoterapiye göre belirli avantajları bulunmaktadır. Bunlar uzun süreli etkiyi tetiklemeleri, hem profilaktik hem de terapötik olarak kullanılabilmesidir. Ayrıca kemoterapiden farklı olarak aşılar karşı direnç gelişmemektedir. Buna rağmen şu ana kadar Leishmaniasisin hiçbir türüne karşı insanlar için etkin bir aşı geliştirilememiştir [5]. Buna rağmen hastalık sonrası iyileşen insanlarda yeniden enfeksiyonun görülmesine karşı immün yanıtın gelişmesi, hastalığa karşı aşı geliştirilmesinin mümkün olabileceğini göstermektedir.

2.8.1 Birinci Jenerasyon Aşılar

Leishmaniasis'e karşı ilk aşı, popüler ismi ile Leishmanizasyon, 1940'lı yılların başında geliştirilmiştir ve yaklaşık 60 sene pek çok ülkede kullanılmıştır [95]. Ancak daha sonra Leishmanizasyon işlemi güvenlik sebebiyle devam etmemiş ve günümüzde ise Özbekistan'da kaydedilen bir aşı ve İranda etkinliği insanlar üzerinde denenilen bir başka aşı olarak hala kullanılmaktadır [96], [97]. Birinci Jenerasyon *Leishmania* aşıları (Leishmanizasyon) ölü parazitlerden ve canlı attenüe *Leishmania* parazitlerinden oluşmaktadır [98].

2.8.1.1 Zayıflatılmış Canlı *Leishmania* Aşıları

Zayıflatılmış canlı aşılar intraselüler patojenlere karşı korumada altın standart olarak değerlendirilir. Leishmanizasyonla ve ölü parazitlerle aşılama ile kıyaslandığında Attenüe parazitler (patojen olmayan parazitler) ile aşılamanın pek çok avantajı olduğu bilinmektedir [99]. Uzun süreli *in vitro* kültürden elde edilen attenüe *Leishmania* aşılarının geliştirilmesi sırasında sıcaklığın etkisi, gama ışınlama, kimyasal mutagenез veya gentamisinli ortamda kültürün devam ettirilmesi gibi işlemlerin yapılması, parazitlerde genetik mutasyonların oluşmasına ve bu nedenle etkinliklerinin azalmasına neden olmaktadır [6], [8], [9], [10], [11], [100], [101], [102]. Ayrıca son zamanlarda *Leishmania* genomuna yeni genlerin ilave edilmesi veya bazı genlerin çıkarılması sonucu genetik olarak modifiye edilmiş parazitlerin geliştirilmesi zayıflatılmış canlı aşı potansiyelini arttırmakta ve bu durum leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesi konusunda güçlü bir alternatif olarak değerlendirilmektedir.

L. major dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) knock-out genlerin değiştirilmesi ile oluşturulan ilk üründür ve potansiyel bir aşı olarak test edilmektedir. Buna rağmen, DHFR-TS immünizasyonu primat modelinde immünite sağlayamamıştır [103]. Ancak bu aşılama antijene özgü pozitif proliferatif cevap oluşturmuşturmasına rağmen, koruyucu IFN- γ cevabı oluşturamamış ve yüksek sensitiviteyi önleyememiştir [103]. GDP-mannozun golgiye taşınmasında görevli *lpg2*⁻ geni eksik olan *L. major* parazitleri ile aşılama ise *L. major*'e karşı oldukça hassas olan farelerde koruma sağlamış ancak C57BL/6 farelerine karşı CPG oligonükleotid adjuvanı kullanılmadan immünite oluşturmada başarısız olmuştur [104], [105]. Ayrıca bazı deneylerde bu mutantlar telafi edici bir mekanizma ile enfeksiyona neden olma kabiliyetlerini tekrardan kazanmışlardır [106].

SIR2 geninin allelerinden birisi eksik olan *L. infantum* ile immünizasyon ise virulent suşlara karşı yüksek derecede koruma sağlamıştır [107]. Ancak SIR2 geni seçici olarak zarar gördüğünden intraselüler amastigot formların büyüme ve gelişmesini etkilemiştir.

2.8.1.2 Ölü *Leishmania* Aşıları

Ölü parazitler ile aşılanmanın geçmişi 1940'lı yılların başına dayanmaktadır. Brezilyalı bilim adamları Later, Mayrink ve arkadaşları 5 farklı *Leishmania* izolatından oluşan bir ölü aşı geliştirmişlerdir [108], [109]. Elde edilen aşının güvenli olduğu ve *Leishmania* deri testi yapılan ölçümlerde immünojenik olduğu gösterilmişse de, sadece %50 oranında koruma sağlamıştır. Leishvacin olarak bilinen ve yalnızca *L. amazonensis*'ten oluşan basit bir aşı da profilaktik koruma sağlayıp sağlamadığının anlaşılabilmesi için Kolombiya ve Ekvator'da test edilmiş ve sonuç olarak aşının güvenli olmasına rağmen, etkili olmadığı ortaya çıkmıştır [110], [111], [112].

BCG ile birlikte otoklavlanmış *L. major*'ü içeren aşıların güvenli olduğu ancak sağlıklı gönüllülere uygulandığında İran'da Kutanöz Leishmaniasis'e, Sudan'da ise Visseral Leishmaniasis'e karşı kayda değer bir immün yanıtın oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. Ancak Otoklavlanmış *L. major*'un şap ile absorbe edilmiş formunun BCG ile kombinasyonunun daha immünojenik, koruyucu olduğu ve Visseral Leishmaniasis'e karşı köpeklerde, maymunlarda ve farelerde güçlü ve uzun süreli Th1 yanıtı ürettiği,

ancak insanlarda kesin ve inandırıcı sonuçlar oluşturamadığı gösterilmiştir [113], [114], [115], [116].

2.8.2 İkinci Jenerasyon Aşılar

İkinci jenerasyon aşılar, sentetik veya rekombinant alt ürünlere, genetik olarak modifiye edilmiş *Leishmania* sp'e, *Leishmania* antijenlerine taşıyan rekombinant bakteri ve virüslere ve parazitlerden pürifiye edilmiş doğal fraksiyonlara dayanır. Pek çok *Leishmania* proteini, yüzey lokalizasyonuna, T hücre klonlarına, antijen havuzlarının görüntülenmesine, enfekte hayvan ve insanlardan alınan serumlar ile gen ekspresyon kütüphanelerinin görüntülenmesine dayanılarak identifiye edilmiştir [117]. Bu proteinler, glikoprotein 63 (gp63), membran glikoprotein 46 (gp46, M-2 olarak da bilinir), fuktoz-mannoz ligandı, aktive edilmiş C kinaz için homolog *Leishmania* reseptörleri (p36/LACK), NH36, Protein Q chimera, cysteine proteinase (CP)B ve CPA, GRP78, LD1 antijenleri, açillenmiş hidrofilik yüzey proteini B1 (HASPB1), LCR1, tükürük proteini 15 (SP15), promastigot yüzey antijeni 2 (PSA-2), A-2, histone H1, MML, *Leishmania* başlangıç faktörü (LeIF), ökaryotik stres indükleyici protein 1'in (LmST11) *L.major* homologu, ökaryotik tiyole özgü antioksidanın (TSA) *L.major* homologu, Leish-111f'dir [5].

2.8.2.1 Gp63

Şu ana kadar en kapsamlı araştırılan antileishmanial aşı adayı parazitin yüzeyinde eksprese edilen glikoprotein 63 (gp63) ve ya diğer adıyla leishmanolisindir. Saflaştırılmış gp63'ün koruyucu etkisi pek çok deneysel modelde farklı suşlar ve adjuvanlar kullanılarak araştırılmış ve çelişkili sonuçlar ortaya çıkmıştır [118]. *E.coli*'de eksprese edilen gp63'ün rekombinant formu *L.major* enfeksiyonuna karşı fareleri korumada başarısız olurken [119], maymunlarda ise yalnızca kısmi bir koruma sağlamıştır [120]. Buna karşın, *L.major*'den saflaştırılan doğal bir protein, BCG veya bir lipozom ile bir arada verildiğinde farelerde sırasıyla *L. major* ve *L. Mexicana* enfeksiyonlarına karşı koruma sağlamıştır [121]. Farelerin gp63'ün transforme edildiği *Salmonella typhimurum* veya BCG'de eksprese edilen gp63 ile aşılması, *L.major* ve *L.donovani* enfeksiyonlarına karşı anlamlı bir direnç oluşturmuştur [115,116].

İmmünize farelerdeki dalak ve lenf düğümü hücreleri yukarı doğru regüle edilen IFN- γ and IL-2 üretimi ile bağlantılı olarak güçlü bir proliferatif T hücre cevabını indüklemiştir [122], [123]. Ancak bu hücreler, gecikmiş tip aşırı duyarlılık cevabını oluşturamamıştır [122]. İnsanlar üzerindeki çalışmalarda değişken sonuçların elde edilmesi [124] ve gp63 ile aşılanan fare makrofajlarındaki T hücrelerin koruyucu bir yanıt oluşturmaması [125], araştırmacıların gp63 ve DNA temelli aşılara ve gp63'den elde edilen sentetik peptidlere odaklanmasına neden olmuştur. Dendritik hücrelerin immün yanıt oluşturmadaki merkezi rolleri, bu hücrelerin bir antijen ile birlikte doğal bir adjuvant olarak görev yapabileceklerine dair umutları arttırmıştır [126]. Bu bakımdan tek başına gp63'ler ve gp63'lerin sentetik peptidleri dendritik hücreleri tetikleyerek, dendritik hücre temelli gp63 aşılarının potansiyelini araştırmak için kullanılmıştır [127]. Leishmanolisinin tetiklediği dendritik hücreler ile aşılanmış farelerin *L.major* enfeksiyonunu kontrol edebildikleri ve korumanın seviyesinin Th1 cevabı ve IL-12 ekspresyonunun seviyesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna rağmen bu aşı hastalığın daha da ağırlaşmasına neden olurken, gp63'ten elde edilen bazı sentetik peptidler ile tetiklenen dendritik hücreler koruma sağlamıştır [127].

2.8.2.2 PSA-2/gp46/M-2

Diğer bir aşı adayı olan GPI bağlı membran proteini gp46/M-2, Lohman ve ark. tarafından karakterize edilmiş ve *Leishmania amazonensis* spesifik promastigot polipeptidi olarak tanımlanmıştır [128], [129]. Glikoprotein gp46/M-2 çoğu *Leishmania* türünde eksprese edilen gen ailesine aittir [130,131]. Membran glikoprotein gp46/M-2 ile immünize edilen farelerde *L.amazonensis*'e karşı önemli derecede bir koruma sağlandığı gösterilmiştir [128], [130]. *L. amazonensis*'e karşı korumanın seviyesini özellikle IgG1 ve IgG2 'ye bağlı olarak artan antikor cevabı yansıtmaktadır. Bu korumanın, antijen ile stümile olmuş dalak hücrelerindeki IFN- γ , IL-2, IL-4 ve TNF- α 'ya bağlı Th1 ve Th2 immün yanıt tiplerinin birlikte çalışmasına bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir [131].

Leishmania infantum PSA-2 ilişkisiz bir yüzey antijeni olan proteofosfoglikan ile ortak olarak 15 bazlık lösin zengin tekrarları içeren (LRR) bölgeler içerir [132]. PSA-2 proteininin farklı türler arasında çok benzerlikleri bulunmasına rağmen ailenin değişik

üyeleri arasında yüksek derecede heterojenlik bulunmaktadır [133]. Doğal parazit yüzey antijeni (PSA-2) ve *Corynebacterium parvum* ile birlikte immünize edilen farelerde Th1 hücre bağımlı immün cevapta önemli bir artış gözlenmiştir [134], [135]. Fakat *E. Coli* de rekombinant olarak üretilen PSA-2'nin *C.parvum* ile immünize edilen farelerde Th1 cevabı oluşan diğer farelere göre başarısız olmuştur [135].

2.8.2.3 LACK

LACK (*Leishmania* aktive C Kinaz için homolog reseptör) (36kDa) yüksek derecede *Leishmania* türleri arasında korunan ve hem promastigotlarda hem de amastigotlarda eksprese edilen bir antijendir [136]. *L. major* infeksiyonlarında farelerdeki immünopatojenik rolü yüzünden LACK antijenine leishmaniasise karşı potansiyel aşı adayı olarak önemli derecede odaklanılmıştır. Fakat LACK ile *L. Amazonensis*'e karşı aşılama farelerde başarısızlığa uğramış ve *L.donovani* infeksiyonları ile yapılan çalışmalarda ise IFN- γ seviyesinde azalma ve yüksek seviyede anti-LACK ve parazit spesifik antijen varlığı görülmüştür [137]. Ayrıca LACK antijeninin SLA antijeni ile birlikte periferik kan mononükleer hücrelere uygulanması sonucu kütanöz ve mukokütanöz *Leishmania* hastalarında artan IL-10 ve azalan IFN- γ üretimi gözlenmiştir [138]. Fakat LACK proteininin bu sonuçları ile geniş kapsamlı bir sonuca varılamadığından araştırmacılar LACK antijeninin protein formu yerine DNA'sına odaklanmış durumdadılar.

2.8.2.4 FML

En çok çalışılmış ikinci nesil açıcı adayı Fruktoz-mannoz ligandı (FML) ilk olarak *L.donovani*'den izole edilmiş ve kimyasal olarak Palatnik de souza ve ark. tarafından karakterize edilmiştir [117]. Şu anda Leishmune®(patent INPI no: PI1100173-9, federal University of Rio de Janeiro , Brezilya) adı altında ticari olarak bulunabilmektedir [139]. Antijen parazitin bütün yaşam siklusları boyunca yüzeyinde bulunmakta ve makrofajların *Leishmania*'nın birçok türünün promastigot ve amastigotlarının fagosite edilmesini inhibe etmektedir [117].

Saponin gibi bir adjuvan ile birlikte FML antijen kullanarak köpeklerde çeşitli çalışmalar yapılmış ve cesaret verici sonuçlar hemen hemen tüm olgularda gözlenmiştir [140],

[141]. FML antijeni ile aşılama IgG2a artış seviyesi ile birlikte etkili koruma sağlamış ve deneysel olarak enfekte edilmiş ve doğal olarak maruz kalan köpeklerde % 79-100 gecikmiş tip aşırı duyarlılık (DTH) tepkisi görülmüştür [141]. Quil-A saponin formülasyonu ile kullanılan FML antijeni, kala-azar enfeksiyonuna karşı köpeklerde % 95 koruma sağlamıştır. Aşılanan köpeklerde yüksek seropozitiflik (%100), hiçbir *Leishmania* DNA ve intradermal reaksiyonlar tespit edilemedi. FML-QuilA aşısı köpeklerde kala-azar'a karşı önemli, uzun ömürlü ve güçlü bir koruyucu etki sağlamıştır [142]. Ancak, Leishmune[®] (1mg) lisanslı bir FML-saponin formülasyonu, daha fazla oranda geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonları göstermiş ve önemli derecede anti-FML IgG antikorları, belirgin olarak yüksek seviyelerde ve istikrarlı IgG2 ve azalan bir IgG1 yanıtına yol açmış ve Th1 tip hücre aracılı yanıtında bozmuştur. Leishmune[®] aşısı köpek visceral leishmaniasis immünoterapisi için iyi bir seçenek olabilir, ancak, bir immünoterapötik ajan olarak kullanımı ile ilgili bir bildirim yoktur.

2.8.2.5 LIESA-MDP

Diğer ikinci-nesil köpek aşısı III. Faz çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilen LIESA-MDP 54 kDa *L.infantum* protein promastigot protein ile Muramil dipeptid'in (MDP) bir kompozisyonudur [143]. LIESAp ile aşılanan köpeklerden elde edilen periferik lenfositlerin *Leishmania* enfekte makrofajlar ile inkübasyonu IFN- γ ile makrofaj aktivasyonu sonucu önemli derecede NO(nitrik oksit) bağımlı leishmaniasidal etki göstermiştir [144].

2.8.2.6 Sistein Proteinaz (CPs)

Katepsin L-sistein proteinazı (CPs), papain süperaillesinin önemli bir aşı adayı olup ağırlıklı olarak amastigot lizozomlarında ifade edilir [145]. Sistein proteinaz parazitin yaşam, çoğalma ve hastalığın başlamasında önemli bir rolü bulunan ilaç veya aşı hedefidir [146]. *Leishmania*'da üç sınıf CP tespit edilmiştir: Tip I (CPB), Tip II (CPA) ve Tip III (CPC) [146]. CPB, özellikle C-terminal uzantısı bulunan ve multikopyalı genlerden oluşmasıyla karakterize edilir, CPA ve CPC ise tek bir kopya gen tarafından kodlanmıştır. Farelerde CPA/B füzyon proteini ile yapılan deneysel kütanöz leishmaniasis çalışmalarında, IgG2a ve IFN- γ artan seviyesi ile farelerde Th1 immün

yanıtı oluşumu sonucu kısmi bir koruma elde edilmiştir [147]. Sistein proteinaz proteini kullanarak bir aşı geliştirmek için çabalar şimdi protein formundan DNA formuna kaymıştır.

2.8.2.7 Glucose-regulated protein 78 (GRP78)

L. donovani'nin glukoz-regüle protein 78 (GRP78) 70kDa stress protein ailesinin en korunmuş üyesidir. GRP78 kodlayan genler mayalar, *Trypanosoma*, sıçan diğer *Leishmania* türleri (*L. major*, *L. infantum* ve *L. braziliensis* dahil olmak üzere birçok türde karakterize edilmiştir [148], [149], [150]. *L. donovani* GRP'si sırasıyla, *L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis* ve *Trypanosoma cruzi* GRP'lerine %98,%97, %89 ve %82 oranlarında homoloji göstermektedir. Son zamanlarda, 78 kDa antijeni çeşitli adjuvanlar (MPL-A, RIL-12 ve lipozomal kapsülleme) ile birlikte formüle edildiğinde artan Th1 immün yanıt gösterdiği ve koruma sağladığı gösterilmiştir [151].

2.8.2.8 Amastigot Antijenleri (P4, P8,A2)

Amastigotlara özgü olan ve potansiyel aşı modelleri için kullanılan antijenler P4, P8 ve A2 antijenleridir. Farelerin *L. pifanoi*'den elde edilen P4 ve P8 antijenleri ile immünizasyonu oldukça büyük proliferatif cevaplara ve artmış IFN- γ üretimi ile kısmen koruma sağlamıştır [152]. Son zamanlarda, farelerde, makrofaja bağlı sitokin ve kemokinlerce üretilen Toll-benzeri reseptör 4 üretiminin P8 proteoglikolipid kompleksi (PGLC) tarafından indüklendiği bildirilmiştir [153]. IFN- γ , makrofaj migrasyonu inhibitör faktörü (MIF) ve tümör nekrozis faktörü / limfotoksin (TNF/LT) üreterek baskın bir CD4⁺ T-hücre cevabı oluşturan P4 antijeninin immünize edici bir ajan olduğunu ortaya çıkıştır [154]. P8 ve P4 antijenlerine [155], [156] karşı cevap veren kütanöz leishmaniasisli hastalardan elde edilen PBMC'ler deneysel olarak *L. chagasi*/*L. infantum* ile enfekte edilmiş [157], ve Th1 benzeri immün cevap oluşturarak artan düzeyde IFN- γ ve TNF- α ürettikleri ve düşük IL-4 mRNA ekspresyonu sağlandığı ortaya çıkmıştır. A2 proteininin sadece *Leishmania*'nın amastigot formunda intraselüler olarak en az 11 genden oluşan bir multigen ailesinden üretilen bir protein olduğu ve *Leishmania* parazitlerinin memeli konak içerisinde hayatını sürdürmesinde gerekli olan virulent bir faktör olduğu kesin olarak bilinmektedir. Son zamanlarda, adenovirüs A2 eksprese

eden (AdA2) BALB/c farelerinin A2'ye özgü CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri yüksek seviyede IFN- γ üretirken düşük antikor cevabı verdikleri belirlenmiştir [158].

2.8.2.9 HASPB1

Asidik yüzey moleküllerinden heterojen bir aileye ait yüzey molekülü olan ve, *Leishmania*'nın hayat döngüsünde sadece amastigot fazda ve metasiklik fazda eksprese edilen rekombinant hidrofilik açillenmiş yüzey proteini B1, VL modeli farelerde adjuvanın yokluğunda koruyucu etkiye sahiptir [159]. Ancak, köpeklerde, adjuvan olarak Montanide kullanıldığında rekombinant HASPB1 kısmi koruma sağlamıştır [160].

2.8.2.10 LCR1

T. cruzi flajellar polipeptidi ile homologik şekilde tekrarlayan 67-aminoasit zinciri içeren bir diğer rekombinant protein ise LCR1'dir. BCG'de *L. chagasi* enfeksiyonuna karşı kısmi koruyucu etkisi olduğu ve aşı olarak yönlendirilen ve enfekte fare dalak hücrelerinde T hücre proliferasyonunu ve IFN- γ üretimini uyardığı belirtilmiştir [161], [162]. BCG-LCR1 ile immünizasyon aracılığı ile duyarlı farelerde LCR1 proteininin yalnız kullanılması ile kıyaslandığında daha iyi bir koruma sağlamaktadır ancak bu koruma salınım rotasına (yoluna, şekline vs) bağlı olmaktadır [162].

2.8.2.11 H1 (Histon 1)

Leishmania histonları, hem *Leishmania* enfeksiyonu ve hem de hastalığı boyunca konağın immün cevap oluşturmaya neden olan potansiyel immünojenlerdir. Rekombinant histon 1'in koruyucu etkisi av köpekleri üzerinde *L. infantum*'a karşı ve yeşil Afrika maymunları üzerinde de *L. major*'a karşı belirlenmiştir [163]. Her iki durumda da immünizasyon kısmi olarak indüklenmiştir. Native H1 ve sentetik peptidleri immünizasyon sonrasında farelerdeki kütanöz leishmaniasis lezyon büyüklüğünde küçülmeye neden olmuştur [164]. Son zamanlarda, köpeklerin immünizasyonu, Montanide ile formüle edilmiş H1 ile kıyaslı deneysel çalışmalar yapıldığında ekstrem koşullarda bile kısmi koruma sağladığı belirtilmiştir [160].

2.8.2.12 ORFF

ORFF (open reading frame fragment) tek bir kopya halinde 35. kromozom üzerinde yer alan multigen LD1 lokusuna aittir ve parazit gelişimi için önemli bir gendir [165], [166]. ORFF proteini ile ilgili aşılama çalışmaları VL'li fare çalışmaları ile sınırlandırılmıştır. Rekombinant ORFF proteininin CpG-ODN kombinasyonu ile farelerin immünizasyonu *L. donovani* enfeksiyonuna karşı belirgin bir koruma sağladığı ve bunu da zengin IgG2a and IFN- γ üretimi ile gerçekleştirdiği ancak proteinin tek başına sadece kısmi bir koruma sağladığı belirlenmiştir [167], [168].

2.8.2.13 dp72

VL hastası insanların serumlarından alınarak tanımlanan, *L. donovani*'den elde edilen dp72 proteini *C. parvum* ile desteklenmiş kombinasyonunun aşı adayı olarak kullanılması ile BALB/c farelerinde *L. donovani*'ye karşı kısmi koruma sağlar [124], [169].

2.8.2.14 P0

P0 ribozomal proteini, VL tanısı konulmuş köpeklerin serumlarındaki *L. infantum*'dan tanımlanmıştır [170]. Artan IFN- γ ve IgG2a üretimi ile Th1 tipi immün cevabı aracılı rekombinant P0 ribozomal proteini (rLiP0) kullanılarak immünize edilen farelerde koruma sağlandığı gösterilmiştir [171]. Ancak, BALB/c farelerinin *L. major* enfeksiyonu ile indüklenmesinde Th2 cevabı yeterli koruma sağlayamamaktadır. Son zamanlarda LRP (*Leishmania major* ribosomal proteins)'nin CpG-ODN ile kombinasyonunun BALB/c farelerini aşılama kullanımı dermal patolojilerde iyileşme olduğunu ve *L. major* ile rekabetinde parazit yükünde azalma olduğunu göstermiştir [172].

2.8.2.15 KMP-11

Hücre yüzey membranına bağlı kinetoplastid membran proteini-11 (KMP-11), *Leishmania* türlerini yüksek şekilde korur, ve bunu T-lenfositlerinin proliferasyonunu ve antikor cevaplarını uyarak yapar [173], [174]. Periferik kan mononükleer hücrelerinin stimülasyonu ile VL ve KL hastalarından native KMP-11 ve sentetik peptidleri ile T hücre proliferasyonunun engellendiği IFN- γ 'nın belirgin şekilde

üretiminin düşük olduğu belirlenmiştir [175]. Ancak, deneysel olarak enfekte edilen köpeklerden elde edilen PBMC'ler KMP-11 antijenine karşı cevap oluşturmuş ve IFN- γ 'ye karşı artan bir düzenleme gelişmiştir [176].

2.8.2.16 PFR-2

Flajellar rod proteini-2 ile immünizasyonda dişi hamsterlerde bulunan yaralardaki büyüme *L. panamensis*'e karşı olan enfeksiyonlarda engellenirken, *L. mexicana*'ya karşı olan enfeksiyonlarda efektif olmamıştır [177].

2.8.2.17 Poliprotein aşıları

Protein Q. Aşı gelişimindeki son yaklaşım poliprotein kompozitlerinin farklı proteinler ile kullanımına daıdır. Asidik ribozomal protein Lip2a, Lip2b, P0 ve histon 2A (H2A) gibi 4 fragmentlerinin genetik füzyonlarını içeren antijen kompoziti olan rekombinant protein Q visceral leishmaniasis hastası köpeklerde % 90 koruma sağlamış ve parazit yükünü düşürmüştür [178]. Protein Q aynı zamanda farklı adjuvanlar (hsp70, BCG, CpG-ODN, pUC18, pcDNA3, alum ve Freund's adjuvant) ile kombinasyonunda immün cevap için aktivatör potansiyele sahiptir [179].

Leish-111f. Umut veren bir diğer ikinci-jenerasyon aşı örneği de Leish-111f'dir. Leish-111f leishmaniasis için tanımlanan ilk aşı olmuştur ve klinik faz1 ve 2 denemelerinde kullanılmıştır. Leish-111f, *L. major* homolog ökaryotik tiyol-spesifik antioksidan (TSA) [180], *L. major* stress- inducible protein 1 (LmSTI1) [181] ve *L. braziliensis* elongation and initiation factor (LeIF) [182] gibi üç molekülün kompozisyonu olan bir poliproteindir. *Leishmania*'nın hayat döngülerinde bulunan proteinler aşı olma potansiyeli taşıyan proteinlerdir. Rekombinant LeIF ile immünize edilen SCID farelerinde IFN- γ , IL-12 ve IL-18 üretimin arttığı Th1 tipi immün cevap oluşumu gözlenmiştir [183]. Leish-111f proteinin diğer bileşenleri TSA ve LmSTI1'dir. Tek başına antijen ile (TSA or LmSTI1) immünize edilen farelerde koruma gözlenmemiştir ve IgG2a antikoruna karşılık IgG1 üretimi olmamıştır.. Buna karşılık, IL-12 kullanımı adjuvan olarak güçlü bir koruma sağlarken LmSTI1 ve TSA adjuvanlarının sırası ile artan IFN- γ ve IgG2a konsantrasyonları ile kısmi koruma sağlamaktadırlar [183], [184].

Ancak *L. braziliensis*'ten tek başına ya da kombinasyonlar şeklinde elde edilen LmSTI1 ve TSA kullanılarak hazırlanan rekombinant izolatlar ile immünizasyonda *L.braziliensis*'e karşı farelerde antikor ve hücre temelli cevaplar oluşmasına rağmen koruma görülmemiştir [185]. Liesh-111f'nin rekombinant bileşimlerinin karışımının köpeklerde oldukça yüksek immünjenite oluşturmuş ancak *L.infantum*'a karşı korumada işe yaramadığı ve köpeklerde faz-3 çalışmalarında ise hastalık gelişimi durdurulamamıştır [186], [187].

2.8.3 Üçüncü Jenerasyon *Leishmania* Aşıları: DNA Aşıları

Yabancı protein kodlayan plazmid DNA'sının direk enjeksiyonunun keşfi, endojen protein biyosentezi ve buna karşı spesifik bir immün cevap oluşması, aşı geliştirmede yeni bakış açısı sağlamıştır. DNA aşıları nispeten kolay üretilibilmeleri, stabil, yönlendirilmesi kolay ve çoğunlukla immünojenik olmaları nedeniyle avantajlıdır [188]. Böyle aşılar sitokinler ve /veya CpG oligonükleotidleri ile daha da modüle edilebilir CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre cevabı ortaya çıkarabilirler [189], [190]. En çok çalışılan ve uzun zamandır kullanılan DNA aşıları rekombinant proteinler halindedir [191], [192], [193]. Çoğu tek başına bazıları ise multijenik aşılar olarak denenmiştir [194]. DNA ile heterolog prime-boost stratejisinde protein ile immün cevabın daha da arttırılmasının modüle edilmesi yoğun çalışmalar gerektirir. Heterolog prime boost stratejisi, DNA ve protein aşılama ile immün cevabın arttırılmasına yönelik bir stratejidir [195]. Bir çok çalışma farede KL'ye ve VL'ye karşı [196], [197], bazı hamsterlarda VL' ye karşı ve köpeklerde canine VL' ye karşı kullanılmıştır [187], [198]. Gp63 kodlayan gen DNA aşısı olarak ilk kullanılandır ve fareye oral yolla gp63 eksprese eden *S. Typhimurium*' un tercihen CD4⁺ Th1 uyaran ancak saptanabilir DTH cevabı vermeyen altkütlesi verilerek immünize edilmiş, pCMV-gp63 intramusküler olarak verildiğinde hem güçlü Th1 cevabı gelişmiş hem de *L. major* enfeksiyonuna karşı belirgin direnç oluşmuştur [199]. Diğer çalışmalar tüm farelerin Th1 yanıtıyla indüklenmesine rağmen farelerin %30'unda *L major*' e karşı koruma sağlandığını ve *L. mexicana* enfeksiyonuna karşı gp63 DNA'sıyla immünizasyonda kısmi koruma sağlandığını ortaya koymuştur [200], [201]. Buna rağmen gp46 ve cysteine proteinase b (CPb) karışımı gp63 ile birlikte koruma derecesini arttırmıştır [202]. Alüminyum fosfat ve plazmid kodlayan CD40L'nin kullanımı adjuvan

olarak gp63'ün etkisini daha da arttırmıştır ve deneysel enfeksiyon sonrası inflamatuvar reaksiyonu kısmen baskılamıştır [203]. Tüm bunlara rağmen gp63 içeren multijenik DNA aşısı köpeklerde *L.infantum'a* karşı koruma sağlayamamıştır [204].

Karşılaştırmalı bir çalışma gp63 içeren farklı DNA aşı adaylarının geçici koruma sağladığını ve neticede aşılanmış farede de kontroldekine benzer lezyonların geliştiğini gösterdi [205]. Aynı çalışma ayrıca koruma sağlamayan yüzey antijen 2 promastigotuda (PSA-2) içermektedir. LACK (*Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase) şimdiye kadar hem kütanoz hem de VL' ye karşı kullanılan en yaygın DNA aşısıdır. Farelerin LACK DNA ile IL-12'li ve IL-12'siz immünizasyonu *L.major* enfeksiyonuna karşı uzun süreli koruma sağlamasına rağmen CD4⁺ and CD8⁺ T hücrelerinin azalması koruyucu immüniteyi ortadan kaldırmıştır [206], [207]. Benzer olarak intranazal verilen LACK DNA aynı zamanda fareyi *L. amazonensis* ve *L. chagasi* enfeksiyonuna karşı korumuş ancak intramusküler olarak verildiğinde IFN- γ artmasına rağmen *L. chagasi* enfeksiyonuna karşı korumada yetersiz kalmıştır [208], [209], [210]. Melby ve arkadaşlarının önceki çalışmalarıda LACK DNA'nın farede *L. donovani* enfeksiyonuna karşı güçlü bir Th1 cevabı tetiklenmesine rağmen korumayı arttıramadığını desteklemiştir [211], [212]. LACK içeren diğer multijenik plazmid DNA'sı köpeklerde deneysel *L. infantum* enfeksiyonuna karşı koruma sağlayamamıştır [204].

DNA kodlayan P4 nükleazı ve IL-12 ile immüninazyon farede Th1 cevabını geliştirmiş ve *L. amazonensis* enfeksiyonuna karşı koruma sağlamasına rağmen *L.major* enfeksiyonuna karşı yetersiz kalmıştır [194]. Farelerin A2 DNA ile immünizasyonu onları Th1 cevabı ile *L. amazonensis* ve *L. chagasi* enfeksiyonunun her ikisine karşı da korumuştur ancak A2'nin HSP70 DNA aşısı ile kombinasyonu karışık Th1/Th2 cevabını indüklemiş ve fareyi *L. amazonensis* enfeksiyonuna karşı koruyamamıştır [213].

2.8.4 Heterolog prime-boost aşısı

DNA prime-protein boost rejimi hümmoral ve hücresele kaynaklı cevapların her ikisini de insan dışı primatlarda aydınlatılmıştır [214]. Bu aynı zamanda aşısı varlığında uzun ömürlü antikor cevabının artmasıyla oluşan etkinliği ve IL-12 ve IFN- γ salgılanmasını artırır [215]. prime-boost stratejisinde *L. infantum* LACK ile birinci aşılamaıı takiben vaccinia virus (VV)' de eksprese edilen LACK ile immunojeniteyi artırmak (boosting)

farede koruma sağlar ve *L.major* enfeksiyonuna karşı Th1 cevabını indükler ve koruma IL-12 and IL-18 eksprese eden DNA'nın birlikteliğiyle daha da kuvvetlenir [216]. Ancak sistein proteinaz tip I' in C-terminal ile birincil aşılamaadan sonra booster, immünojenik olmasına rağmen fareleri *L. infantum* enfeksiyonuna karşı koruma sağlayamamıştır [217]. Ancak prime-boost rejimi ile indüklenen koruyucu cevap sadece DNA aşısıyla oluşandan daha fazla değildir [218].

2.9 Leishmania Aşı Adaylarında Test Edilen Adjuvanlar

2.9.1 İnterlökin-12 (IL-12)

IL -12, makrofajlar, dendritik hücreler, B lenfositler ve diğer yardımcı hücreler tarafından üretilir ve hücre aracılı immunitenin gelişmesinde ve proliferasyon ve leishmaniasisin koruyucu immunitesinde önemli olan T hücreleri ile doğal NK hücreleri tarafından INF- γ üretiminin stimülasyonunda kritik bir komponentdir [31], [58], [219]. Ayrıca bu sitokin, leishmaniasisin immunitesinde koruyucu olmaktadır [220], [221]. Deney hayvanlarında, baskın Th1 lenfosit yanıtı (IL-2, IFN- γ) ile hastalığın kendi kendini sınırladığı; baskın Th2 cevabının ise hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [222]. IL-12'nin kullanılmasının en sınırlayıcı faktörü, yüksek maliyetli olması olabilir. IL-12 pahalı ve üretimi zor olmakla beraber insanda adjuvan olarak kullanılması tartışmalıdır [223].

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

Rekombinant GM-CSF; dendritik hücrelerin göçünü, olgunlaşmasını ve aktivasyonunu uyarak etki etmektedir. Bu sitokin Th1 hücre cevabında baskındır [224]. Adjuvan olarak etkili dozunun 25 mg -50 mg olduğu ve VL hastalarında kullanıldığında iyi tolere edildiği gösterilmiştir [225], [226]. Bu sitokin ile aşılanan mukozal leishmaniasisli hastaların iyileşmesinin arttığı gösterilmiştir [224]. Lezyon bölgesine pentevalan antimoneller ile birlikte enjekte edildiğinde, GM-CSF iyileşme süresini azaltmıştır [227].

2.9.3 Bacille Calmette Guerin (BCG)

BCG, tüberkülozun etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* ile yakın ilişkili olan *Mycobacterium bovis*'in zayıflatılmış halidir. ([http:// www. MedicineNet. com](http://www.MedicineNet.com)). BCG, Th1 tip immun yanıtı uyatarak etki eder ve insanda kullanımı için Th1 yanıtını uyaran en kabul edilebilir adjuvandır. BCG'nin aşılar da adjuvan olarak uygulaması her zaman problemsiz olmamaktadır. BCG'nin enflamatuar artrit ve otoimmun reaksiyonlar gibi yan etkileri ve komplikasyonları rapor edilmiştir [113], [228], [229]. Bu nedenle, BCG'nin bu etkileri güvenli bir aşı için dezavantajdır.

2.9.4 Montanide ISA 720

Montanide Incomplete Seppic adjuvanları, (Montanide ISA) metabolize edilmeyen mineral yağları, metabolize mineral yağları veya iki yağın karışımı ile kombine edilen farklı sürfaktanları içeren bir gruptur. ([http: // www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/overview.htm](http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/overview.htm)). Montanide ISA 720 alüminyum hidroksite alternatif adjuvan olarak insanda deneysel kullanımı onaylanmıştır [163], [230], [231]. İnsanda Th1 tipi hücresel ve hü mor al immun cevap için uyarıcı oldu ğ u gösterilmiştir [163]. Montanide ISA 720 ayrıca primatlarla yapılan aşılama çalışmalarında da iyi sonuçlar göstermiştir [163], [232].

2.9.5 Alüminyum tuzları

Alüminyum tuzlarına dayalı adjuvanlar genellikle Alum olarak isimlendirilirler ve alüminyum oksihidroksid, alüminyum hidroksifosfat veya alüminyum hidroksil sülfat gibi çeşitli tuzları içeren kristal olmayan jellerdir [233]. Adjuvanlar arasında insanda kullanımı onaylanmış olan alum göreceli olarak reaktogenik değildir [234]. Alüminyum fosfat ve alüminyum hidroksit (alum) insan aşılarında kullanılan en yaygın bileşiklerdir. Alumun kullanılması 70 yıl önce Glenny ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır [235]. Glenny ve ark. Alum-çöktürülmüş difteri toksoidlerinin sıvı toksoidlerden çok daha immunojenik olduğunu keşfetmişlerdir. Alüminyum adjuvanları dokulardaki antijenlerin depo formunda olup immun hücrelere sunmak üzere antijen üretir ve belli komplement ve diğer immun arttırıcıları aktive eder. Bazı immun yanıtlarda, ancak hepsinde değil, protein antijenleri alüminyum tuzlarla arttırılmış ancak bu tuzlar peptit

ve polisakkarit antijenlerde düşük etkiye sahiptir. Alüminyum adjuvanlar birincil immunizasyon serilerini arttırırken, antijen miktarını ve doz sayısını azaltır [236]. Alüminyum içeren aşılar da lokal reaksiyonlar, steril abseler, eritema, deri altı nodüller, granulomatoz enflamasyon ve aşırı duyarlılık gibi yan etkiler rapor edilmiştir [237].

2.9.6 CPG Oligodeoksinükleotit (CpG ODN)

Metillenmemiş CpG dinükleotit motifleri bakteriyal genomda veya sentetik oligodeoksinükleotitlerde sunulmuş ve farede verilen antijene karşı hümmoral ve hüccresel cevabı uyararak güçlü immunostimolan etki sergilemiştir [238], [239]. İmmunostimulan CpG motiflerini içeren ODN'ler Th1 yanıtını, leishmaniasis'e karşı aşılama için istenen adjuvan aktivitesini uyarabilirler.

2.9.7 Lipozomlar

Lipozomlar, belli lipidler veya sulu ortamlarda kendiğinden oluşabilen mikropartikül veya kolloid taşıyıcılardır [240].

2.9.8 Glukan

Glukan ekmek mayasının β 1,3 polyglukoz türevidir [241].

2.9.9 *Corynebacterium parvum* (C. parvum)

Bakteriyel enfeksiyonlardaki mikroorganizmalar ve ölü bakterileri, bazı bakterilerin metabolik ürünleri ve bileşiklerini içeren aşıların verilmesinin antikor yanıtını uyardığı ve immunostimulan olarak görev aldığı bilinmektedir. Böyle mikroorganizmaların ve bileşiklerin aşıların içine eklenmesi immun yanıtı arttırır. Mikroorganizmaların tamamen veya belli parçaları kullanıldığı en genel yapılar Bordetella pertussis komponentleri, kolera toksini, *Mycobacteria* ve *Corynebacteria*'dır [242].

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

Saponinler, bitkilerden izole edilen triterpen glikozidlerdir [243]. Adjuvan araştırmalarında en fazla kullanılan saponin Quil-A ve onun türevleri olup Quillaja saponaria ağacının kabuğundan ekstrakte edilirler [244]. Quil-A, adjuvan aktivitesi ve

toksisitesini değiştiren triterpen glikozidlerinin heterojen bir karışımıdır. Saponinler veteriner aşılarında adjuvan olarak geniş şekilde kullanılırlar. Özellikle Quil-A nın saflaştırılmış fraksiyonları antijen, fosfolipit, kolesterol ve Quil-A fraksiyonlarından oluşan immunostimulatör komplekslerde kullanılırlar [233]. ISCOM'lar, hemolitik aktiviteleri ve bazı lokal etkileri nedeniyle sadece veteriner aşılamada kullanılmaktadır.

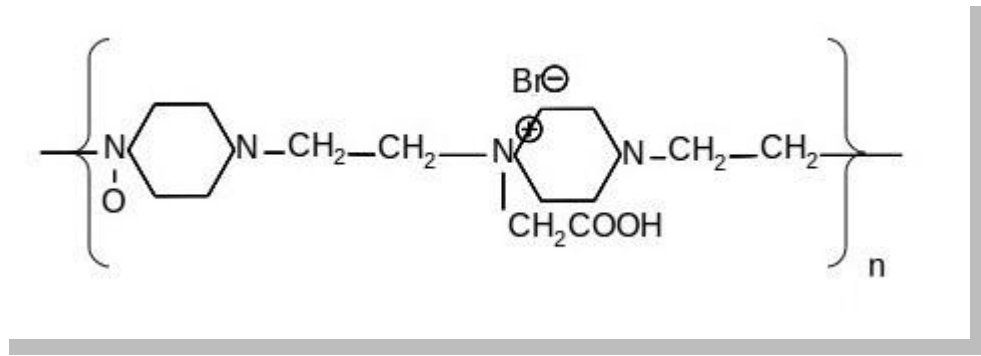
2.9.11 Freund's adjuvants

Tam ve tam olmayan olmak üzere 2 tür Freud's adjuvanı bulunmaktadır. Freund's tam adjuvanı (FCA) metabolize olmayan yağlar, bir sũrfaktan (Arlacel A) ve mikobakteri (*M. tuberculosis* or *M. butyricum*) karışımıdır. Bir hacim FCA ile bir volum sulu antijen solũsyonunun kombine edilmesi ile hazırlanır. Emũlsiyonda antijen geniş yũzey alanına yayılır ve ilişkili hũcrelerle etkileşim potansiyelini arttırır [245]. Mikobakteri ve sũrfaktan tarafından makrofajların immun spesifik olmayan potansiyelleri ve depo etkileri sayesinde FCA tarafından Antikor üretimi arttırılır [246].

2.10 Adjuvan Olarak Kullanılan ilk Sentetik Polimer: Polioksidonyum (POX)

Antijenlerin sentetik immunostimulan polimerlerle konjugasyonu ile oluşturulan polimer-subunit aşı prensibi, teorik olarak temel alınmış ve deneysel olarak doğrulanmıştır. Bu prensibe gũre gribe karşı Grippoll ticari ismiyle üretimi yapılan ilk sentetik polimer aşısı geliştirilmış ve Rusya'da milyonlarca insan aşılanmıştır. Grippol, sentetik bir polimer olan Polioksidonyum (POX) ile influenza virũs proteinlerinin konjuge edilmesiyle elde edilmiştir. POX, N-oxidized polyethylene-piperazine tũrevi olup, suda çũzünebilen 60–100 kDa molekül ağırlıklığında, sentetik immunomodũlatör bir moleküldür Polielektrolit antijen konjugatının hem hũcressel hemde hũmoral immun yanıtı 10 ila 100 kat arasında arttırdığı ve koruyucu özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir [12]. POX'un insan periferel fagositik kan hũcrelerinin fonksiyonel aktivitesi üzerine *in vitro* etkisi incelenmiştir. POX, lũkositlere bir saat maruz tutulduğunda doza-bağımlı olarak lũkositlerin fagositik aktivitelerini arttırarak *Staphylococcus aureus*'un fagositoz yoluyla öldürũlmesine neden olmuştur [247], [248], [249]. Lũkositlerdeki bu etki hem sağlıklı kişilerde hemde kronik granũlomatöz hastalarında gözlenmiştir. Genel olarak POX'un immunostimulan aktivasyonundaki mekanizmaları belirlenmiştir. Bunlar; T ve B

hücrelerinin göç aktivasyonu, hücreler arası işbirliği, yardımcı T hücrelerinin yenilenmesi, membran proteinlerinin kümelenmesi ve böylece membran geçirgenliğinin artması, $\text{Ca}(2+)$ ve $(\text{Na}(+),\text{K}(+))\text{-ATPaz}$ aktivasyonudur [247], [248], [249]. Ayrıca bu aşılarda koruyucu antikor sınıfında bulunan IgM, IgG1, Ig2a, Ig2b, IgG3, IgA antikorlarını artırdığı fakat alerjik IgE antikorlarında artışa neden olmadığı gösterilmiştir. Sonuç olarak POX ile yapılan Grippol aşısı yüksek etkinlik ve mutlak koruyuculuğuyla halen ilk sentetik polimer aşısı olarak kullanılmaktadır [12]. POX ile konjuge edilmek üzere bruselloz, tüberküloz, dizanteri, AIDS ve hepatit virüs antijenlerine karşı polimer-subunit aşılarda ön klinik ve klinik denemeleri halen devam etmektedir. Ayrıca, biyoyumlu olan Polioksidonyum Rusya’da özellikle immun sistem yetmezliği olan kişilerde immunomodülatör ilaç olarak kullanılmaktadır. POX antitümoral bağışıklık etkinliğini artırır [250]. Polioksidonyumun antitümoral etkisinin temelini, antitümoral korumanın oldukça önemli bileşenlerinden olan makrofaj ve nötrofilleri aktive etmesi oluşturur. Kanserli hastaların tedavisinde, cerrahi tedavi, kemoterapi ve radyoterapiyle kombine olarak kullanılan POX’un tümörün gerilemesinde ve komplikasyonların önlenmesinde daha iyi sonuçlar verdiği gösterilmiştir [250]. Böylece POX’un immunitiyi aktive ederek tümör gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir.



Şekil 2.5 POX’un moleküler yapısı

2.11 Polimerler

2.11.1 Polimerlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılmaları

Polimerler monomer adlı basit yapıların birleşmesiyle oluşan uzun zincirli moleküllerdir. İki veya daha fazla monomerin birleşiminden yapılabildikleri gibi tek bir monomerden de yapılabilirler [251].

Polimerlerin, farklı kriterleri göz önünde bulundurularak, farklı sınıflandırmaları yapılmaktadır. Örneğin molekül ağırlıklarına göre (oligomer, makromolekül), doğal veya sentetik olmalarına göre, ısıya karşı gösterdikleri davranışlara göre (termoplastikler, termosetler), zincirin kimyasal ve fiziksel yapısına göre (düz, dallanmış, çapraz bağlı, kristal, amorf; homopolimer, kopolimer), sentezlenme şekillerine göre sınıflandırılabilirler.

Polimerleşme reaksiyonları esnasında pek çok monomer, diğer monomerlerle ya da ortamda daha önce tepkime vermiş ve belli bir moleküler ağırlığa ulaşmış molekül zinciri ile tepkime verebilir. Eğer polimer zinciri yeterince büyümemişse oligomer olarak adlandırılır. Oluşan zincirlerin büyüklükleri, türlerin moleküler yapılarından, tepkime verme yollarına ve sentez şekillerine kadar pek çok faktöre bağlıdır.

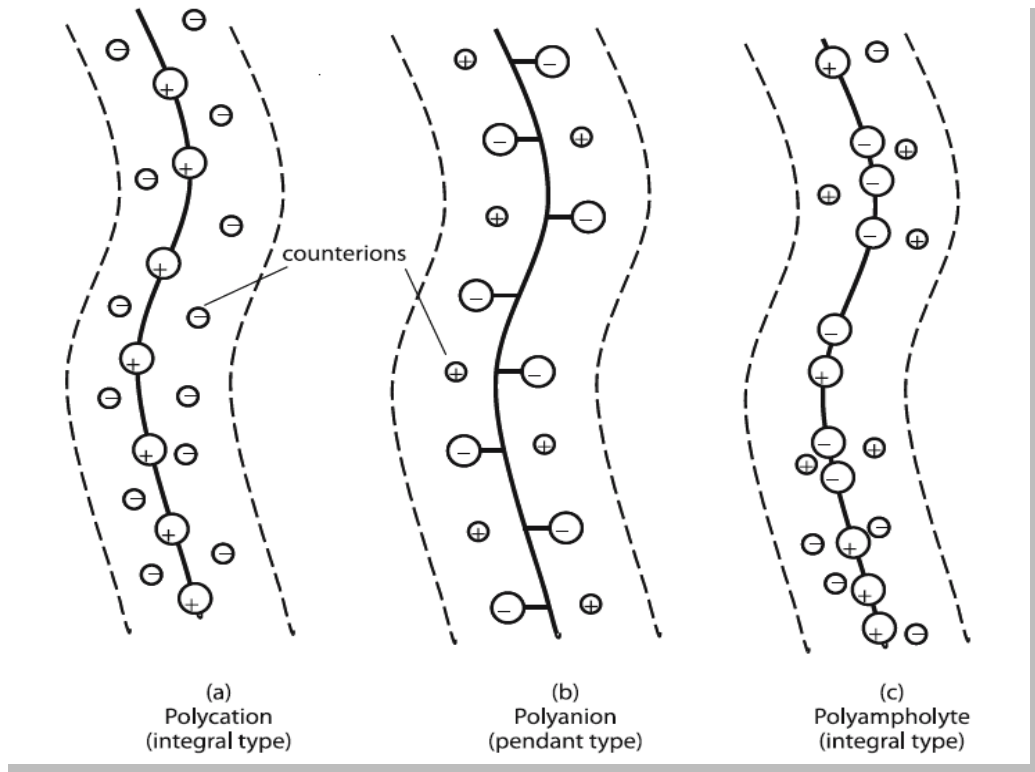
Uzun zincirler halinde bulunan düz ya da dallanmış zincirlerden oluşan polimer sistemlerine termoplastik adı da verilmektedir. Yüksek oranda çapraz bağ içeren sistemler ise termosetting olarak tanımlanır. Termoplastik bir malzeme, sıcaklık artışı ile eriyerek şeklini değiştirebilir ve böylece kalıplara dökülebilmesi mümkün olur. Oysa yüksek oranda çapraz bağ içeren bir yapının sıcaklık artışı ile böyle bir değişim geçirmesi, zincirlerin hareketli olmayışı nedeniyle, zordur ve sıcaklığın artışı bu tür malzemenin erimesine değil, parçalanmasına neden olur [251].

Polimerlerin çoğu etilen, stiren gibi basit monomerlerden hazırlanır. Poli(etilen terethalate) veya naylon-6,6 gibi polimerler iki monomerin reaksiyonundan hazırlanırken, iki monomerden fazlasının reaksiyonunu içeren polimerler de vardır. Buna örnek olarak akrilonitril, stiren ve butadienin polimerizasyonu ile oluşan poli(akrilonitril-butadien-stiren) kopolimeri verilebilir [251].

Sentetik polimerlerin yanı sıra doğal olarak oluşan birçok polimer vardır. En iyi bilinen doğal polimerler; proteinler, deoksiribonükleik asit (DNA), hemoglobin, insülin, nişasta gibi yapılardır [251].

2.11.2 Polielektrolitler

Polielektrolitler, kovalent olarak bağlı anyonik veya katyonik grupları ve bu gruplara bağlı iyonları bulunan polimer sistemleridir. Polielektrolitler, üzerinde bulunan yüklü grupların tümünün eksi yüklü olması durumunda polianyon adını alırken, tümü artı yüklü ise polikasyon adını alır. Poliamfolitler yapılarında kovalent bağlı olarak anyonik ve katyonik grupların her ikisini de içeren makromoleküllerdir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Polielektrolitlerin sınıflandırılması a.polikasyon b.polianyon c.poliamfolit[252]

Polifosfatlar ve polisilikatlar inorganik polielektrolitler olarak sayılabilir. Sentetik polielektrolitler genelde bir katılma veya kondenzasyon polimerleşme reaksiyonlarıyla elde edilebilir. Sentetik yapıda polielektrolitlerin dışında, polisakkaritler, proteinler ve nükleik asitler gibi doğal polielektrolitler de mevcuttur [253]. Bunların yanı sıra karboksimetilselüloz gibi yarı sentetik polielektrolitler, doğal polimerlerin özelliklerinin iyileştirilmesi için modifiye edilmesiyle elde edilir [254].

Polielektrolite bağlı elektrolit gruplar sulu çözeltelerde dissosiyeye olup polimeri yüklü hale getirirler. Bu durum polimerin konformasyonunu değiştirir. Herhangi bir polimerin konformasyonu, polimerin yapısı ve çözeltiyle ilişkisi gibi çeşitli etkenlere bağlıdır. Çözelti içindeki yüksüz, düz bir polimer zinciri rasgele yumak konformasyonu gösterirken, polielektrolitler üzerindeki yüklerin birbirini itmesi sonucu uzanmış, düz bir konformasyon oluşturmaya eğilim gösterir (Coulomb etkisi). Bu konformasyon, polielektrolit çözeltilerinin viskozitesinin yükselmesine yol açar. Polielektrolit özeltilerinin özellikleri, sulu ortamın iyonik şiddetine bağlıdır. İyonik şiddetin artmasıyla polielektrolitteki iyonların elektrik yükleri arasındaki itme kuvvetinin engellenmesi viskozitenin değişmesine neden olur. Polielektrolitler, çözeltideki iyonik şiddetin daha fazla artması ile yüksüz polimerlere benzer davranış göstermeye başlarlar [255].

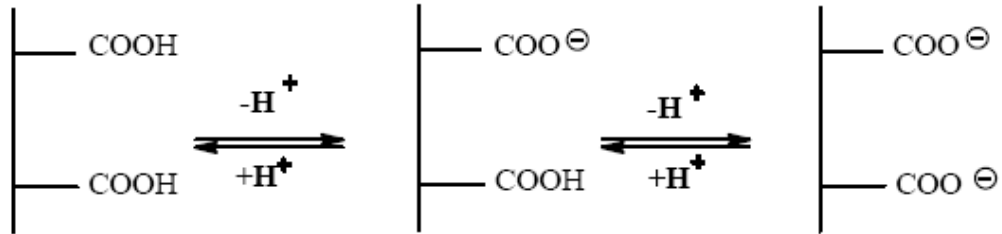
Zayıf polielektrolitlerin özellikleri iyonik şiddetin yanı sıra, ortamın pH'ından da etkilenir. Çünkü iyonik grupların dissosiyasyon derecesi ve polielektrolitin yük yoğunluğu ortamın pH'ına bağlı olarak değişir. Polielektrolit özeltilerinin diğer bir özelliği ise yüksek iyonik iletkenlikleridir. Elektrik alanı altında, küçük molekül ağırlıklı iyonlardan daha yavaş olmakla birlikte makroiyonlar da göç etmektedirler.

1970'li yılların başlarında immünologların ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bazı sentetik polielektrolitlerin organizmadaki immün cevaba etkisi aydınlatılmış ve sentetik polielektrolitlerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu tespit edilmiştir. Çünkü polielektrolitlerin sentezi ve modifikasyonu daha basittir, istenilen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek mümkündür. Ayrıca suda iyi çözünür ve bilinen yapılarda çeşitli kompleksleri sentezlenebilir. Polielektrolitlerin molekül ağırlığı, polimerleşme derecesi ile orantılı olup molekül ağırlığı çözünürlüğü etkiler [256].

2.11.2.1 Homopolielektrolitler

Homopolielektrolitler bütün monomerlerinde aynı işaretli yüklere sahip olan polielektrolitlerdir. Yüklü grupların tümünün eksi yüklü olması durumunda polianyon adını alırken, tümü artı yüklü ise polikasyon adını alır. Polielektrolitler, her bir tekrarlayan birimi bir elektrolit grup taşıyan polimerlerdir. Bu elektrolit gruplar sulu

çözeltilerde dissosiyasyon olup polimeri yüklü hale getirirler (Şekil 2.7). Polielektrolitlerin özellikleri hem elektrolitlere (tuzlar) hem de polimerlere benzemektedir ve bazen polituzlar olarak adlandırılmaktadırlar. Sulu çözeltileri, tuzlar gibi elektriği iletir ve polimerler gibi viskozdur.



Şekil 2.7 Poliakrilik asitin sulu çözeltideki dissosiyasyonu

2.11.2.2 Poliamfolitler

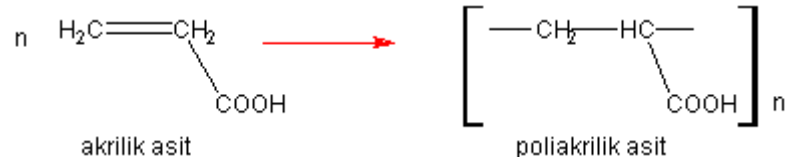
Poliamfolitler yapılarında kovalent bağlı olarak anyonik ve katyonik grupların her ikisini de içeren makromoleküllerdir. Doğada bol bulunan veya sentetik yapıda elde edilebilen proteinler, asidik veya bazik aminoasitler içerdikleri için amfolit özelliktedir. Bu proteinler pH'a bağlı olarak proton verme veya alma özelliğindedir. Asidik ortamlarda proteinler çözeltiden proton aldıkları için net pozitif bir yüke, bazik ortam koşullarında ise ortama proton verdikleri için net negatif yüke sahip olurlar. İzoelektrik noktada ise poliamfolitlerin net yük toplamı sıfıra eşittir[257] .

Poliamfolitlerin yapısal özellikleri, anyonik ve katyonik monomer birimleri arasındaki iyonik çekme kuvvetleri tarafından yönlendirilmektedir. Anyonik ve katyonik grupların molar oranı birbirine yaklaştıkça iyonik etkileşimler globular yapıya neden olurlar ve birçok durumda deiyonize suda çözünmezler [257]. Bir poliamfolit izoelektrik noktasının pH koşullarında bulunuyorsa çözünürlüğü düşüktür ve kolay çöktürülebilir .

2.12 Poliakrilik Asit

Poliakrilik asit, akrilik asit monomerlerinden oluşan bir polimerdir. Akrilik asit oda sıcaklığında renksiz ve kokulu bir sıvıdır. Su, alkol, eter ve birçok organik çözücü ile çözünebilen bir maddedir. Akrilik asit ısıya, ışığa veya metallerle maruz bırakıldığında

çok kolay polimerleşir. Şekil 2.8’de görüldüğü gibi akrilik asitin kimyasal yapısı $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$ ’dır (Willey, 1964).



Şekil 2.8 Poliakrilik asitin yapısı

Akrilik asitin bazı özellikleri Çizelge 2.3’de verilmiştir (Willey, 1964). Akrilik asitin kolaylıkla polimerize olma özelliğinden dolayı kuvvetli bir ekzotermik polimerleşmeden korunmak için ticari akrilik asitin içerisine polimerleşme inhibitörü eklenir. Poliakrilik asitin çözünürlüğünü etkileyen birçok parametre vardır. Bunlara deney şartları, dallanma derecesi, molekül ağırlığı, çapraz bağlanma oranı, ortamdaki diğer çözünen maddeler ve sıcaklık örnek verilebilir. Poliakrilik asitin kurutma işlemi çapraz bağlanmayı önleyecek şekilde yapılırsa çözünürlüğü yükselir. Buna karşın polimer yüksek sıcaklıklarda tamamen kurutulmuşsa çözünürlüğü oldukça azdır [258].

Çizelge 2.4 Akrilik asitin bazı özellikleri [258]

Molekül ağırlığı (g/mol)	72,0
Donma noktası (°C)	13,5
Yoğunluk (g/mL)	1,045 (25,0 °C)
Normal kaynama noktası (°C)	141,0
Refraktif indeksi	1,4185 (25,0 °C)
Kinematik viskozitesi (cks)	1,1 (25,0 °C)

Poliakrilik asitin çözünürlüğü sıcaklığın azalmasıyla düşer. Fakat poliakrilik asitin molekül ağırlığı ve konsantrasyonu düşükse ve tuz ya da mineral asitleri bulunduruyorsa sıcaklık düştüğünde çözünürlüğünde azalma görülmez. Ancak hidrojen bağı olan bileşiklerdeki çözünürlüğü sıcaklığın artması ile düşer (Willey, 1964).

Akrilik asit farklı alanlarda kullanılmaktadır. Örneğin tekstil materyallerinin modifiye edilmesinde, plastiklerde, kâğıt imalatında, dış cephe boyalarında, zemin cilalarında,

zemin ve duvar kaplamalarında, otomobil, araç-gereç ve mobilya verniklemede, eczacılıkta kontrollü ilaç salınım sistemlerinde kullanılmaktadır.

Biyo-adeziv hidrojel olarak, hem mukozaya yapışan hem de viskozite artıran PAA jelleri, gözde merhemler gibi bulanıklık yapmadan rahat şekilde kullanılmaktadır. Göz için yapılan ilaçların, göz içine iyi bir şekilde absorplanabilmeleri ve tedavide aktif rol oynayan maddelerin daha uzun süreli göz tabakasında bulunabilmeleri için PAA ile deneyler yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada PAA gibi ayrı ayrı kullanılan polimerler mukoz tabakayla bağ kurarak göz yüzeyinde çözünür, kolloidal ve partikül halde bulunan materyali yakalayabilmektedir [259].

Vajinal lezyonların tedavisi amacıyla poliakrilik asit, metilselüloz, karboksi metilselüloz, hidroksi propil selüloz ve hidroksipropil metil selüloz kullanılarak asiklovir içeren bioadhesive tabletler hazırlanmıştır. Biyoadeziv polimer olarak poliakrilik asit ve hidroksipropil metil selüloz kullanılan tabletlerin laktik çözeltisi veya distile suda 6 saat boyunca şiştiği ve etkin madde salımının 8 saatten daha fazla olduğu görülmüştür. Poliakrilik asit, sodyum karboksimetil selüloz ve çinko sülfat içeren vajinal tabletler bu konuda önemli örneklerdir [260].

Yapılan bazı çalışmalarda poliakrilik asitin adjuvant, antitrombojenik madde ve ilaç salınımlarında taşıyıcı olarak kullanılmakta olduğu gösterilmiştir. Normalde toksik olan PAA zincirine, NIPAAm ünitelerinin katılmasıyla toksisitesi azaltılmaktadır. Mevcut çalışmalar, poliakrilik asit ve Cu^{2+} komplekslerinin sulu çözeltilerinin, protein karışımları ile radyasyon etkisine maruz bırakıldıklarında, belli dozlara kadar gerek polimer gerekse protein moleküllerinin *in vitro* koşullarda bozulmadan direnç gösterdiklerini bildirmiştir. Poliakrilik asit ve poliakrilik asit- Cu^{2+} örneklerinin kan hücrelerini radyasyondan koruma özelliği taşıdığı gösterilmiştir [261].

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3. MATERYAL

3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler

Çizelge 3.1 Ekipman ve sarf malzemeler

EKİPMAN VE SARF MALZEME	ÜRETİCİ FİRMA
Hava akımlı kabinler (Laminar flow)	Thermo Scientific Hera safe, Faster BH- EN 2006)
Karbondiyoksitli inkübatör	(New Brunswick scientific CO-150 37°C)
Soğutmalı inkübatör	FrioCell 111 25 °C
İnverted mikroskop	(Olympus CKX41)
Işık mikroskobu	(Olympus)
Santrifüj	(Eppendorf, Thermo Micromax RF)
Manyetik karıştırıcı	(Heidolph MR3000)

Çizelge 3.1 Ekipman ve sarf malzemeler (devamı)

EKİPMAN VE SARF MALZEME	ÜRETİCİ FİRMA
Isıtıcı karıştırıcı	(Heidolph instruments)
ELISA çoklu plak yıkama cihazı	(Thermo)
Dondurucular	(Beko(+4,-20°C), Arçelik(+4,-20°C), GFL(-40°C))
-195°C azot tankı ve azot taşıma tankları	(DMC air liquid systems)
Otoklav	(Kerman, HIRAYAMA)
UV-spektrofotometre	(Jasco V-530)
ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrometre)	(Thermo)
Saf su ve ultra saf su sistemleri	(GFL2104)
10, 50, 100, 1000 µl'lik mikropipetler	(Thermo, Pippetman)
100,300 µl 'lik çok kanallı pipetler	(Thermo)
1-10, 10-100, 100-1000 µl 'lik tek kullanımlık pipet uçları	(AxyGen)
Santrifüj tüpleri -1, 2, 15, 50 ml.	(Eppendorf , IsoLAB)
Buz makinesi	(Scotsman AF100)
Vortex	(LMS(laboratuvarı medical supplies) VTX-3000L)
Su banyoları	(GFL (gessellschaft für labortechnik) mbH, Kerman)

Çizelge 3.1 Ekipman ve sarf malzemeler (devamı)

EKİPMAN VE SARF MALZEME	ÜRETİCİ FİRMA
ELISA 96 kuyulu plakları	(TPP)
Hücre kültürü plakları	(TPP)
Pipet tabancası	(Thermo)
Serolojik pipetler -1,5,10 ml	(Blau Brand Germany)
Steril pastör pipeti -3ml	(LP ITALIANA SPA)
Whatman filtre kâğıdı	3M
Kriyotüpler	(TPP)
Makas, diseksiyon seti	(Müller - Germany)
Süzgeç	(BD Falcon)
50-1000ml'lik otoklavlanabilir cam şişeler	(ISOLAB, SCHOTT)
Hücre sayımı için thoma lamı	(Menzel superior)
1-2,5-5-10-50 cc'lik enjektör	(Ayset)
0,22 p,m ve 0, 45 pm'lik şırınga filtreleri	(MILLIPORE, TPP, Sartorius)
Lateks eldiven	(Broche)
Hassas terazi	(Precisa Gravimetrics AG)

3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

Çizelge 3.2 Kimyasal ve besiyerleri

MADDE ADI	ÜRETİCİ FİRMA
Sodyum hidroksit	Riedel De Haen
Hidroklorik asit	Merck
L-glutamin	Biological Industries
Penisilin streptomisin	Biological Industries
Gentamicin	Sigma
Fetal sığır serumu	Seromed
Tripsin EDTA	Biological Industries
DMSO	Sigma
Sodyum klorür	Atabay
Potasyum klorür	Carlo Erba
Disodyum hidrojen fosfat	Riedel De Haen
Potasyum dihidrojen fosfat	Riedel De Haen
HEPES	(AppliChem)
FBS-fetal bovine serum	(GIBCO Invitrogen)

Çizelge 3.2 Kimyasal ve besiyerleri (devamı)

MADDE ADI	ÜRETİCİ FİRMA
Potasyum klorür	Carlo Erba
Tripsin	Biochrom
EDTA	Merck
Thiazoly blue tetrazolium bromide(MTT)	Sigma
Formaldehyd (%37)	Applichem
2-propanol	Applichem
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck
Poliakrilik Asit (MA:100,000)	Aldrich
Poliakrilik Asit (MA:30,000)	Aldrich
Polioksidonyum	
Anti-fare IgG-AP konjugatı	(Millipore)
BSA bovine serum albümin	Sigma
Tripan mavisi	(Biological Industry)
Yağsız süt tozu	(AppliChem)
Amonyum sülfat, (NH ₄) ₂ SO ₄	Merck
Sodyum bikarbonat, NaHCO ₃	Merck

Çizelge 3.2 Kimyasal ve besiyerleri (devamı)

MADDE ADI	ÜRETİCİ FİRMA
Glisin	(Fluka)
Magnezyum klorür, $MgCl_2$	(Fluka)
Çinko Klorür, $ZnCl_2$	(Fluka)
Sodyum azid, NaN_3	(Sigma)
Potasyum hidroksit, KOH	(Merck)
Dipotasyum fosfat, K_2HPO_4	(Sigma)
Monopotasyum fosfat, KH_2PO_4	(Sigma)
Sodyum di hidrojen fosfat mono hidrat, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	(Merck)
Disodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4	(Merck)
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	(Sigma)
Sükroz	(MERCK)
N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED)	(Sigma)
Metanol	(Merck)
Formalin	(Sigma)
Paranitrofenil fosfat	(Sigma)
RPMI-1640 (Fenol redli ve fenol redsiz) besiyerleri	(GIBCO Invitrogen)

3.3 Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1 1x PBS Tampon Hazırlanması

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

3.3.2 1x Tripsin solusyonu

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

3.3.3 RPMI 1640 Medyumunun Hazırlanması

100 ml RPMI 1640 (L-glutamin içeren) içerisine 0,5 ml gentamisin (10 mg/ml'lik) eklenerek stok hazırlandı. Kültürde kullanılmak üzere buradan 45 ml alınıp 5 ml FCS eklenerek %10 FCS'li besiyeri hazırlandı.

3.3.4 Hücre Dondurma Medyumunun Hazırlanması

%80 FCS ve %20 DMSO'dan steril bir biçimde hazırlandı.

3.3.5 MTT Solüsyonunun Hazırlanması

MTT (Sigma M5655) 1xPBS içerisinde çözündürüldü. Kullanılacak MTT prosedürüne uygun olarak 0,6 mg/ml ve 10 mg/ml konsantrasyonlarda 5 ml hazırlandı. Önce hassas terazide 0,6 mg/ml için 3 mg, 10 mg/ml için 50 mg MTT tartılıp PBS ile 5 ml'ye tamamlandı. Vortekste çalkalanarak iyice çözündükten sonra steril edilmek üzere önce 0, 45µl daha sonra 0,22 µl'lik (CS) filtreden geçirilerek steril edildi. MTT ışığa duyarlı olduğu için, genel olarak bu işlemler karanlıkta yapıldı.

3.3.6 MTT Reaksiyon Sonlandırıcı Solüsyonun Hazırlanması

%50 izopropanol, %10 SDS bulunan bu çözeltiden 10 ml hazırlandı. 5 ml sıvı izopropanol, 5 ml distile su ve 1 mg toz SDS tartılıp vorteksle karıştırılarak hazırlandı.

3.3.7 Poliakrilik Asit (50 mg/ml, MA: 100,000 dalton) Çözeltisinin Hazırlanması

Deneylerde MA:100.000 olan ve ticari olarak satın alınan su içinde ağırlıkça %35 jel PAA kullanıldı. PAA %35'lik olduğu için 100 ml'de 35 g PAA bulunur. 50 mg'dan 5 ml hazırlamak için 2500 mg PAA gereklidir.

100 ml'de 35 g varsa

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

X=7,142 ml PAA

35 ml PBS eklendi 48–72 saat manyetik karıştırıcıda karışması beklendi. pH 7'ye ayarlandı. Son hacim 50 ml olacak şekilde PBS ile tamamlandı, 0,22 µm'lik millipore filtrelerden geçirilerek steril edildi ve +4°C'de saklandı.

3.3.8 Poliakrilik Asit (50 mg/ml, MA: 30,000) Çözeltisinin Hazırlanması

MA: 30,000 olan ve ticari olarak satın alınan %40 g/ml sıvı PAA kullanıldı. 100 ml'sinde 40 g PAA bulunacağı için

100 ml'de 40 g varsa

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

X= 6,25 ml PAA

PBS eklenip manyetik karıştırıcıda 48 saat karıştırıldıktan sonra pH 7'ye ayarlanıp son hacim 50 ml olacak şekilde PBS ile tamamlandı. 0,22 µm'lik millipore filtrelerden geçirilerek steril edildi ve +4°C'de saklandı

3.3.9 Polioksidonyum Çözeltisinin Hazırlanması

Polioksidonyum (POX) FDA onaylı katyonik bir polimer olup, 3 ve 6 mg toz şeklinde bulunur. POX çözeltileri 3 mg/ml, 6 mg/ml ve 12 mg /ml olmak üzere steril PBS ile hazırlanmıştır.

3.3.10 ELISA için Kaplama Çözeltisi (Coating buffer)

1,59 g Na₂CO₃ , 2,93 g NaHCO₃ , 0,2 g NaN₃ tartılarak 800 ml distile su içinde çözülür. pH'ı 9,6'ya ayarlandıktan sonra distile su ile 1lt'ye tamamlanır.

3.3.11 ELISA için Substrat Tamponu (pH:10,4)

0,02 g ZnCl₂, 0,04 g MgCl₂, 1,5 g Glisin tartılarak 150 ml distile suda çözülür. pH; 10,4'e ayarlanır 200 ml'ye tamamlanır (miktar ihtiyaca göre ve taze olarak hazırlanır).

3.3.12 ELISA için Substrat Çözeltisi

25 mg paranitrofenil fosfat(PNFF , pNPP) 25 ml substrat tamponunda çözündürülür. Kullanılacağı gün taze olarak hazırlanır.

3.3.13 ELISA için PBS/Tween20 Çözeltisi

PBS çözeltisine %0,05 (v/v) olacak şekilde Tween20 eklenir (ihtiyaca miktarına göre hazırlanır her kuyuya 100 µl).

3.3.14 ELISA için PBS/Tween20/milk Çözeltisi

PBS/Tween20 çözeltisine %2 olacak şekilde süt tozu eklenir (ihtiyaç miktarına göre hazırlanır her kuyuya 100 µl).

3.3.15 İnterlökin 2 (IL2) , İnterlökin 4 (IL4), İnterlökin 10 (IL10) ve γ-interferon (INF-γ) için Solüsyonlar

Yıkama Tamponu - 0.05% Tween® 20 PBS içinde çözülür, pH 7.2 - 7.4 (R&D Systems Catalog # WA126).

Bloklayıcı Tampon 1% BSA, 0.05% NaN₃ PBS içinde çözülür.

Reagent Diluent - 1% BSA PBS içinde çözülür, pH 7.2 - 7.4 (R&D Systems Catalog # DY995).

Substrat Solüsyonu - 1:1 (H₂O₂) ve Tetramethylbenzidine karıştırılır (R&D Systems Catalog # DY999).

Durdurma Solüsyonu - 2 N H₂SO₄ (R&D Systems Catalog # DY994).

3.4 METOD

3.4.1 Hücrelerin Kriyobanktan Çıkarılması

3.4.1.1 J774 Hücre Hattının Kriyobanktan Çıkarılması

Sıvı azot tankından çıkartılan hücreler 37°C su banyosunda çalkalanarak sıvı içersinde tutularak çözündürüldü. Çözünen hücre süspansiyonu tüpüne alınarak üzerine 5 ml %10 FCS'li RPMI 1640 eklenir ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra pellete az miktar besiyeri eklenerek yavaşça pipetaj yapıldı ve besiyeri konulmuş flasklara ekim yapıldı.

3.4.1.2 MCAN/TR / 2005 / EP126 *L. infantum* Suşlarının Kriyobanktan Çıkarılması

Sıvı azot tankından çıkartılan hücreler 37°C su banyosunda çalkalanarak sıvı içersinde tutularak çözündürüldü. Çözündürülen hücre süspansiyonunun, 7,5 ml RPMI 1640 (%10 FCS) besiyeri konulmuş flasklara ekimi yapıldı.

3.4.2 Hücre Hatlarının Kültürü

3.4.2.1 J774 Hücre Hattının Kültürü

Bu çalışmada kullanılan J774 serisi makrofajlar, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Ayhan Bilir tarafından temin edilmiştir. Hücreler, Yıldız Teknik Üniversitesi, Hücre Kültürü Laboratuvarı'na, devamlı kültürleri yapılmak üzere getirildi ve kültürün adaptasyonu sağlandı. Kültür labotuvara getirildikten sonra kendi besiyerinde tutuldu. 48 saat sonra ise kültür ortamında bulunan 5 ml besiyerinin 2,5 ml'si alınarak yerine yeni hazırladığımız besiyerinden (RPMI 1640 +%10 FCS) aynı miktarda eklendi. Kültürün durumu her gün ters mikroskop ile incelendi. Besiyeri, kültürün durumuna ve ortamın pH'sına uygun olarak değiştirildi. Yüzey kaplamasını tamamladığı tespit edilen makrofajların pasajı yapıldı. Pasajın yapılması için hücrelerin devamlı kültürü %10 FBS

içeren RPMI 1640 besiyerinde yapıldı. Kültür kabı olarak 25 cm²'lik steril kültür flaskları kullanıldı. Kültür %5 CO₂ içeren etüvde (Innova CO-150) 37°C de inkübasyona bırakıldı. Ters mikroskop ile günlük gelişimleri ve hareketlilikleri incelendi. Genel olarak pasajı haftada bir kez yapıldı. Yüzeyi kaplayan hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldı. Tripsinizasyon işlemi için önce flask içerisindeki besiyeri döküldü ve PBS ile 2 defa yıkandı. 2 ml Tripsin-EDTA eklenerek 37°C' de 5 dakika inkübe edildi. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra 7 ml RPMI 1640 (%10 FBS) içeren besiyeri içerisinde 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek dipteki hücre pelletinden makrofajların sayımı yapılarak ml' deki makrofaj sayısı hesaplandı. Flask içindeki 5 ml besiyerinde 5x10⁵ makrofaj olacak şekilde ekim yapıldı. Ayrıca pasaj sırasında elde edilen kültürün geri kalan kısmı kriyoprezervasyonu yapılarak kriyobankın oluşturulması için kullanıldı [263].

3.4.2.2 Tripan Mavisi (TM) ile J774 Hücre Canlılığının Tayin Edilmesi ve Hücre Sayımı

Tripan mavisi (Biol. Ind., 628255) molekül yapısı C₃₄H₂₃N₆O₁₄S₄Na₄ olan, canlı hücreleri boyamayıp ölü hücreleri boyayan böylece canlı hücre sayısını tespit etmekte kullanılan vital bir boyadır.

Hücrelerin pasaj ve deneylerde kullanılmadan önce sayımı, tripan mavisi ile thoma lamında yapıldı. Sayımın kolay yapılması için 50 kat seyreltme tercih edildi. Kültür flaskı içerisindeki besiyeri döküldü ve PBS ile 2 defa yıkandı. 2 ml Tripsin-EDTA eklenerek 37°C' de 5 dakika inkübe edildi. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra 7 ml RPMI 1640 (%10 FBS) içeren besiyeri içerisinde 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek dipteki hücre pelletinden makrofajların sayımı yapılarak ml' deki makrofaj sayısı hesaplandı. Hücre süspansiyonundan 2 µl alınarak 1,5 ml'lik steril eppendorf tüpü içine konuldu. Bu oranın sağlanması için üzerine 48 µl tripan mavisi solüsyonu ve 50 µl besiyeri eklenerek iyice pipetaj yapıldı. Thoma laminin her iki bölümüne de lam ile lamel arasına 10' ar µl hücre süspansiyonundan dikkatlice yayıldı. Ters mikroskopta tripan mavisi ile maviye boyanmış ve boyanmamış olan hücreler sayıldı ve kültürün % canlılık oranı hesaplandı. Hücre canlılığı %95 'in altında olan kültürler deneylerde kullanılmadı.

3.4.2.3 MCAN/TR / 2005 / EP126 *Leishmania* Promastigot Kültürünün Yapılması

VL etkeni olan *L.infantum* promastigotları (MCAN/TR / 2005 / EP126), Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Seray Özensoy ve Prof. Dr. Yusuf Özbel'den temin edildi. *Leishmania* parazitlerinin kültürü RPMI 1640 besiyerlerinde 27°C soğutmalı etüvde (Friocell, 111) gerçekleştirildi. Parazitlerin gelişimi ve morfolojik durumu ters (invert) mikroskopta (Olympus CKX41) günlük olarak incelendi. Kültürün pasajı haftada bir kez yapıldı. Pasaj öncesi kültürden örnek alındı, ortamın pH'ı parazitlerin morfolojileri, hareketlilikleri incelendi ve sayımları yapıldı. Flaska 7,5 ml besiyeri eklendi ve üzerine 3×10^5 parazit/ml olacak şekilde kültürden parazit ekimi yapıldı. *Leishmania* promastigotlarının kültürü bu şekilde devam ettirildi [264].

3.4.2.4 Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı

Kültür ortamındaki parazitler hareketli oldukları için thoma lamında sayılması zordur. Bu nedenle homojenliği sağlanmış kültürden ~100–200µl alındı ve 1:1 oranında %2'lik formalinle (sigma, HT501128) karıştırılarak 5–10 dakika bekletildi. Daha sonra Thoma lamında (Menzel superior) aşağıdaki formül kullanılarak sayım yapıldı:

Parazit sayısı = Ortalama hücre sayısı x Sulandırma katsayısı x Thoma lamı sabiti

Parazit sayısı: 1 ml'deki parazit sayısı

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

Sulandırma katsayısı: Sayım için yapılan sulandırma katsayısı

Thoma lamı sabiti: 10.000

3.4.3 Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

3.4.3.1 J774 Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması

Flask yüzeyini tek tabaka olarak kaplayan makrofaj kültürü üzerine Tripsin-EDTA solüsyonundan 2 ml. ilave edilerek hücrelerin ayrılması sağlandı. Derhal üzerine 7 ml

kültür medyumunu ilave edilerek hücreler pipetle steril santrifüj tüplerine aktarılıp 1000 rpm' de 5 dakika, +4°C' de santrifüj edildi. Santrifüj edilen tüplerin üst fazı döküldükten sonra dipte kalan pellet resüspanse edildi ve son hacim , %10 DMSO içeren dondurma solüsyonu ilave edilerek kriyo tüplere aktarıldı. Kriyo tüpler +4°C' de 1 saat, – 20°C' de 2 saat kaldıktan sonra, – 40°C derin dondurucuda 24 saat bekletildi, kriyobankı oluşturulmak üzere sıvı nitrojen tankına konuldu.

3.4.3.2 MCAN/TR / 2005 / EP126 Promastigotlarının Dondurulması ve Saklanması

Kültürün genel durumunun iyi olduğu invert mikroskop ile incelendikten sonra pasaj aşamasına gelen hücreler donduruldu. Süspansiyon halindeki kültürden 1,8 ml kriyo tüpe alınıp, 0,2 ml steril DMSO yavaşça eklendi. 1 saat 4°C'de, 24 saat -40°C'de bekletilip sıvı azot tankına konuldu.

3.4.4 Balb/c türü Farelerden Peritoneal Makrofaj Hücrelerinin İzolasyonu

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

2,5 mL'lik enjektör içerisine fenol kırmızısı içermeyen RPMI 1640 ile izole edilen besiyeri-hücre karışımı santrifüj tüpüne alındı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine 5 mL fenol kırmızısı içermeyen %10 FBS içeren RPMI 1640 eklendi ve süspanse edildi. Dipteki hücre pelletinden makrofajların sayımı yapılarak mililitredeki makrofaj sayısı hesaplandı. Sayımı yapılan makrofajlar daha sonra Nitrik Oksit ve toksisite çalışmaları için kullanıldı.

3.4.5 POX ve PAA'nın Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

Polimerlerin toksik etkileri *Leishmania* parazitleri için konak hücre olan makrofaj hücreleri ile *L.infantum* promastigotlarında yapıldı. Bu amaçla hem primer fare periton

makrofaj hücreleri hemde J774 fare monosit/makrofaj hücre hattı kullanıldı. Daha önce canlılığı ölçülen ve sayımı yapılan makrofaj hücreleri düztabanlı 96 kuyuculu plaklara ekildi. Yüzey kaplaması tamamlandıktan sonra ortama farklı konsantrasyonlarda POX ve PAA ilave edildi. Madde ile 48 saat inkübasyonun ardından 10 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Formazan kristalleri oluşumu invert mikroskopla tek tek incelendi. MTT durdurucu solüsyondan 100 µl eklendi 30 dakika oda sıcaklığında beklenip formazan kristallerinin çözündüğü kontrol edildi. Aynı işlemler polimer besiyeri etkileşimini kontrol etmek amacıyla, hücre bulunmayan sadece besiyeri ilave edilmiş 96 kuyucuklu plaklarda da yapıldı. Son olarak optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 570 nm dalga boyuna ayarlanmış ELIZA cihazına yerleştirildi ve cihazın optik ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı [263].

3.4.5.1 POX ve PAA'nın Fare Periton Makrofajları ve J774 Hücrelerindeki 48 Saatlik Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

Periton makrofajları ve J774 hücreleri ml'de 100,000 olacak şekilde fenol red'siz RPMI 1640 (%10 FCS) besiyeri içersinde deneyde kullanılacak miktarda hazırlandı. Hazırlanan hücre süspansiyonundan her kuyucuğa 100 µl (10,000 hücre/kuyucuk) eklendi. Kuyucuk sayısı polimerin her konsantrasyonu için 4 kuyucuk olacak şekilde hesaplandı. Hücrelerin dağılımının eşit olduğu mikroskop ile incelendikten sonra, 37°C'lik CO₂ etüvüne kaldırıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan 24 saat sonra hücrelerin yüzeyi kapladığı ve morfolojik olarak normal olduğu tespit edildikten sonra PAA konsantrasyonu 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml olacak şekilde eklendi. POX konsantrasyonu ise 5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml, 6000 µg/ml ve 12000 µg/ml olacak şekilde eklendi.

Polimerler eklendikten sonra %5 CO₂ içeren etüvde 37°C de 48 saat inkübasyona bırakıldı. MTT solüsyonunun hazırlanması bölümünde açıklandığı gibi hazırlanan 10 mg/ml MTT solüsyonundan her kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Formazan kristalleri oluşumu invert mikroskopla tek tek incelendi ve fotoğrafları çekildi. MTT durdurucu solüsyondan 100 µl eklendi, formazan kristallerinin tamamen

         mikroskopik olarak incelendi ve 30 dakika oda sıcaklığında beklenip ELIZA cihazı ile 570 nm dalga boyunda optik yoğunluk        [263].

3.4.5.2 POX ve PAA'nın MCAN/TR / 2005 / EP126 Promastigotlarına 48 Saatlik Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile  ncelenmesi

L.infantum promastigot kültürü yapılan parazitler yeterince    aldıkları ve durumlarının iyi olduğu invert mikroskopta incelendikten sonra, hücre sayımı yapıldı. Süspanse kültürden ml'de 300,000 parazit olacak şekilde mikropipet ile çekildi ve fenol red'siz RPMI 1640 (%10 FCS) besiyeri içersinde dil e edilerek deneyde kullanılacak miktarda hazırlandı. Hazırlanan hücre s spanسیونundan her kuyucuğa 100  l (30,000 hücre/kuyucuk) eklendi. Polimerin her konsantrasyonu için 4 kuyucuk olacak şekilde hesaplandı. Hücrelerin dağılımının eşit olduğu mikroskop ile incelendikten sonra, PAA 1, 2.5, 5, 10 ve 15 mg/ml olacak şekilde eklendi. POX ise 25  g/ml, 50  g/ml, 100  g/ml, 250  g/ml, 500  g/ml, 1000  g/ml, 2000  g/ml, 6000  g/ml ve 12000  g/ml olacak şekilde eklendi.

Kontrol grubu olarak hücresiz besiyeri üzerine aynı konsantrasyonlardaki polimerler aynı şekilde ilave edildi. Polimer eklendikten sonra hücreli ve hücresiz örnekler 27 C'de 48 saat inkübe edildi. MTT solüsyonunun hazırlanması bölümünde açıklandığı gibi hazırlanan 10 mg/ml MTT solüsyonundan her kuyucuğa 10  l eklendi ve 27 C'de 4 saat inkübe edildi. Formazan kristalleri oluşumu ve hareketlerinin aktifliği invert mikroskopta tek tek incelendi ve fotoğrafları çekildi. MTT durdurucu solüsyondan 100  l eklendi, formazan kristallerinin tamamen          mikroskopik olarak incelendi ve 30 dakika oda sıcaklığında beklenip ELIZA cihazı ile 570 nm dalga boyunda optik yoğunluk        [263].

3.4.6 Promastigotların PAA ve POX'a Maruz Tutulduktan Sonra Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) Ultrayapı Analizi

SEM analizleri Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Nanobiyoteknoloji Laboratuvarı sorumlusu Sayın Prof. Dr. Mustafa  ulha'nın desteğiyle yapılmıştır. Bu amaçla daha önce kültürü yapılan MCAN/TR / 2005 / EP126 promastigotları stasyonier faza geldiğinde enfektiflik çalışmaları sonucu belirlenen

polimer konsantrasyonlarına (5 mg PAA ve 12 mg POX) 1 saat maruz tutulduktan sonra 3 kez 3000 rpm'de 5 dakika PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama yapıldıktan sonra promastigotlar poly-L Lysine kaplı lamlara yayıldıktan sonra % 2,5 gluteraldehid için 30 dakika fiske edilmiştir. Distile suyla 3-5 defa yıkama yapıldıktan sonra dehidrasyon protokolüne geçilmiştir. Bu amaçla %25-100 arası etanol içeren ortamlarda Tabloda belirtildiği gibi bekletilmiştir. Dehidrasyon sonrası lamaların yüzeyi altın ile kaplandıktan sonra SEM cihazında analiz edilmiştir.

Çizelge 3.3 SEM analizi öncesi hücreleri hazırlama protokolü

	Kimyasal	Sıcaklık	Zaman	Tekrarlama
Fiksasyon	% 2.5 Gluteraldehit (distile suda)	0-4°C	30 dakika	1
Yıkama	Distile su	0-4°C	5-10 dakika	3-5
Dehidrasyon	% 25 etanol	0-4°C	5 dakika	1
	%50 etanol		5 dakika	1
	%70-75 etanol		5 dakika	1
	%90-95 etanol		5 dakika	1
	%100 etanol		5-10 dakika	2

3.4.7 Promastigotların PAA ve POX'a Maruz Tutulduktan Sonra Enfektiflik Özelliklerinin İncelenmesi

3.4.7.1 Makrofajların Enfekte Edilmesi

Makrofaj kültürünün enfekte edilmesi amacıyla *L.infantum* (MCAN/TR / 2005 / EP126) kullanıldı. Makrofaj kültürünü promastigot ile enfekte etmek için 24 kuyucuklu kültür plağı (TPP) kullanıldı. Steril 12 mm çapındaki yuvarlak steril lameller tek tek kuyucuklara yerleştirildi. Thoma lamında makrofaj hücrelerinin sayımı yapıldı. Lamel yerleştirilen kuyucuklara 5×10^4 hücre olacak şekilde RPMI 1640 (%10 FCS) içeren hücre süspansiyonundan eklendi. Makrofajların lamellerin üzerine adhezyonu için 24 saat 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyonu sağlandı. Kültürü yapılan MCAN/TR / 2005 / EP126 promastigotları stasyoner faza geldiğinde PAA (molekül ağırlığı 30,000 ve 100,000) konsantrasyonu 1, 2.5, 5 ve 10 mg/ml olacak şekilde 1, 2, 3 ve 24 saat

polimere maruz tutulduktan sonra 3 kez 3000 rpm'de 5 dakika PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama yapıldıktan sonra 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılan 24 kuyucuklu kültür plağındaki makrofajlar üzerine hücre başına 10 promastigot düşecek şekilde (5×10^5 parazit) promastigotların ekimi yapılmıştır. Aynı şekilde stasyoner fazdaki promastigotlar POX konsantrasyonu 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 3000 µg/ml, 6000 µg/ml ve 12000 µg/ml olacak şekilde 1, 2, 3 ve 24 saat polimere maruz tutulduktan sonra 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılan 24 kuyucuklu kültür plağındaki makrofajlar üzerine hücre başına 10 promastigot düşecek şekilde (5×10^5 parazit) promastigotların ekimi yapılmıştır. Kontrol grupları ise herhangi bir polimere maruz tutulmadan direk makrofaj hücreleri üzerine ekimi yapılmıştır [263].

Makrofajlara verilen tüm promastigotlar %5 CO₂ içeren etüvde 37°C'de 4 saat süreyle inkübe edildikten sonra fagosit edilmeyen ekstrasellüler promastigotları uzaklaştırmak için 1 ml RPMI 1640 ile kuyular 3'er kez yıkandı ve yeni hazırlanmış RPMI 1640 (%10 FCS) besiyerinden 1 ml ilave edildi. Deney ve kontrol grubunda bulunan lameller 24. ve 48. saatlerde Giemsa boyanarak ışık mikroskopunda (100x) enfektiflik hesaplandı. 24. ve 48. saatlerde Giemsa boyama yapılmadan önce her konsantrasyon ve gruptan alınan besiyeri örnekleri Nitrik Oksit ölçümü için ependorf tüplerinde -20 °C'de saklandı.

3.4.7.2 Enfekte Olmuş Makrofajların Giemsa ile Boyanması

Enfekte makrofajlar 24 ve 48 saat 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldıktan sonra, 24 kuyucuklu kültür plağındaki besiyeri alındıktan sonra. Her kuyu 500 µl PBS ile bir kez yıkandı. PBS boşaltıldıktan sonra her kuyu 500 µl PBS-metanol (1:1,5) solusyonu ile yıkandı. PBS-metanol solusyonu boşaltıldıktan sonra her kuyuya 250 µl metanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika beklendi. Metanol döküldükten sonra tekrar metanol ile yıkama yapılır. Sonra lamel yüzeyini kaplayacak miktarda (200 µl) Giemsa eklendi. 24'lük kültür plağı hafifçe sallanarak boyanın tüm yüzeye yayılması sağlandı. 3 dakika oda sıcaklığında duran boya döküldü. Boya döküldükten sonra 24'lük kültür plağı çeşme suyu altında yıkandı. Daha önceden 24'lük kültür plağı içine koyduğumuz 12 mm'lik lameller çıkarılarak, Giemsa ile boyanmış olan enfekte

makrofajlar ışık mikroskopunda x100 büyütmede immersiyon yağı (Applichem, 3w07849) ile gözlendi [263].

3.4.7.3 Enfektifliğin Hesaplanması

Giemsa boyama ile elde edilen simirlerde toplam 200 makrofaj sayılarak, bunların içinden kaç tanesinin enfekte olduğu mikroskopik olarak belirlendi (yüzde enfektiflik). Daha sonra makrofaj başına düşen ortalama amastigot sayısı hesaplandı. Son olarak enfeksiyon indeksini (infection index) belirlemek için yüzde enfektiflik sayısı ile makrofaj başına düşen ortalama amastigot sayısı çarpılarak enfeksiyon indeksi hesaplandı. Enfeksiyon indeksi, amastigot-makrofaj kültürlerinde, parazitlerin virulanslığını belirlemek için oldukça önemli bir değerdir [263].

3.4.8 PAA ve POX'a Maruz Tutulan Promastigotların Makrofaj Kültüründe Nitrik Oksit Üretimine Etkisi

Promastigotlar PAA ve POX'a maruz tutulduktan sonra makrofajlarda 24. ve 48. saatlerdeki enfektiflik ölçümünden önce süpernatantlar Nitrik Oksit ölçümü için toplanmıştı. Genel olarak hücre kültürlerindeki besiyerinde Nitrik Oksit ölçümü Griess Reaksiyonu ile spektrofotometrik olarak yapılmaktadır. Griess Reaksiyonu iki adımda gerçekleşir ilk adımda Nitrik, Sulfanilamid ile reaksiyona girerek diazonyum iyonuna dönüşür. Oluşan bu iyonlarda N-(1-Naphthyl)Ethylenediamine ile bağlanarak kromoforik azo türevlerine dönüşür. Son olarakta 540/550 nm de okuma yapılır [263].

3.4.8.1 Griess Reaktifi'nin Hazırlanması:

- 20 ml distile suya 2,5 ml fosforik asit eklenir
- Bu çözeltiye sırasıyla 0,1 g N-(1-Naphthyl)Ethylenediamine ve 1 g Sulfanilamide eklenerek karıştırıcıda çözünmesi sağlanır.
- Son olarak çözelti distile su ile 100 ml ye tamamlanır.

3.4.8.2 Standartların Hazırlanması:

- 10 ml distile su içinde 0, 345 g Sodyum Nitriki 500 μ M olacak şekilde çözülür.(stok)
- Daha sonra aşağıdaki tabloya göre standart ayarlanır.
- Distile su yerine besiyeri kullanılır.

Standart	Nitrat Konsantrasyonu (μ M)	Besiyeri Hacmi (ml)	Transfer Hacmi (ml)	Transfer Kaynağı
S7	100.0	4.0	1.0	Stok
S6	50.0	1.0	1.0	S7
S3	25.0	1.0	1.0	S6
S4	10.0	1.5	1.0	S5
S3	5.0	1.0	1.0	S4
S2	1.0	4.0	1.0	S3
S1	0.5	1.0	1.0	S2
S0	0	1.0	-	-

Standartlar hazırlandıktan sonra, standartlardan ve NO ölçümü yapılacak kültür ortamından 50 μ l alınarak 96'lık plate eklenir. Bu örneklerin üzerine 50 μ l Griess reaktifi eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. inkübasyon yapılır.

Çizelge 3.4 Örneklerin Plate Üzerindeki Yerleşimi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S0	S0	U1	U1	U9	U9	U17	U17	U25	U25	U33	U33
B	S1	S1	U2	U2	U10	U10	U18	U18	U26	U26	U34	U34
C	S2	S2	U3	U3	U11	U11	U19	U19	U27	U27	U35	U35
D	S3	S3	U4	U4	U12	U12	U20	U20	U28	U28	U36	U36
E	S4	S4	U5	U5	U13	U13	U21	U21	U29	U29	U37	U37
F	S5	S5	U6	U6	U14	U14	U22	U22	U30	U30	U38	U38
G	S6	S6	U7	U7	U15	U15	U23	U23	U31	U31	U39	U39
H	S7	S7	U8	U8	U16	U16	U24	U24	U32	U32	U40	U40

Son olarak 540 nm’de absorbans alınır. Standartlar üzerinden nmol/ml biriminden NO miktarı belirlenir.

3.4.9 PAA ve POX’un Antileishmanial Etkisinin Amastigot-Makrofaj Kültüründe İncelenmesi

Daha önce yapılan çalışmalarda polimerlerin makrofajlar ve *L.infantum* üzerindeki toksik etkisi ile polimerlere maruz kalan parazitlerin enfektiflik özellikleri incelenmişti. Çalışmanın bu bölümünde ise özellikle ilaç ve dirençlilik çalışmalarında antileishmanial etkinin en önemli kriterlerinden biri olan amastigot-makrofaj kültürlerinde polimerlerin etkisinin incelenmesi olacaktır. Bu amaçla ilk aşamada amastigot-makrofaj kültürü elde edildi. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda PAA ve POX verilerek pozitif kontrol olarak *Leishmania* tedavisinde önemli bir ilaç olan Glucantim’e göre etkisi incelendi. Polimerlerin amastigot-makrofaj kültüründe antileishmanial etkisini belirlemek amacıyla 3 farklı yöntem kullanıldı. 3 yöntemde de ilk adımda amastigot-makrofaj kültürünün elde edilmesi gerekmektedir. Bu yöntemlerden biri olan Giemsa boyama ile enfektifliğin belirlenmesi daha önce açıklanmıştır.

3.4.9.1 Amastigot-Makrofaj Kültürünün Elde edilmesi

Makrofaj kültürünü promastigot ile enfekte etmek için 24 kuyucuklu kültür plağı kullanıldı. Steril 12 mm çapındaki yuvarlak steril lameller tek tek kuyucuklara yerleştirildi. Thoma lamında makrofaj hücrelerinin sayımı yapıldı. Lamel yerleştirilen kuyucuklara 5×10^4 hücre olacak şekilde RPMI 1640 (%10 FCS) içeren hücre süspansiyonundan eklendi. Makrofajların lamellerin üzerine adhezyonu için 24 saat 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyonu sağlandı. 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılan 24 kuyucuklu kültür plağındaki makrofajlar üzerine hücre başına 10 promastigot düşecek şekilde (5×10^5 parazit) Stasyonier fazdaki promastigotların ekimi yapılmıştır. Makrofajlara verilen tüm promastigotlar %5 CO₂ içeren etüvde 37°C'de 4 saat süreyle inkübe edildikten sonra fagosite edilmeyen ekstrasellüler promastigotları uzaklaştırmak için 1 ml RPMI 1640 ile kuyular 3'er kez yıkandı ve yeni hazırlanmış RPMI 1640 (%10 FCS) besiyerinden 1 ml ilave edildi. Böylece antileishmanial çalışmalar için amastigot-makrofaj kültürü elde edilmiş oldu.

3.4.9.2 PAA ve POX'un Antileishmanial Etkisinin Amastigot-Makrofaj Kültüründe MTT Yöntemiyle Belirlenmesi

MTT yöntemiyle daha önce makrofaj ve promastigotlardaki toksisite çalışmaları yapılmıştır. Amastigot kültüründe ise parazitler hücre içinde olduğu için makrofajların lize uğratarak hücre dışına salınması gerekmektedir. Bu yüzden protokol olarak normal MTT yöntemine göre farklılıklar içermektedir. Bu amaçla daha önce elde ettiğimiz amastigot-makrofaj kültürlerine 150, 300, 600 ve 1000 µg/ml olacak şekilde Glucantime, 25, 50, 250, 500 µg/ml olacak şekilde PAA son olarak 150, 300, 750, 1500, 3000, 6000 v3 12000 µg/ml olacak şekilde POX eklenmiştir. PAA, POX ve Glucantime eklendikten 24 ve 48 saat sonra amastigot canlılığını ölçmek amacıyla MTT yapılmıştır. Öncelikle 24. ve 48. saatlerde enfekte makrofajlar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra 200 µl serumsuz RPMI-1640 besiyerinde hazırlanmış %0,01 sodyum dodesil sülfat (SDS) ile lize uğrattılır. Lizis işlemi yaklaşık 10-15 dakika sürer ve inverted mikroskoptan lizis kontrolü yapılır. Hücre içi amastigotlar serbest kaldıktan sonra üzerlerine 800 µl serumsuz RPMI-1640 eklenir ve 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılır. Bu işlemden sonra amastigot pelleti 100 µl fenolred'siz

besiyeri ile süspanse edilip 96'lık plate'e eklenir [265]. MTT solüsyonunun hazırlanması bölümünde açıklandığı gibi hazırlanan 10 mg/ml MTT solüsyonundan her kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Formazan kristalleri oluşumu ve hareketlerinin aktifliği invert mikroskopla tek tek incelendi ve fotoğrafları çekildi. MTT durdurucu solüsyondan 100 µl eklendi, formazan kristallerinin tamamen çözöldüğü mikroskopik olarak incelendi ve 30 dakika oda sıcaklığında beklenip ELIZA cihazı ile 570 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçöldü. Ayrıca lizis öncesi enfekte makrofajlar PBS ile yıkanmadan önce besiyeri Nitrik Oksit ölçümü için ayrılmıştır.

3.4.9.3 PAA ve POX'un Antileishmanial Etkisinin Amastigot-Promastigot Dönüşümüne Göre Belirlenmesi

Bu amaçla daha önce elde ettiğimiz amastigot-makrofaj kültürlerine 150, 300, 600 ve 1000 µg/ml olacak şekilde Glucantime, 25, 50, 250, 500 µg/ml olacak şekilde PAA son olarak 150, 300, 750, 1500, 3000, 6000 ve 12000 µg/ml olacak şekilde POX eklenmiştir. PAA, POX ve Glucantime eklendikten 24 ve 48 saat sonra kültür ortamı 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra 1 ml RPMI-1640 + %5 FBS içeren besiyeri eklenerek 24'lük plate'ler promastigotların kültür sıcaklığı olan 25 °C'lik soğutmalı etüve alınmıştır. Böylece bu ortamda 48 saat içinde canlı kalan amastigotlar hareketli promastigot formuna dönüştükten sonra MTT yöntemiyle canlılık ölçölmüştür. Bunun için önce besiyeri steril farklı bir ortama alınarak serbest haldeki promastigotlar ayrıldı. Daha sonra daha önce belirtilen lizis protokol uygulanarak makrofaj içinde promastigota dönüşen fakat makrofajdan çıkamayan hücrelerin izolasyonu yapıldı. Birleştirilen kültür yıkama yapıldıktan sonra MTT protokolü uygulanarak canlılık testi tamamlandı. Ayrıca kontrol, Glucantim, PAA ve POX 'un tüm konsantrasyonlarında amastigottan hareketli promastigotlara dönüşen kültürlerin video kaydı yapıldı.

3.5 *IN VIVO* HAYVAN ÇALIŞMALARI

3.5.1 Çeşitli Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması

Çalışmalarda PAA ve POX'un *in vitro* enfektiflik sonuçlarına dayanarak, PAA ve POX'tan iki tip aşı adayı hazırlanmıştır.

Birinci tip aşı adayı: Stasyoner fazdaki *L.infantum* promastigotları sayılarak, 1×10^6 olacak şekilde 5 mg/ml PAA içeren RPMI-1640 besiyerinde bir saat tutulduktan sonra 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Son hacim 100 µl olacak şekilde ayarlanmıştır.

İkinci tip aşı adayı: Stasyoner fazdaki *L.infantum* promastigotları sayılarak, 1×10^6 olacak şekilde 12 mg/ml POX içeren RPMI-1640 besiyerinde bir saat tutulduktan sonra 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Son hacim 100 µl olacak şekilde ayarlanmıştır.

Kontrol Grubu: Bu gruptaki farelere ilk aşamada sadece 100 µl PBS verilmiştir.

3.5.2 PAA ve POX'a Maruz Kalmış Promastigotların *Balb/C* Farelere Enjekte Edilmesi

Çalışmanın etik kurul onayı ile birlikte çalışmada kullanılacak fareler Bezmialem Vakıf Üniversitesi Araştırma Merkezi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilmiş ve yapılmıştır. Deneylerde 20-25 gram ağırlında 6-8 haftalık dişi *Balb/C* türü fareler kullanılmıştır. Enjekte edilecek aşı formülasyonları daha önce anlatıldığı gibi 0,1 mL hacimde PBS içerisinde hazırlandı. Hazırlanan aşı formülasyonları eter anestezisi altındaki farelerin periton bölgesine, intraperitonel olarak enjekte edildi. Deney gruplarına göre ayrılan kafesler farelerin uygun yaşam koşulları sağlanan odalarda bırakıldı. Enjeksiyonu takiben, *Leishmania*'ya karşı antikor oluşumları incelenmek üzere her hafta farelerden serum örnekleri alındı.

3.5.3 *BALB/C* Farelerden Serum Örneklerinin Alınması

Kan örnekleri, eter anestezisi altındaki farelerin kuyruk bölgesinden alındı. Alkolle silinen kuyruğun uç kısmından yaklaşık 1 cm uzunlukta kesim yapıldı. Kuyruk kısmından çıkan yaklaşık 30–50 µl hacmindeki kan, otomatik pipet yardımıyla alınarak

antikoagölan olarak EDTA içeren ependorf tüpler içerisine konuldu. Tüm hayvanlardan kan alımını takiben, tüpler 5000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar başka ependorf tüplerine alınarak ELISA yöntemi ile analiz edilinceye kadar -20°C’de saklandı.

Farelerden kan alma işlemi 10 hafta boyunca devam ettirildi. İkinci haftadan itibaren kuyrukta kan alınan kuyruk bölgesinin yaklaşık yarım cm altından tekrar kesim yapılarak kan örnekleri alınmaya devam edildi.

3.5.4 ELISA Yöntemi ile Serumdaki İmmünoglobulin Miktarlarının Tayini

PAA ve POX’a maruz kalmış stasyoner fazdaki *Leishmania* promastigotlarına karşı fare serumunda oluşan antikorların ELISA yöntemiyle tayin edilmesi için parazitin çözünür antijenleri kullanıldı.

3.5.4.1 Antijen Hazırlama

Kültürü yapılan *L.infantum* promastigotları önceden belirlenen protokole göre kültürün 4. ve 5. günlerinde stasyoner faza gelmektedir. Bu nedenle stasyoner faza gelen parazitler sayım yapıldıktan sonra 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilir ve steril PBS’de yıkanır ve distile su ile 1:40 oranında süspanse edilir. Çözünür antijen hazırlamak amacıyla dondurma-çözdürme yöntemi kullanıldı. Dondurma işlemi sıvı azot içinde hızlı bir şekilde dondurmak için bekleterek, çözme işlemi ise 37°C’lik su banyosunda yapıldı. Dondurma-çözdürme işlemi en az 3 kez tekrarlandıktan sonra çözünmeyen kısımların ayrılması için 10.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilir ve süpernatant antijen olarak kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanır.

3.5.4.2 ELISA Plate’lerin Tam Parazit Antijeni ile Kaplanması

Daha önce hazırlanan çözünür antijenlerdeki protein miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi. Seyreltilen protein çözeltisinin 280nm (**A280**) ve 260nm (**A260**) dalga boylarındaki absorbanları ölçüldü. Protein miktarının belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanıldı:

Protein derişimi (mg/ml): $(1.5 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260}) \times \text{sulandırım katsayısı}$

Sulandırma katsayısı: Ölçüm için yapılan sulandırma katsayısı

A₂₈₀: Protein çözeltisinin 280 nm dalga boyunda gösterdiği absorbans değeri

A₂₆₀: Protein çözeltisinin 260 nm dalga boyunda gösterdiği absorbans değeri

Protein miktarı spektrofotometrik olarak belirlendikten sonra 0,05 M karbonat kaplama solüsyonu (coating buffer) (pH: 9,6) içinde antijen dilüsyonları hazırlanır. Her kuyuya 1µg/100 µl olacak şekilde antijen eklenir ve kaplamanın olması için bir gece +4 °C’de inkübasyona bırakılır. Bir gece inkübasyondan sonra plate’ler PBS /Tween20 ile 3 defa yıkanır. Kaplama solusyonu içine %2 olacak şekilde eklenen süt tozu eklenerek hazırlanan solusyondan plate’lere 100 µl eklenerek 37°C’de 1 saat inkübe edilir. Süt totunun eklenme amacı plate’lerde antijen kaplanmayan boş yerlerin doldurulmasıdır. Süt tozu ile bir saat inkübasyondan sonra plate’ler 3 kez PBS/Tween 20 ile yıkanır.

3.5.4.3 Plate’lere Fare Serum Örneklerinin Eklenmesi

10 hafta boyunca farelerden alınan serum örnekleri 1:100 oranında seyreltilir. Seyreltme çözeltisi olarak daha önce hazırlanan %2lik süt tozu ile PBS/Tween20 kullanıldı. Negatif-Pozitif kontrol grupları ve deney gruplarından seyreltilen serumlar kuyulara 100 µl olacak şekilde eklendi. 37°C’de bir saat inkübasyondan sonra plate’ler 3 kez PBS/Tween 20 ile yıkanır. Bu aşamada *Leishmania* çözünür antijenlerine karşı oluşan antikorların, daha önceden kaplanan antijenlere bağlanması gerçekleştirildi.

3.5.4.4 Enzim Bağlı Anti-Mouse IgG (Fc) Antikorlarının Eklenmesi

Alkelin fosfataz (AP) konjuge IgG monoklonal antikorları 1/2000 oranında PBS/Tween20 ile sulandırılarak her kuyuya 100µl eklenir. Bir saat 37°C’de oda sıcaklığında inkübe edilir. 37°C’de bir saat inkübasyondan sonra plate’ler 5 kez PBS/Tween 20 ile yıkanır [266].

3.5.4.5 Substrat Eklenmesi ve ELISA Cihazında Okuma

Plakların inkübasyonu ve yıkamasını takiben, substrat çözeltisinden (Paranitrofenil) 100 µL eklendi ve 45 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi. ELISA

ölçümlerinin sonuçları, ELISA okuyucu cihazında 405 nm dalga boyunda okuma yapılarak tespit edildi.

3.5.5 Deney Hayvanlarının PAA ve POX'a Maruz Kalmış Parazitlerde İmmünizasyonundan Sonra *Leishmania* Parazitleriyle Enfekte Edilmesi

3.5.5.1 İmmünize Edilen Farelerin *L.infantum* Parazitleri ile Efekte Edilmesi

PAA ve POX'a maruz kalmış fareler 4 hafta boyunca immünize edildi. Polimerlere maruz kalmış parazitlerin aşı olarak koruyucu etkisinin olup olmadığını anlamak için, kontrol ve immünize fareler 1×10^7 *L.infantum* promastigotları ile farelerin karın bölgesinde deri altına enjeksiyon yapılarak, enfekte edildi. Daha sonra farklı parazitolojik ve immünolojik çalışmalar için enfekte edilen fareler incelendi.

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

Deneylerde polimerlere maruz kalmış canlı parazit kullanıldığından, immünizasyon ve enfeksiyon süresince fare kanında parazit olup olmadığını belirlemek amacıyla oldukça duyarlı bir yöntem olan Mikrokültür Yöntemi ve Giemsa Boyama ile incelenmiştir. Tüm fare gruplarından alınan kan örneklerinden 10 µl alınarak alkolle (Riedel, 32221) temizlenmiş lam (Metzel gloser) üzerine yayma yapıldı. Lam üzerindeki örnek kurutuldu ve metanol (Merck,106009) ile 5 dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Simir kurutuldu ve 1:10 oranında sulandırılmış Giemsa boyasında (Merck, 109204) 25 dakika oda sıcaklığında boyama işlemi gerçekleştirildi. Giemsa ile boyanmış örnekler çeşme suyu ile yıkandı, kurutuldu. Son olarak ışık mikroskopunda (100x) immersiye yağ kullanılarak incelendi. Giemsa boyama ile parazit varlığının değerlendirilmesi Çizelge 3.3'e göre yapıldı.

Mikrokültür yönteminde ise antikoagülan (EDTA) madde bulunan tüplere alınan 100 µl kan örneği kapiller bir tüpe aktararak 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Serum bulunan üst fazı ile eritrositlerin bulunan alt faz arasında kalan buffy coat tabakası 10 µL'lik mikropipet yardımı ile alındı. %15 FBS içeren RPMI 1640 besiyerine alınan örnek, mikrokapiler tüplere aktarıldı. Kapiler tüplerin kenarları mum yardımı ile kapatılarak 27

°C'ye ayarlanmış soğutmalı etüve kaldırıldı. 24 saatlik inkübasyonu takiben mikroskopiler tüpler inverted mikroskopta incelendi.

Çizelge 3.5 Giemsa ve Mikrokültür yöntemi ile fare periferik kanında parazitlerin değerlendirilmesi

<i>Leishmania</i> amastigotlarının smearde derecelendirilmesi		<i>Leishmania</i> promastigotlarının Mikrokültürde derecelendirilmesi	
Derece	Ortalama parazit yoğunluğu	Derece	Ortalama parazit yoğunluğu
6 +	>100 parazit/ bir alanda	6 +	>100 parazit/ tüm alanda
5 +	10-100 parazit/ bir alanda	5 +	51-100 parazit/ tüm alanda
4 +	1-10 parazit/ bir alanda	4 +	26-50 parazit/ tüm alanda
3 +	1- 10 parazit/ bir alanda	3 +	11-25 parazit/ tüm alanda
2 +	1- 10 parazit/ 100 alanda	2 +	6-10 parazit/ tüm alanda
1 +	1- 10 parazit/ 1.000 alanda	1 +	1-5 parazit/ tüm alanda
0	0 parazit/ 1.000 alanda	0	0 parazit/ tüm alanda

3.5.7 Farelerin Sakrifiye Edilmesi ve Organlarının Ayrılması

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

Daha sonra karaciğer ve dalak izolasyonu için periton kesildi. Organların hızla ve travmatize etmeksizin steril olarak tartımları yapıldı. Dalaktan IL-2,IL-4, IL-10 ve INF-γ

miktarını belirlemek amacıyla lenfosit izolasyonu yapıldı. İzole edilen lenfositler antijenle uyarılarak kültür ortamına salgılanan sitokinleri belirlemek amacıyla süpernatantlar toplandı ve -20 °C'de saklandı. Ayrıca dalak ve karaciğerden ise Leishman-Donovan Unit'in (LDU) hesaplanması için smear hazırlandı.

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

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

Şırınga ile periton içinden izole edilen makrofajlar 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve dipteki hücre pelletinden makrofajların sayımı yapılarak mililitredeki makrofaj sayısı hesaplandı.

Periton makrofajlarını *Leishmania donovani* promastigotları ile enfekte etmek için 24 kuyucuklu kültür plağı (TPP) kullanıldı. Steril 12 mm çapındaki yuvarlak lameller tek tek kuyulara yerleştirildi. Daha önce Thoma lamında sayımı yapılan hücreler lamel yerleştirilen kuyulara 5x10⁴ hücre olacak şekilde RPMI 1640 (%10 FBS) içeren hücre süspansiyonundan eklendi. Makrofajların lamellerin üzerine tutunması için 24 saat 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyonu sağlandı.

24 saat 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılan 24 kuyucuklu kültür plağındaki makrofajlar üzerine hücre başına 10 promastigot düşecek şekilde (5x10⁵ parazit) inoküle edildi. Hazırladığımız plate %5 CO₂ içeren etüvde 37°C'de 4 saat süreyle inkübe edilerek makrofajların enfekte olması sağlandı. Daha sonra ekstrasellüler promastigotları uzaklaştırmak için 1 mL RPMI 1640 ile kuyular üçer kez yıkandı ve yeni hazırlanmış RPMI 1640 (%10 FBS) besiyerinden 1 ml ilave edildi. Deney ve kontrol grubunda bulunan lameller 48. saatte Giemsa boyanarak ışık mikroskopunda (100x) enfeksiyon indeksi hesaplandı.

3.5.8.1 Enfekte Olmuş Periton Makrofajların Giemsa ile Boyanması

Enfekte makrofajlar 48 saat 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldıktan sonra 24 kuyucuklu kültür plağındaki besiyeri döküldü. Her kuyu 500 µL PBS ile bir kez yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra her kuyu 500 µL PBS-metanol (1:1,5) solusyonu ile yıkandı. PBS-metanol solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya 250 µL metanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika beklendi. Metanol uzaklaştırıldıktan sonra tekrar metanol ile yıkama yapıldı. Daha sonra hücre yüzeyini örtecek miktarda (200 µL) Giemsa eklendi. 3 dakika oda sıcaklığında duran boya uzaklaştırıldı. Boya uzaklaştırıldıktan sonra 24'lük kültür plağı çeşme suyu altında yıkandı. Daha önceden 24'lük kültür plağı içine eklediğimiz 12 mm'lik lameller çıkarılarak, Giemsa ile boyanmış olan enfekte makrofajlar ışık mikroskopunda x100 büyütmede immersiyon yağı (Applichem, 3w07849) ile gözlendi [151].

3.5.8.2 Enfektifliğin Hesaplanması

Giemsa boyama ile elde edilen simirlerde toplam 200 makrofaj içinden kaç tanesinin enfekte olduğu belirlendi (yüzde enfektiflik). Daha sonra toplam amastigot sayısı belirlendi. Böylece ortalama bir makrofaja düşen amastigot sayısı hesaplandı. Son olarak enfeksiyon indeksini (infection index) belirlemek için yüzde enfektiflik sayısı ile ortalama amastigot sayısı çarpıldı. Sonuçlar kontrole göre enfeksiyon indeksindeki (Ei) düşüş yüzdesine göre değerlendirildi [151].

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

3.5.9 Karaciğer ve Dalaktan Simir Hazırlanması ve Enfeksiyonun Değerlendirilmesi

Sakrifiye edilen her hayvanın dalak ve karaciğeri alınıp tartıldı. Dalak ve karaciğerin kesilen parçaları RPMI 1640 (pH: 7,2) içinde yıkandı ve kesik kısımları lam üzerine sürülerek simir hazırlandı. Simir örnekleri metanolde fikse edilip Giemsa ile boyandı. Simirler immersiyon yağı ile mikroskopik (100x) olarak incelendi. Her lam için toplam

200 hücre incelendi ve hücrelerin içindeki parazitler sayıldı. Parazit yükü Leishman-Donovan Units (LDU) kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı [151]:

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

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

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

$$\%LDU \text{ Düşüşü} = 100 - \left(\frac{\text{İmmunize Grubunun LDU Değeri}}{\text{Kontrol Grubunun LDU Değeri}} \times 100 \right)$$

3.5.10 Gecikmiş Tip Aşırıduyarlılık (DTH) Testi

Enfeksiyon sonrası farelerin kesiminden iki gün önce, tüm farelerin sağ ayaklarına 50 µl PBS sol ayaklarına ise 50 µl'de 40 µg olacak şekilde Leishmanin (parazit antijeni) deri altına enjekte edildi. *Leishmania* promastigot pelleti, 5 ml %0,5 fenol içinde 10 dakika bekletildi. Fenolü uzaklaştırmak için PBS ile 3 kez yıkama yapıldı. Parazitler dondurma çözündürme yöntemiyle lizise uğratıldıktan sonra spektrofotometrik olarak protein miktarı belirlendi. Farelere antijen enjeksiyonu yapıldıktan 48 saat sonra, arka sağ ve sol ayaklarının kalınlığı elektronik kumpas ile ölçüldü. DTH yanıtı aşağıdaki formüle göre değerlendirildi [151];

$$DTH = \frac{(\text{Sol Ayak Kalınlığı} - \text{Sağ Ayak Kalınlığı})}{\text{Sağ Ayak Kalınlığı}} \times 100$$

3.5.11 Aşı Tarafından İndüklenen Sitokin Üretiminin Belirlenmesi

Tüm fare gruplarının dalaklarından izole edilen lenfositler Thoma lamında sayıldıktan sonra 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde 24 kuyulu plate'ye RPMI-1640 %5 FBS içeren ortama ekildi. Kültür ortamında her fare için antijenle uyarılmış ve uyarılmamış olmak üzere iki grup oluşturuldu. Uyarılmış olan gruplara 50 µg antijen verilirken diğer gruplara sade PBS verildi. Daha sonra %5 CO₂ içeren etüvde 37°C'de 72 saat süreyle inkübe edildikten sonra süpernatant alınıp sitokin ölçümü için -20°C'ye kaldırıldı [151].

3.5.11.1 İnterlökin 2 (IL-2) Üretiminin ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi

Kaplama Antikorumun (Capture Antibody) Hazırlanması: 180 µg/mL sıçan anti-mouse IL-2 1.0 mL PBS ile sulandırılır. Çalışma konsantrasyonu ise 180 µg/mL'lik stoktan 1 µg/mL olacak şekilde taşıyıcı protein kullanmadan PBS içinde hazırlanır.

Belirleyici Antikorum (Detection Antibody) Hazırlanması: 72 µg/mL biyotin bağlı goat anti-mouse IL-2 1.0 mL Reagent Diluent ile sulandırılır. Çalışma konsantrasyonu ise 72 µg/mL'lik stoktan 400 ng/mL olacak şekilde taşıyıcı protein kullanmadan Reagent Diluent içinde hazırlanır.

Standardın Hazırlanması: 100 ng/mL rekombinant fare IL-2 olacak şekilde ticari alınan tüp 0,5 ml Reagent Diluent ile sulandırılır. 15 dakika yavaşça çalkalandıktan sonra 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, ve 800 pg/mL olacak şekilde Reagent Diluent ile seri sulandırmalar yapılarak standart hazırlanır.

IL-2 İçin ELISA Plate'in Hazırlanması

Kaplama antikoru ile hazırlanan çalışma solusyonundan 96'lık ELISA plate'ine 100 µl eklenerek bir gece oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Kaplama antikoru ELISA plate'in yüzeyini kapladıktan sonra 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra her kuyucuğa 300 µl bloklama tamponu eklenerek en az bir saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası 3 kez yıkama tamponu ile yıkanır böylece plate örnek eklemeye hazırdır.

IL-2 için Örnek ve Standartların Eklenerek Ölçümün Yapılması

Daha önce fare dalak örneklerinden izole edilen lenfosit kültüründen alınan süpernatant örnekleri ile hazırlanan standartlardan 100 µl alınarak IL-2 için hazırlanmış plate'lere eklenerek 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Bu işlemden sonra 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra her kuyuya 100 µl Biotin bağlı belirleyici antikor eklenir. Bu işlemden sonra da 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra Streptavidin-HRP solusyonundan 100 µl eklenerek Biotin-Streptavidin bağlanması için 20 dakika ışısız ortamda oda sıcaklığında beklenir. Bu işlemden sonra da 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra 100 µl substrat solusyonu eklenerek dakika ışısız ortamda oda sıcaklığında beklenir. Bu aşamadan sonra enzim substrat reaksiyonunu durdurmak için 50 µl durdurma solusyonu eklenir ve yavaşça karıştırılır. Son olarak optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 450 nm dalga boyuna ayarlanmış ELIZA cihazına yerleştirildi ve cihazın optik ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı.

3.5.11.2 İnterferon-γ (IFN-γ) Üretiminin ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi

Kaplama Antikorumun (Capture Antibody) Hazırlanması: 720 µg/mL sıçan anti-mouse IFN-γ 1.0 mL PBS ile sulandırılır. Çalışma konsantrasyonu ise 720 µg/mL'lik stoktan 4 µg/mL olacak şekilde taşıyıcı protein kullanmadan PBS içinde hazırlanır.

Belirleyici Antikorum (Detection Antibody) Hazırlanması: 18 µg/mL biyotin bağlı goat anti-mouse IFN-γ 1.0 mL Reagent Diluent ile sulandırılır. Çalışma konsantrasyonu ise 18 µg/mL'lik stoktan 100 ng/mL olacak şekilde taşıyıcı protein kullanmadan Reagent Diluent içinde hazırlanır.

Standardın Hazırlanması: 205 ng/mL rekombinant fare IFN-γ olacak şekilde ticari alınan tüp 0,5 ml Reagent Diluent ile sulandırılır. 15 dakika yavaşça çalkalandıktan sonra 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, ve 800 pg/mL olacak şekilde Reagent Diluent ile seri sulandırmalar yapılarak standart hazırlanır.

IFN-γ için ELISA Plate'in Hazırlanması

Kaplama antikor ile hazırlanan çalışma solusyonundan 96'lık ELISA plate'ine 100 µl eklenerek bir gece oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Kaplama antikor ELISA

plate'in yüzeyini kapladıktan sonra 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra her kuyucuğa 300 µl bloklama tamponu eklenerek en az bir saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası 3 kez yıkama tamponu ile yıkanır böylece plate örnek eklemeye hazırdır.

IFN-γ için Örnek ve Standartların Eklenerek Ölçümün Yapılması

Daha önce fare dalak örneklerinden izole edilen lenfosit kültüründen alınan süpernatant örnekleri ile hazırlanan standartlardan 100 µl alınarak IFN-γ için hazırlanmış plate'lere eklenerek 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Bu işlemden sonra 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra her kuyuya 100 µl Biotin bağlı belirleyici antikor eklenir. Bu işlemden sonra da 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra Streptavidin-HRP solusyonundan 100 µl eklenerek Biotin-Streptavidin bağlanması için 20 dakika ışısız ortamda oda sıcaklığında beklenir. Bu işlemden sonra da 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra 100 µl substrat solusyonu eklenerek dakika ışısız ortamda oda sıcaklığında beklenir. Bu aşamadan sonra enzim substrat reaksiyonunu durdurmak için 50 µl durdurma solusyonu eklenir ve yavaşça karıştırılır. Son olarak optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 450 nm dalga boyuna ayarlanmış ELIZA cihazına yerleştirildi ve cihazın optik ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı.

3.5.11.3 İnterlökin 4 (IL-4) Üretiminin ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi

Kaplama Antikorumun (Capture Antibody) Hazırlanması: 720 µg/mL sıçan anti-mouse IL-4 1.0 mL PBS ile sulandırılır. Çalışma konsantrasyonu ise 720 µg/mL'lik stoktan 4 µg/mL olacak şekilde taşıyıcı protein kullanmadan PBS içinde hazırlanır.

Belirleyici Antikorum (Detection Antibody) Hazırlanması: 108 µg/mL biyotin bağlı goat anti-mouse IL-4 1.0 mL Reagent Diluent ile sulandırılır. Çalışma konsantrasyonu ise 108 µg/mL'lik stoktan 600 ng/mL olacak şekilde taşıyıcı protein kullanmadan Reagent Diluent içinde hazırlanır.

Standardın Hazırlanması: 180 ng/mL rekombinant fare IL-4 olacak şekilde ticari alınan tüp 0,5 ml Reagent Diluent ile sulandırılır. 15 dakika yavaşça çalkalandıktan sonra

3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, ve 800 pg/mL olacak şekilde Reagent Diluent ile seri sulandırmalar yapılarak standart hazırlanır.

IL-4 İçin ELISA Plate'in Hazırlanması

Kaplama antikoru ile hazırlanan çalışma solusyonundan 96'lık ELISA plate'ine 100 µl eklenerek bir gece oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Kaplama antikoru ELISA plate'in yüzeyini kapladıktan sonra 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra her kuyucuğa 300 µl bloklama tamponu eklenerek en az bir saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Inkübasyon sonrası 3 kez yıkama tamponu ile yıkanır böylece plate örnek eklemeye hazırdır.

IL-4 için Örnek ve Standartların Eklenerek Ölçümün Yapılması

Daha önce fare dalak örneklerinden izole edilen lenfosit kültüründen alınan süpernatant örnekleri ile hazırlanan standartlardan 100 µl alınarak IL-4 için hazırlanmış plate'lere eklenerek 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Bu işlemten sonra 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra her kuyuya 100 µl Biotin bağlı belirleyici antikor eklenir. Bu işlemten sonra da 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra Streptavidin-HRP solusyonundan 100 µl eklenerek Biotin-Streptavidin bağlanması için 20 dakika ışısız ortamda oda sıcaklığında beklenir. Bu işlemten sonra da 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra 100 µl substrat solusyonu eklenerek dakika ışısız ortamda oda sıcaklığında beklenir. Bu aşamadan sonra enzim substrat reaksiyonunu durdurmak için 50 µl durdurma solusyonu eklenir ve yavaşça karıştırılır. Son olarak optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 450 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA cihazına yerleştirildi ve cihazın optik ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı.

3.5.11.4 İnterlökin 4 (IL-4) Üretiminin ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi

Kaplama Antikorumun (Capture Antibody) Hazırlanması: 720 µg/mL sıçan anti-mouse IL-10 1.0 mL PBS ile sulandırılır. Çalışma konsantrasyonu ise 720 µg/mL'lik stoktan 4 µg/mL olacak şekilde taşıyıcı protein kullanmadan PBS içinde hazırlanır.

Belirleyici Antikoru (Detection Antibody) Hazırlanması: 72 µg/mL biyotin bağlı goat anti-mouse IL-4 1.0 mL Reagent Diluent ile sulandırılır. Çalışma konsantrasyonu ise 72 µg/mL'lik stoktan 400 ng/mL olacak şekilde taşıyıcı protein kullanmadan Reagent Diluent içinde hazırlanır.

Standardın Hazırlanması: 50 ng/mL rekombinant fare IL-4 olacak şekilde ticari alınan tüp 0,5 ml Reagent Diluent ile sulandırılır. 15 dakika yavaşça çalkalandıktan sonra 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 ve 3200 pg/mL olacak şekilde Reagent Diluent ile seri sulandırmalar yapılarak standart hazırlanır.

IL-10 için ELISA Plate'in Hazırlanması

Kaplama antikoru ile hazırlanan çalışma solusyonundan 96'lık ELISA plate'ine 100 µl eklenerek bir gece oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Kaplama antikoru ELISA plate'in yüzeyini kapladıktan sonra 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra her kuyucuğa 300 µl bloklama tamponu eklenerek en az bir saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Inkübasyon sonrası 3 kez yıkama tamponu ile yıkanır böylece plate örnek eklemeye hazırdır.

IL-10 için Örnek ve Standartların Eklenerek Ölçümün Yapılması

Daha önce fare dalak örneklerinden izole edilen lenfosit kültüründen alınan süpernatant örnekleri ile hazırlanan standartlardan 100 µl alınarak IL-10 için hazırlanmış plate'lere eklenerek 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Bu işlemden sonra 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra her kuyuya 100 µl Biotin bağlı belirleyici antikor eklenir. Bu işlemden sonra da 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra Streptavidin-HRP solusyonundan 100 µl eklenerek Biotin-Streptavidin bağlanması için 20 dakika ışısız ortamda oda sıcaklığında beklenir. Bu işlemden sonra da 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Daha sonra 100 µl substrat solusyonu eklenerek dakika ışısız ortamda oda sıcaklığında beklenir. Bu aşamadan sonra enzim substrat reaksiyonunu durdurmak için 50 µl durdurma solusyonu eklenir ve yavaşça karıştırılır. Son olarak optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 450 nm dalga boyuna ayarlanmış ELIZA cihazına yerleştirildi ve cihazın optik ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı.

3.6 İstatistik Analiz

Deneyler en az 3 kez tekrarlandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak ifade edildi. *In vitro* çalışmalarda toksisite, enfektiflik ve nitrik Oksit çalışmalarda gruplar arasındaki fark parametrik yöntemler olan ANOVA ve student t test ile belirlenmiştir. *In vivo* çalışmalarda ise ELISA, sitokin, LDU değerleri, periton makrofajlarındaki %enfektiflik düşüşü, DTH değerleri, karaciğer ve dalak ağırlığı arasındaki fark istatistiksel olarak parametrik yöntemler olan ANOVA ve student t test ile belirlenmiştir. Tüm veriler Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 19.0 for Windows) programı ile yapıldı ve $p<0,05$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

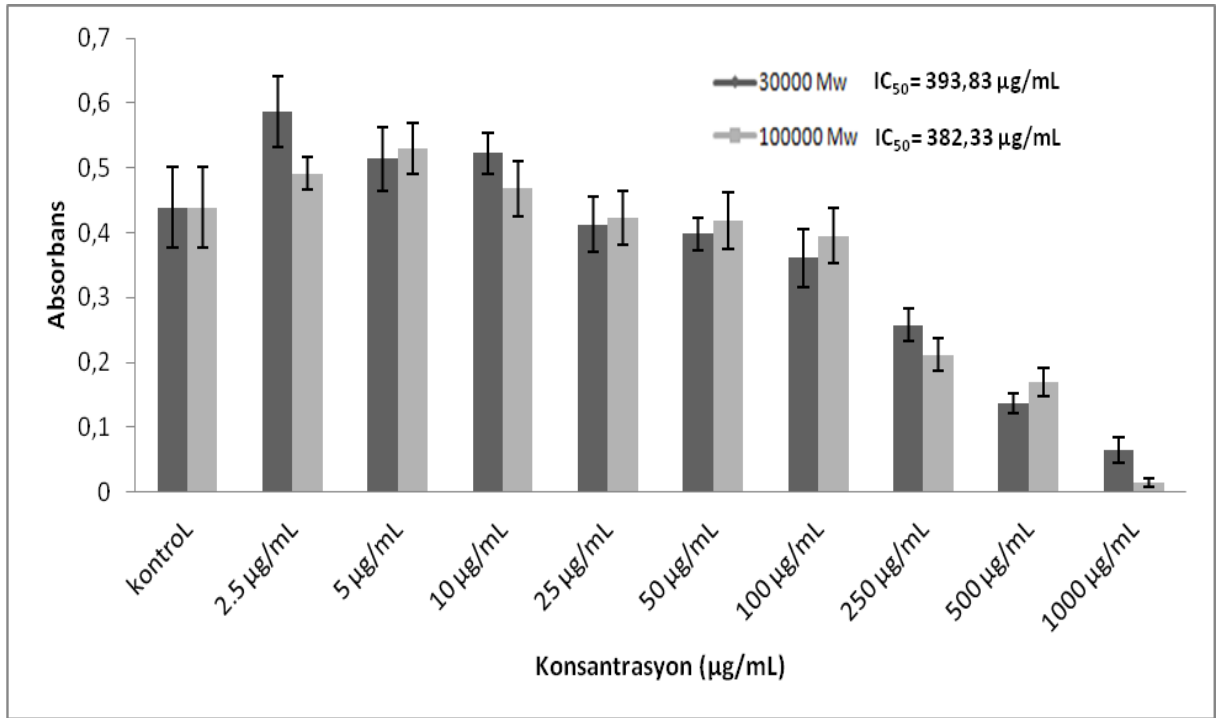
DENEYSEL SONUÇLAR

4. IN VİTRO ÇALIŞMA SONUÇLARI

4.1 POX ve PAA'nın J774 Fare Makrofaj Hücre Hattı ve Primer Fare Periton Makrofajlarında Toksik Etkisinin İncelenmesi

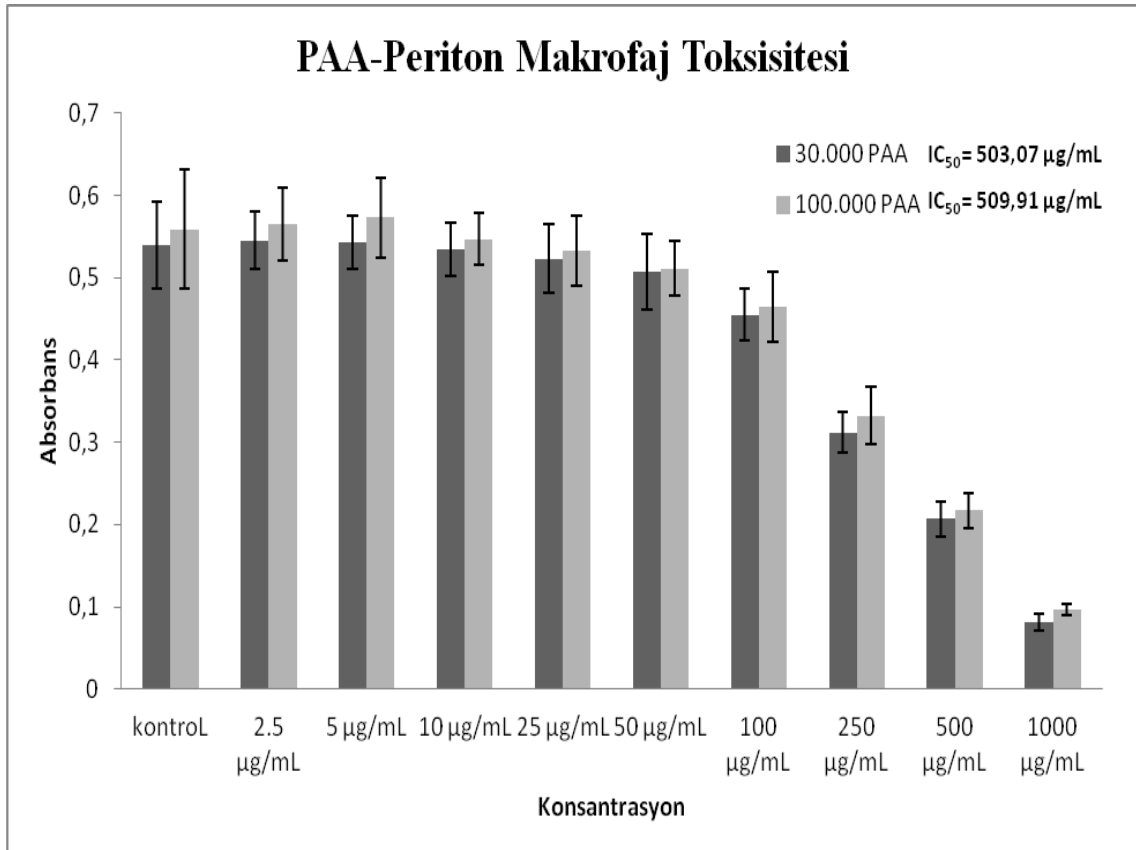
Molekül ağırlıklı 30 ve 100 kDa olan PAA ile POX'un toksik etkisini incelemek amacıyla, 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 10,000 J774 fare makrofaj hücre hattı ve primer fare periton makrofajları ekilip 24 saat inkübe edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa MTT boyası ilave edildi ve spektrofotometrik olarak hücre canlılığı belirlenmiştir.

PAA 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml olacak şekilde canlılık sonuçları belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre PAA konsantrasyonu 100 µg/ml'ye kadar olan olan konsantrasyonlarda önemli bir toksik etki görülmezken, PAA'nın her iki molekül ağırlığında da 250 µg/ml'de canlılık düşmeye başlamıştır (Şekil 4.1). Buna göre PAA'nın farklı molekül ağırlıklarında yapılan IC₅₀ hesaplamalarına göre molekül ağırlığı 30 kDa olan polimerin IC₅₀ değeri 393,83 µg/ml iken molekül ağırlığı 100 kDa olan polimerin IC₅₀ değeri ise 382,33 µg/ml'dir.



Şekil 4.1 J774 hücrelerinin 30 ve 100 kDa PAA ile 48 saat inkübasyon sonrası MTT yöntemiyle sitotoksik etkisi

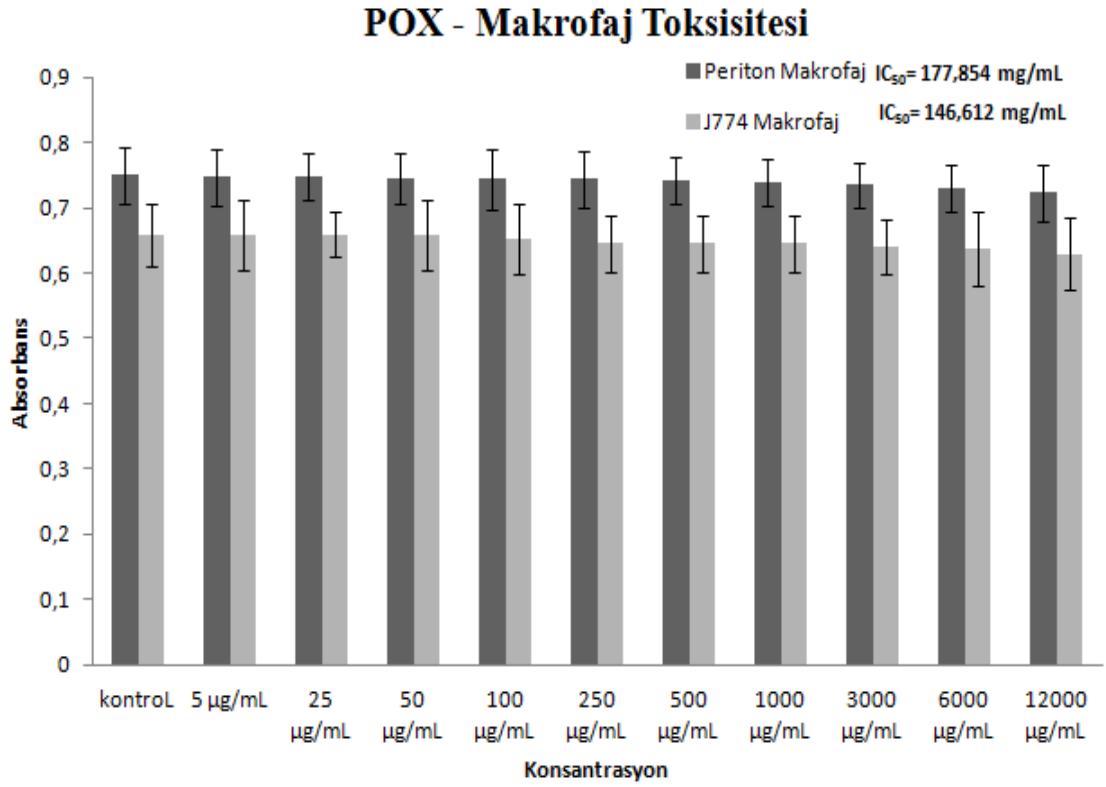
Ayrıca PAA 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml olacak şekilde primer fare periton makrofajlarında da canlılık sonuçları belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre J774 makrofaj hücre hattında olduğu gibi primer makrofaj hücrelerindedeki PAA konsantrasyonu 100 µg/ml'ye kadar olan olan konsantrasyonlarda önemli bir toksik etki oluşmazken, PAA'nın her iki molekül ağırlığında da 250 µg/ml'de canlılık düşmeye başlamıştır (Şekil 4.2). Buna göre PAA'nın farklı molekül ağırlıklarında yapılan IC₅₀ hesaplamalarına göre molekül ağırlığı 30 kDa olan polimerin IC₅₀ değeri 503,07 µg/ml iken molekül ağırlığı 100 kDa olan polimerin IC₅₀ değeri ise 509,91 µg/ml'dir. PAA'nın her iki molekül ağırlığında da özellikle primer hücre makrofaj hücre kültüründe IC₅₀ değerinin daha yüksek çıkması ileride aşılarda kullanılmasında olumlu bir sonuç olarak görülmektedir.



Şekil 4.2 Primer fare periton makrofajlarında 30 ve 100 kDa PAA ile 48 saat inkübasyon sonrası MTT yöntemiyle sitotoksik etkisi

J774 fare makrofaj hücre hattı ve primer fare periton makrofajlarında, POX konsantrasyonu ise 5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml, 6000 µg/ml ve 12000 µg/ml olacak şekilde canlılık sonuçları MTT yöntemiyle belirlenmiştir.

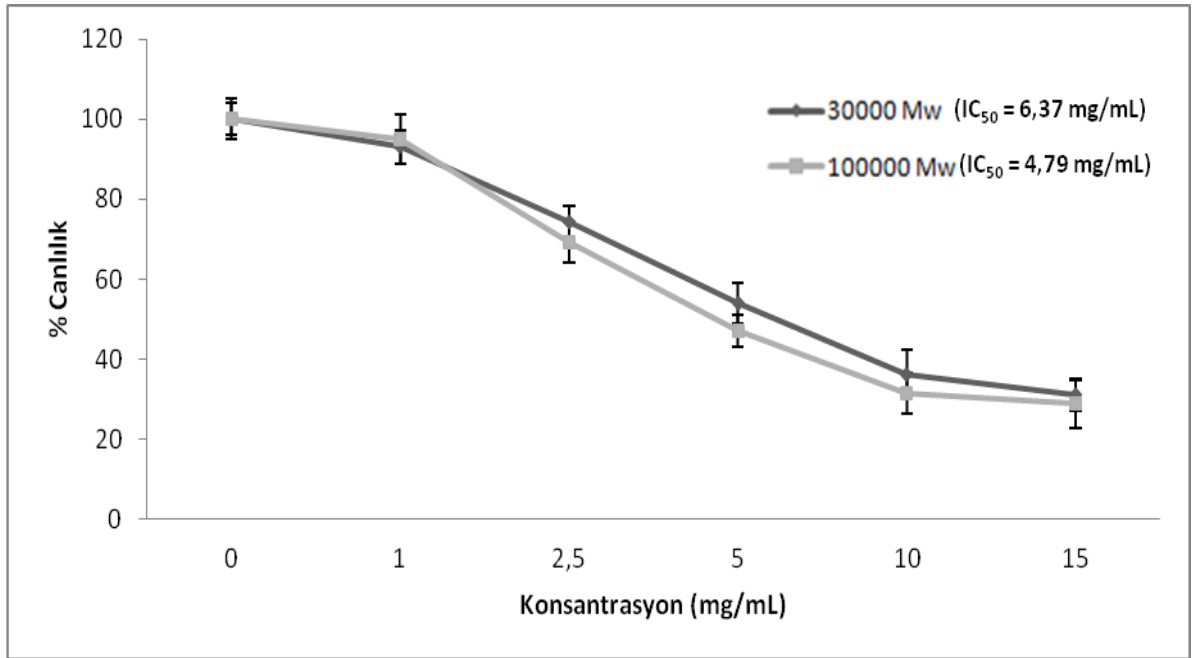
Elde edilen sonuçlara göre POX konsantrasyonu 12000 µg/ml'ye kadar olan olan konsantrasyona kadar denenmiş fakat hem J774 fare makrofaj hücre hattı hemde primer fare periton makrofajlarında önemli bir toksik etki görülmemiştir (Şekil 4.3). Buna göre POX'un farklı iki hücre tipinde yapılan IC_{50} hesaplamalarına göre J774 fare makrofaj hücre hattı için IC_{50} değeri 146,612 mg/ml iken primer fare periton makrofajlarında IC_{50} değeri ise 177,854 mg/ml'dir. Bu sonuçlara göre POX makrofaj hücrelerinde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bile toksik etkisi olmayacağını göstermektedir.



Şekil 4.3 J774 fare makrofaj hücre hattı ve primer fare periton makrofajlarında POX'un MTT yöntemiyle sitotoksik etkisi

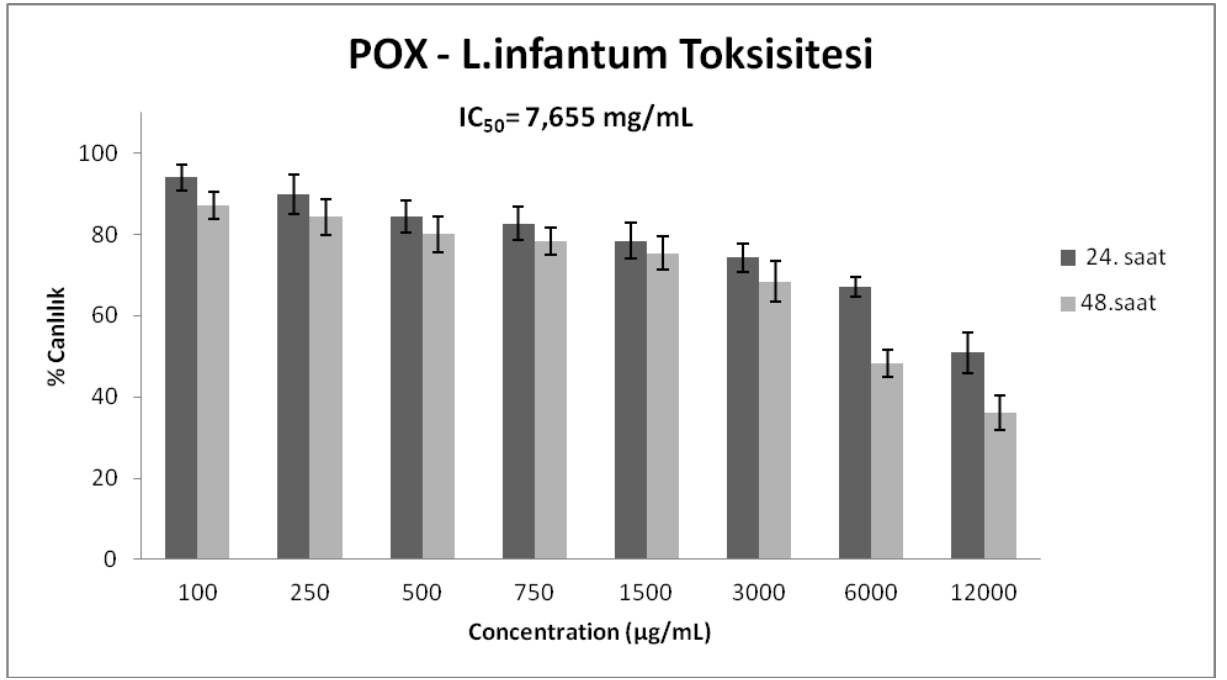
4.2 POX ve PAA'nın *L.infantum* Promastigotları Üzerine Toksik Etkisinin İncelenmesi

POX ve PAA'nın *L.infantum* promastigotları üzerine toksik etkisi MTT yöntemi ile belirlenmiş olup, kontrolün canlılığı %100 kabul edilerek PAA'nın farklı konsantrasyonlarının (1, 2,5, 5, 10 ve 15 mg/ml) *L.infantum* promastigotları üzerine etkisi Şekil 4.4'te verilmiştir. 1 mg/ml PAA'ya maruz kalmış promastigotların canlılığı ile kontrol arasında istatiki olarak fark yoktur ($p > 0,05$). 5 mg/ml PAA'ya maruz kalmış promastigotların kontrole göre canlılığı anlamlı ölçüde düşmüştür ($p < 0,05$). 5 mg/ml'nin üzerinde PAA'ya maruz kalmış promastigotlarda canlılık giderek azalmıştır. Elde edilen MTT sonuçlarına göre molekül ağırlığı 30 kDa olan PAA'da IC_{50} değeri 6,37 mg/ml iken molekül ağırlığı 100 kDa olan PAA'da IC_{50} değeri 4,79 mg/ml'dir. Buna göre de *in vivo* çalışmalarda hangi molekül ağırlığının kullanılacağına yönelik ilk sonuçlar elde edilmiştir.



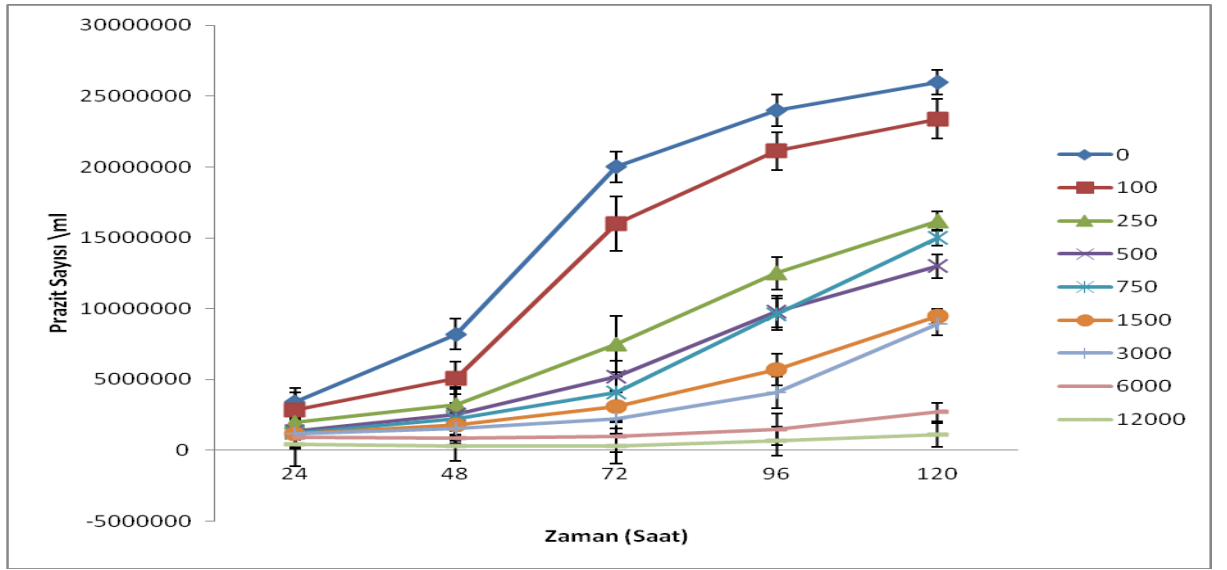
Şekil 4.4 *Leishmania infantum* promastigotlarında 30 ve 100 kDa PAA ile 48 saat inkübasyon sonrası MTT yöntemiyle sitotoksik etkisi

POX'un farklı konsantrasyonlarının (100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 3000 µg/ml, 6000 µg/ml ve 12000 µg/ml) *L.infantum* promastigotları üzerine etkisi Şekil 4.5'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 1500 µg/ml konsantrasyona kadar POX'a maruz kalmış promastigotların canlılığı ile kontrol arasında istatistiki olarak fark yoktur ($p > 0,05$). 3000 µg/ml POX'a maruz kalmış promastigotların kontrole göre canlılığı anlamlı ölçüde düşmüştür ($p < 0,05$). 3000 µg/ml'nin üzerinde POX'a maruz kalmış promastigotlarda canlılık giderek azalmıştır. Elde edilen MTT sonuçlarına göre molekül ağırlığı 48. saat IC_{50} değeri 7,655 mg/ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5 *Leishmania infantum* promastigotlarında POX ile 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası MTT yöntemiyle sitotoksik etkisi

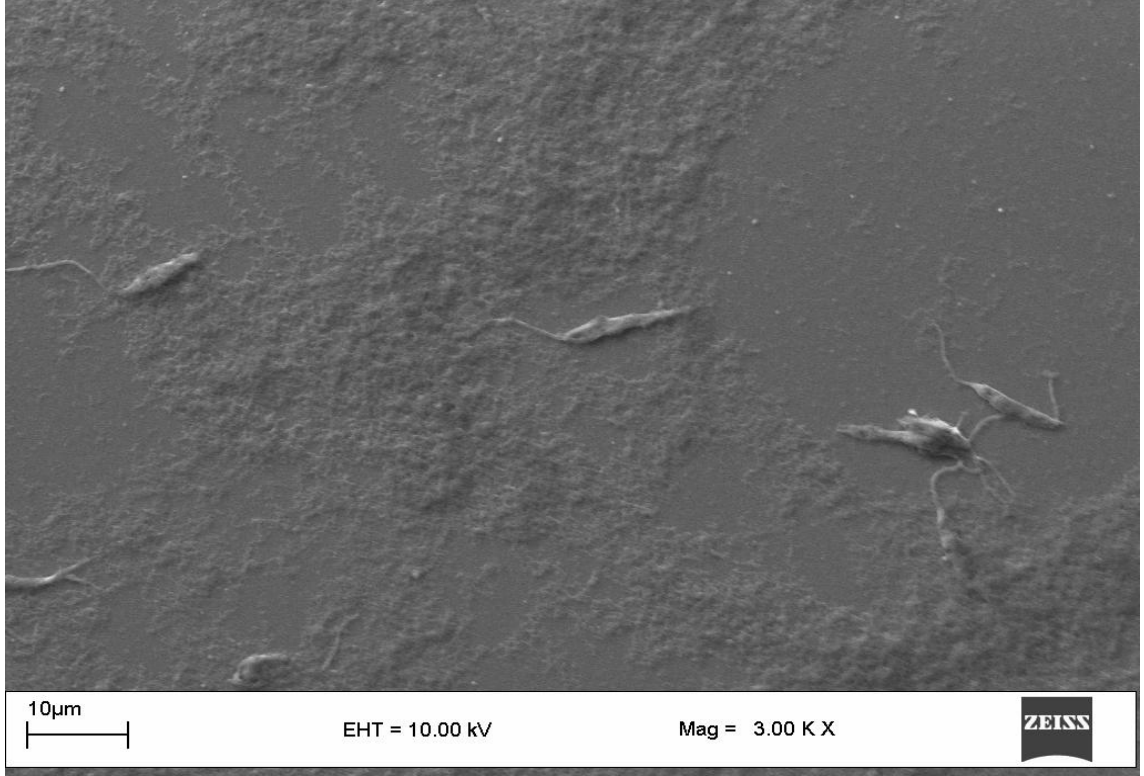
MTT dışında POX'un farklı konsantrasyonlarının *L.infantum* promastigotları üzerine toksik etkisi sayım yapılarak incelenmiştir. Buna göre POX'un farklı konsantrasyonlarına (100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml, 6000 µg/ml ve 12000 µg/ml) 1×10^6 parazit/ml olan tüplerden 5 gün boyunca sayım yapılmıştır. Sonuçlar MTT sonuçlarını destekler nitelikte olmasına rağmen özellikle 6000 ve 12000 µg/ml olan konsantrasyonlarda parazit üremesi tamamen inhibe olmuştur (Şekil 4.6).



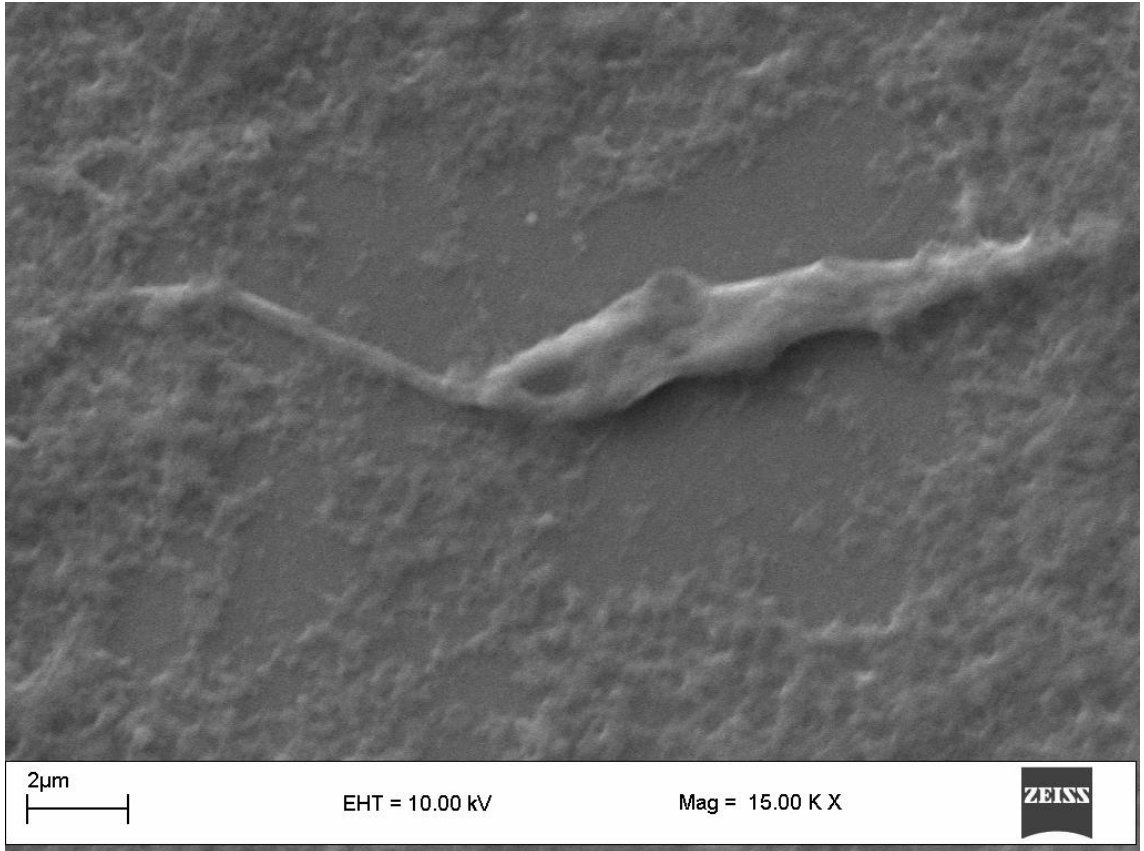
Şekil 4.6 *Leishmania infantum* promastigotlarında POX ile 120 saat inkübasyon sonrası sitotoksik etkisi

4.3 Promastigotların PAA ve POX'a Maruz Tutulduktan Sonra Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) Ultrayapı Analiz Sonuçları

PAA ve POX'un bir saat *L.infantum* promastigotlarına maruz tutulduğunda morfolojik olarak ultrayapı üzerine olan etkisi SEM ile incelenmiştir. Buna göre 3000x ve 15000x büyütme yapılan kontrol grunda parazitlerin morfolojik olarak gerek kamçıları gerekse hücre şekillerinin normal olduğu görülmektedir (Şekil 4.7 ve 4.8).

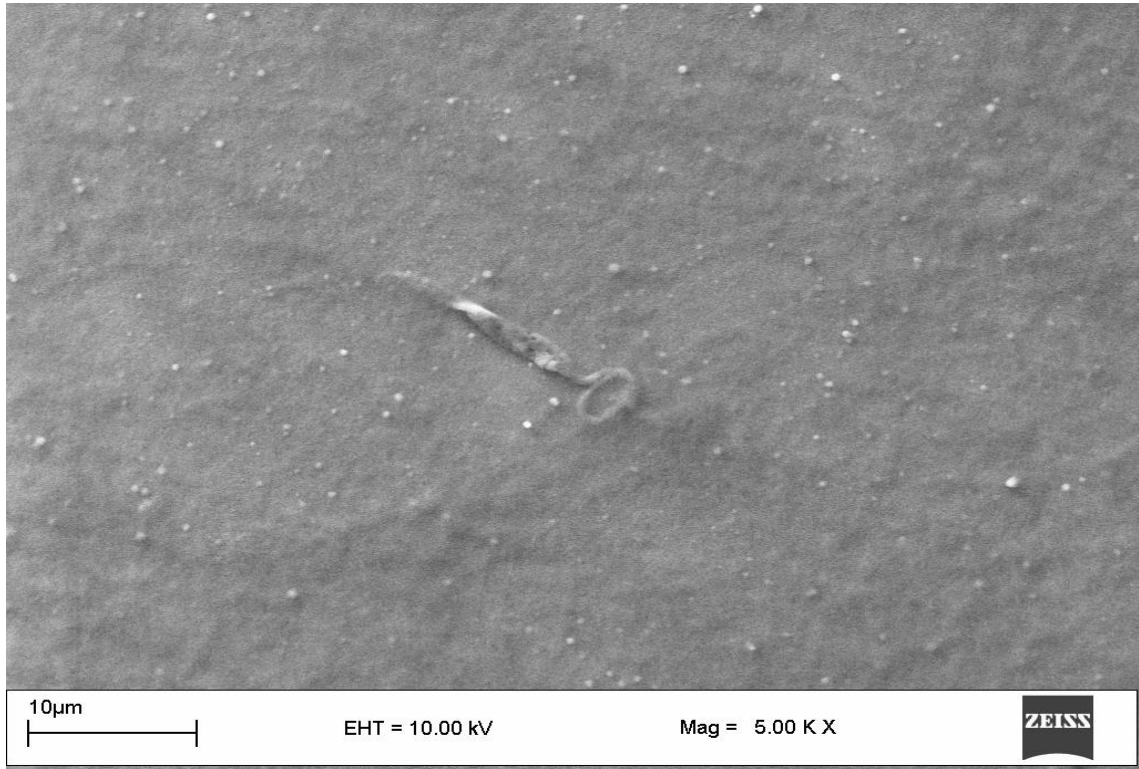


Şekil 4.7 *L. infantum* promastigotlarının morfolojik görüntüsü (SEM, 3000x)



Şekil 4.8 *L. infantum* promastigotlarının morfolojik görüntüsü (SEM, 15000x)

PAA'ya bir saat tutulmuş olan *L.infantum* promastigotlarının ise hücre yüzeylerinde polimerin etkisiyle oluşmuş olan porlar görülmektedir. B hücreleriyle yapılan çalışmalarda PAA'nın hücre yüzey molekülleri ile etkileşime girerek hücre yüzeyinde bulunan sodyum-potasyum ve kalsiyum geçirgenliğinden sorumlu olan pompaların işlevini bozarak geçirgenliğini değiştirdiği bilinmektedir. Benzer olarak PAA'nın promastigot yüzeyinde bulunan moleküller ile etkileşime girerek porlar oluşturduğunu görmekteyiz (Şekil 4.9 ve 4.10).

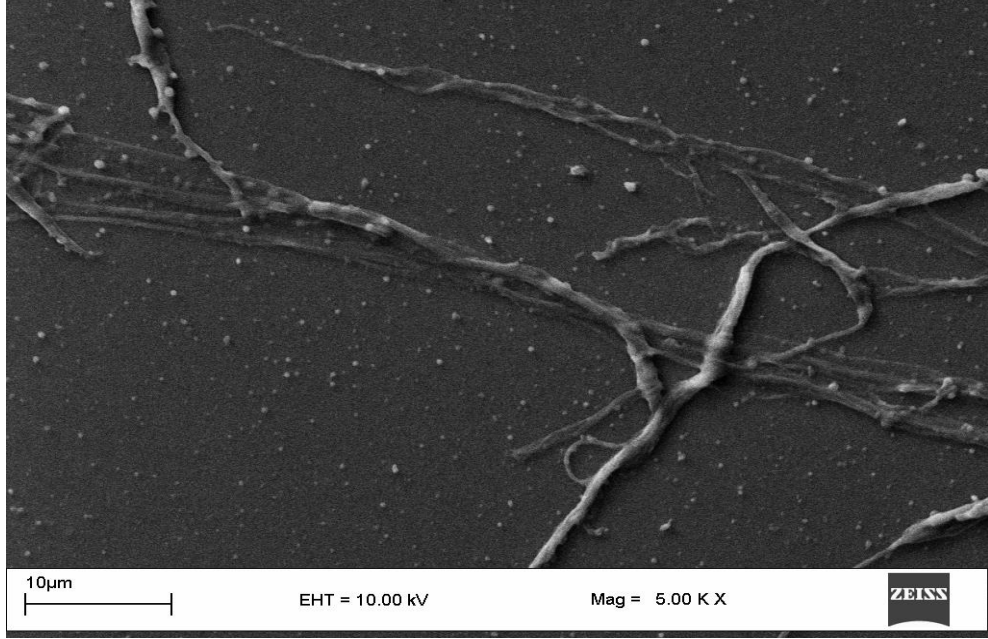


Şekil 4.9 *L.infantum* promastigotlarının PAA'ya bir saat maruz tutulduktan sonra morfolojik görüntüsü (SEM, 5000x)

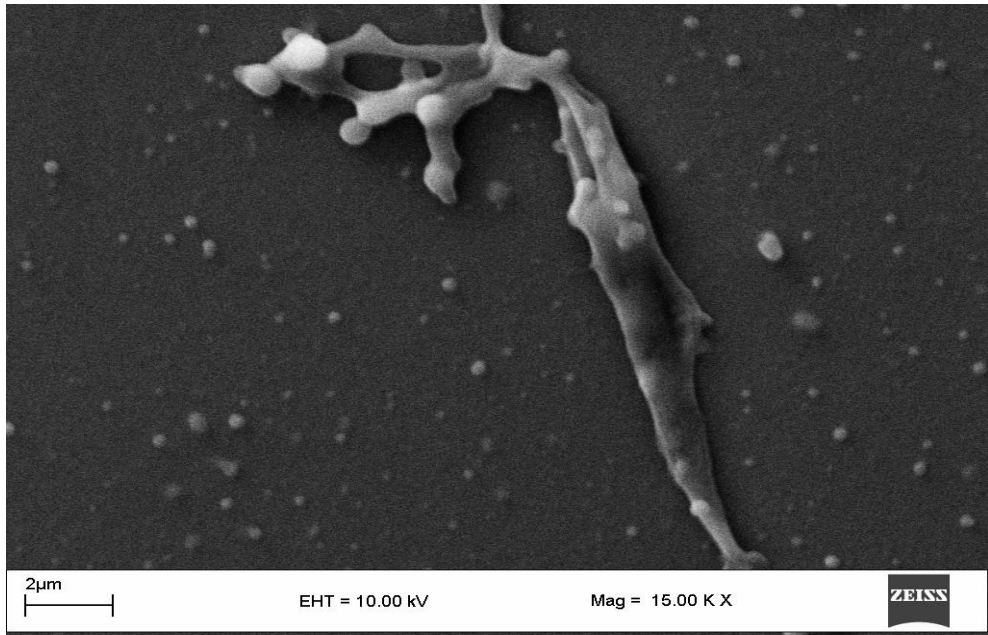


Şekil 4.10 *L.infantum* promastigotlarının PAA'ya bir saat maruz tutulduktan sonra morfolojik görüntüsü (SEM, 15000x)

POX'a bir saat tutulmuş olan *L.infantum* promastigotların polimerin etkisiyle oluşmuş kümelerin normal parazit kümelerinden farklı olarak uç uca birleştiği bir şekil aldığı görülmektedir. SEM görüntülerinden anlaşılacağı gibi parazitlerin kamçıları ile diğer hücresel kısımları ayırt edilememektedir. Ayrıca kümelenmemiş parazitlerde kamçının morfolojik olarak atipik olduğu görülmektedir. (Şekil 4.11 ve 4.12).



Şekil 4.11 *L. infantum* promastigotlarının POX'a bir saat maruz tutulduktan sonra morfolojik görüntüsü (SEM, 5000x)

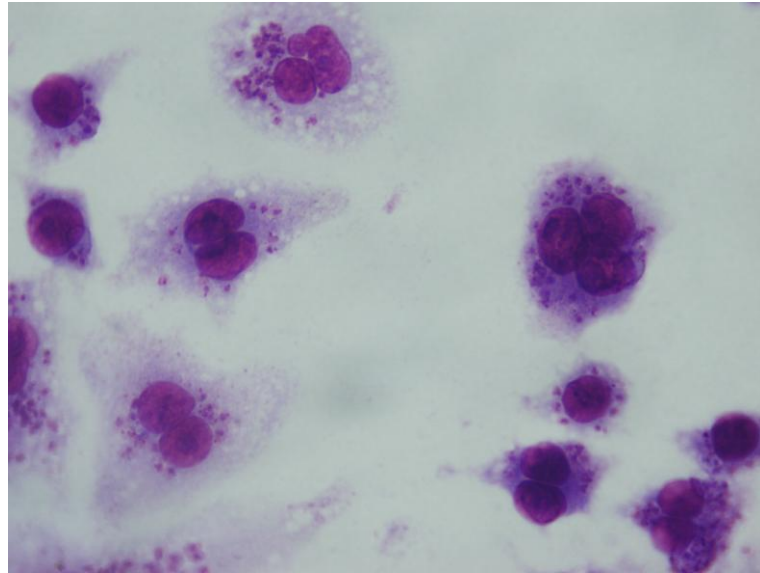


Şekil 4.12 *L. infantum* promastigotlarının POX'a bir saat maruz tutulduktan sonra morfolojik görüntüsü (SEM, 15000x)

4.4 PAA'ya Maruz Kalmış *L. infantum* Promastigotlarının J774 Hücreleri ile Etkileşimi ve Enfektifliğinin İncelenmesi

Parazitler 1 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml ve 10 mg/ml PAA'ya 1, 2, 3 ve 24 saat maruz bırakıldıktan sonra PBS ile yıkanıp sayım yapılarak, J774 makrofaj hücrelerine, makrofaj başına 10 promastigot olacak şekilde verildikten 4 saat sonra, makrofajlara giremeyen

promastigotlar, yıkama yapılarak ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra enfektifliği belirlemek amacıyla 24. ve 48. saatlerde Giemsa boyama yapıldı. Genel olarak elde edilen sonuçlarda, polimere maruz kalmış ortamlarda kontrole göre enfektifliğin önemli ölçüde düştüğü gözlemlendi. Giemsa boyama ile elde edilen simirlerde toplam 200 makrofaj içinden kaç tanesinin enfekte olduğu belirlendi (yüzde enfektiflik). Daha sonra toplam amastigot sayısı belirlendi. Böylece ortalama bir makrofaja düşen amastigot sayısı hesaplandı. Son olarak enfeksiyon indeksini (infection index) belirlemek için yüzde enfektiflik sayısı ile ortalama amastigot sayısının çarpımı hesaplandı. Bu hesaplamalara göre, polimere maruz kalmamış 24. saatteki kontrol grubunda makrofajların %70,27'si enfekte makrofaj olup, ortalama bir makrofaja düşen promastigot sayısı ise 3.1'dir. Bu durumda enfeksiyon indeksi $70,27 \times 3,1 = 218$ 'dir. Polimere maruz kalmamış 48. saatteki kontrol grubunda makrofajların %28,12'si enfekte makrofaj olup, ortalama bir makrofaja düşen promastigot sayısı ise 0,6'dır. Bu durumda enfeksiyon indeksi $28,12 \times 0,6 = 19$ 'dur. 48. saatte enfektifliğin bu kadar düşmesinin nedeni; *in vitro* koşullarda makrofaj sayısının sabit olması ve amastigotların diğer makrofajları enfekte etmesi için yeterli zamanı *in vitro*'da sağlayamaması olabilir. Şekil 4.13'de Giemsa boyama ile kontrol grubundaki morfolojik sonuçlar görülmektedir



Şekil 4.13 *L.infantum* ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Kontrol, Giemsa boyama, 48 saat sonra, 100x)

Çizelge 4.1’de molekül ağırlığı 30 ve 100 kDa olan 1 mg PAA’ya maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının enfektifliği verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda kontrole göre 1 mg polimere maruz kalmış tüm sürelerde %enfektiflik, amastigot sayısı ve enfeksiyon indeksinde anlamlı düşüş meydana gelmiştir (Çizelge 4.1). Fakat 100 kDa PAA’ya maruz kalan ortamda 30 kDa PAA’ya göre % enfektiflik daha yüksektir. Ayrıca her iki molakül ağırlığında da PAA’ya maruziyet süresi arttıkça enfektiflikte çok düşüğe olsa bir artış meydana gelmiştir. Bunun nedeni ilk saatte parazitle etkileşime giren polimer miktarının zamanla azalması yada parazit tarafından polimerin uzaklaştırılması olabilir.

Çizelge 4.2’de molekül ağırlığı 30 ve 100 kDa olan 2,5 mg PAA’ya maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının enfektifliği verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda kontrole göre 2,5 mg polimere maruz kalmış tüm sürelerde %enfektiflik, amastigot sayısı ve enfeksiyon indeksinde anlamlı düşüş meydana gelmiştir (Çizelge 4.2). 1 mg PAA’dan farklı olarak 2,5 mg PAA’ya maruz kalan ortamda 100 kDa ve 30 kDa PAA’da % enfektiflik açısından bir fark oluşmamıştır. Ayrıca her iki molakül ağırlığında da PAA’ya maruziyet süresi arttıkça enfektiflikte çok düşüğe olsa bir artış meydana gelmiştir.

Çizelge 4.1 Molekül ağırlığı 30 ve 100 kDa olan 1 mg PAA'ya maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının enfektifliği

		24 Saat Sonra Enfektiflik			48 Saat Sonra Enfektiflik		
		% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi	% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi
	Kontrol	70,27±1,20	3,1±0,10	219±2,80	28,12±0,05	0,6±0,01	19±0,9
PAA Molekül Ağırlığı 30 kDa	1 mg/mL, 1 h	2±0,01	0,2±0,001	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	1 mg/mL, 2 h	5±0,02	0,2±0,001	1±0,01*	2±0,01	0,01±0	0*
	1 mg/mL, 3 h	6±0,001	0,2±0	1±0,01*	2±0,01	0,01±0	0*
	1 mg/mL, 24 h	4±0,03	0,3±0,001	1±0,01*	1±0,01	0,01±0	0*
PAA Molekül Ağırlığı 100 kDa	1 mg/mL, 1 h	17,2±0,06	0,3±0,007	5±0,04*	2±0,01	0,01±0	0*
	1 mg/mL, 2 h	15,2±0,04	0,27±0,01	4±0,06*	4,5±0,01	0,01±0	0*
	1 mg/mL, 3 h	13,3±0,003	0,11±0	1±0,01*	4±0,01	0,01±0	0*
	1 mg/mL, 24 h	17,7±0,06	0,34±0,01	6±0,06*	4±0,01	0,01±0	0*

Çizelge 4.2 Molekül ağırlığı 30 ve 100 kDa olan 2,5 mg PAA'ya maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının enfektifliği

		24 Saat Sonra Enfektiflik			48 Saat Sonra Enfektiflik		
		% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi	% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi
	Kontrol	70,27±1,20	3,1±0,10	219±2,80	28,12±0,05	0,6±0,01	19±0,9
PAA Molekül Ağırlığı 30 kDa	2,5 mg/mL, 1 h	1,2±0,01	0,2±0,001	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	2,5 mg/mL, 2 h	1,4±0,03	0,1±0,001	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	2,5 mg/mL, 3 h	1,7±0,001	0,2±0	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	2,5 mg/mL, 24 h	3,4±0,002	0,2±0	1±0,01*	1±0,01	0,01±0	0*
PAA Molekül Ağırlığı 100 kDa	2,5 mg/mL, 1 h	1±0,05	0,1±0,004	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	2,5 mg/mL, 2 h	1,1±0,06	0,1±0,01	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	2,5 mg/mL, 3 h	1,3±0,002	0,01±0	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	2,5 mg/mL, 24 h	3,2±0,03	0,12±0,001	0*	1±0,01	0,01±0	0*

Çizelge 4.3'te molekül ağırlığı 30 ve 100 kDa olan 5 mg PAA'ya maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının enfektifliği verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda kontrole göre 5 mg polimere maruz kalmış tüm sürelerde %enfektiflik, amastigot sayısı ve enfeksiyon indeksinde anlamlı düşüş meydana gelmiştir (Çizelge 4.3). 1 mg PAA'dan farklı olarak 5 mg PAA'ya maruz kalan ortamda 30 kDa PAA'da 100 kDa PAA'ya göre 2 ve 3 saat maruziyet sürelerinde % enfektiflik açısından bir artış olmuştur. Ayrıca her iki molakül ağırlığında da PAA'ya maruziyet süresi arttıkça enfektiflikte çok düşüğe olsa bir artış meydana gelmiştir. Bu sonuçlara göre 100 kDa, 5 mg PAA'ya bir saat maruz kalmış promastigotların *in vivo* çalışmalar için en uygun molekül ağırlığı, konsantrasyon ve maruziyet süresi olduğu belirlenmiştir.

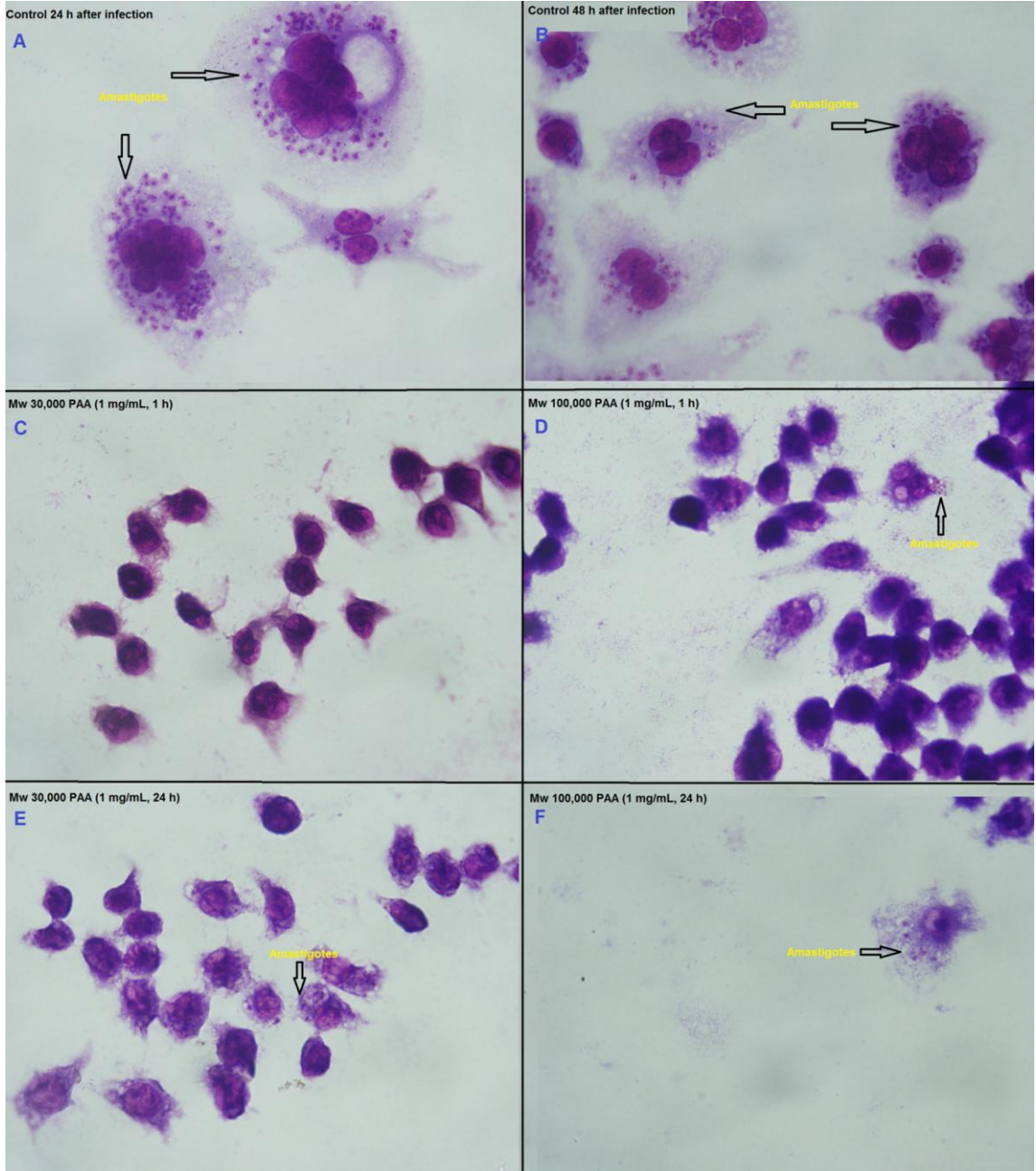
Çizelge 4.4'te molekül ağırlığı 30 ve 100 kDa olan 10 mg PAA'ya maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının enfektifliği verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda kontrole göre 10 mg polimere maruz kalmış tüm sürelerde %enfektiflik, amastigot sayısı ve enfeksiyon indeksinde anlamlı düşüş meydana gelmiştir (Çizelge 4.4). 1, 2,5 ve 5 mg PAA'dan farklı olarak 10 mg PAA'ya maruz kalan ortamda 30 kDa PAA ve 100 kDa PAA'da maruziyet süreleri arttıkça % enfektiflik açısından bir artış olmuştur. Fakat bu artış 100 kDa PAA'da daha düşüktür.

Çizelge 4.3 Molekül ağırlığı 30 ve 100 kDa olan 5 mg PAA'ya maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının enfektifliği

		24 Saat Sonra Enfektiflik			48 Saat Sonra Enfektiflik		
		% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi	% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi
	Kontrol	70,27±1,20	3,1±0,10	219±2,80	28,12±0,05	0,6±0,01	19±0,9
PAA Molekül Ağırlığı 30 kDa	5 mg/mL, 1 h	1±0,001	0,01±0	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	5 mg/mL, 2 h	4±0,03	0,3±0,001	1±0,01*	1±0,01	0,01±0	0*
	5 mg/mL, 3 h	5,3±0,001	0,43±0	2±0,01*	1,4±0,01	0,01±0	0*
	5 mg/mL, 24 h	1±0,002	0,01±0	0*	1±0,01	0,01±0	0*
PAA Molekül Ağırlığı 100 kDa	5 mg/mL, 1 h	1±0,002	0,01±0	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	5 mg/mL, 2 h	1±0,003	0,02±0,01	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	5 mg/mL, 3 h	1±0,001	0,01±0	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	5 mg/mL, 24 h	4±0,03	0,12±0,001	0*	1±0,01	0,01±0	0*

Çizelge 4.4 Molekül ağırlığı 30 ve 100 kDa olan 10 mg PAA'ya maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının enfektifliği

		24 Saat Sonra Enfektiflik			48 Saat Sonra Enfektiflik		
		% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi	% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi
	Kontrol	70,27±1,20	3,1±0,10	219±2,80	28,12±0,05	0,6±0,01	19±0,9
PAA Molekül Ağırlığı 30 kDa	10 mg/mL, 1 h	3±0,01	0,2±0,001	1±0,01*	1±0,01	0,01±0	0*
	1 mg/mL, 2 h	4,3±0,03	0,3±0,001	1±0,01*	1±0,01	0,01±0	0*
	10 mg/mL, 3 h	4,6±0,001	0,3±0	1±0,01*	1±0,01	0,01±0	0*
	10 mg/mL, 24 h	11,2±0,02	0,4±0	4±0,06*	1±0,01	0,01±0	0*
PAA Molekül Ağırlığı 100 kDa	10 mg/mL, 1 h	1±0,002	0,01±0	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	10 mg/mL, 2 h	1,8±0,06	0,2±0,01	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	10 mg/mL, 3 h	2,1±0,002	0,1±0	0*	1±0,01	0,01±0	0*
	10 mg/mL, 24 h	4,4±0,03	0,12±0,001	1±0,01*	1±0,01	0,01±0	0*



Şekil 4.14 Giemsa boyama ile PAA'ya maruz kalmış önemli olan konsantrasyonlardaki morfolojik sonuçlar görülmektedir.

4.5 POX'a Maruz Kalmış *L.infantum* Promastigotlarının J774 Hücreleri ile Etkileşimi ve Enfektifliğinin İncelenmesi

Parazitler, POX konsantrasyonu 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml, 6000 µg/ml ve 12000 µg/ml olacak şekilde 1, 2, 3, 4 ve 24 saat polimere maruz bırakıldıktan sonra PBS ile yıkanıp sayım yapılarak, J774 makrofaj hücrelerine, makrofaj başına 10 promastigot olacak şekilde verildikten 4 saat sonra, makrofajlara giremeyen promastigotlar, yıkama yapılarak ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra enfektifliği belirlemek amacıyla 24. ve 48. saatlerde Giemsa boyama yapıldı. Elde edilen sonuçlarda, 6000 ve 12000 µg/ml POX'a maruz kalmış ortamlarda kontrole göre enfektifliğin önemli ölçüde düştüğü gözlemlendi. Giemsa boyama ile elde edilen simirlerde toplam 200 makrofaj içinden kaç tanesinin enfekte olduğu belirlendi (yüzde enfektiflik). Daha sonra toplam amastigot sayısı belirlendi. Böylece ortalama bir makrofaja düşen amastigot sayısı hesaplandı. Son olarak enfeksiyon indeksini (infection index) belirlemek için yüzde enfektiflik sayısı ile ortalama amastigot sayısının çarpımı hesaplandı.

Çizelge 4.5'te görüldüğü gibi 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml POX'a maruz kalan parazitlerin enfektifliği ile kontrol grubu arasında hem 24 hem 48. Saatlerde anlamlı bir fark görülmemektedir. Fakat Çizelge 4.6'da ise özellikle 1000 µg/ml POX ile kontrol arasında enfektiflik açısından %6'lık bir düşüş meydana gelmiştir. Aynı konsantrasyonda enfeksiyon indeksindeki düşüş ise %31,6'dır. Bu durum enfektiflik yüzdesinde %6'lık bir düşüş olsa bile

1000 µg/ml POX'un makrofaj başına düşen amastigot sayısını önemli ölçüde düşürdüğünü göstermektedir. Bunu başka şekilde açıklarsak polimere maruz kalmış parazitlerin önemli ölçüde makrofaj içindeki replikasyonları düşmüştür.

Çizelge 4.7'ye baktığımızda 2000 µg/ml, 6000 µg/ml ve 12000 µg/ml maruz kalan parazitlerin enfektifliği ile kontrol grubu arasında hem 24 hem 48. Saatlerde anlamlı bir fark görülmektedir. Enfektiflikteki en fazla düşüş özellikle polimerin farklı konsantrasyonlarının parazite bir saat maruz kaldığında görülmüştür. 2000 µg/ml'de enfektiflik %20,08 düşerken enfeksiyon indeksi %50,09 düşmüştür. 6000 µg/ml'de enfektiflik %85,3 düşerken enfeksiyon indeksi %98,6 düşmüştür. 12000 µg/ml'de

enfektiflik %99,6 düşerken enfeksiyon indeksi %100 düşmüştür. Böylece POX için *in vivo* çalışmalarda en uygun konsantrasyonun 12000 µg/ml'ye bir saat maruz kalmış parazitler olduğu belirlendi.

Çizelge 4.5 25, 50 ve 100 µg/ml POX'a maruz kalmış *L.infantum* enfektifliği

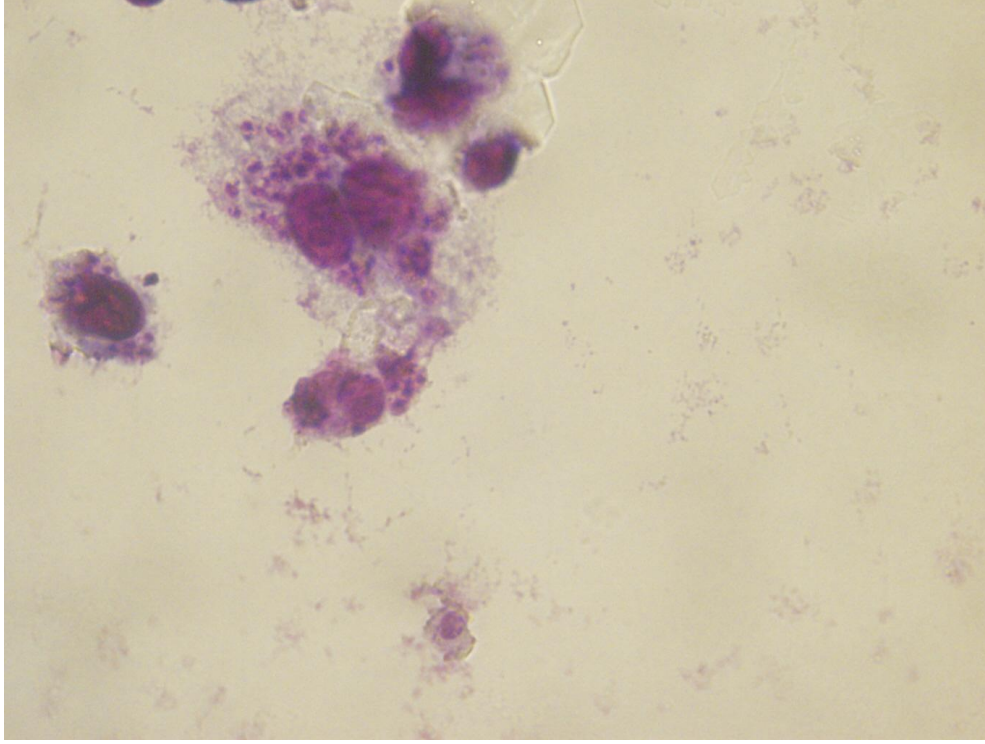
		24 Saat Sonra Enfektiflik			48 Saat Sonra Enfektiflik		
		% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi	% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi
	Kontrol	82,27±1,51	4,2±0,09	346±3,13	42,34±0,1	1,78±0,031	75±1,56
POLİOKSIDONYUM	25 µg/ml, 1 h	81,45±1,65	4,7±0,11	346±3,48	44,71±0,3	1,92±0,044	86±3,96
	25 µg/ml , 2 h	83,11±1,34	4,44±0,14	369±5,21	47,66±0,21	1,38±0,042	66±4,23
	25 µg/ml , 3 h	82,45±1,40	3,42±0,08	282±4,22	43,44±0,4	1,55±0,037	67±1,88
	25 µg/ml , 24 h	83,11±1,98	4,01±0,12	333±4,10	43,30±0,14	1,55±0,020	67±1,61
	50 µg/ml , 1 h	81,30±1,76	4,10±0,15	333±3,66	42,55±0,11	1,81±0,036	77±1,91
	50 µg/ml , 2 h	80,10±1,21	3,32±0,11	266±2,47	41,01±0,04	1,29±0,022	53±1,14
	50 µg/ml , 3 h	80,15±1,32	3,44±0,08	276±3,01	42,12±0,3	1,54±0,025	65±1,36
	50 µg/ml , 24 h	83,05±1,62	3,92±0,14	326±3,84	40,37±0,6	1,23±0,044	50±1,13
	100 µg/ml , 1 h	81,47±1,28	3,12±0,07	254±2,83	41,07±0,3	1,65±0,031	68±1,37
	100 µg/ml , 2 h	81,22±1,27	3,54±0,07	288±3,46	40,35±0,23	1,78±0,042	52±1,11
	100 µg/ml , 3 h	80,20±1,38	3,2±0,02	257±2,68	39,78±0,07	1,34±0,022	53±1,08

Çizelge 4.6 250, 500 ve 1000 µg/ml POX'a maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının enfektifliği

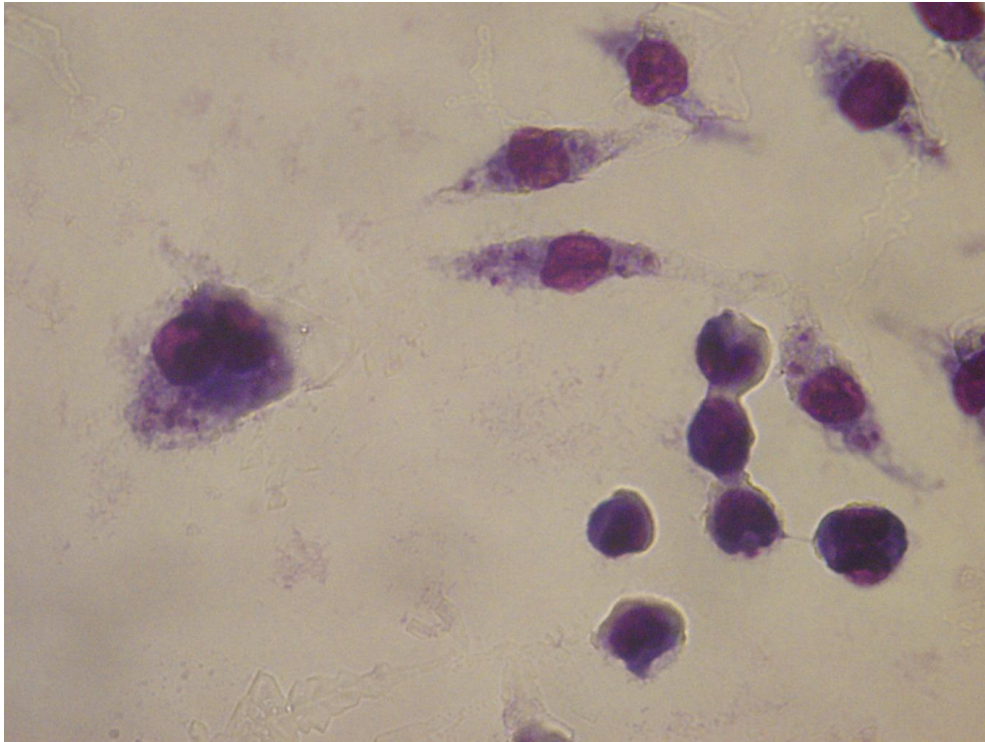
		24 Saat Sonra Enfektiflik			48 Saat Sonra Enfektiflik		
		% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi	% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi
	Kontrol	82,27±1,51	4,2±0,09	346±3,13	42,34±0,1	1,78±0,031	75±1,56
POLİOKSIDONYUM	250 µg/ml, 1 h	80,35±1,44	3,88±0,15	312±3,56	39,93±0,4	1,88±0,074	75±3,55
	250 µg/ml, 2 h	80,24±1,41	4,01±0,21	322±3,11	41,34±0,12	1,41±0,033	58±3,22
	250 µg/ml, 3 h	80,15±1,27	3,81±0,09	305±3,75	42,12±0,5	1,44±0,041	61±1,43
	250 µg/ml, 24 h	78,88±1,76	3,33±0,21	263±4,10	39,41±0,25	1,27±0,027	50±1,33
	500 µg/ml, 1 h	79,46±1,87	3,90±0,14	310±3,10	40,11±0,24	1,51±0,049	61±1,24
	500 µg/ml, 2 h	79,90±1,82	3,67±0,31	293±2,99	40,55±0,37	1,55±0,062	63±1,35
	500 µg/ml, 3 h	78,89±1,77	3,59±0,28	283±3,36	40,97±0,43	1,65±0,031	68±1,77
	500 µg/ml, 24 h	77,10±1,22	3,44±0,31	265±3,11	39,98±0,54	1,47±0,037	59±2,24
	1000 µg/ml, 1 h	78,44±1,33	3,41±0,03	267±2,53	39,11±0,42	1,71±0,040	67±2,45
	1000 µg/ml, 2 h	78,31±1,45	3,75±0,04	294±3,76	38,47±0,33	1,55±0,051	60±1,96
	1000 µg/ml, 3 h	77,95±1,78	3,34±0,03	260±2,87	38,18±0,06	1,22±0,035	47±1,44
	1000 µg/ml, 24 h	77,45±1,66	3,06±0,27	237±3,75	37,71±0,38	1,37±0,051	52±2,11

Çizelge 4.7 2000, 6000 ve 12000 µg/ml POX'a maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının enfektifliği

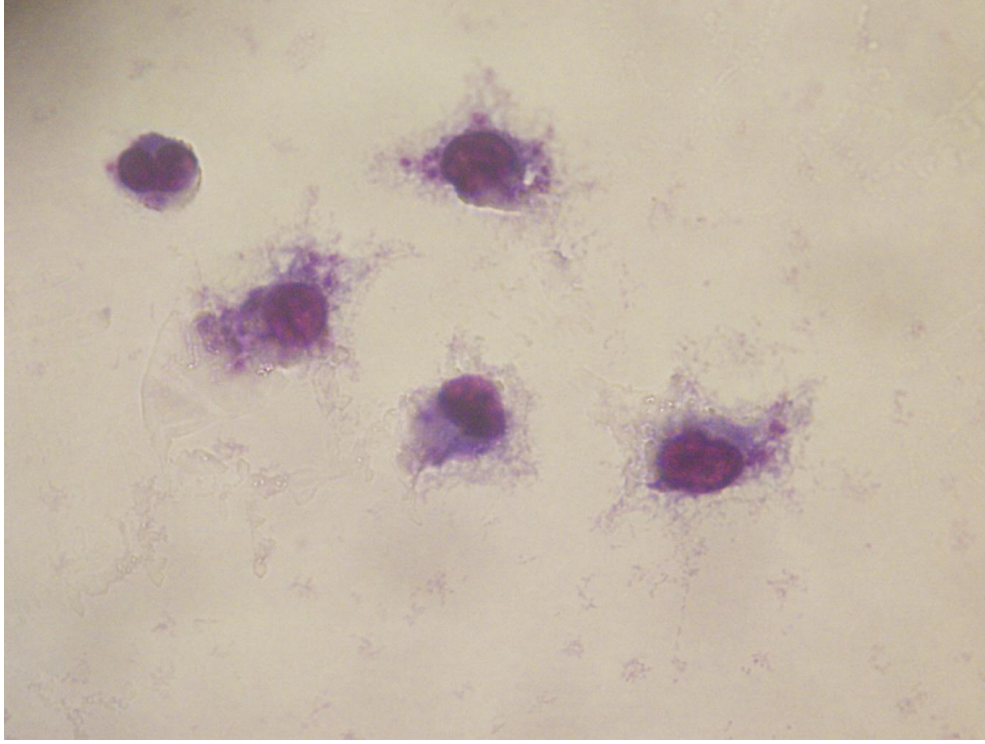
		24 Saat Sonra Enfektiflik			48 Saat Sonra Enfektiflik		
		% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi	% Enfektiflik	Amastigot Sayısı	Enfeksiyon İndeksi
	Kontrol	82,27±1,51	4,2±0,09	346±3,13	42,34±0,1	1,78±0,031	75±1,56
POLİOKSIDONYUM	2000 µg/ml, 1 h	65,23±1,49	2,61±0,04	170±2,11	29,20±0,12	1,01±0,017	29±0,89
	2000 µg/ml , 2 h	66,44±1,65	2,87±0,04	191±3,33	30,12±0,22	1,23±0,043	37±1,15
	2000 µg/ml , 3 h	66,57±1,59	2,34±0,02	156±2,13	30,14±0,09	1,19±0,027	36±1,84
	2000 µg/ml , 24 h	68,15±1,39	2,86±0,35	195±2,98	30,85±0,24	1,21±0,047	37±1,31
	6000 µg/ml , 1 h	12,12±0,04	0,4±0,007	5±0,03*	1,57±0,01	0,2±0,001	0*
	6000 µg/ml , 2 h	13,26±0,06	0,57±0,06	8±0,06*	2,51±0,01	0,27±0,001	1±0,01*
	6000 µg/ml , 3 h	13,44±0,03	0,51±0	7±0,03*	2,86±0,01	0,31±0	1±0,01*
	6000 µg/ml , 24 h	15,17±0,04	0,54±0,01	8±0,05*	3,01±0,01	0,31±0	1±0,01*
	12000 µg/ml , 1 h	1,02±0,004	0,01±0,0002*	0*	0,1±0,001	0,01±0,001	0*
	12000 µg/ml , 2 h	2,2±0,03	0,1±0,003	0*	0,1±0,001	0,01±0,001	0*
	12000 µg/ml , 3 h	3,91±0,04	0,23±0,001	1±0,01*	0,1±0,001	0,01±0,001	0*
	12000 µg/ml , 24 h	4,25±0,03	0,27±0,001	1±0,01*	0,1±0,001	0,01±0,001	0*



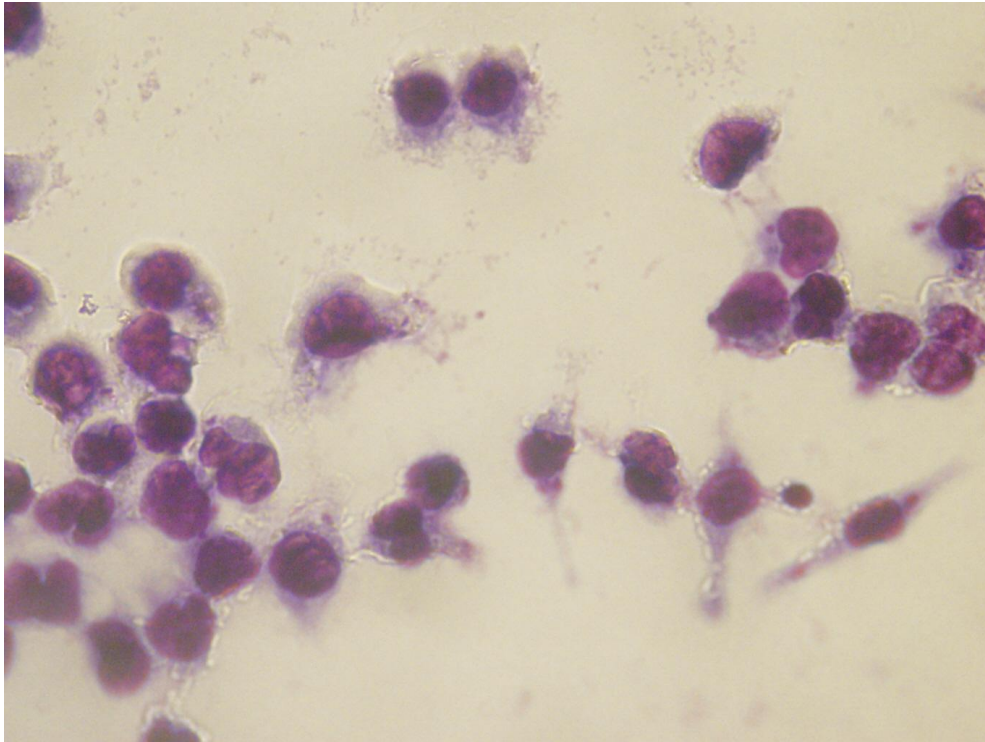
Şekil 4.15 50 µg/ml POX'a bir saat maruz kalmış *L.infantum* promastigotları ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Giemsa boyama, 24 saat sonra, 100x)



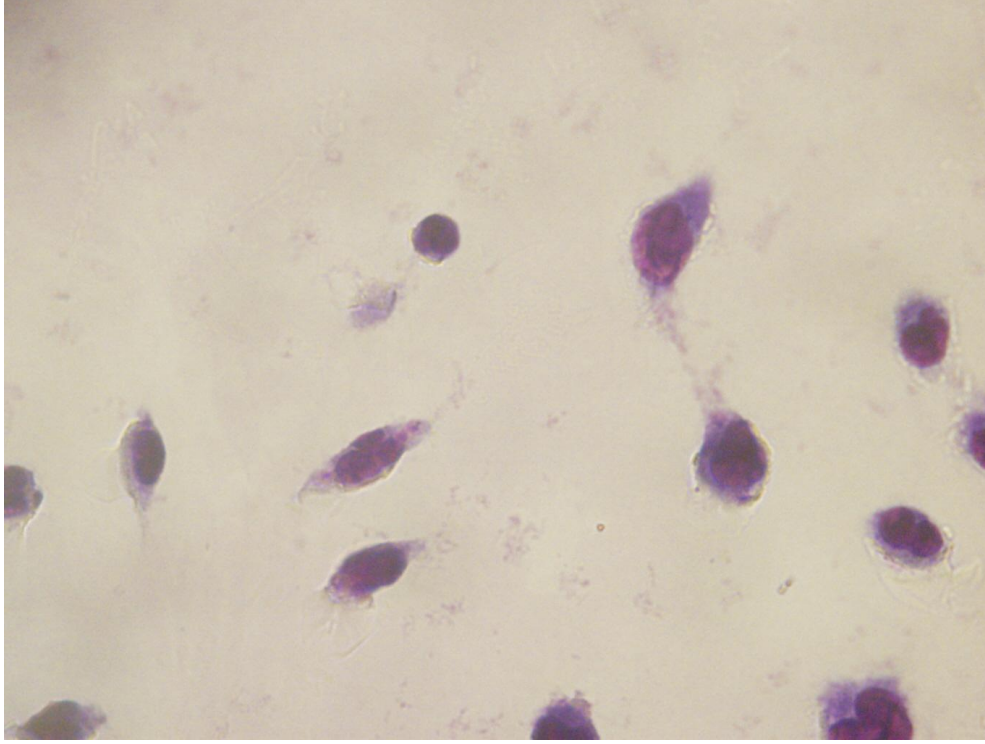
Şekil 4.16 250 µg/ml POX'a bir saat maruz kalmış *L.infantum* promastigotları ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Giemsa boyama, 24 saat sonra, 100x)



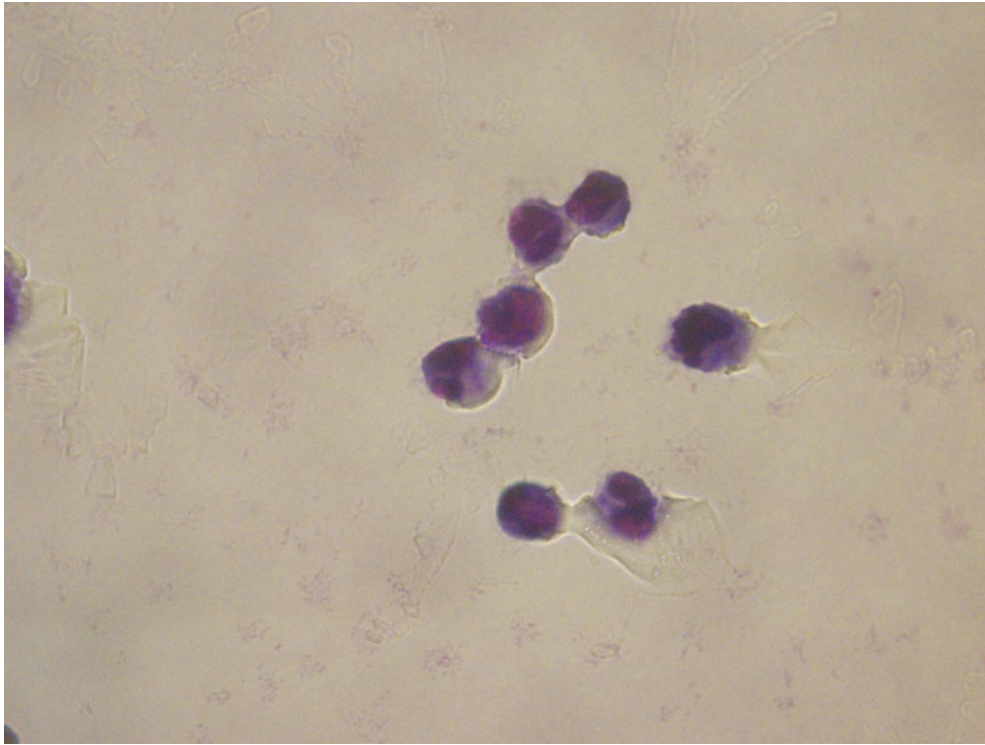
Şekil 4.17 1000 µg/ml POX'a bir saat maruz kalmış *L. infantum* promastigotları ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Giemsa boyama, 24 saat sonra, 100x)



Şekil 4.18 2000 µg/ml POX'a bir saat maruz kalmış *L. infantum* promastigotları ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Giemsa boyama, 24 saat sonra, 100x)



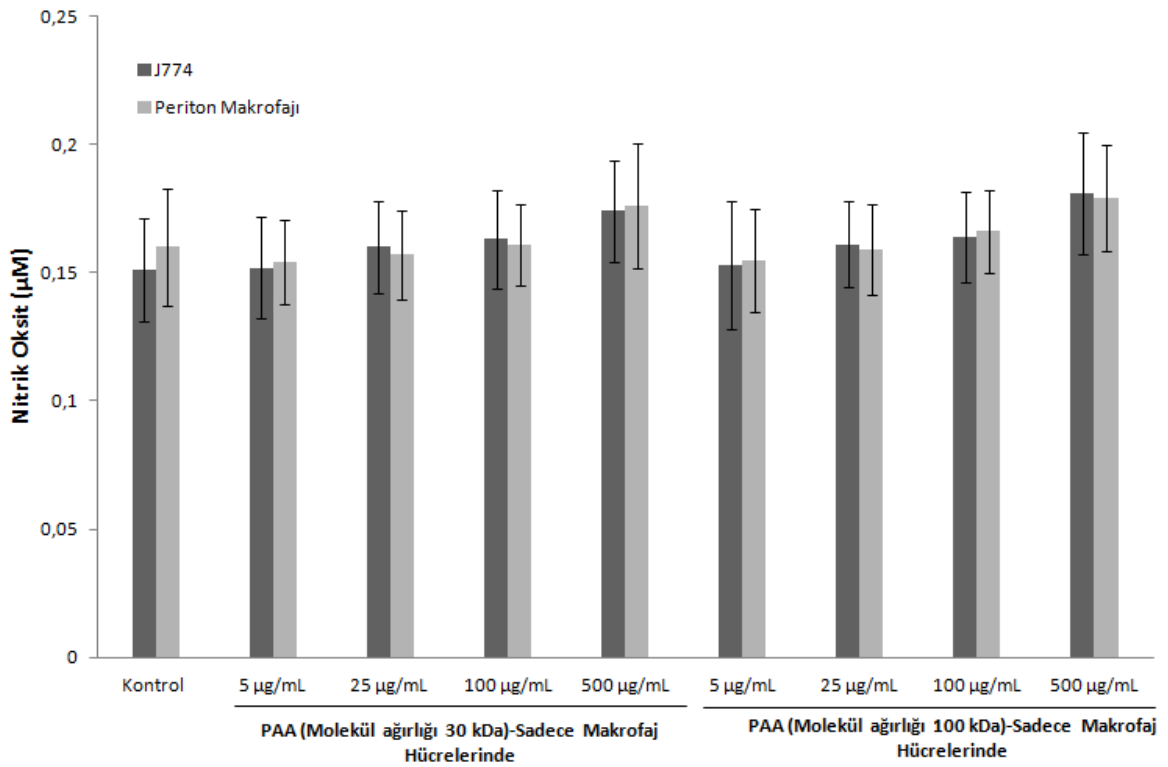
Şekil 4.19 6000 µg/ml POX'a bir saat maruz kalmış *L.infantum* promastigotları ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Giemsa boyama, 24 saat sonra, 100x)



Şekil 4.20 12000 µg/ml POX'a bir saat maruz kalmış *L.infantum* promastigotları ile enfekte olmuş J774 makrofaj hücreleri (Giemsa boyama, 24 saat sonra, 100x)

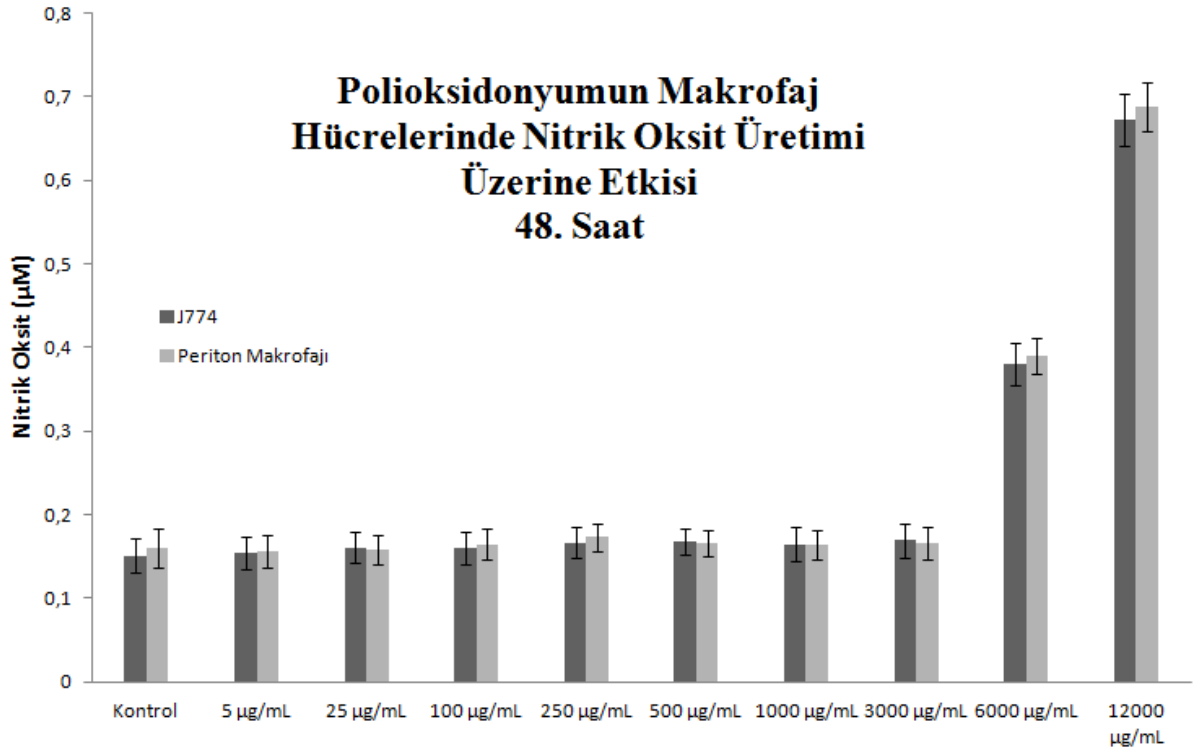
4.6 PAA ve POX'un Makrofaj Kültüründe Nitrik Oksit Üretimine Etki Sonuçları

Makrofaj kaynaklı NO *Leishmania* parazitleri üzerinde sitotoksik etki yapar. Bu yüzden makrofajlar tarafından üretilen NO oldukça önemlidir. Bu çalışmada parazite maruz bırakmaksızın PAA ve POX'un farklı konsantrasyonlarının hem J774 makrofaj hücre hattında hemde primer periton makrofajlarında NO üretimine etkisi incelenmiş ve Griess Reaktifi kullanılarak üretilen NO miktarı ölçülmüştür. Molekül ağırlığı 30 ve 100 kDa olan PAA'nın 5, 25, 100 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarında hem J774 makrofaj hücre hattında hemde primer periton makrofajlarında NO üretimine etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlara göre sadece PAA'nın makrofaj hücrelerinde NO üretimine etkisi olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21 PAA'nın farklı makrofaj hücrelerinde NO üretimine etkisi

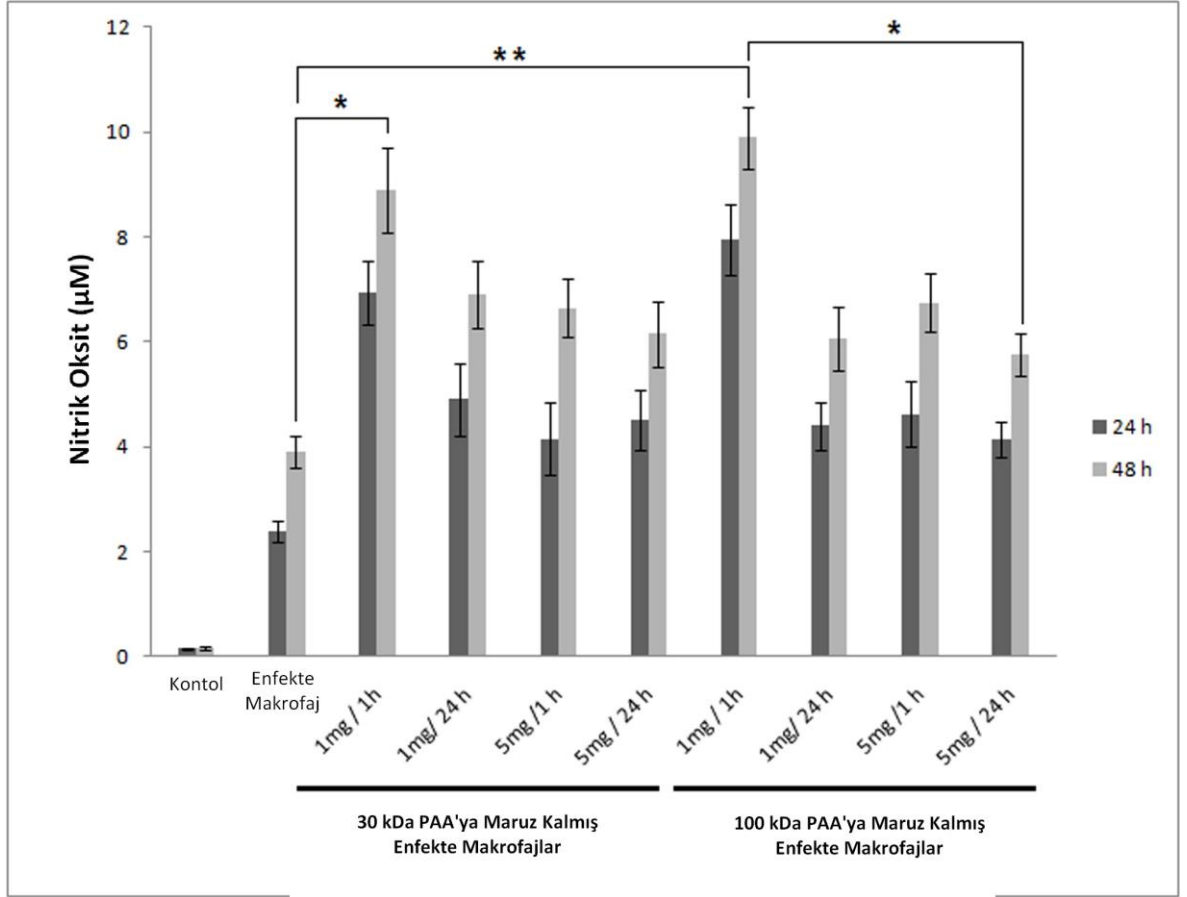
POX'un 5, 25, 100, 250, 500, 1000, 3000, 6000 ve 12000 µg/ml konsantrasyonlarında hem J774 makrofaj hücre hattında hemde primer periton makrofajlarında NO üretimine etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlara göre sadece POX'un makrofaj hücrelerinde NO üretimine etkisi 6000 ve 12000 µg/ml olan konsantrasyonlarda gösterilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 POX'un farklı makrofaj hücrelerinde NO üretimine etkisi

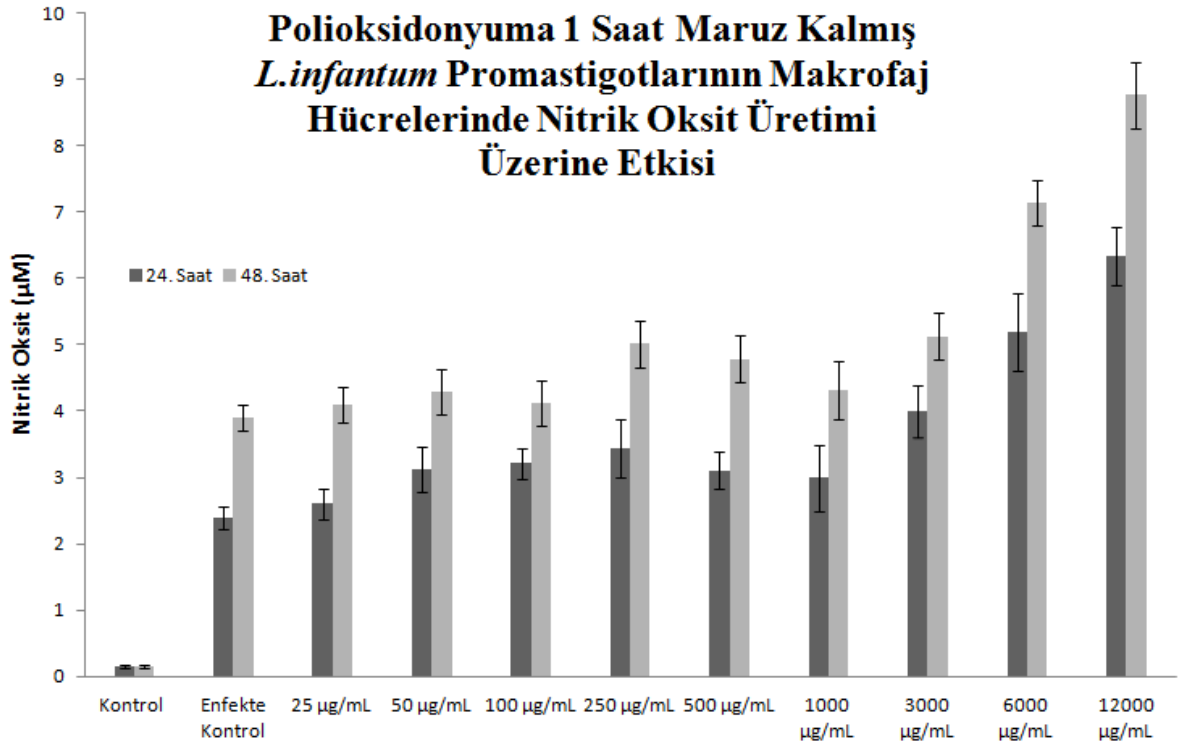
4.7 PAA ve POX'a Maruz Tutulan Promastigotların Makrofaj Kültüründe Nitrik Oksit Üretimine Etki Sonuçları

Makrofaj kaynaklı NO *Leishmania* parazitleri üzerinde sitotoksik etki yapar. Fakat doğal enfeksiyonlarda parazitler makrofajların NO üretimini inhibe ederek hayatta kalabilirler. Polimerlere maruz kalan parazitlerin enfektiflik özelliklerini kaybetmesi, makrofajlar tarafından öldürülme ve bunun da NO üretiminin bir etkisi olup olmadığını incelemek amacıyla Griess Reaktifi kullanılarak üretilen NO miktarı ölçülmüştür. PAA'nın farklı konsantrasyonlarına maruz kalmış *L.infantum* parazitlerinin NO üretimine etkisi incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.23'te gösterilmiştir. Buna göre sadece PAA'nın makrofajlarda NO üretimine etkisi olmazken parazitin özellikle 1 mg/ml PAA'ya bir saat maruz kalan konsantrasyonlarında NO üretiminde kontrole göre fark görülmüştür ($p < 0,05$). Ayrıca diğer konsantrasyonlardaki PAA'ya maruz kalan parazitlerde de kontrole göre anlamlı fark belirlenmiştir.

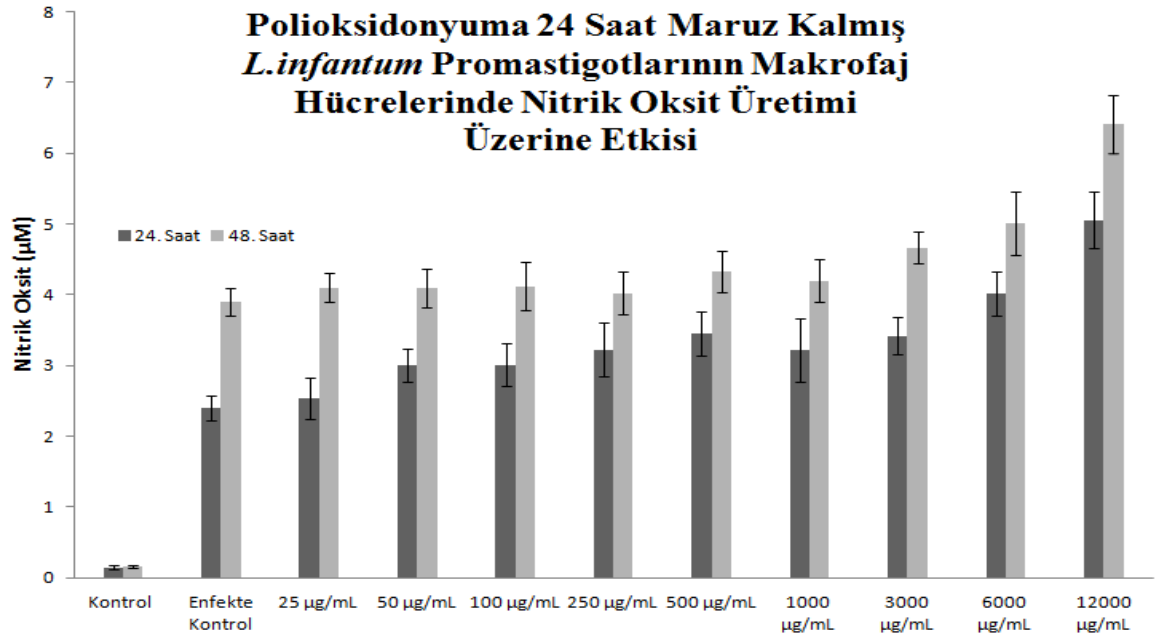


Şekil 4.23 PAA'ya maruz kalan *L. infantum* promastigotlarının J774 makrofaj hücrelerinde NO üretimine etkisi

POX'un 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 3000, 6000 ve 12000 µg/ml konsantrasyonlarının maruz kalmış *L. infantum* promastigotlarının J774 makrofaj hücre hattında NO üretimine etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlara göre sadece POX'un makrofaj hücrelerinde NO üretimine etkisi 6000 ve 12000 µg/ml olan konsantrasyonlarda gösterilmiştir (Şekil 4.24). Özellikle 6000 ve 12000 µg/ml POX olan konsantrasyonlarda parazitlerin polimere maruz tutulduğunda meydana enfektiflik düşüşünün, makrofajlar tarafından üretilen NO üretimini destekler nitelikte olduğu görülmektedir.

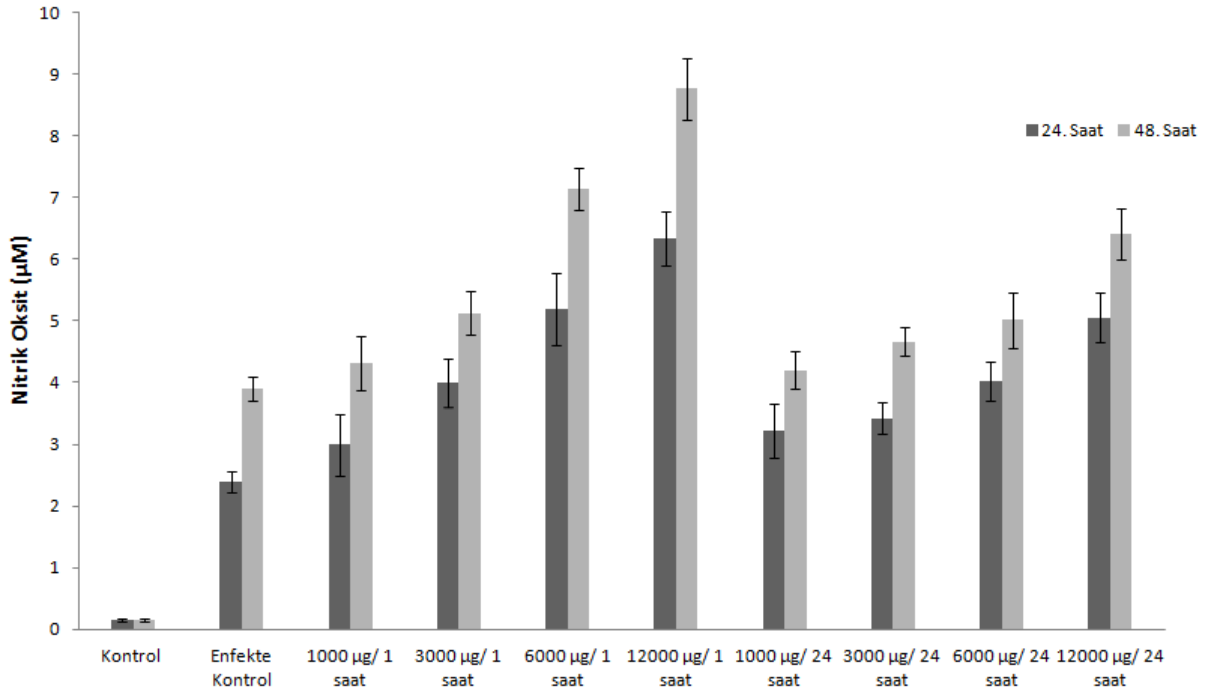


Şekil 4.24 Farklı konsantrasyonlarda polioksidonyuma bir saat maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının makrofaj hücrelerinde NO üretimi üzerine etkisi



Şekil 4.25 Farklı konsantrasyonlarda polioksidonyuma 24 saat maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının makrofaj hücrelerinde NO üretimi üzerine etkisi

Farklı konsantrasyonlarda polioksidonyuma 1 ve 24 saat maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının makrofaj hücrelerinde NO üretimi üzerine etkisine Şekil 4.26'da aynı grafikte bakıldığında özellikle 6000 ve 12000 µg/ml POX olan konsantrasyonlara 1 saat maruz kalmış parazitlerin NO üretimine daha fazla etkisi olduğu belirlenmiştir.

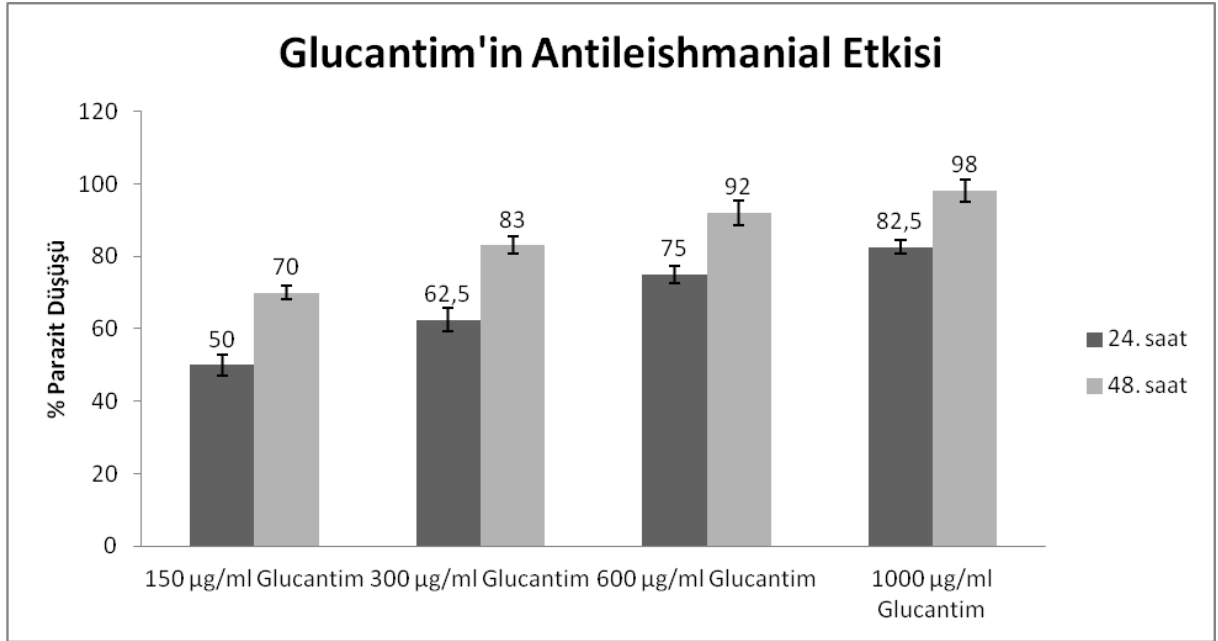


Şekil 4.26 Farklı konsantrasyonlarda polioksidonyuma 1 ve 24 saat maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının makrofaj hücrelerinde NO üretimi üzerine etkisi

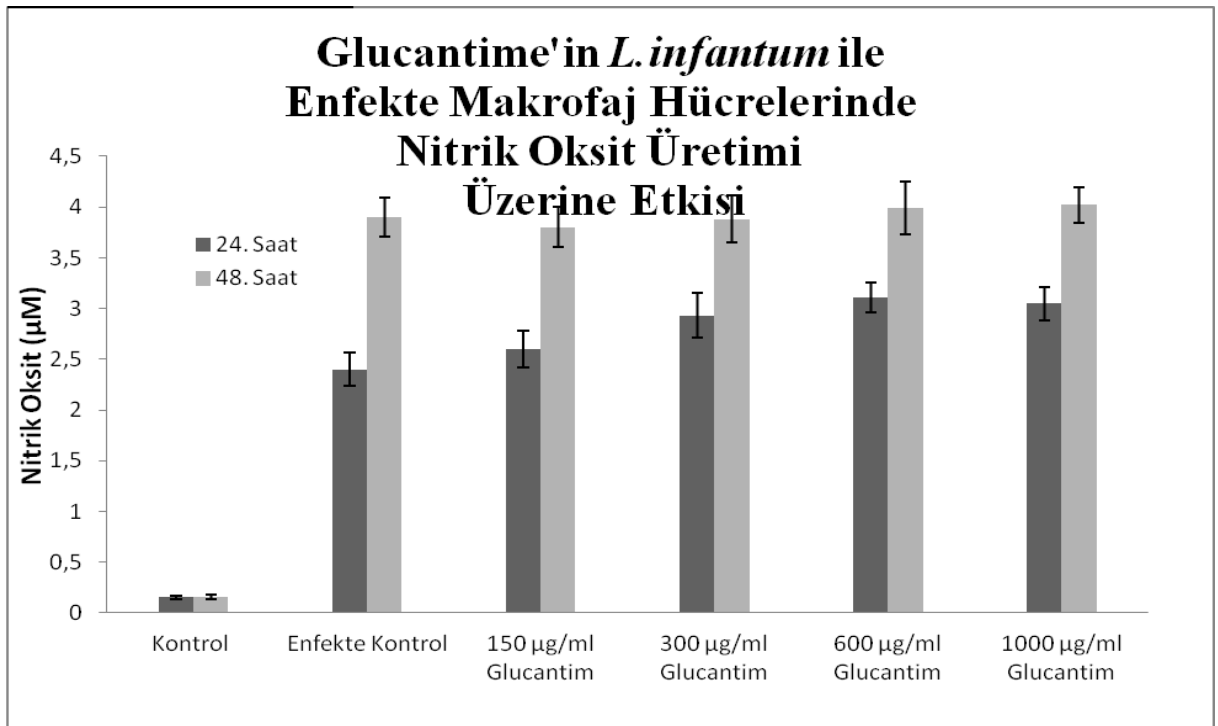
4.8 PAA ve POX'un Antileishmanial Etkisinin Amastigot-Makrofaj Kültüründe İnceleme Sonuçları

Amastigot kültüründe ise parazitler hücre içinde olduğu için makrofajların lizise uğratılarak hücre dışına salınması gerekmektedir. Bu yüzden protokol olarak normal MTT yöntemine göre farklılıklar içermektedir. Bu amaçla daha önce elde ettiğimiz amastigot-makrofaj kültürlerine 150, 300, 600 ve 1000 µg/ml olacak şekilde Glucantime, 25, 50, 250, 500 µg/ml olacak şekilde PAA son olarak 150, 300, 750, 1500, 3000, 6000 v3 12000 µg/ml olacak şekilde POX eklenmiştir. PAA, POX ve Glucantime eklendikten 24 ve 48 saat sonra amastigot canlılığını ölçmek amacıyla MTT yapılmıştır. Şekil 4.27'de Glucantim'in antileishmanial etkisine bakıldığında 1000 µg/ml

konsantrasyonda parazit canlılığı %98 azalmıştır. Glucantime Leishmaniasis tedavisinde kullanılan bir ilaç olmasına rağmen parazitlerin tamamını öldürememiştir.

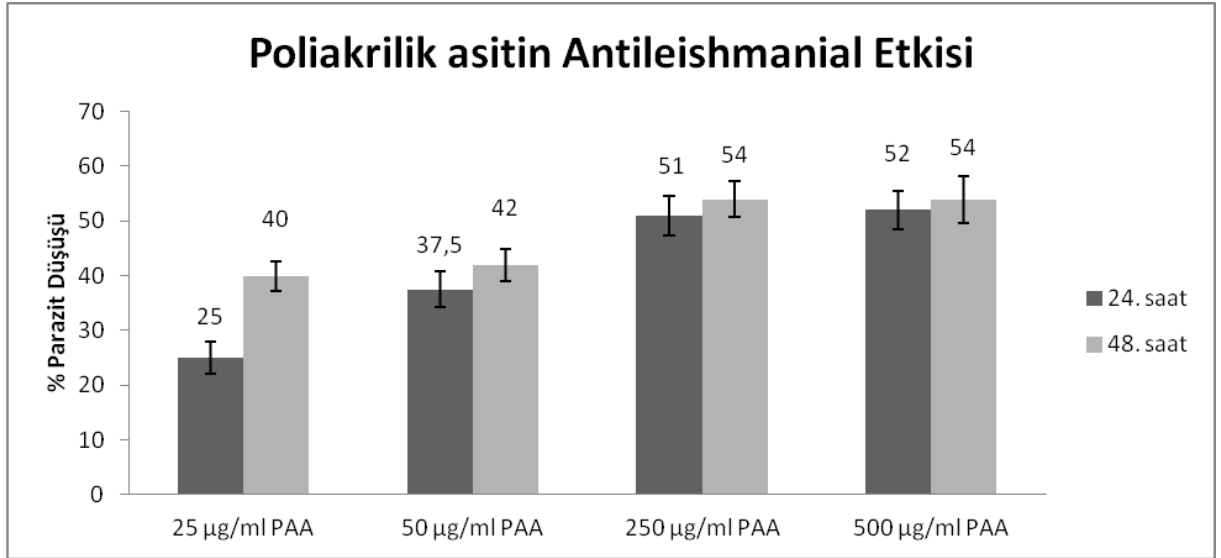


Şekil 4.27 Glucantim'in hücre içi amastigot kültüründe antileishmanial etkisi
Glucantim'in amastigot kültüründe NO üretimine baktığımızda, enfekte makrofajlar tarafından NO üretimine etkisi olmadığı Şekil 4.28'de görülmektedir.



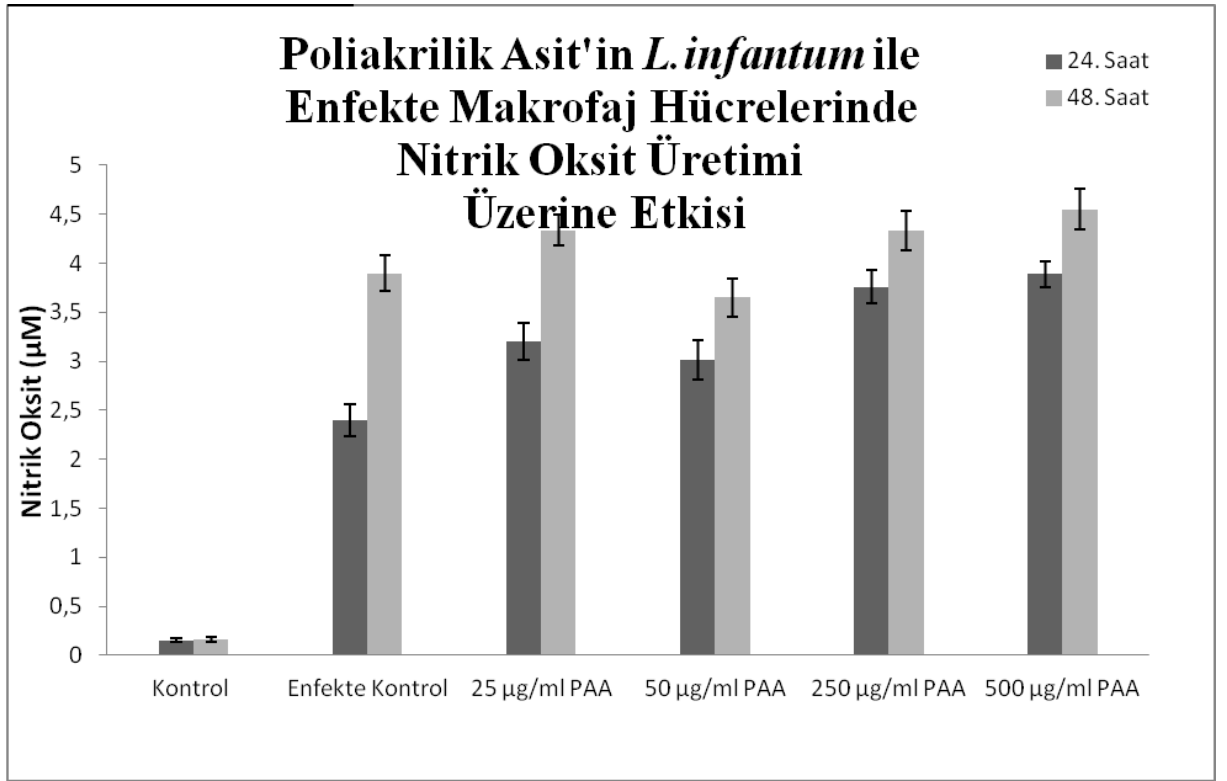
Şekil 4.28 Glucantim'in hücre içi amastigot kültüründe NO üretimine etkisi

Şekil 4.29'da PAA'nın antileishmanial etkisine bakıldığında 500 µg/ml konsantrasyonda parazit canlılığı %54 azalmıştır. Bu sonuçlara göre PAA'nın antileishmanial etkisi yetersizdir. Bunun en önemli nedeni kullanılan konsantrasyonların zaten makrofajlarda toksik etki göstermesidir.



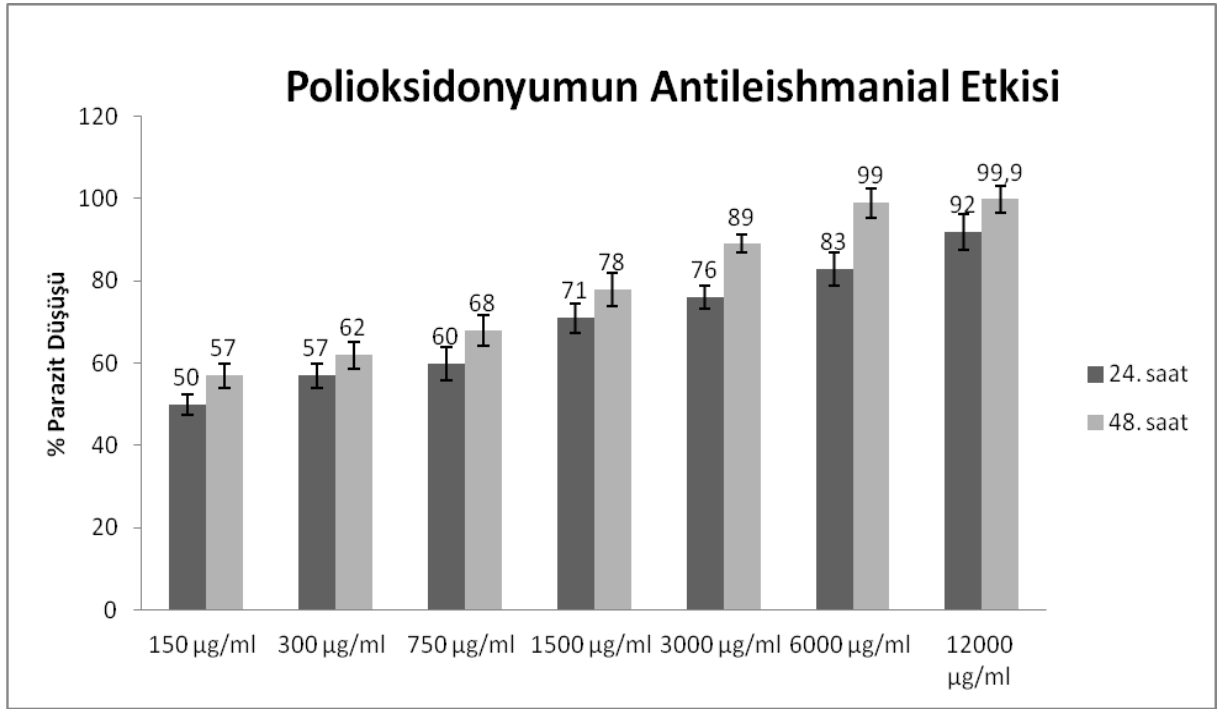
Şekil 4.29 PAA'nın hücre içi amastigot kültüründe antileishmanial etkisi

PAA'nın amastigot kültüründe NO üretimine baktığımızda, enfekte makrofajlar tarafından NO üretimine etkisi olmadığı Şekil 4.30'da görülmektedir.

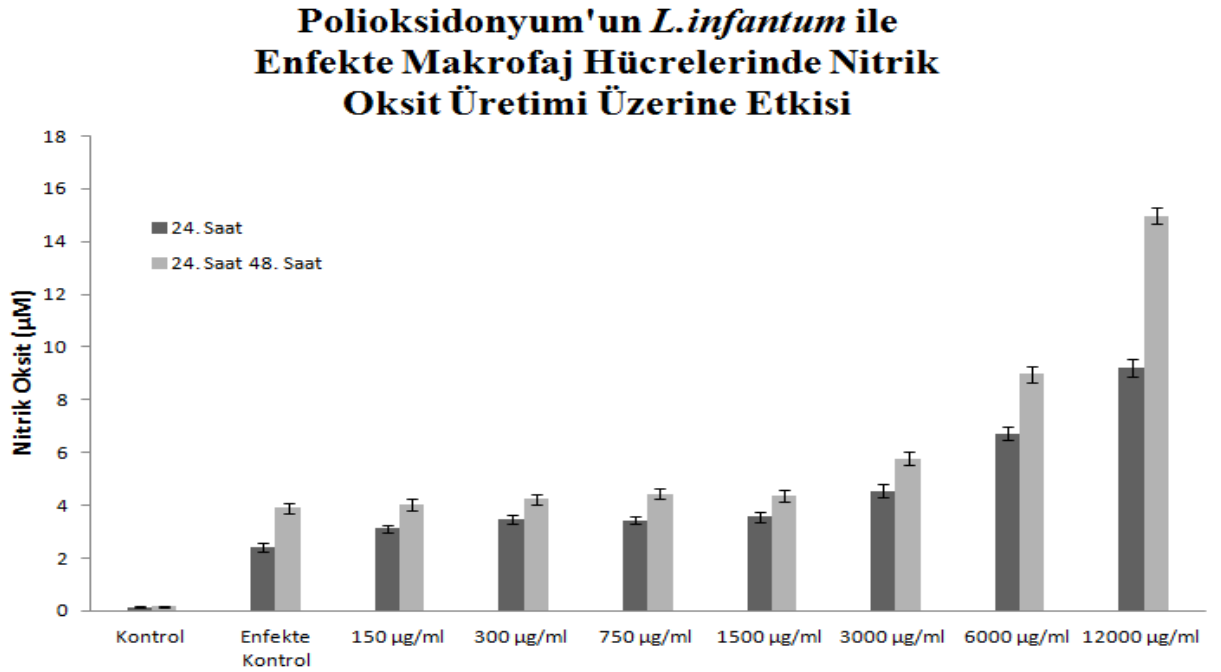


Şekil 4.30 PAA'nın hücre içi amastigot kültüründe NO üretimine etkisi

Şekil 4.31'de POX'un antileishmial etkisine bakıldığında 6000 ve 12000 µg/ml konsantrasyonda kontrole göre parazit canlılığı %99 ve %99,9 azalmıştır. Elde edilen bu sonuçlar Glucantime ile kıyaslandığında kullanılan bu konsantrasyonlarda POX'un hem toksik olmaması hemde ciddi oranda amastigot ve promastigot canlılığını azaltması, makrofajlarda NO üretimini indüklemesi, polimerin ileride *Leishmania* tedavisinde kullanılabilecek önemli bir ilaç olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.31 POX'un hücre içi amastigot kültüründe antileishmanial etkisi

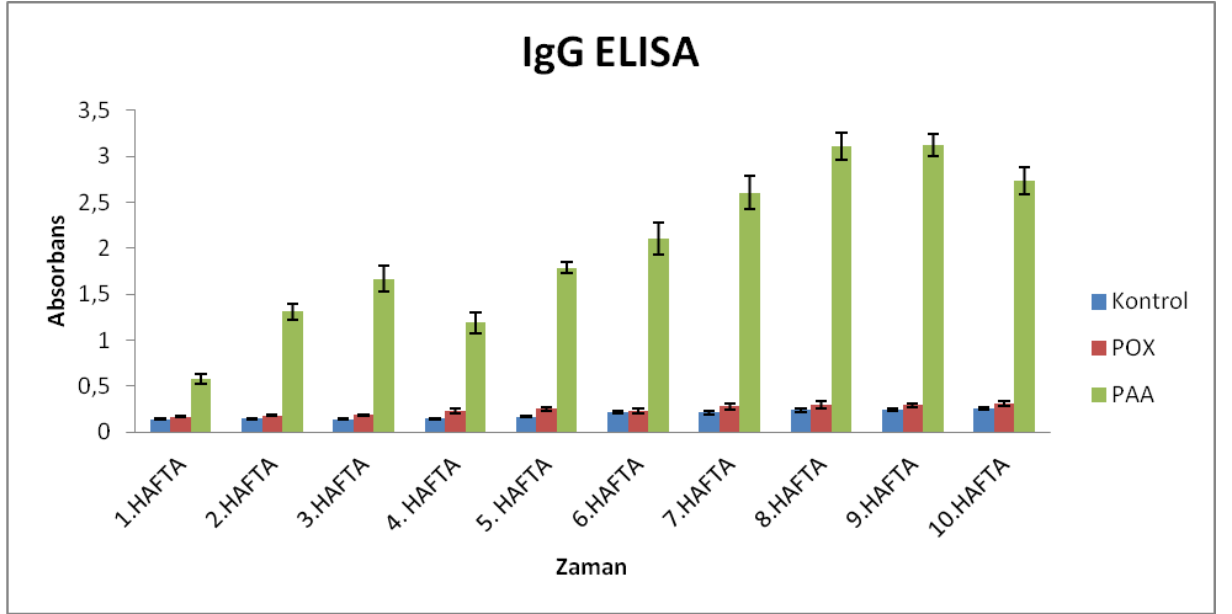


Şekil 4.32 POX'un hücre içi amastigot kültüründe NO üretimine etkisi

5. *IN VIVO* ÇALIŞMA SONUÇLARI

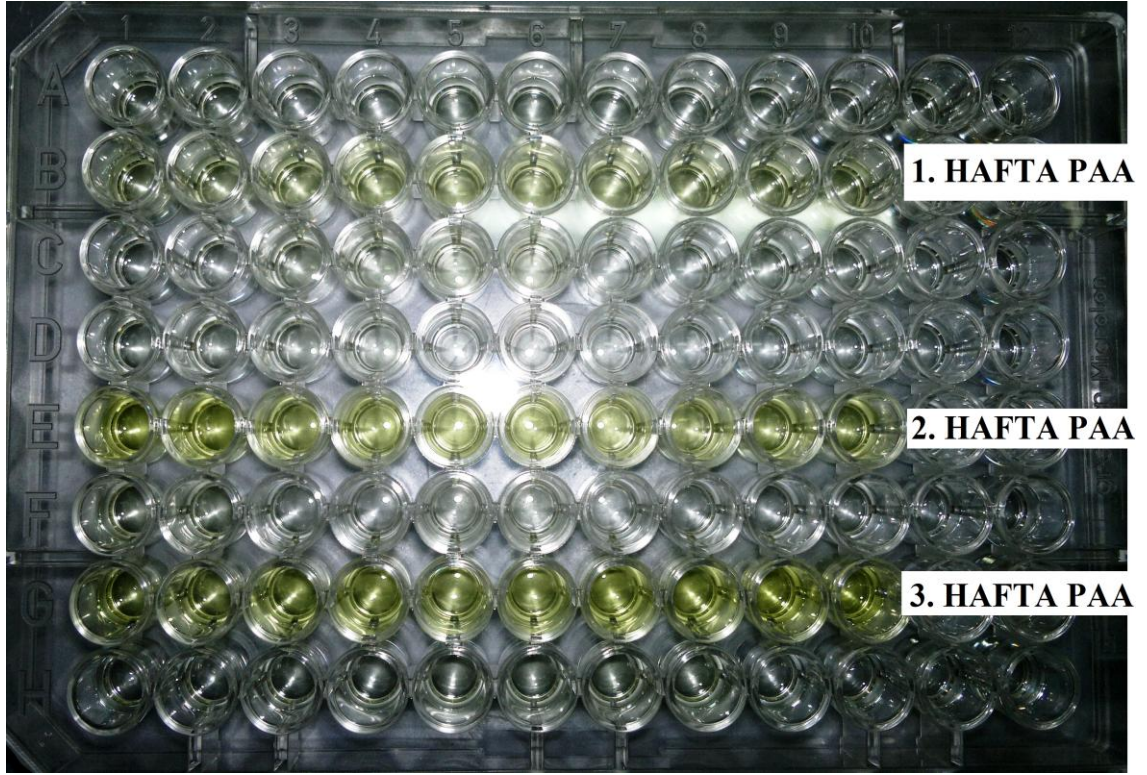
5.1 PAA ve POX'a Maruz Tutulan Promastigotların Fare Serumlarında Antileishmanial Antikor Seviyelerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

ELISA testi sonucunda 5 mg PAA ve 12 mg POX'a bir saat maruz tutulan promastigotların fare serumlarında antileishmanial antikor seviyelerinin absorbans değerleri Şekil 5.1'te sunulmuştur. Fare çalışmasının ilk 4 haftasında 2 deney grubuna PAA ve POX'a maruz kalan parazitler verilirlen kontrol grubuna sadece PBS verilmiştir. 4. haftada ise tüm gruplar polimerlerin aşı etkinliğini ölçmek amacıyla enfeksiyon bulaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ilk 4 haftada sadece PAA'ya maruz bırakılan parazitlere karşı, antileishmanial IgG antikorları oluşurken POX verilen gruplarda herhangi bir antikor yanıtı alınamamıştır. Farelerde yapılan doğal *L.infantum* enfeksiyonlarında parazitlerin IgG antikor yanıtını engelleyerek Th2 tip immün yanıtın oluşmasını sağladığı ve bu nedenle enfeksiyonun ilerlediği tespit edilmiştir. Fakat yaptığımız çalışmada PAA'ya maruz kalan parazitlerin immün sistemi yönlendiremedikleri Th1 tip immün yanıtın oluşarak parazite karşı önemli bir koruma sağlanmıştır. 4. haftada enfeksiyon bulaştırmak amacıyla metasiklik enfektif parazit açısından zengin olan stasyoner faz promastigotları fare gruplarına verildiğinde yine sadece PAA içeren grupta 2. İmmünizasyon etkisi yaratarak her hafta artış gösterecek şekilde absorbans artışı olmuştur. Enfeksiyon sonrası kontrol ve POX içeren grupta çok düşük seviyede antileishmanial IgG üretimi olsada PAA içeren grupta kıyaslanamıyacak seviyededir (Şekil 5.1).



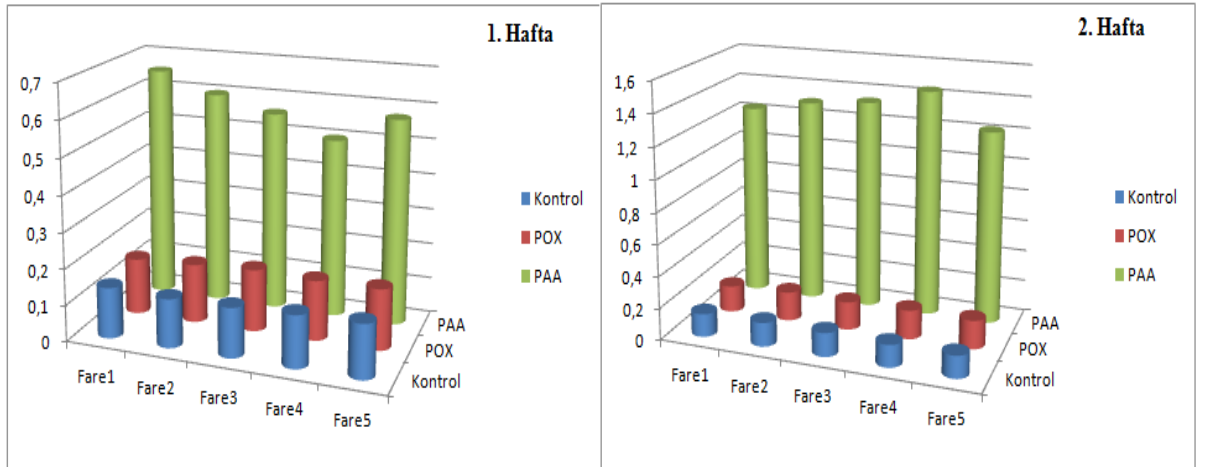
Şekil 5.1 PAA ve POX'a maruz tutulan promastigotların fare serumlarında antileishmanial antikor seviyeleri

Şekil 5.2'de ELISA testi sonucunda 5 mg PAA ve 12 mg POX'a bir saat maruz tutulan promastigotların ilk 3 hafta boyunca fare serumlarında antileishmanial antikor seviyelerinin göstergesi olan renk oluşumu görülmektedir. PAA'nın ilk haftadan itibaren antikor üretimine ne kadar etkisi olduğu şekilden görülmektedir. Sadece PAA içeren gruplarda antikor yanıtı oluşurken POX içeren gruplarda herhangi bir antikor yanıtı oluşmamıştır.

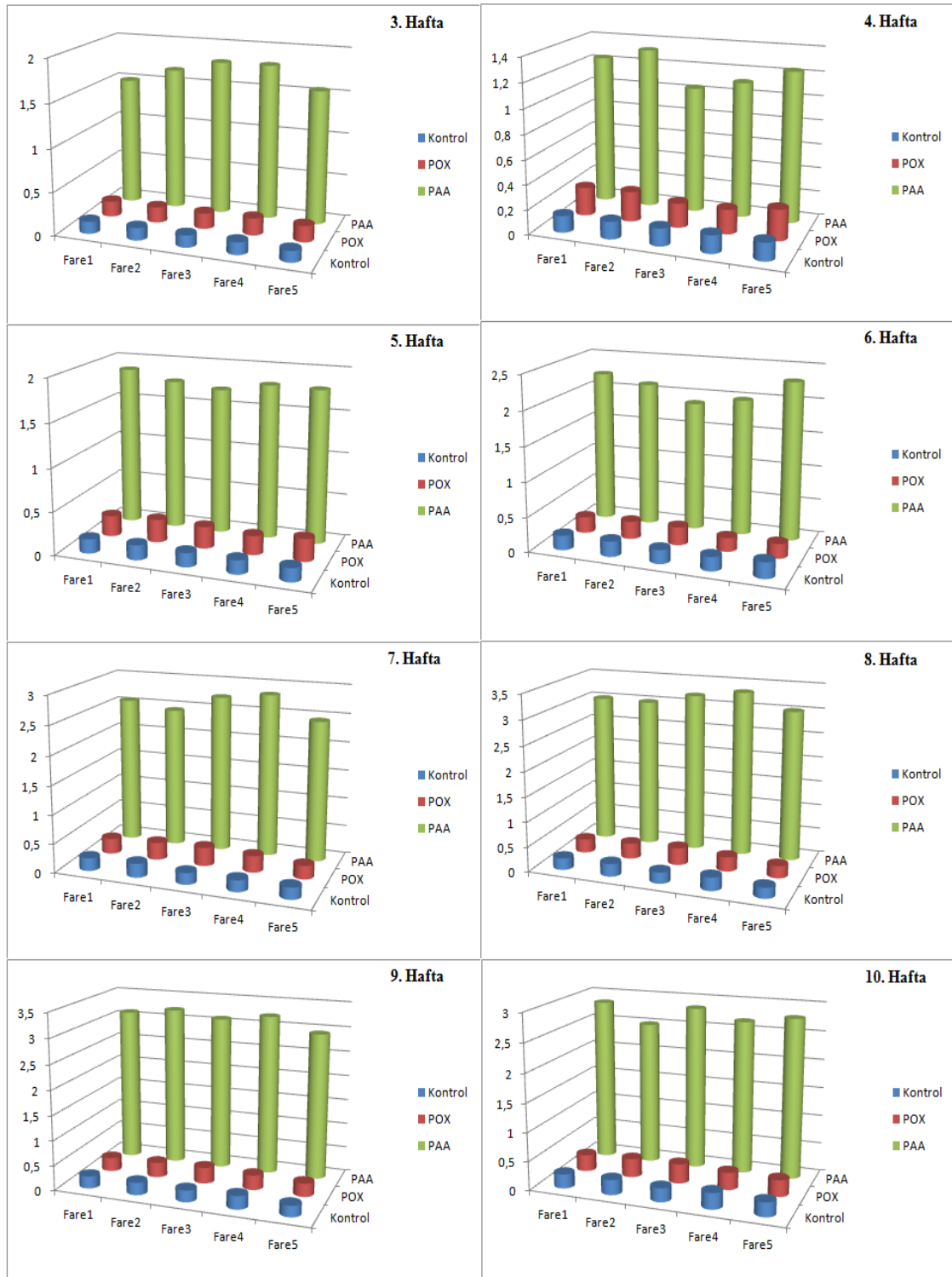


Şekil 5.2 İlk 3 hafta boyunca farelerde oluşan antikor şiddeti

Kontrol, POX ve PAA fare gruplarına karşı 10 hafta boyunca oluşan antikor yanıtları Şekil 5.3 ve 5.4'te verilmiştir.



Şekil 5.3 1. ve 2. hafta antileishmanial antikor seviyesi



Şekil 5.4 Haftalara göre antileishmanial antikor seviyesi

5.2 Giemsa Boyama ve Mikro Kültür Yöntemi (MKY) ile Fare Periferik Kanında Parazit Varlığının Belirlenmesi

Giemsa boyama ile periferik kanda yapılan incelemelerde duyarlılık oldukça düşüktür. Bunun nedeni kandaki parazit sayısının oldukça düşük sayıda olmasıdır. Bu nedenle Mikrokültür yönteminde parazit sayısına göre değerlendirme tarafımızdan geliştirilen Çizelge 3.3'teki değerlendirme ile yapıldı.. Bu yöntemin temeli kapiler tüp içinde mikroaerofilik ortamda bulunan hücre içi amastigotların 27 °C'lik etüvde hareketli promastigotlara dönüşmesine dayanır. Mikrokültür yöntemi özellikle asemptomatik *Leishmania* enfeksiyonlarında bile oldukça duyarlıdır. Yaptığımız çalışmalarda immunize gruplarda parazit redaksiyonu beklendiğinden parazit varlığını belirlemek giemsa yöntemi ile oldukça zordur. PAA ve POX'a maruz kalan parazitler canlı olduğu için ilk 4 hafta boyunca farelerden alınan kan örneklerinde giemsa boyama ve MKY ile tarama yapılmıştır. Sonuçlara göre ne giemsa ne de MKY ile ilk 4 hafta boyunca kanda parazit tespit edilememiştir. Fakat 5. Haftadan itibaren tüm incelenen gruplarda parazit yoğunluğuna göre farklıklar tespit edilmiştir (Çizelge 5.1).

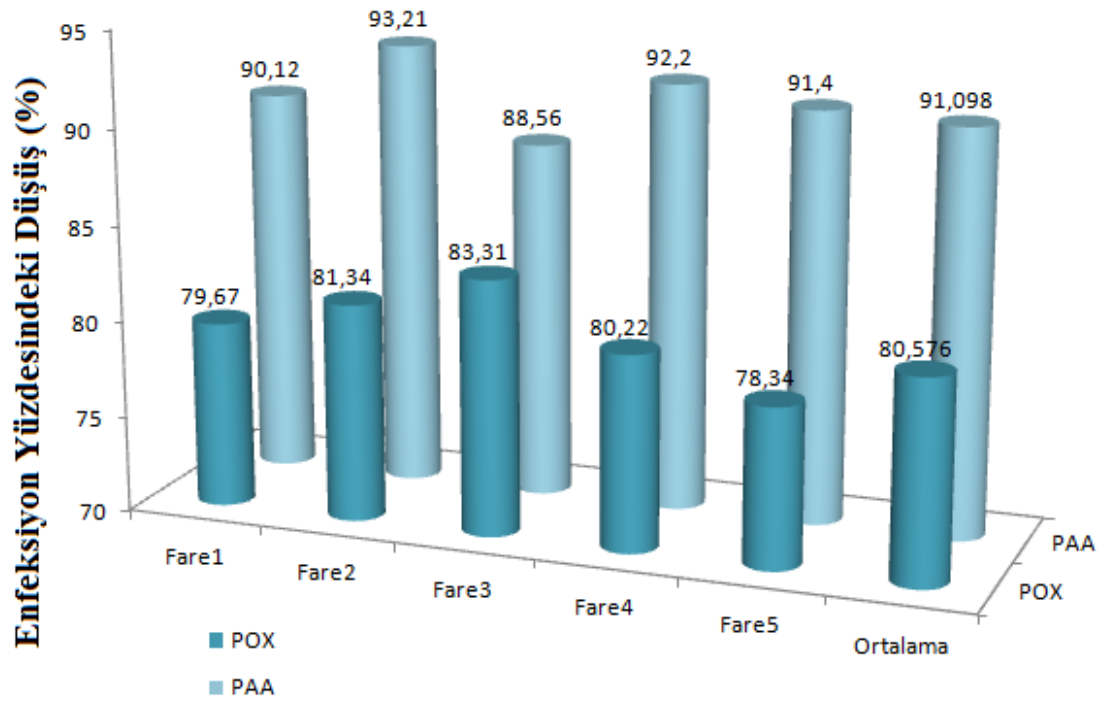
Çizelge 5.1 Giemsa ve Mikrokültür yöntemi ile fare periferik kanında parazit derecelendirme sonuçları

	5. hafta		6. hafta		7. hafta		8. hafta	
	Giemsa	MCM	Giemsa	MCM	Giemsa	MCM	Giemsa	MCM
Kontrol	0	4+	0	5+	1+	6+	1+	6+
PAA- <i>L.infantum</i>	0	1+	0	1+	0	0	0	0
POX- <i>L.infantum</i>	0	2+	0	2+	0	2+	0	1+

5.3 Periton Makrofajların *In Vitro* Efektiflik Sonuçları

Leishmania aşı çalışmalarında, aşı tarafından indüklenmiş koruyucu immün yanıt iki şekilde değerlendirilir. Bunlardan birincisi parazit yükündeki düşüşü değerlendirmede kullanılan *in vitro* periton makrofaj modelleri diğeri ise enfeksiyon sonrası *in vivo* fare modellerinde karaciğer yada dalaktaki parazit yükünü belirlemeye dayanır. Elde edilen

sonuçlara göre enfekte periton makrofajların yüzdesi ve enfekte olmuş makrofaj başına düşen amastigot sayısı kontrol grubu ile kıyaslandığında immünize edilmiş gruplarda daha düşük olduğu belirlendi. Enfeksiyon indeksindeki en belirgin azalma PAA'ya maruz kalmış fare gruplarında görülürken (%91,098±1,87) POX'a maruz kalan fare gruplarında ise ortalama %80,576±1,81'lik bir düşüş belirlenmiştir (Şekil5.5).

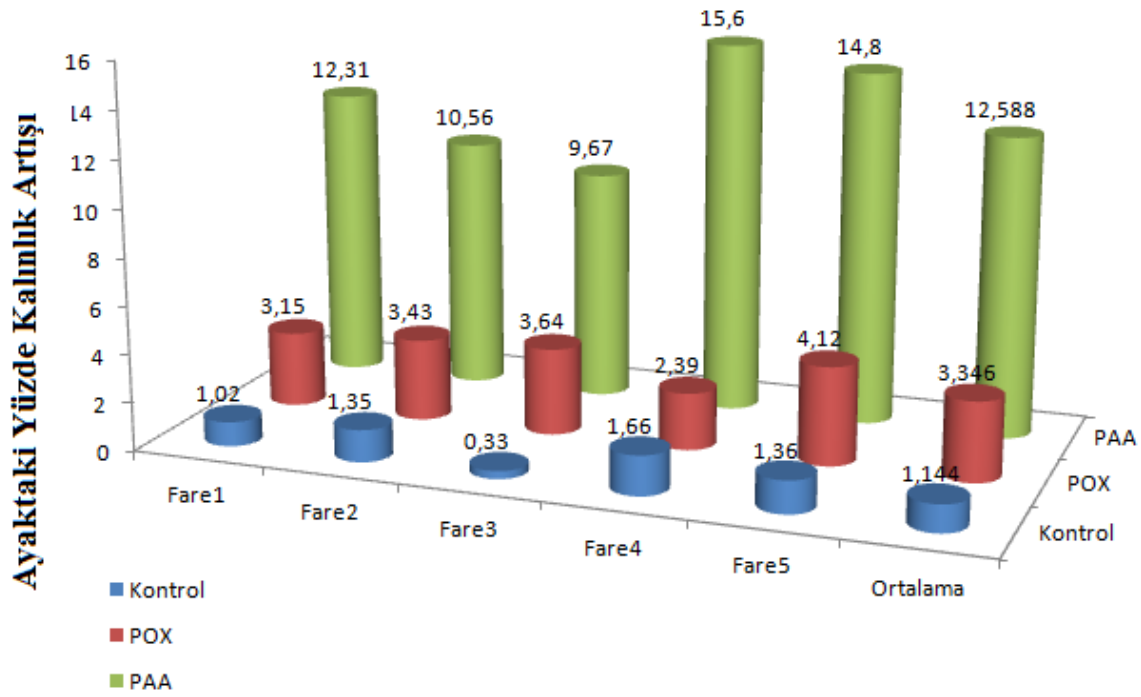


Şekil 5.5 POX ve PAA'ya maruz kalmış fare gruplarında kontrole göre enfeksiyon yüzdesindeki düşüş

5.4 Gecikmiş Tip Aşırıduyarlılık (DTH) Yanıtı

İnsan ve hayvanlarda başarılı bir aşılamanın iki kriteri vardır bunlardan birincisi verilen antijene karşı indüklenen *in vivo* gecikmiş tip aşırıduyarlılık yanıtıdır. İkincisi ise antijene karşı oluşan *in vitro* T hücre stimülasyonudur. Bu yüzden aşı çalışmamızda her iki kriterde denenmiştir. Buna göre gecikmiş tip aşırıduyarlılık yanıtı en fazla PAA'ya maruz

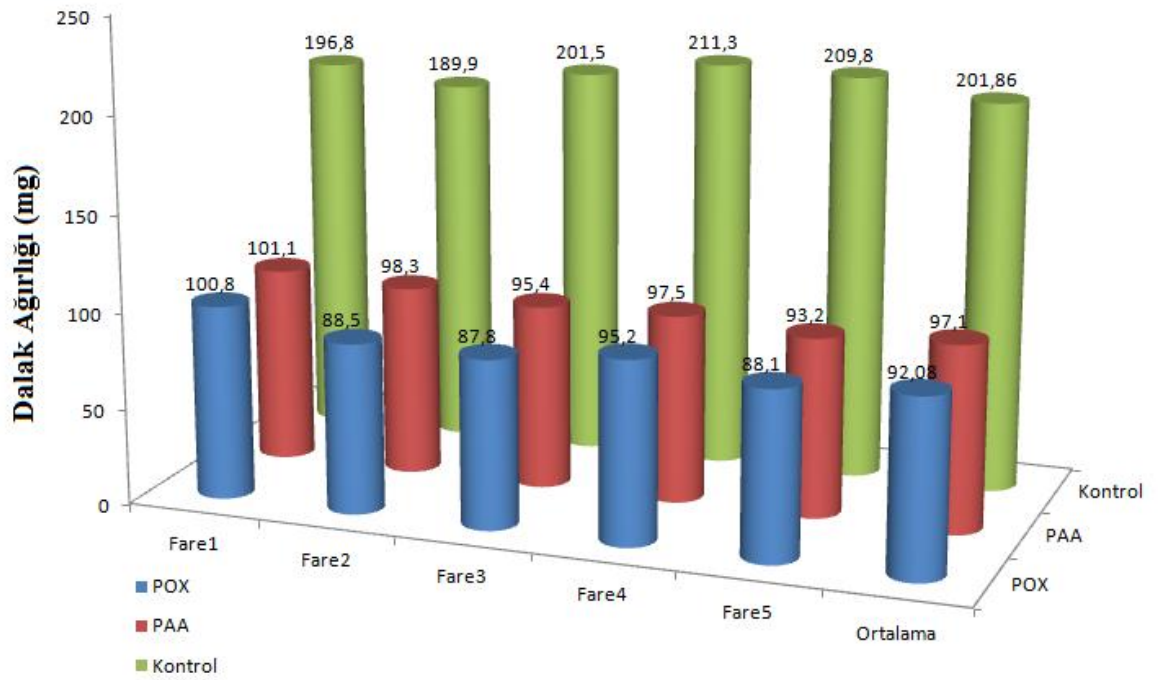
kalmış parazitlerin verildiği deney grubunda tespit edilmiştir. Ayrıca POX'a maruz kalmış parazitlerin verildiği deney grubunda kontrole göre fark belirlenmiştir. Böylece ayaktaki yüzde kalınlık artışı PAA olan fare grubunda $12,588 \pm 2,582$, POX olan fare grunda $3,346 \pm 0,612$ son olarak kontrol grubunda ise $1,144 \pm 0,508$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.6).



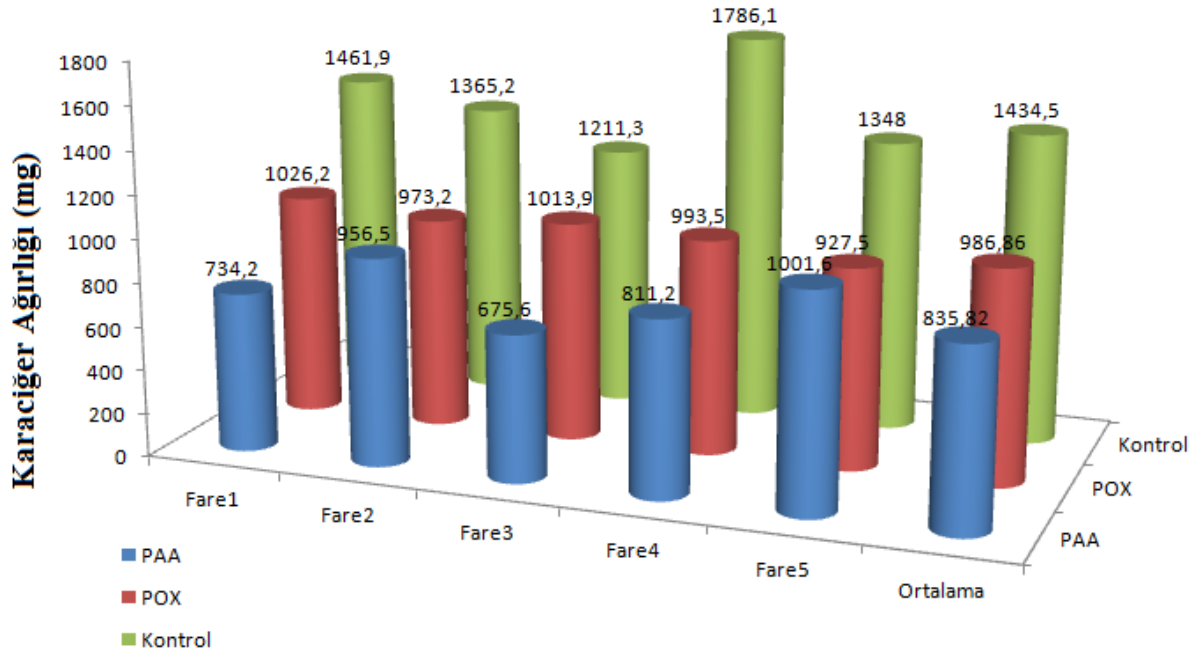
Şekil 5.6 DTH yanıtına bağlı olarak POX ve PAA'ya maruz kalmış fare grupları ve kontrolde ayaktaki yüzde kalınlık artışı

5.5 Dalak ve Karaciğer Ağırlıklarının Belirlenmesi

Visseral leishmaniasisin en önemli klinik bulgularından biri dalak ve karaciğer ağırlığında meydana gelen artıştır. POX ve PAA'ya maruz kalmış fare grupları ve kontroldeki dalak ve karaciğer ağırlıkları ölçülmüş ve ortalamaları Şekil'da verilmiştir. Sağlıklı Balb/c farelerde ortalama dalak ağırlığı 100 mg'dır. Elde edilen sonuçlara göre dalak ağırlığı PAA olan fare grubunda $97,1 \pm 2,98$, POX olan fare grunda $92,08 \pm 5,76$ son olarak kontrol grubunda ise $201,86 \pm 8,95$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.7). Karaciğer ağırlığı ise PAA olan fare grubunda $835,92 \pm 140,2$ POX olan fare grunda $986,86 \pm 38,83$ son olarak kontrol grubunda ise $1435,5 \pm 215,9$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.8).



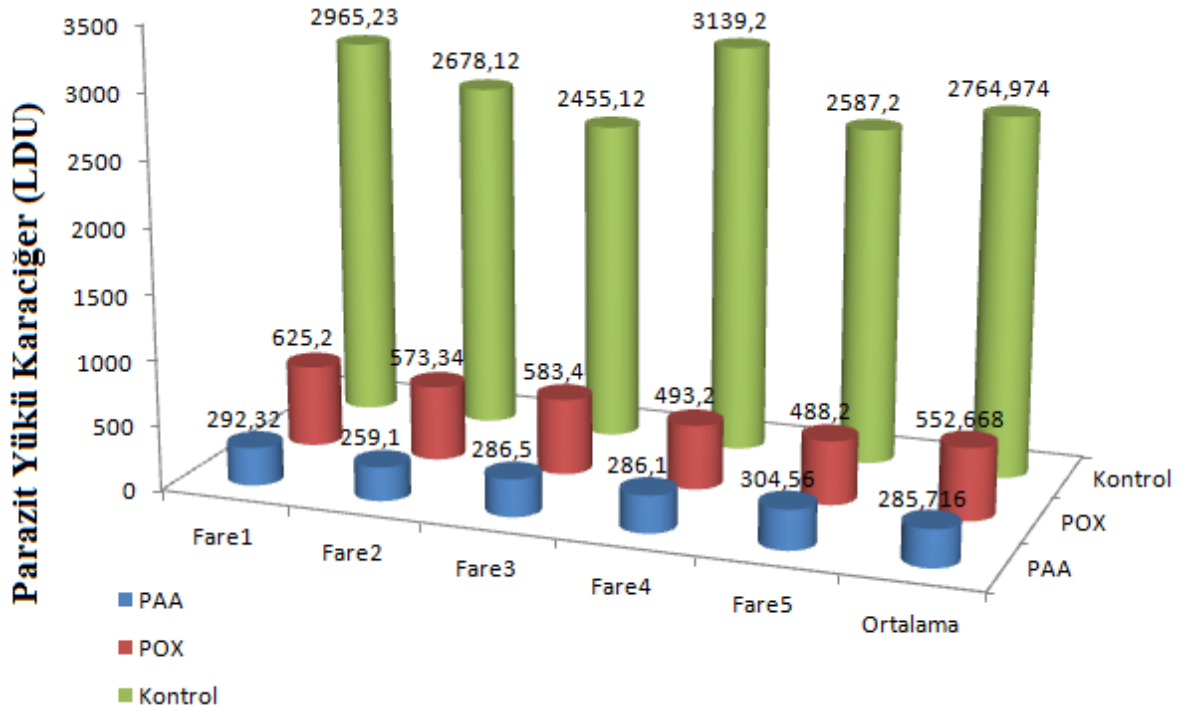
Şekil 5.7 POX ve PAA'ya maruz kalmış fare grupları ve kontrol grubunun dalak ağırlığı (mg)



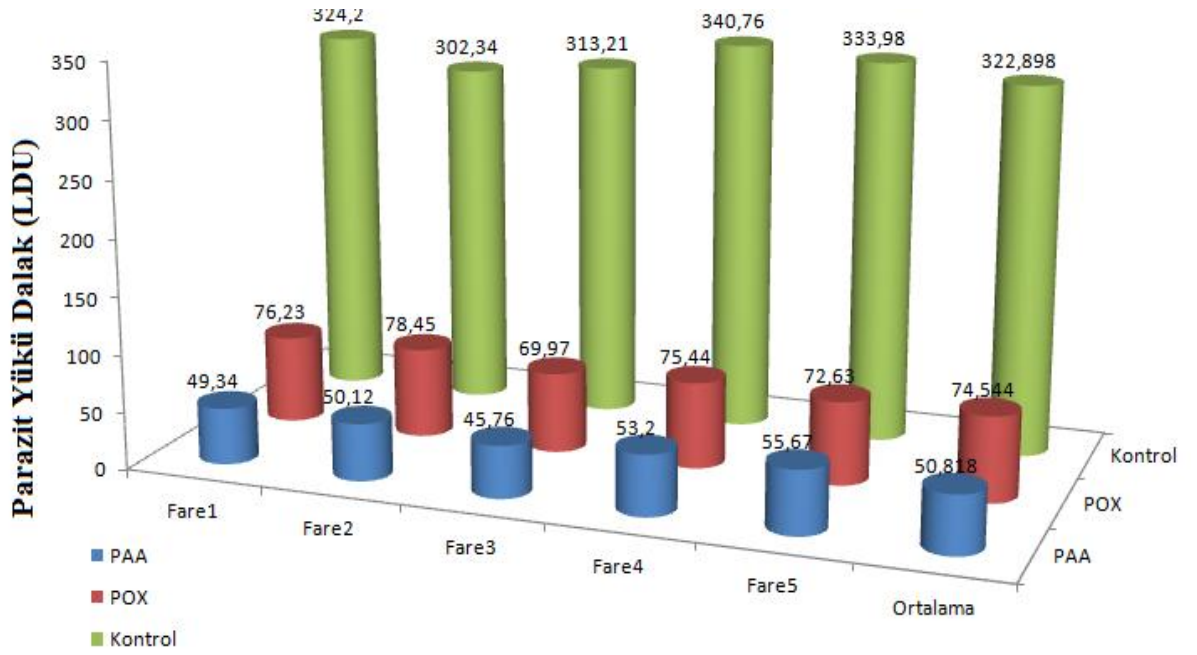
Şekil 5.8 POX ve PAA'ya maruz kalmış fare grupları ve kontrol grubunun karaciğer ağırlığı (mg)

5.6 Karaciğer ve Dalaktan Simir Hazırlanması ve Enfeksiyonun Değerlendirilmesi

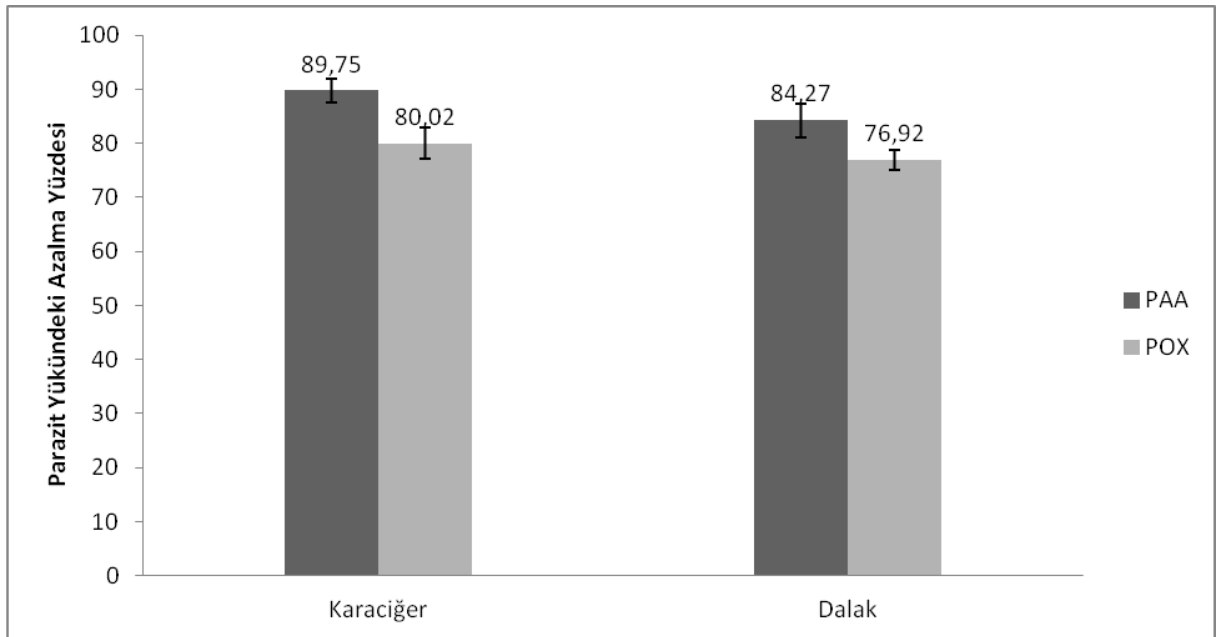
Parazit yükü Leishman-Donovan Units (LDU) kullanılarak hesaplandıktan sonra immünize gruplarda meydana gelen parazit yükündeki azalma Şekil 5.11’de gösterilmiştir. PAA’ya maruz kalan parazitlerin verildiği fare grubunda, oluşan immün yanıtı bağlı olarak parazit yükünde anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir. Elde edilen sonuçlara göre karaciğere ait LDU değeri PAA olan fare grubunda $285,716 \pm 16,64$, POX olan fare grubunda $552,668 \pm 59,84$ son olarak kontrol grubunda ise $2764,974 \pm 280,75$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.9). Elde edilen sonuçlara göre dalağa ait LDU değeri ise PAA olan fare grubunda $50,818 \pm 3,79$, POX olan fare grubunda $74,544 \pm 3,29$ son olarak kontrol grubunda ise $322,898 \pm 15,49$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.10). Dalak ve karaciğer parazit yüküne bağlı olarak POX ve PAA’ya maruz kalmış fare gruplarına ait parazit yükündeki azalma yüzdeleri PAA dalak için $84,27 \pm 2,98$, PAA karaciğer için $89,75 \pm 2,12$, POX dalak için $76,92 \pm 1,88$ ve son olarak POX karaciğer için $80,02 \pm 3,11$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.11).



Şekil 5.9 POX ve PAA’ya maruz kalmış fare grupları ve kontrol grubunun karaciğer parazit yükü (LDU)



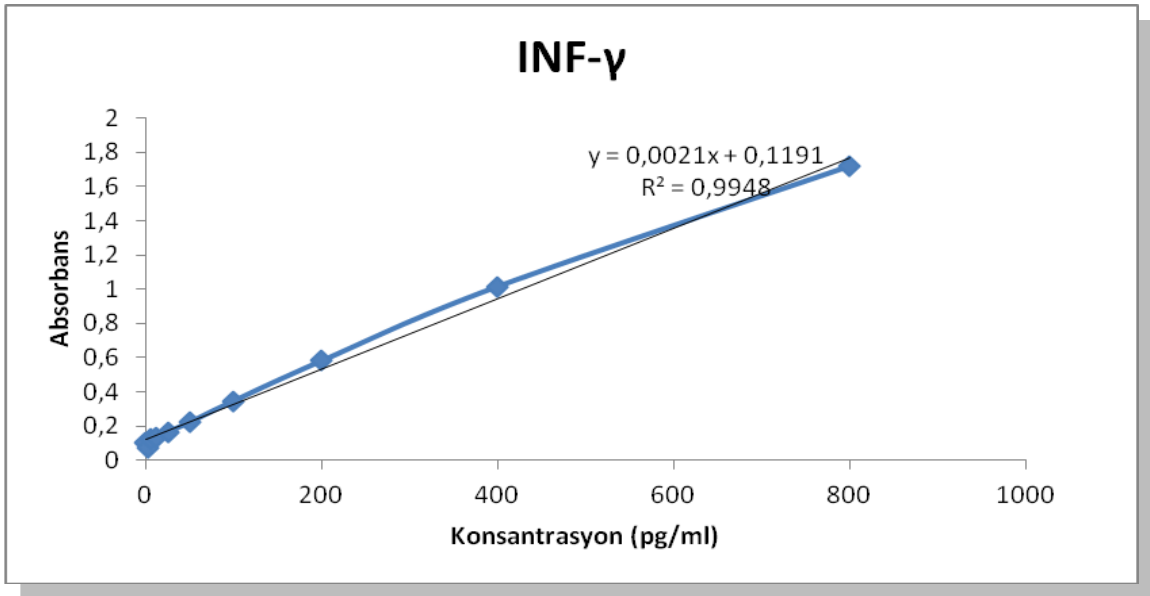
Şekil 5.10 POX ve PAA'ya maruz kalmış fare grupları ve kontrol grubunun dalak parazit yükü (LDU)



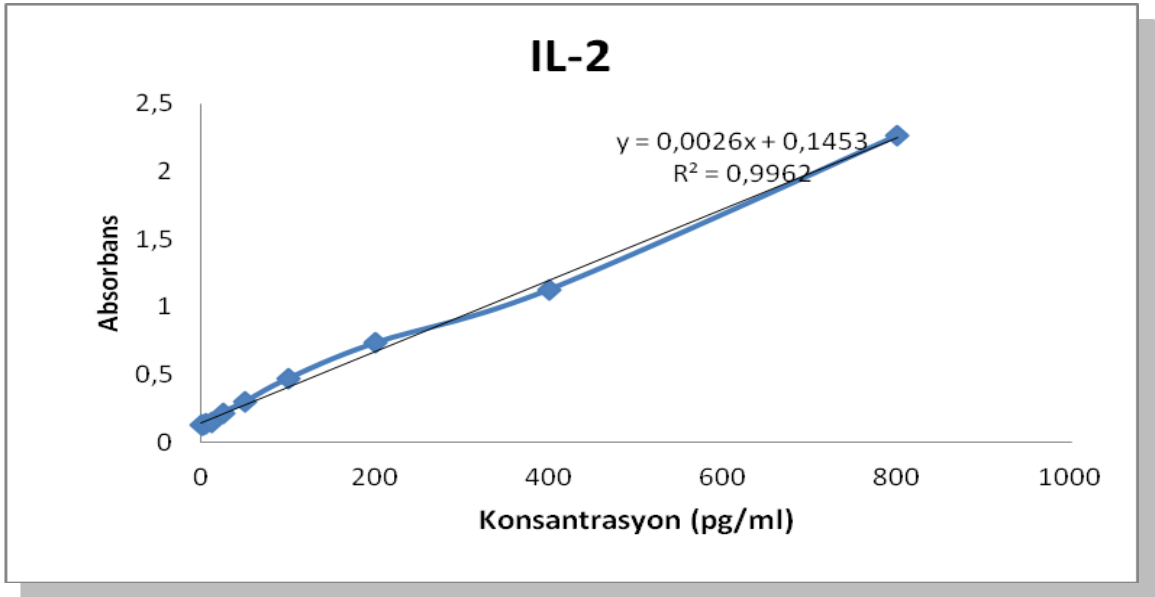
Şekil 5.11 POX ve PAA'ya maruz kalmış fare grupları ve kontrol grubunun dalak ve karaciğere ait parazit yükündeki azalma yüzdeleri

5.7 POX ve PAA'ya Maruz Kalmış Fare Grupları Ve Kontrol Grubunun Sitokin Yanıtları

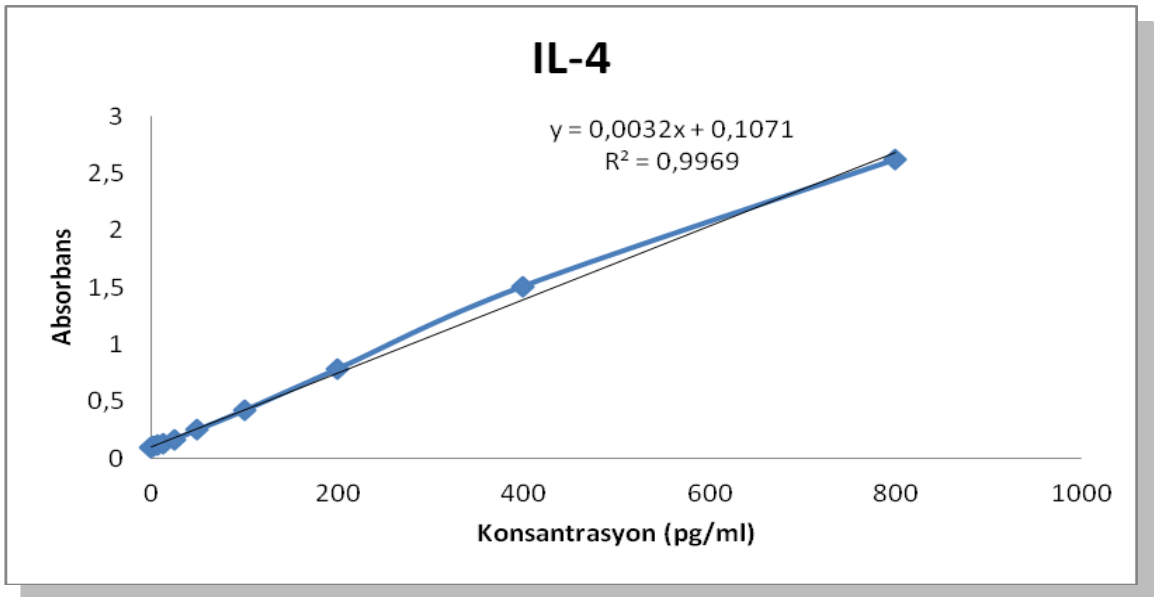
Leishmania enfeksiyonlarında makrofajların aktivasyonu ve hücre içi parazitlerin öldürülmesine bağlı olarak Th1 ve Th2 yanıtları arasında bir denge vardır. *Leishmania* enfeksiyonlarına karşı direnç genel olarak CD4⁺ T lenfositlerin alt tipi olan Th1 hücrelerinin çoğalarak IFN- γ üretmeleriyle ilişkilidir. Böylece Th1 tarafından IFN- γ üretilerek makrofajların aktivasyonu sağlanır. Aktive olmuş makrofajlar ise serbest O₂ radikalleri ve NO üreterek amastigotların öldürülmesi sağlanır. Ayrıca IFN- γ Th2 alt tip lenfositleri baskılar ve buna bağlı olarak IL-4 üretimini engeller. Bu durum *Leishmania* enfeksiyonlarında koruyucu immün yanıtın oluşmasında oldukça önemli bir kriterdir. *Leishmania* enfeksiyonlarına duyarlı kişilerde genel olarak Th2 lenfositlerine bağlı olarak IL-4 ve IL-10 sitokinleri üretilir. Bu sitokinlerden IL-4, Th1 lenfositlerin çoğalmasını inhibe eder. Bu yüzden *Leishmania* aşı çalışmalarında sitokin ölçümleri oldukça önemlidir. Sitokin ölçümlerine ait standart grafikler Şekil 5.12, 5.13, 5.14 ve 5.15'te gösterilmiştir.



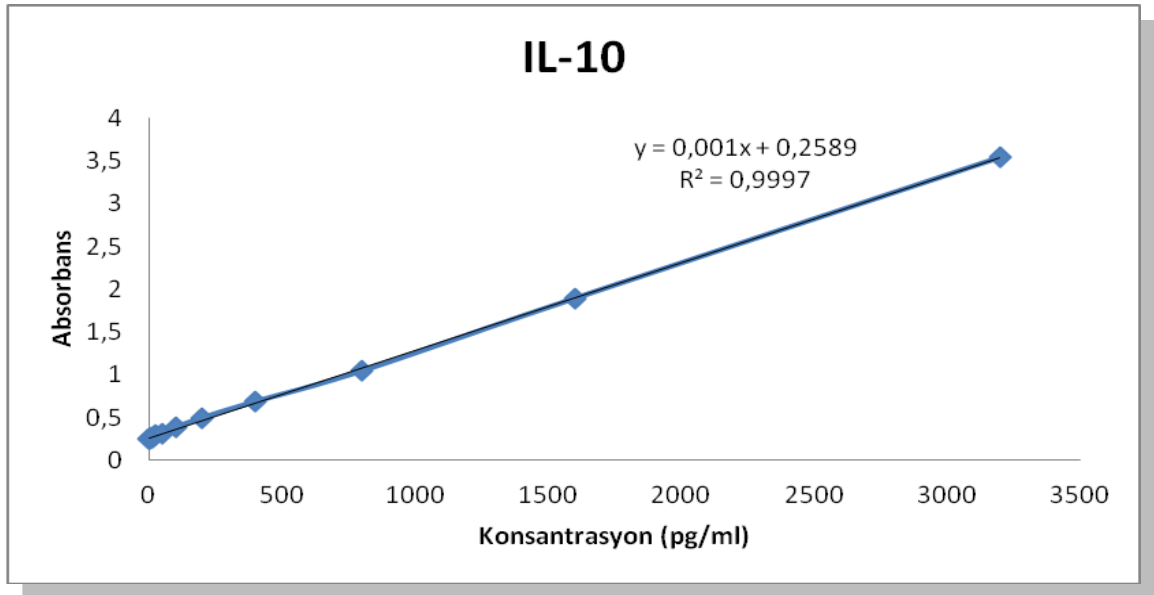
Şekil 5.12 IFN- γ üretimine ait standart eğri



Şekil 5.13 IL-2 üretimine ait standart eğri

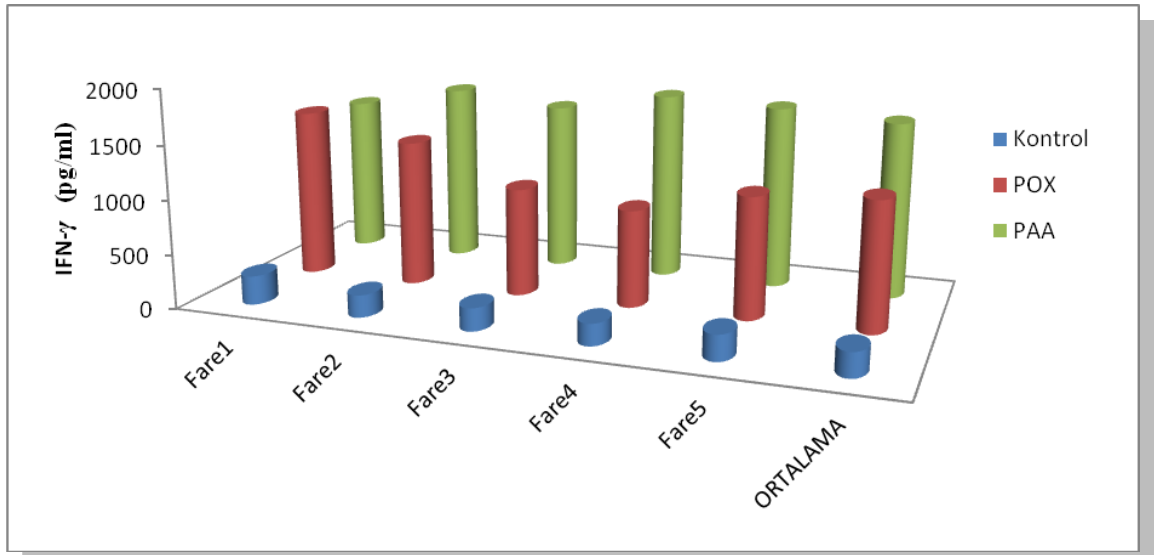


Şekil 5.14 IL-4 üretimine ait standart eğri

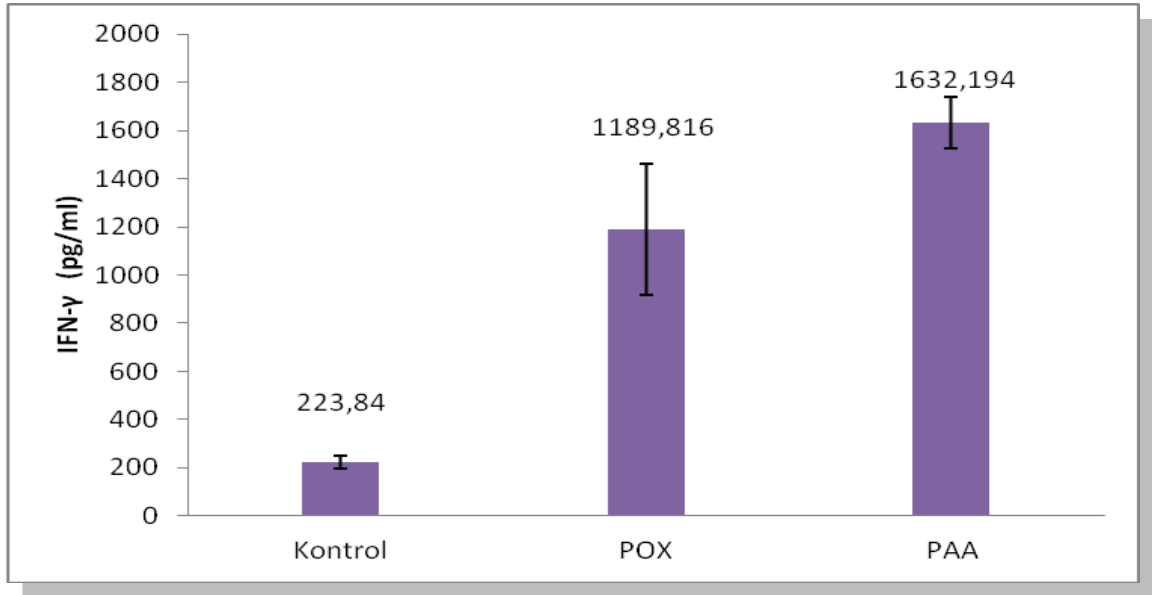


Şekil 5.15 IL-10 üretimine ait standart eğri

Standartlar kullanılarak POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotların farelerde sitokin üretimine etkisi hesaplanmıştır. Buna göre POX ve PAA'ya maruz kalmış fare gruplarına ait IFN- γ seviyeleri PAA için $1632,194 \pm 108,41$, POX için $1189,816 \pm 227,82$ iken en düşük değerler kontrol grubunda $223,84 \pm 27,49$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.17).

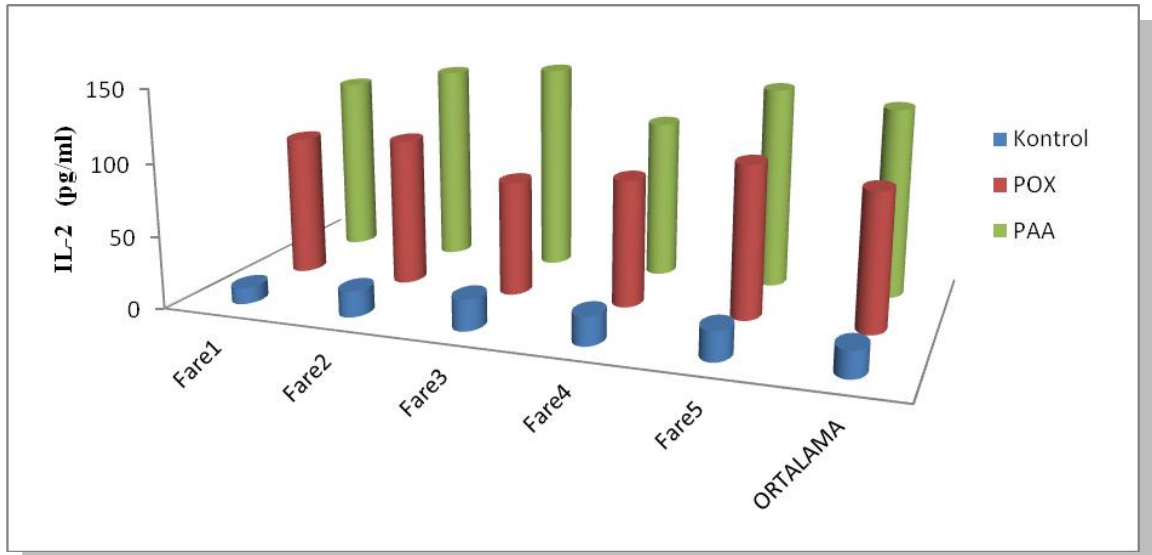


Şekil 5.16 POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IFN- γ sitokin yanıtları

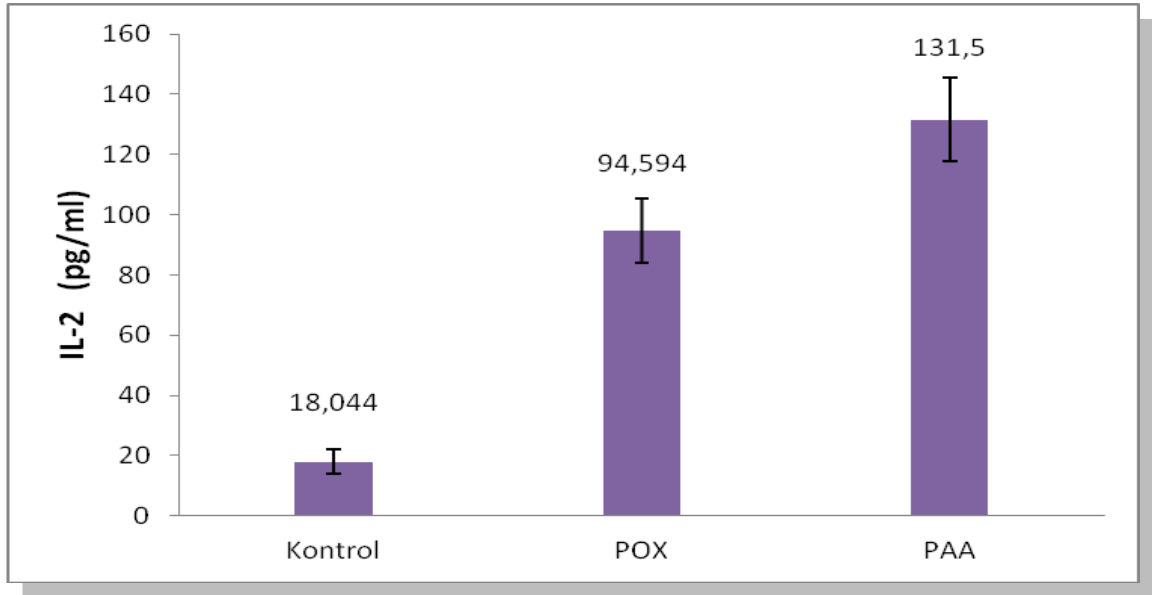


Şekil 5.17 POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IFN-γ sitokin yanıt ortalaması (enfeksiyondan 45 gün sonra)

POX ve PAA'ya maruz kalmış fare gruplarına ait IL-2 seviyeleri PAA için $131,5 \pm 13,89$, POX için $94,594 \pm 10,65$ iken en düşük değerler kontrol grubunda $18,044 \pm 4,02$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.19).

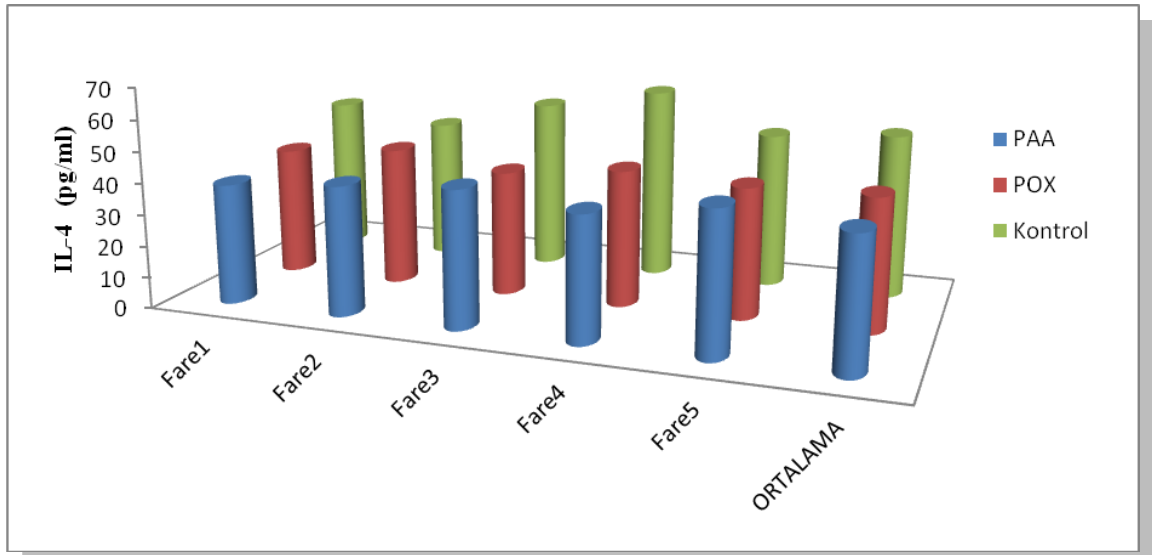


Şekil 5.18 POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-2 sitokin yanıtları

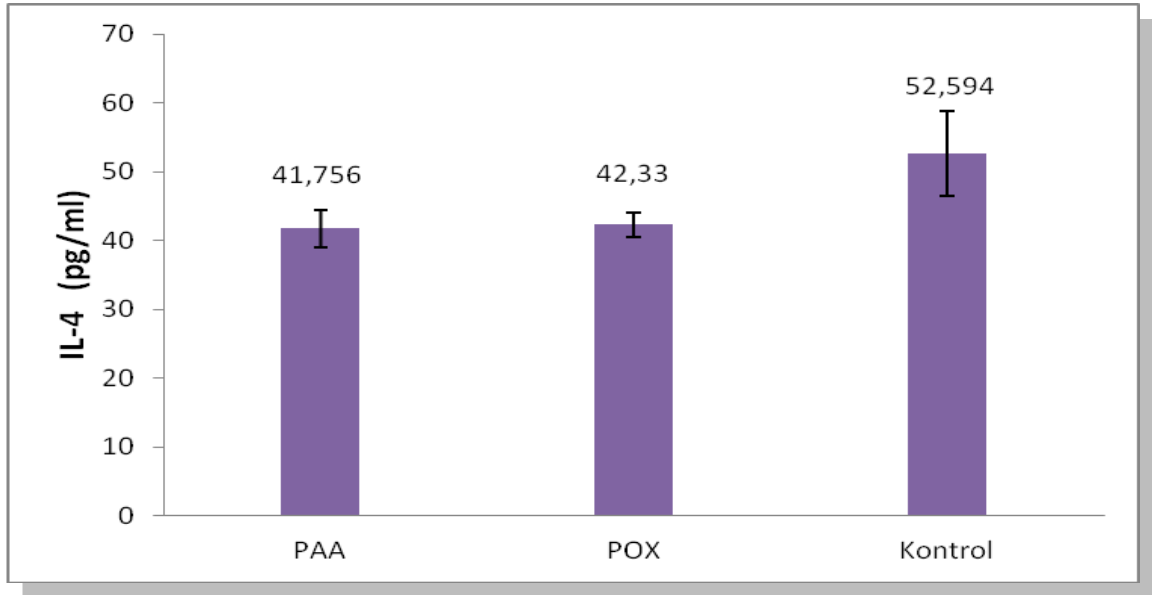


Şekil 5.19 POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-2 sitokin yanıt ortalaması (enfeksiyondan 45 gün sonra)

POX ve PAA'ya maruz kalmış fare gruplarına ait IL-4 seviyeleri PAA için $41,756 \pm 2,70$, POX için $42,33 \pm 1,80$ iken en yüksek değerler kontrol grubunda $52,594 \pm 6,13$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.21).

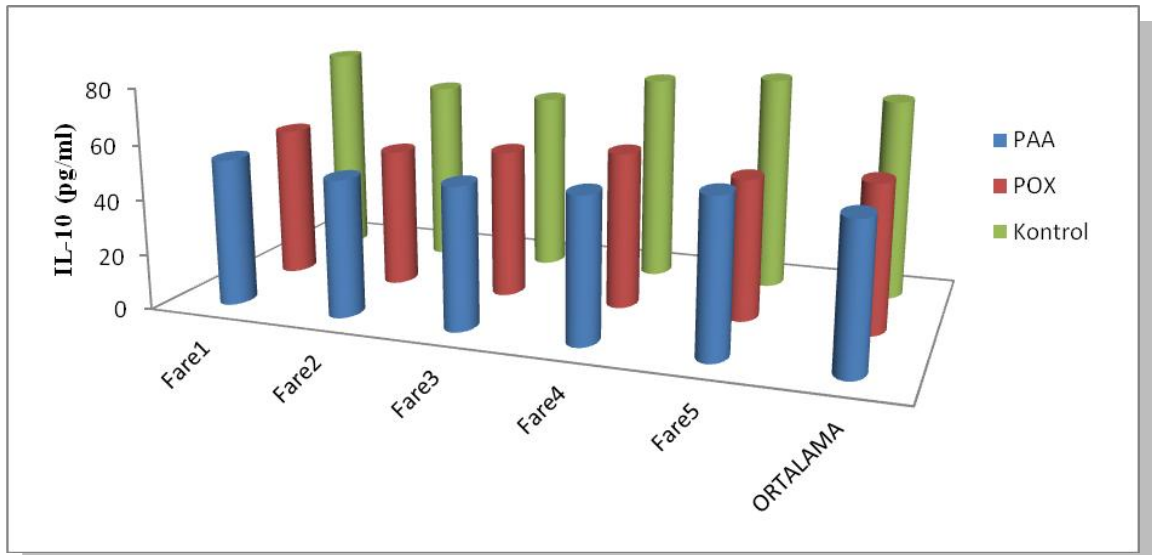


Şekil 5.20 POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-4 sitokin yanıtları

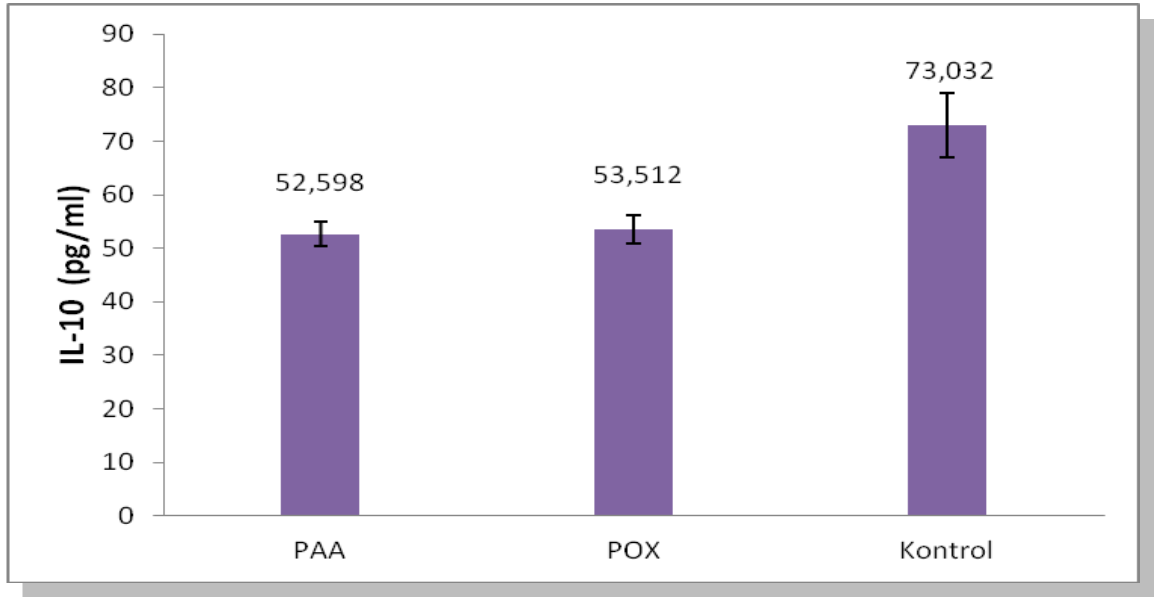


Şekil 5.21 POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-4 sitokin yanıt ortalaması (enfeksiyondan 45 gün sonra)

POX ve PAA'ya maruz kalmış fare gruplarına ait IL-10 seviyeleri PAA için $52,598 \pm 2,92$, POX için $53,12 \pm 2,68$ iken en yüksek değerler kontrol grubunda $73,032 \pm 6,03$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.23).



Şekil 5.22 POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-10 sitokin yanıtları



Şekil 5.23 POX ve PAA'ya maruz kalmış promastigotlarla immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-10 sitokin yanıt ortalaması (enfeksiyondan 45 gün sonra)

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada ilk kez olarak immünostümölan özelliği olan negatif yüklü PAA ve pozitif yüklü POX'a maruz kalan VL etkeni *L.infantum* promastigotlarının in vitro makrofaj kültürlerinde enfektifliğine ve hücre yanıtına, in vivo ise parazite karşı oluşan humoral ve hücreyel immün yanıtına etkisi incelenmiştir. *In vitro* makrofaj kültürü incelendiğinde, polimere maruz kalmış parazitlerin enfektifliğini kaybetmiş olmasına rağmen, makrofajların NO üretimini indüklediği gösterilmiştir. *In vivo* fare modellerinde ise PAA'ya maruz kalmış parazitlerle enfekte olmuş fare gruplarında IgG antikor seviyesinin kontrole göre anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. Kontrole göre parazit yükündeki azalma yüzdeleri ise PAA'ya maruz kalan parazitler ile enfekte olmuş farelerin dalakları için $84,27 \pm 2,98$, karaciğerleri için $89,75 \pm 2,12$ olduğu belirlenmiştir. POX'a maruz kalan parazitlerle enfekte olmuş farelerin dalakları için $76,92 \pm 1,88$ ve karaciğerleri için ise $80,02 \pm 3,11$ oranında parazit yükünde düşüş olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Özellikle PAA'ya maruz kalan promastigotların immün sistemi Th1 tip hücre proliferasyonu yönünde uyararak, *L.infantum* enfeksiyonlarında koruyucu rolü olan IFN— γ sitokinlerinin üretimini indüklediği ve kontrole göre 7 kat artış olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Ayrıca POX ile yapılan deney sonuçları ise POX'un 6000 $\mu\text{g/ml}$ ve üzerindeki dozlarının hücre içi parazitlerin proliferasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir.

Tezin amacına uygun olarak yapılan çalışmalar ile aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

PAA'nın J774 makrofaj ve primer fare periton makrofajlarında, 100 $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar olan konsantrasyonlarda önemli bir toksik etki görülmezken, PAA'nın her iki molekül

ağırlığında da 250 µg/ml’de canlılığın azaldığı tespit edilmiştir. Buna göre PAA ‘nın farklı molekül ağırlıklarında j774 makrofajlarında yapılan IC₅₀ hesaplamalarına göre molekül ağırlığı 30 kDa olan polimerin IC₅₀ değeri 393,83 µg/ml iken molekül ağırlığı 100 kDa olan polimerin IC₅₀ değeri ise 382,33 µg/ml’dir. Buna göre PAA ‘nın farklı molekül ağırlıklarında primer fare periton makrofajlarında yapılan IC₅₀ hesaplamalarına göre molekül ağırlığı 30 kDa olan polimerin IC₅₀ değeri 503,07 µg/ml iken molekül ağırlığı 100 kDa olan polimerin IC₅₀ değeri ise 509,91 µg/ml’dir. PAA’nın her iki molekül ağırlığında da özellikle primer hücre makrofaj hücre kültüründe IC₅₀ değerinin daha yüksek çıkması ileride aşılar da kullanılmasında olumlu bir sonuç olarak görülmektedir. Yapılan bir çalışmada antijenle beraber çok düşük konsantrasyonda sentetik polielektrolit eklenen İzole B lenfositlerinde, DNA sentezi aktivasyonu ile proliferatif etkisi olduğu belirlenmiştir [12], [267], [268]. Benzer şekilde PAA’nın 1-5 µg/ml gibi düşük konsantrasyon aralığında makrofaj hücrelerinin canlılığında kontrole göre anlamlı artış meydana gelmiştir (p < 0,05)

J774 fare makrofaj hücre hattı ve primer fare periton makrofajlarında, POX’un toksik etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlara göre POX konsantrasyonu 12000 µg/ml’ye kadar olan konsantrasyona kadar denenmiş fakat hem J774 fare makrofaj hücre hattı hemde primer fare periton makrofajlarında önemli bir toksik etki görülmemiştir. Buna göre POX’un farklı iki hücre tipinde yapılan IC₅₀ hesaplamalarına göre J774 fare makrofaj hücre hattı için IC₅₀ değeri 146,612 mg/ml iken primer fare periton makrofajlarında IC₅₀ değeri ise 177,854 mg/ml olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar POX’un makrofaj hücrelerinde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bile toksik etkisi olmayacağını göstermektedir. Yapılan bir çalışmada POX’un karaciğer hücrelerinin rejeneratif özelliklerini artırdığı da belirlenmiştir [269].

Çalışmanın sonraki aşamasında ise POX ve PAA’nın *L.infantum* promastigotları üzerine toksik etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlara göre 5 mg/ml’nin üzerinde PAA’ya maruz kalmış promastigotlarda canlılığın giderek azaldığı gösterilmiştir. Molekül ağırlığı 30 kDa olan PAA’da IC₅₀ değeri 6,37 mg/ml iken molekül ağırlığı 100 kDa olan PAA’da IC₅₀ değeri 4,79 mg/ml’dir. POX’un ile elde edilen sonuçlara göre 1500 µg/ml konsantrasyona kadar POX’a maruz kalmış promastigotların canlılığı ile kontrol arasında istatistik olarak fark olmadığı görülmüştür (p > 0,05). 3000 µg/ml POX’a maruz

kalmış promastigotların kontrole göre canlılığı anlamlı ölçüde düşmüştür ($p<0,05$). 3000 $\mu\text{g/ml}$ 'nin üzerinde POX'a maruz kalmış promastigotlarda canlılık giderek azalmıştır. Elde edilen MTT sonuçlarına göre IC_{50} değeri 7,655 mg/ml olarak belirlenmiştir. MTT dışında POX'un farklı konsantrasyonlarının *L.infantum* promastigotları üzerine toksik etkisi sayım yapılarak incelenmiştir. Sonuçlar MTT sonuçlarını destekler nitelikte olmasına rağmen özellikle 6000 ve 12000 $\mu\text{g/ml}$ olan konsantrasyonlarda parazit üremesi tamamen inhibe olmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda da POX'un antibakteriyel ve antiviral özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir [270]. Böylece bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile ilk kez olarak POX'un şimdiye kadar gösterilen antibakteriyel ve antiviral özelliklerinin yanında antiparazitik özelliği de ortaya çıkmıştır.

Deneylerde aynı zamanda kullanılan polimerlerin *L.infantum* parazitleri üzerine olan morfolojik etkileri SEM ile incelendiğinde ise PAA'ya bir saat tutulmuş olan *L.infantum* promastigotlarının hücre yüzeylerinde polimerin etkisiyle oluşmuş olan porlar saptanmıştır. Daha önce B hücreleriyle yapılan çalışmalarda PAA'nın hücre yüzey molekülleri ile etkileşime girerek hücre yüzeyinde bulunan sodyum-potasyum ve kalsiyum geçirgenliğinden sorumlu olan pompaların işlevini bozarak geçirgenliğini değiştirdiği bilinmektedir [12]. Benzer olarak PAA'nın promastigot yüzeyinde bulunan moleküller ile etkileşime girerek porlar oluşturduğunu görmekteyiz. Yapılan bir çalışmada B lenfosit süspansiyonuna PAA'nın sulu çözeltisi eklendiğinden, hücrelerin dış membran geçirgenliği ciddi bir şekilde artarak tersine dönmüştür. Özellikle hücre içinde yüksek konsantrasyonda bulunan potasyum iyonları, düşük konsantrasyonda olan hücre dışına doğru akmıştır. Diğer iyonlarda benzer olarak konsantrasyon gradiyenti yönünde hareket etmiştir. Sonuç olarak sentetik polielektrolitler hücrel membranlarda bulunan porların formasyonunu uyarak hücrelerin seçici geçirgenliğini etkilemiştir [12], [267], [268]. Böylece PAA'nın B hücrelerinde görülen bu etkisi sonuçlarımızı desteklemiştir. POX'a bir saat tutulmuş olan *L.infantum* promastigotların polimerin etkisiyle oluşmuş kümelerin normal parazit kümelerinden farklı olarak uç uca birleştiği bir şekil aldığı bu yüzden parazitlerin kamçıları ile diğer hücrel kısımların ayırt edilemediği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada B hücrelerinin düşük konsantrasyonda PAA içeren ortamda hücre füzyonunu uyardığı belirlenmiştir

[12]. Bu duruma benzer olarak POX'un kullandığımız konsantrasyonda hücre füzyonuna neden olduğu belirlenmiştir.

Polimere maruz kalmış parazitlerin enfektifliğini incelediğimizde, genel olarak elde edilen sonuçlarda, polimere maruz kalmış ortamlarda kontrole göre enfektifliğin önemli ölçüde düştüğü gözlemlendi. Kontrole göre 5 mg polimere maruz kalmış tüm sürelerde %enfektiflik, amastigot sayısı ve enfeksiyon indeksinde anlamlı düşüş meydana gelmiştir. 1 mg PAA'dan farklı olarak 5 mg PAA'ya maruz kalan ortamda 30 kDa PAA'da 100 kDa PAA'ya göre 2 ve 3 saat maruziyet sürelerinde % enfektiflik açısından bir artış olmuştur. Ayrıca her iki molekül ağırlığında da PAA'ya maruziyet süresi arttıkça enfektiflikte, çok düşüğe olsa bir artış meydana gelmiştir. Bu sonuçlara göre 100 kDa, 5 mg PAA'ya bir saat maruz kalmış promastigotların *in vivo* çalışmalar için en uygun molekül ağırlığı, konsantrasyon ve maruziyet süresi olduğu belirlenmiştir. 6000 ve 12000 µg/ml POX'a maruz kalmış ortamlarda kontrole göre enfektifliğin önemli ölçüde düştüğü gözlemlendi. Enfektiflikteki en fazla düşüş özellikle polimerin farklı konsantrasyonlarının parazite bir saat maruz kaldığında görülmüştür. 2000 µg/ml'de enfektiflik %20,08 düşerken enfeksiyon indeksi %50,09 düşmüştür. 6000 µg/ml'de enfektiflik %85,3 düşerken enfeksiyon indeksi %98,6 düşmüştür. 12000 µg/ml'de enfektiflik %99,6 düşerken enfeksiyon indeksi %100 düşmüştür. Böylece POX için *in vivo* çalışmalarda en uygun konsantrasyonun 12000 µg/ml'ye bir saat maruz kalmış parazitler olduğu belirlendi.

Makrofaj kaynaklı NO *Leishmania* parazitleri üzerinde sitotoksik etki yapar. Bu yüzden makrofajlar tarafından üretilecek NO oldukça önemlidir. RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde PAA'nın NO üretimine etkisi konusunda yapılan bir çalışmada, sadece PAA'nın NO miktarının artışıyla bir uyarıcı olmadığı belirlenmiştir [271]. Benzer olarak yaptığımız çalışmada hem J774 makrofaj hücre hattında hem de primer periton makrofajlarında NO üretimine etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlara göre sadece PAA'nın makrofaj hücrelerinde NO üretimine etkisi olmadığı gösterilmiştir. POX'un ise makrofaj hücrelerinde NO üretimine etkisi 6000 ve 12000 µg/ml olan konsantrasyonlarda gösterilmiştir.

Doğal *Leishmania* enfeksiyonlarında parazitler makrofajların NO üretimini inhibe ederek hayatta kalabilirler. Bu yüzden polimerlere maruz kalan parazitlerin enfektiflik özelliklerini kaybetmesi ve makrofajlar tarafından öldürülmesinde NO üretiminin bir etkisi olup olmadığını incelenmiştir. Buna göre sadece PAA'nın makrofajlarda NO üretimine etkisi olmazken parazitin özellikle 1 ve 5 mg/ml PAA'ya bir saat maruz kalan konsantrasyonlarında NO üretiminde kontrole göre fark görülmüştür ($p < 0,05$). POX ile yapılan incelemelerde ise Özellikle 6000 ve 12000 µg/ml POX olan konsantrasyonlarda parazitlerin polimere maruz tutulduğunda meydana enfektiflik düşüşünün, makrofajlar tarafından üretilen NO üretimini destekler nitelikte olduğu görülmektedir. Farklı konsantrasyonlarda polioksidonyuma 1 ve 24 saat maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının makrofaj hücrelerinde NO üretimi üzerine etkisine bakıldığında özellikle 6000 ve 12000 µg/ml POX olan konsantrasyonlara 1 saat maruz kalmış parazitlerin NO üretimine daha fazla etkisi olduğu belirlenmiştir.

Polimerlerin hücre içi parazitlere etkisi amastigot-makrofaj kültürlerinde incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak Glucantim'in antileishmial etkisine bakıldığında 1000 µg/ml konsantrasyonda parazit canlılığı %98 azalmıştır. Uzun yıllardan beri Leishmaniasis tedavisinde kullanılan Glucantime, hücre içi amastigotların öldürülmesinde yeterli etkinliği gösterememiştir. PAA'nın antileishmial etkisine bakıldığında 500 µg/ml konsantrasyonda parazit canlılığı %54 azalmıştır. Bu sonuçlara göre PAA'nın antileishmanial etkisi yetersizdir. Bunun en önemli nedeni kullanılan konsantrasyonların zaten makrofajlarda toksik etki göstermesidir. POX'un antileishmial etkisine bakıldığında 6000 ve 12000 µg/ml konsantrasyonda kontrole göre parazit canlılığı %99 ve %99,9 azalmıştır. Elde edilen bu sonuçlar Glucantime ile kıyaslandığında kullanılan bu konsantrasyonlarda POX'un hem toksik olmaması hemde ciddi oranda amastigot ve promastigot canlılığını azaltması, makrofajlarda NO üretimini indüklemesi, POX'un ileride *Leishmania* tedavisinde kullanılabilecek önemli bir bileşik adayı olabileceğini gösterilmiştir.

Polielektrolitlerin *Leishmania* parazitlerindeki in vitro sonuçlarına dayanarak çalışmanın son aşamasında in vivo çalışmalar başlatılmıştır. Bu amaçla efektifliğin düşürülmesi için en uygun polimer konsantrasyonu ve maruziyet süresi belirlendikten sonra farelere enjeksiyon yapılmıştır. Aşı adayları ile yapılan immünizasyondan 4 hafta

sonra farelerde aşının etkinliğinin incelenmesi amacıyla enfektif parazitler verilmiştir. 10 haftalık in vivo çalışmalarında her hafta farelerden kan alınarak serumda *Leishmania* antijenlerine karşı oluşan antikor miktarı ELISA yöntemi ile incelenmiştir.

ELISA testi sonucunda elde edilen sonuçlara göre ilk 4 haftada sadece PAA'ya maruz bırakılan parazitlere karşı, antileishmanial IgG antikorları oluşurken POX verilen gruplarda herhangi bir antikor yanıtı alınamamıştır. Farelerde yapılan doğal *L.infantum* enfeksiyonlarında parazitlerin IgG antikor yanıtını engelleyerek Th2 tip immün yanıtın oluşmasını sağladığı ve bu nedenle enfeksiyonun ilerlediği tespit edilmiştir [266]. Fakat yaptığımız çalışmada PAA'ya maruz kalan parazitlerin immun sistemi yönlendiremedikleri Th1 tip immün yanıtın oluşarak parazite karşı önemli bir koruma sağlanmıştır. 4. haftada enfeksiyon bulaştırmak amacıyla metasiklik enfektif parazit açısından zengin olan stasyoner faz promastigotları fare gruplarına verildiğinde yine sadece PAA içeren grupta 2. İmmünizasyon etkisi yaratarak her hafta artış gösterecek şekilde absorbans artışı olmuştur. Enfeksiyon sonrası kontrol ve POX içeren grupta çok düşük seviyede antileishmanial IgG üretimi olsada PAA içeren grupla kıyaslanamıyacak seviyededir.

Parazitolojik incelemede ise Giemsa boyama ile periferik kanda yapılan incelemelerde duyarlılık oldukça düşüktür. Bunun nedeni kandaki parazit sayısının oldukça düşük sayıda olmasıdır. Bu nedenle Mikrokültür yöntemi ile de değerlendirme yapıldı.. Bu yöntemin temeli kapiler tüp içinde mikroaerofilik ortamda bulunan hücre içi amastigotların 27 °C'lik etüvde hareketli promastigotlara dönüşmesine dayanır. Mikrokültür yöntemi özellikle asemptomatik *Leishmania* enfeksiyonlarında bile oldukça duyarlıdır. PAA ve POX'a maruz kalan parazitler canlı olduğu için ilk 4 hafta boyunca farelerden alınan kan örneklerinde giemsa boyama ve MKY ile tarama yapılmıştır. Sonuçlara göre ne giemsa nede MKY ile ilk 4 hafta boyunca kanda parazit tespit edilememiştir. Fakat 5. haftadan itibaren tüm incelenen gruplarda parazit yoğunluğuna göre farklıklar tespit edilmiştir.

Leishmania aşı çalışmalarında, aşı tarafından indüklenmiş koruyucu immün yanıt iki şekilde değerlendirilir. Bunlardan birincisi parazit yükündeki düşüşü değerlendirmede

kullanılan *in vitro* periton makrofaj modelleri diğeri ise enfeksiyon sonrası *in vivo* fare modellerinde karaciğer yada dalaktaki parazit yükünü belirlemeye dayanır. Elde edilen sonuçlara göre enfekte periton makrofajların yüzdesi ve enfekte olmuş makrofaj başına düşen amastigot sayısı kontrol grubu ile kıyaslandığında immünize edilmiş gruplarda daha düşük olduğu belirlendi. Enfeksiyon indeksindeki en belirgin azalma PAA'ya maruz kalmış fare gruplarında görülürken ($91,098 \pm 1,87$) POX'a maruz kalan fare gruplarında ise ortalama $80,576 \pm 1,81$ 'lik bir düşüş belirlenmiştir.

Başarılı bir aşılamanın iki kriteri vardır bunlardan birincisi verilen antijene karşı indüklenen *in vivo* gecikmiş tip aşırıduyarlılık yanıtıdır. İkincisi ise antijene karşı oluşan *in vitro* T hücre stimülasyonudur. Bu yüzden aşı çalışmamızda her iki kriterde denenmiştir. Buna göre gecikmiş tip aşırıduyarlılık yanıtı en fazla PAA'ya maruz kalmış parazitlerin verildiği deney grubunda tespit edilmiştir. Ayrıca POX'a maruz kalmış parazitlerin verildiği deney grubunda kontrole göre fark belirlenmiştir ($p < 0,05$). Böylece ayaktaki yüzde kalınlık artışı PAA olan fare grubunda $12,588 \pm 2,582$, POX olan fare grunda $3,346 \pm 0,612$ son olarak kontrol grubunda ise $1,144 \pm 0,508$ olarak belirlenmiştir.

Visseral leishmaniasisin en önemli klinik bulgularından biri dalak ve karaciğer ağırlığında meydana gelen artıştır. Sağlıklı Balb/c farelerde ortalama dalak ağırlığı 100 mg'dır. Elde edilen sonuçlara göre dalak ağırlığı PAA olan fare grubunda $97,1 \pm 2,98$ mg, POX olan fare grunda $92,08 \pm 5,76$ mg son olarak kontrol grubunda ise $201,86 \pm 8,95$ mg olarak belirlenmiştir. Karaciğer ağırlığı ise PAA olan fare grubunda $835,92 \pm 140,2$ mg POX olan fare grubunda $986,86 \pm 38,83$ mg son olarak kontrol grubunda ise $1435,5 \pm 215,9$ mg olarak belirlenmiştir

PAA'ya maruz kalan parazitlerin verildiği fare grubunda, oluşan immün yanıtı bağlı olarak parazit yükünde anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir. Elde edilen sonuçlara göre karaciğere ait LDU değeri PAA olan fare grubunda $285,716 \pm 16,64$, POX olan fare grubunda $552,668 \pm 59,84$ son olarak kontrol grubunda ise $2764,974 \pm 280,75$ olarak belirlenmiştir Elde edilen sonuçlara göre dalağa ait LDU değeri ise PAA olan fare grubunda $50,818 \pm 3,79$, POX olan fare grubunda $74,544 \pm 3,29$ son olarak kontrol grubunda ise $322,898 \pm 15,49$ olarak belirlenmiştir. Dalak ve karaciğer parazit yüküne

bağlı olarak POX ve PAA'ya maruz kalmış fare gruplarına ait parazit yükündeki azalma yüzdeleri PAA dalak için %84,27±2,98, PAA karaciğer için %89,75±2,12, POX dalak için %76,92±1,88 ve son olarak POX karaciğer için %80,02±3,11 olarak belirlenmiştir.

Leishmania enfeksiyonlarında makrofajların aktivasyonu ve hücre içi parazitlerin öldürülmesine bağlı olarak Th1 ve Th2 yanıtları arasında bir denge vardır. *Leishmania* enfeksiyonlarına karşı direnç genel olarak CD4⁺ T lenfositlerin alt tipi olan Th1 hücrelerinin çoğalarak IFN- γ üretmeleriyle ilişkilidir. Böylece Th1 tarafından IFN- γ üretilerek makrofajların aktivasyonu sağlanır. Aktive olmuş makrofajlar ise serbest O₂ radikalleri ve NO üreterek amastigotların öldürülmesi sağlanır. Ayrıca IFN- γ Th2 alt tip lenfositleri baskılar ve buna bağlı olarak IL-4 üretimini engeller. Bu durum *Leishmania* enfeksiyonlarında koruyucu immün yanıtın oluşmasında oldukça önemli bir kriterdir. *Leishmania* enfeksiyonlarına duyarlı kişilerde genel olarak Th2 lenfositlerine bağlı olarak IL-4 ve IL-10 sitokinleri üretilir. Bu sitokinlerden IL-4, Th1 lenfositlerin çağılmasını inhibe eder. Buna göre POX ve PAA'ya maruz kalmış fare gruplarına ait IFN- γ seviyeleri PAA için 1632,194±108,41, POX için 1189,816±227,82 iken en düşük değerler kontrol grubunda 223,84±27,49 olarak belirlenmiştir. POX ve PAA'ya maruz kalmış fare gruplarına ait IL-2 seviyeleri PAA için 131,5±13,89, POX için 94,594±10,65 iken en düşük değerler kontrol grubunda 18,044±4,02 olarak belirlenmiştir. POX ve PAA'ya maruz kalmış fare gruplarına ait IL-4 seviyeleri PAA için 41,756±2,70, POX için 42,33±1,80 iken en yüksek değerler kontrol grubunda 52,594±6,13 olarak belirlenmiştir. POX ve PAA'ya maruz kalmış fare gruplarına ait IL-10 seviyeleri PAA için 52,598±2,92, POX için 53,12±2,68 iken en yüksek değerler kontrol grubunda 73,032±6,03 olarak belirlenmiştir. Böylece PAA'ya maruz kalan promastigotların doğal enfeksiyondan farklı olarak immün sistemi Th1 tip hücre proliferasyonu yönünde uyararak, *L.infantum* enfeksiyonlarında koruyucu rolü olan IFN- γ sitokinlerinin üretimini indüklediği belirlenmiştir.

Böylece bu çalışmada ilk kez olarak PAA ve POX kullanılarak leishmaniasise karşı attenüe olmuş aşı modelinin geliştirilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçların ileride leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde önemli bir rol oynayabileceği ve aynı zamanda immünoterapi açısından yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin temelini oluşturabileceği düşünülmektedir.

ÖNERİLER

1. PAA ve *Leishmania* parazitlerinde bulunan moleküller arasında gerçekleşen etkileşim sonucunda oluşan in vitro ve in vivo immün yanıtta dolayı ilerde zayıflatılmış aşı geliştirilmesinde kullanılabilir.
2. Zayıflatılmış aşı geliştirmede polimerlere dayalı bu yaklaşım ilerde diğer enfeksiyon ajanları içinde kullanılabilir.
3. PAA'ya maruz kalmış *Leishmania* parazitlerinin, hümmoral ve hüccresel immüniteyi uyarması ilerde leishmaniasisli hastalarda immünoterapi açısından ciddi bir koruma sağlayabilir.
4. PAA'ya maruz kalmış *Leishmania* parazitlerinin, yüksek seviyede IgG antikor üretimini indüklemesinden dolayı, PAA ilerde hem *Leishmania* hemde diğer enfeksiyonlarda monoklonal antikor üretiminde kullanılabilir.
5. Her iki polimerinde *Leishmania* enfeksiyonlarında önemli olan Th1 tip lenfositlerin proliferasyonunu uyarması ilerde yapılacak immunolojik çalışmalar açısından önemli olabilir.
6. Uzun yıllardan beri leishmaniasisin tedavisinde kullanılan Glucantime göre POX'un hücre içi parazitlere karşı gösterdiği yüksek etkinlikten dolayı ilerde POX ,antileishmanial ilaçların geliştirilmesi için incelenebilir.
7. *Leishmania* aşı çalışmalarında farelerin sakrifye edilmesine gerek kalmadan enfeksiyonun değerlendirilmesi amacıyla ilerde Mikro Kültür Yöntemi kullanılabilir.
8. İlacın etkinliğini daha iyi belirlemek amacıyla geliştirdiğimiz amastigottan promastigota dönüşen parazitlerin MTT yöntemiyle canlılığının belirlenmesine dayanan yöntem ilerde antileishmanial ilaç çalışmalarında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Organization, W.H., (2010). "Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis", Geneva: WHO.
- [2] Desjeux, P., (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives", *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27: 305-318.
- [3] Gürel, M.S. Yeşilova, Y. Ölgün, M.K. ve Özbek, Y., (2012). "Türkiye’de Kutanöz Leishmaniasisin Durumu", *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 36: 121-129.
- [4] Sundar, S. ve Chatterjee, M., (2006). "Visceral leishmaniasis-current therapeutic modalities", *The Indian journal of medical research*, 123: 345-352.
- [5] Nagill, R. ve Kaur, S., (2011). "Vaccine candidates for leishmaniasis: A review", *International immunopharmacology*, 11: 1464-1488.
- [6] Daneshvar, H. Coombs, G.H. Hagan, P. ve Phillips, R.S., (2003). "Leishmania mexicana and Leishmania major: attenuation of wild-type parasites and vaccination with the attenuated lines", *Journal of Infectious Diseases*, 187: 1662-1668.
- [7] Silvestre, R. Cordeiro-da-Silva, A. ve Ouassini, A., (2008). "Live attenuated Leishmania vaccines: a potential strategic alternative", *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 56: 123-126.
- [8] Mitchell, G.F. Handman, E. ve Spithill, T.W., (1984). "Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of Leishmania major and importance of route of injection", *Australian journal of experimental biology and medical science*, 62: 145-153.
- [9] Kimsey, P. Theodos, C. Mitchen, T. Turco, S. ve Titus, R., (1993). "An avirulent lipophosphoglycan-deficient Leishmania major clone induces CD4+ T

cells which protect susceptible BALB/c mice against infection with virulent *L. major*", *Infection and immunity*, 61: 5205-5213.

- [10] Rivier, D. Shah, R. Bovay, P. ve Mauel, J., (1993). "Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge", *Parasite immunology*, 15: 75-84.
- [11] Streit, J.A. Recker, T.J. Gueiros Filho, F. Beverley, S.M. ve Wilson, M.E., (2001). "Protective immunity against the protozoan *Leishmania chagasi* is induced by subclinical cutaneous infection with virulent but not avirulent organisms", *The Journal of Immunology*, 166: 1921-1929.
- [12] Kabanov, V.A., (2004). "From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines", *Pure and applied chemistry*, 76: 1659-1678.
- [13] Cattand, P. Desjeux, P. Guzmán, M. Jannin, J. Kroeger, A. Médici, A. Musgrove, P. Nathan, M.B. Shaw, A. ve Schofield, C., (2006). "Tropical diseases lacking adequate control measures: dengue, leishmaniasis, and African trypanosomiasis", *Disease Control Priorities Project*: 451-466.
- [14] Molyneux, D.H. ve Ashford, R.W., (1983). *The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals*: London, UK; Taylor & Francis Ltd.
- [15] Veland, N. Boggild, A.K. Valencia, C. Valencia, B.M. Llanos-Cuentas, A. Van der Auwera, G. Dujardin, J.C. ve Arevalo, J., (2012). "Leishmania (*Viannia*) species identification on clinical samples from cutaneous leishmaniasis patients in Peru: assessment of a molecular stepwise approach", *J Clin Microbiol*, 50: 495-498.
- [16] Campos, M.B. De Castro Gomes, C.M. de Souza, A.A. Lainson, R. Corbett, C.E. ve Silveira, F.T., (2008). "In vitro infectivity of species of *Leishmania* (*Viannia*) responsible for American cutaneous leishmaniasis", *Parasitol Res*, 103: 771-776.
- [17] Gardener, P., (1977). "Taxonomy of the genus *Leishmania*: a review of nomenclature and classification", *Tropical diseases bulletin*, 74: 1069.
- [18] Unat, E. Yücel, A. Atlaş, K. ve Samastı, M., (1995). "İnsanın ökaryonlu parazitleri ve bunlarla oluşan hastalıkları", *Unat'ın Tıp Parazitolojisi*, 5: 3-56.
- [19] Garcia, L.S. ve Bruckner, D.A., (1997). *Diagnostic medical parasitology*: American Society for Microbiology (ASM).

- [20] Cook, G.C. ve Zumla, A., (2008). Manson's Tropical Diseases E-Book: Saunders Limited.
- [21] Williams, J., (1992). "Atlas of medical helminthology and protozoology: by GD Cowan, Churchill Livingstone, 1991.£ 30.00 (88 pages) ISBN 0 443 04093 1", Parasitology Today, 8: 247.
- [22] Besteiro, S. Williams, R.A. Coombs, G.H. ve Mottram, J.C., (2007). "Protein turnover and differentiation in *Leishmania*", International journal for parasitology, 37: 1063-1075.
- [23] Jeronimo, S. Pearson, R. Avila, J. ve Harris, J., (1992). "The *Leishmania*. Protozoans adapted for extracellular and intracellular survival", Subcellular biochemistry, volume 18: Intracellular parasites.: 1-37.
- [24] Higashi, G.I., (1988). "Vaccines for parasitic diseases", Annual review of public health, 9: 483-501.
- [25] Doerig, C. Chakrabarti, D. Kappes, B. ve Matthews, K., (1998). "The cell cycle in protozoan parasites", Progress in cell cycle research, 4: 163-184.
- [26] Killick-Kendrick, R., (1990). "The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host", Annales de Parasitologie humaine et comparée, 65: 37.
- [27] ÖZBEL, Y., "Leishmaniasis' in Tan› ve Tedavisindeki Sorunlar› Çözmeye Yönelik Çal› flmalar".
- [28] Allahverdiyev, A.M. Bagirova, M. Elcicek, S. Koc, R.C. ve Oztel, O.N., (2011). "Effect of human urine on cell cycle and infectivity of *Leishmania* species promastigotes in vitro", Am J Trop Med Hyg, 85: 639-643.
- [29] Somanna, A. Mundodi, V. ve Gedamu, L., (2002). "In vitro cultivation and characterization of *Leishmania chagasi* amastigote-like forms", Acta tropica, 83: 37-42.
- [30] Berman, J., (1997). "Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years", Clinical Infectious Diseases, 24: 684-703.
- [31] Liew, F. ve O'donnell, C., (1993). "Immunology of leishmaniasis", Advances in parasitology, 32: 162-162.

- [32] Sadick, M.D. Heinzl, F.P. Holaday, B.J. Pu, R.T. Dawkins, R.S. ve Locksley, R.M., (1990). "Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism", *The Journal of experimental medicine*, 171: 115-127.
- [33] Ridley, M.J. ve Wells, C., (1986). "Macrophage-parasite interaction in the lesions of cutaneous leishmaniasis. An ultrastructural study", *The American journal of pathology*, 123: 79.
- [34] Manson-Bahr, P., (1961). "Immunity in kala-azar", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 55: 550-555.
- [35] Barral-Netto, M. Brodskyn, C. Carvalho, E. ve Barral, A., (1998). "Human_Leishmaniasis@ cytokines. bahia. br", *Brazilian journal of medical and biological research*, 31: 149-155.
- [36] Chang, K. Chaudhuri, G. ve Fong, D., (1990). "Molecular determinants of *Leishmania* virulence", *Annual Reviews in Microbiology*, 44: 499-529.
- [37] Anderson, C.F. Oukka, M. Kuchroo, V.J. ve Sacks, D., (2007). "CD4+ CD25– Foxp3– Th1 cells are the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis", *The Journal of experimental medicine*, 204: 285-297.
- [38] Bogdan, C. ve Rölinghoff, M., (1999). "How do protozoan parasites survive inside macrophages?", *Parasitology Today*, 15: 22-28.
- [39] Roberts, L.S. Janovy, J. ve Schmidt, G.D., (1996). *Foundations of parasitology*: Wm. C. Brown.
- [40] Descoteaux, A. ve Turco, S.J., (1999). "Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1455: 341-352.
- [41] Miao, L. Stafford, A. Nir, S. Turco, S.J. Flanagan, T.D. ve Epand, R.M., (1995). "Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*", *Biochemistry*, 34: 4676-4683.
- [42] Cunningham, A.C., (2002). "Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*", *Experimental and molecular pathology*, 72: 132-141.
- [43] Kane, M.M. ve Mosser, D.M., (2000). "*Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation", *Current opinion in hematology*, 7: 26-31.

- [44] Descoteaux, A. Turco, S.J. Sacks, D.L. ve Matlashewski, G., (1991). "Leishmania donovani lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages", *The Journal of Immunology*, 146: 2747-2753.
- [45] Olivier, M. Baimbridge, K.G. ve Reiner, N.E., (1992). "Stimulus-response coupling in monocytes infected with Leishmania. Attenuation of calcium transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphates", *The Journal of Immunology*, 148: 1188-1196.
- [46] Turco, S.J. ve Descoteaux, A., (1992). "The lipophosphoglycan of Leishmania parasites", *Annual Reviews in Microbiology*, 46: 65-92.
- [47] Reiner, N.E., (1994). "Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection", *Immunology today*, 15: 374-381.
- [48] Carvalho, E.M. Teixeira, R.S. ve Johnson Jr, W.D., (1981). "Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection", *Infection and immunity*, 33: 498-500.
- [49] Kato, T. Yamane, H. ve Nariuchi, H., (1997). "Differential effects of LPS and CD40 ligand stimulations on the induction of IL-12 production by dendritic cells and macrophages", *Cellular immunology*, 181: 59-67.
- [50] Munder, M. Mallo, M. Eichmann, K. ve Modolell, M., (1998). "Murine macrophages secrete interferon γ upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation", *The Journal of experimental medicine*, 187: 2103-2108.
- [51] Brodskyn, C. de Oliveira, C.I. Barral, A. ve Barral-Netto, M., (2003). "Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years", *Expert review of vaccines*, 2: 705-717.
- [52] Reiner, N. Ng, W. ve McMaster, W., (1987). "Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. Leishmania donovani suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products", *The Journal of Immunology*, 138: 1926-1932.
- [53] Fruth, U. Solioz, N. ve Louis, J.A., (1993). "Leishmania major interferes with antigen presentation by infected macrophages", *The Journal of Immunology*, 150: 1857-1864.
- [54] Prina, E. Jouanne, C. de Souza Lao, S. Szabo, A. Guillet, J. ve Antoine, J., (1993). "Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with

Leishmania amazonensis amastigotes", *The Journal of Immunology*, 151: 2050-2061.

- [55] Bogdan, C. Gessner, A. Werner, S. ve Martin, R., (1996). "Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites", *Current opinion in immunology*, 8: 517-525.
- [56] Heinzl, F.P. Rerko, R.M. ve Hujer, A.M., (1998). "Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity", *Cellular immunology*, 184: 129-142.
- [57] Kobayashi, M. Fitz, L. Ryan, M. Hewick, R.M. Clark, S.C. Chan, S. Loudon, R. Sherman, F. Perussia, B. ve Trinchieri, G., (1989). "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes", *The Journal of experimental medicine*, 170: 827-845.
- [58] Trinchieri, G., (1993). "Interleukin-12 and its role in the generation of T_H 1 cells", *Immunology today*, 14: 335-338.
- [59] Park, A.Y. Hondowicz, B. Kopf, M. ve Scott, P., (2002). "The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*", *The Journal of Immunology*, 168: 5771-5777.
- [60] Carrera, L. Gazzinelli, R.T. Badolato, R. Hieny, S. Muller, W. Kuhn, R. ve Sacks, D.L., (1996). "*Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice", *The Journal of experimental medicine*, 183: 515-526.
- [61] Von Stebut, E. Belkaid, Y. Jakob, T. Sacks, D.L. ve Udey, M.C., (1998). "Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity", *The Journal of experimental medicine*, 188: 1547-1552.
- [62] Snijders, A. Kalinski, P. Hilken, C. ve Kapsenberg, M.L., (1998). "High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals", *International immunology*, 10: 1593-1598.
- [63] Neogy, A. Nandy, A. Ghosh, D.B. ve Chowdhury, A., (1988). "Modulation of the cell-mediated immune response in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis in relation to chemotherapy", *Annals of tropical medicine and parasitology*, 82: 27.

- [64] Launois, P. Maillard, I. Pingel, S. Swihart, K.G. Xénarios, I. Acha-Orbea, H. Diggelmann, H. Locksley, R.M. MacDonald, H.R. ve Louis, J.A., (1997). "IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice", *Immunity*, 6: 541.
- [65] Roberts, M., (2005). "Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment", *British medical bulletin*, 75: 115-130.
- [66] Wang, Z.-E. Reiner, S.L. Zheng, S. Dalton, D.K. ve Locksley, R.M., (1994). "CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*", *The Journal of experimental medicine*, 179: 1367-1371.
- [67] Locksley, R.M. ve Louis, J.A., (1992). "Immunology of leishmaniasis", *Current opinion in immunology*, 4: 413-418.
- [68] Belosevic, M. Finbloom, D. Van Der Meide, P. Slayter, M. ve Nacy, C., (1989). "Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*", *The Journal of Immunology*, 143: 266-274.
- [69] Wilhelm, P. Ritter, U. Labbow, S. Donhauser, N. Röllinghoff, M. Bogdan, C. ve Körner, H., (2001). "Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF", *The Journal of Immunology*, 166: 4012-4019.
- [70] Theodos, C. Povinelli, L. Molina, R. Sherry, B. ve Titus, R., (1991). "Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo", *Infection and immunity*, 59: 2839-2842.
- [71] Kindler, V. Sappino, A.-P. Grau, G.E. Piguet, P.-F. ve Vassalli, P., (1989). "The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection", *Cell*, 56: 731-740.
- [72] de Waal Malefyt, R. Abrams, J. Bennett, B. Figdor, C.G. ve de Vries, J.E., (1991). "Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes", *The Journal of experimental medicine*, 174: 1209-1220.
- [73] Ribeiro-de-Jesus, A. Almeida, R. Lessa, H. Bacellar, O. ve Carvalho, E., (1998). "Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis", *Brazilian journal of medical and biological research*, 31: 143-148.

- [74] Ghalib, H.W. Piuvezam, M.R. Skeiky, Y. Siddig, M. Hashim, F. El-Hassan, A. Russo, D. ve Reed, S., (1993). "Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections", *Journal of Clinical Investigation*, 92: 324.
- [75] Carvalho, E.M. Bacellar, O. Brownell, C. Regis, T. Coffman, R.L. ve Reed, S.G., (1994). "Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis", *The Journal of Immunology*, 152: 5949-5956.
- [76] Oswald, I.P. Wynn, T.A. Sher, A. ve James, S.L., (1992). "Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 8676-8680.
- [77] D'Andrea, A. Aste-Amezaga, M. Valiante, N. Ma, X. Kubin, M. ve Trinchieri, G., (1993). "Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells", *The Journal of experimental medicine*, 178: 1041-1048.
- [78] Ding, L. Linsley, P. Huang, L. Germain, R. ve Shevach, E., (1993). "IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression", *The Journal of Immunology*, 151: 1224-1234.
- [79] Kubin, M. Kamoun, M. ve Trinchieri, G., (1994). "Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells", *The Journal of experimental medicine*, 180: 211-222.
- [80] Ghalib, H.W. Whittle, J.A. Kubin, M. Hashim, F.A. El-Hassan, A.M. Grabstein, K.H. Trinchieri, G. ve Reed, S.G., (1995). "IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections", *The Journal of Immunology*, 154: 4623-4629.
- [81] Levinson, W. ve Jawetz, E., (1996). *Medical microbiology and immunology: examination and board review*: Appleton & Lange.
- [82] Mescher, A.L., (2010). *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas*: McGraw-Hill Medical.
- [83] Junqueira, L.C.U. Carneiro, J. ve Kelley, R.O., (1998). *Basic histology*: Appleton & Lange Stamford, CT.

- [84] Maslin, C.L.V. Kedzierska, K. Webster, N.L. Muller, W.A. ve Crowe, S.M., (2005). "Transendothelial migration of monocytes: the underlying molecular mechanisms and consequences of HIV-1 infection", *Current HIV research*, 3: 303-317.
- [85] Marotta, P. Sautebin, L. ve Rosa, M., (2012). "Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line J774", *British journal of pharmacology*, 107: 640-641.
- [86] Lichtman, M.A., (2006). *Williams hematology*: McGraw-Hill, Medical Pub. Division.
- [87] Abbas, A.K. Lichtman, A.H. ve Pillai, S., (2011). *Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access*: Saunders.
- [88] Parslow, T.G. Stites, D.P. Terr, A.I. ve Imboden, J.B., (2004). *Imunologia médica; Medical immunology*: Guanabara Koogan.
- [89] Young, B. ve Heath, J., (2000). "Wheater's functional histology 4th ed", London: Churchill Livingstone.
- [90] Jourdain, D. Hallén, K. Feelisch, M. ve Grisham, M.B., (2000). "Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood", *Free Radical Biology and Medicine*, 28: 409-417.
- [91] Lowenstein, C.J. Dinerman, J.L. ve Snyder, S.H., (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger", *Annals of internal medicine*, 120: 227.
- [92] Jakovljevic, V.L. Cubrilo, D. Zivkovic, V. Djordjevic, D. ve Djuric, D., "Exercise and Oxidative Stress".
- [93] Liew, F. Millott, S. Parkinson, C. Palmer, R. ve Moncada, S., (1990). "Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine", *The Journal of Immunology*, 144: 4794-4797.
- [94] Taylor-Robinson, A.W., (1997). "Inhibition of IL-2 production by nitric oxide: a novel self-regulatory mechanism for Th1 cell proliferation", *Immunology and cell biology*, 75: 167-175.
- [95] Gavron, D. ve Saul, A., (1997). "Pioneer of tropical medicine", Rehovot, Israel: Balaban Publishers.
- [96] Tabbara, K.S. Peters, N.C. Afrin, F. Mendez, S. Bertholet, S. Belkaid, Y. ve Sacks, D.L., (2005). "Conditions influencing the efficacy of vaccination with live

organisms against *Leishmania major* infection", *Infection and immunity*, 73: 4714-4722.

- [97] Khamesipour, A. Rafati, S. Davoudi, N. Maboudi, F. ve Modabber, F., (2006). "Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview", *Indian Journal of Medical Research*, 123: 423.
- [98] Modabber, F. Coler, R. ve Reed, S., (2010). "Vaccines against *Leishmania*", *New generation vaccines*. 4th ed. New York, London: Informa Healthcare: 790-807.
- [99] Kedzierski, L. Zhu, Y. ve Handman, E., (2006). "Leishmania vaccines: progress and problems", *Parasitology*, 133: S87-S112.
- [100] Gorczynski, R.M., (1985). "Immunization of susceptible BALB/c mice against *Leishmania braziliensis*: II. Use of temperature-sensitive avirulent clones of parasite for vaccination purposes", *Cellular immunology*, 94: 11-20.
- [101] Titus, R.G. Gueiros-Filho, F.J. De Freitas, L. ve Beverley, S.M., (1995). "Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 10267-10271.
- [102] Veras, P. Brodskyn, C. Balestieri, F. Freitas, L.d. Ramos, A. Queiroz, A. Barral, A. Beverley, S. ve Barral-Netto, M., (1999). "A *dhfr-ts-Leishmania major* knockout mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 491-496.
- [103] Amaral, V. Teva, A. Oliveira-Neto, M. Silva, A. Pereira, M. Cupolillo, E. Porrozzzi, R. Coutinho, S. Pirmez, C. ve Beverley, S., (2002). "Study of the safety, immunogenicity and efficacy of attenuated and killed *Leishmania* (*Leishmania*) major vaccines in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of the human disease", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 1041-1048.
- [104] Uzonna, J.E. Wei, G. Yurkowski, D. ve Bretscher, P., (2001). "Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease", *The Journal of Immunology*, 167: 6967-6974.
- [105] Lecoeur, H. Buffet, P.A. Milon, G. ve Lang, T., (2010). "Early curative applications of the aminoglycoside WR279396 on an experimental *Leishmania major*-loaded cutaneous site do not impair the acquisition of immunity", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54: 984-990.

- [106] Späth, G.F. Lye, L.-F. Segawa, H. Turco, S.J. ve Beverley, S.M., (2004). "Identification of a compensatory mutant (lpg2– Rev) of *Leishmania major* able to survive as amastigotes within macrophages without LPG2-dependent glycoconjugates and its significance to virulence and immunization strategies", *Infection and immunity*, 72: 3622-3627.
- [107] Silvestre, R. Cordeiro-Da-Silva, A. Santarém, N. Vergnes, B. Sereno, D. ve Ouassiss, A., (2007). "SIR2-deficient *Leishmania infantum* induces a defined IFN- γ /IL-10 pattern that correlates with protection", *The Journal of Immunology*, 179: 3161-3170.
- [108] Mayrink, W. Da Costa, C. Magalhães, P. Melo, M. Dias, M. Lima, A.O. Michalick, M. ve Williams, P., (1979). "A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 385-387.
- [109] Mayrink, W. Williams, P. Da Costa, C. Magalhães, P. Melo, M. Dias, M. Oliveira, L.A. Michalick, M. Ferreira, C.E. ve Barros, G., (1985). "An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil", *Annals of tropical medicine and parasitology*, 79: 259.
- [110] Vélez, I.D. del Pilar Agudelo, S. Arbelaes, M.P. Gilchrist, K. Robledo, S.M. Puerta, J.A. Zicker, F. Berman, J. ve Modabber, F., (2000). "Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania (L.) amazonensis* vaccine against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94: 698-703.
- [111] Vélez, I.D. Gilchrist, K. Arbelaes, M.P. Rojas, C.A. Puerta, J.A. Antunes, C.M. Zicker, F. ve Modabber, F., (2005). "Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99: 593-598.
- [112] Armijos, R. Weigel, M. Calvopina, M. Hidalgo, A. Cevallos, W. ve Correa, J., (2004). "Safety, immunogenecity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis", *Vaccine*, 22: 1320-1326.
- [113] Misra, A. Dube, A. Srivastava, B. Sharma, P. Srivastava, J. Katiyar, J. ve Naik, S., (2001). "Successful vaccination against *Leishmania donovani* infection in Indian langur using alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* with BCG", *Vaccine*, 19: 3485-3492.

- [114] Kamil, A. Khalil, E. Musa, A. Modabber, F. Mukhtar, M. Ibrahim, M. Zijlstra, E. Sacks, D. Smith, P. ve Zicker, F., (2003). "Alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* plus bacille Calmette-Guérin, a candidate vaccine for visceral leishmaniasis: safety, skin-delayed type hypersensitivity response and dose finding in healthy volunteers", Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 97: 365-368.
- [115] Khalil, E.A.G. Musa, A.M. Modabber, F. ve El-Hassan, A.M., (2006). "Safety and immunogenicity of a candidate vaccine for visceral leishmaniasis (Alum-precipitated autoclaved *Leishmania major*+ BCG) in children: an extended phase II study", Annals of Tropical Paediatrics: International Child Health, 26: 357-361.
- [116] Ghalib, H. ve Modabber, F., (2007). "Consultation meeting on the development of therapeutic vaccines for post kala azar dermal leishmaniasis", Kinetoplastid biology and disease, 6: 7.
- [117] Palatnik, C.B. Borojevic, R. Previato, J. ve Mendonça-Previato, L., (1989). "Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands", Infection and immunity, 57: 754-763.
- [118] Rivier, D. Bovay, P. Shah, R. Didisheim, S. ve Mael, J., (1999). "Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection", Parasite immunology, 21: 461-474.
- [119] Handman, E. Button, L.L. ve McMaster, R.W., (1990). " *Leishmania major*: Production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice", Experimental parasitology, 70: 427-435.
- [120] Olobo, J. Anjili, C. Gicheru, M. Mbatia, P. Kariuki, T. Githure, J. Koech, D. ve McMaster, W., (1995). "Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant *Leishmania major* surface glycoprotein'(gp63)", Veterinary parasitology, 60: 199-212.
- [121] Russell, D.G. ve Alexander, J., (1988). "Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes [published erratum appears in J Immunol 1988 Apr 15; 140 (8): 2858]", The Journal of Immunology, 140: 1274-1279.
- [122] Xu, D. McSorley, S. Chatfield, S. Dougan, G. ve Liew, F., (1995). "Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA-AroD-)", Immunology, 85: 1.

- [123] McSorley, S.J. Xu, D. ve Liew, F., (1997). "Vaccine efficacy of Salmonella strains expressing glycoprotein 63 with different promoters", *Infection and immunity*, 65: 171-178.
- [124] Jaffe, C.L. Rachamim, N. ve Sarfstein, R., (1990). "Characterization of two proteins from *Leishmania donovani* and their use for vaccination against visceral leishmaniasis", *The Journal of Immunology*, 144: 699-706.
- [125] Bhowmick, S. Ravindran, R. ve Ali, N., (2008). "gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*", *Infection and immunity*, 76: 1003-1015.
- [126] Berberich, C. Ramírez-Pineda, J.R. Hambrecht, C. Alber, G. Skeiky, Y.A. ve Moll, H., (2003). "Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens", *The Journal of Immunology*, 170: 3171-3179.
- [127] Tsagozis, P. Karagouni, E. ve Dotsika, E., (2004). "Dendritic cells pulsed with peptides of gp63 induce differential protection against experimental cutaneous leishmaniasis", *International journal of immunopathology and pharmacology*, 17: 343.
- [128] Lohman, K.L. Langer, P.J. ve McMahon-Pratt, D., (1990). "Molecular cloning and characterization of the immunologically protective surface glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 8393-8397.
- [129] Kahl, L. ve McMahon-Pratt, D., (1987). "Structural and antigenic characterization of a species- and promastigote-specific *Leishmania mexicana amazonensis* membrane protein", *The Journal of Immunology*, 138: 1587-1595.
- [130] Champs, J. ve McMahon-Pratt, D., (1988). "Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection", *Infection and immunity*, 56: 3272-3279.
- [131] McMahon-Pratt, D. Rodriguez, D. Rodriguez, J. Zhang, Y. Manson, K. Bergman, C. Rivas, L. Rodriguez, J. Lohman, K. ve Ruddle, N., (1993). "Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection", *Infection and immunity*, 61: 3351-3359.
- [132] Kedzierski, L. Montgomery, J. Bullen, D. Curtis, J. Gardiner, E. Jimenez-Ruiz, A. ve Handman, E., (2004). "A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3", *The Journal of Immunology*, 172: 4902-4906.

- [133] Murray, P.J. ve Spithill, T.W., (1991). "Variants of a Leishmania surface antigen derived from a multigenic family", *Journal of Biological Chemistry*, 266: 24477-24484.
- [134] Handman, E. Symons, F.M. Baldwin, T.M. Curtis, J.M. ve Scheerlinck, J., (1995). "Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response", *Infection and immunity*, 63: 4261-4267.
- [135] Sjölander, A. Baldwin, T.M. Curtis, J.M. Lövgren Bengtsson, K. ve Handman, E., (1998). "Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection", *Vaccine*, 16: 2077-2084.
- [136] Mougneau, E. Altare, F. Wakil, A.E. Zheng, S. Coppola, T. Wang, Z.-E. Waldmann, R. Locksley, R.M. ve Glaichenhaus, N., (1995). "Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen", *Science (New York, NY)*, 268: 563.
- [137] Coelho, E.A.F. Tavares, C.A.P. Carvalho, F.A.A. Chaves, K.F. Teixeira, K.N. Rodrigues, R.C. Charest, H. Matlashewski, G. Gazzinelli, R.T. ve Fernandes, A.P., (2003). "Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection", *Infection and immunity*, 71: 3988-3994.
- [138] Carvalho, L. Passos, S. Dutra, W. Soto, M. Alonso, C. Gollob, K. Carvalho, E. ve Ribeiro de Jesus, A., (2005). "Effect of LACK and KMP11 on IFN- γ Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis Patients", *Scandinavian journal of immunology*, 61: 337-342.
- [139] Parra, L. Borja-Cabrera, G. Santos, F. Souza, L. Palatnik-de-Sousa, C. ve Menz, I., (2007). "Safety trial using the Leishmune[®] vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil", *Vaccine*, 25: 2180-2186.
- [140] Palatnik-de-Sousa, C.B. de Figueiredo Barbosa, A. Oliveira, S.M. Nico, D. Bernardo, R.R. Santos, W.R. Rodrigues, M.M. Soares, I. ve Borja-Cabrera, G.P., (2008). "FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine", *Expert review of vaccines*, 7: 833-851.
- [141] da Silva, V.O. Borja-Cabrera, G.P. Correia Pontes, N.N. de Souza, E.P. Luz, K.G. Palatnik, M. ve Palatnik de Sousa, C.B., (2000). "A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN)", *Vaccine*, 19: 1082-1092.

- [142] Borja-Cabrera, G. Correia Pontes, N. Da Silva, V. Paraguai de Souza, E. Santos, W. Gomes, E. Luz, K. Palatnik, M. ve Palatnik de Sousa, C., (2002). "Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN)", *Vaccine*, 20: 3277-3284.
- [143] Lemesre, J.-L. Holzmuller, P. Gonçalves, R.B. Bourdoiseau, G. Hugnet, C. Cavaleyra, M. ve Papierok, G., (2007). "Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the Li ESAP-MDP vaccine in endemic areas of France: Double-blind randomised efficacy field trial", *Vaccine*, 25: 4223-4234.
- [144] Holzmuller, P. Cavaleyra, M. Moreaux, J. Kovacic, R. Vincendeau, P. Papierok, G. ve Lemesre, J.-L., (2005). "Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis", *Veterinary immunology and immunopathology*, 106: 247.
- [145] Rafati, S. Fasel, N. ve Masina, S., (2003). "Leishmania cysteine proteinases: from gene to subunit vaccine", *Current Genomics*, 4: 253-261.
- [146] McKerrow, J.H. Engel, J.C. ve Caffrey, C.R., (1999). "Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections", *Bioorganic & medicinal chemistry*, 7: 639-644.
- [147] Zadeh-Vakili, A. Taheri, T. Taslimi, Y. Doustdari, F. Salmanian, A.-H. ve Rafati, S., (2004). "Immunization with the hybrid protein vaccine, consisting of *Leishmania major* cysteine proteinases Type I (CPB) and Type II (CPA), partially protects against leishmaniasis", *Vaccine*, 22: 1930-1940.
- [148] Tibbetts, R.S. Kim, I.Y. Olson, C.L. Barthel, L.M. Sullivan, M.A. Winkquist, A.G. Miller, S.D. ve Engman, D.M., (1994). "Molecular cloning and characterization of the 78-kilodalton glucose-regulated protein of *Trypanosoma cruzi*", *Infection and immunity*, 62: 2499-2507.
- [149] Ivens, A.C. Peacock, C.S. Worthey, E.A. Murphy, L. Aggarwal, G. Berriman, M. Sisk, E. Rajandream, M.-A. Adlem, E. ve Aert, R., (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*", *Science Signalling*, 309: 436.
- [150] Peacock, C.S. Seeger, K. Harris, D. Murphy, L. Ruiz, J.C. Quail, M.A. Peters, N. Adlem, E. Tivey, A. ve Aslett, M., (2007). "Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease", *Nature genetics*, 39: 839-847.

- [151] Nagill, R. ve Kaur, S., (2010). "Enhanced efficacy and immunogenicity of 78kDa antigen formulated in various adjuvants against murine visceral leishmaniasis", *Vaccine*, 28: 4002-4012.
- [152] Soong, L. Duboise, S.M. Kima, P. ve McMahon-Pratt, D., (1995). "Leishmania pifanoi amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis", *Infection and immunity*, 63: 3559-3566.
- [153] Whitaker, S.M. Colmenares, M. Pestana, K.G. ve McMahon-Pratt, D., (2008). "Leishmania pifanoi proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through Toll-like receptor 4", *Infection and immunity*, 76: 2149-2156.
- [154] Kar, S. Metz, C. ve McMahon-Pratt, D., (2005). "CD4+ T cells play a dominant role in protection against new world leishmaniasis induced by vaccination with the P-4 amastigote antigen", *Infection and immunity*, 73: 3823-3827.
- [155] Silveira, F. Blackwell, J. Ishikawa, E. Braga, R. Shaw, J. Quinnell, R. Soong, L. Kima, P. McMahon-Pratt, D. ve Black, G., (1998). "T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of Leishmania of the subgenera Leishmania and Viannia", *Parasite immunology*, 20: 19-26.
- [156] Haberer, J.E. Da-Cruz, A.M. Soong, L. Oliveira-Neto, M.P. Rivas, L. McMahon-Pratt, D. ve Coutinho, S.G., (1998). "Leishmania pifanoi amastigote antigen P-4: epitopes involved in T-cell responsiveness in human cutaneous leishmaniasis", *Infection and immunity*, 66: 3100-3105.
- [157] Carrillo, E. Ahmed, S. Goldsmith-Pestana, K. Nieto, J. Osorio, Y. Travi, B. Moreno, J. ve McMahon-Pratt, D., (2007). "Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis", *Vaccine*, 25: 1534-1543.
- [158] Resende, D.M. Caetano, B.C. Dutra, M.S. Penido, M.L. Abrantes, C.F. Verly, R.M. Resende, J.M. Piló-Veloso, D. Rezende, S.A. ve Bruna-Romero, O., (2008). "Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the Leishmania amastigote specific A2 antigen: Correlation with IFN- γ and cytolytic activity by CD8+ T cells", *Vaccine*, 26: 4585-4593.
- [159] Stäger, S. Smith, D.F. ve Kaye, P.M., (2000). "Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from Leishmania donovani induces protection against visceral leishmaniasis", *The Journal of Immunology*, 165: 7064-7071.

- [160] Moreno, J. Nieto, J. Masina, S. Canavate, C. Cruz, I. Chicharro, C. Carrillo, E. Napp, S. Reymond, C. ve Kaye, P., (2007). "Immunization with H1, HASPB1 and MML< i> Leishmania</i> proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis", *Vaccine*, 25: 5290-5300.
- [161] Wilson, M.E. Young, B.M. Andersen, K.P. Weinstock, J.V. Metwali, A. Ali, K.M. ve Donelson, J.E., (1995). "A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice", *Infection and immunity*, 63: 2062-2069.
- [162] Streit, J.A. Recker, T.J. Donelson, J.E. ve Wilson, M.E., (2000). "BCG Expressing LCR1 of< i> Leishmania chagasi</i> Induces Protective Immunity in Susceptible Mice", *Experimental parasitology*, 94: 33-41.
- [163] Masina, S. Gicheru, M.M. Demotz, S.O. ve Fasel, N.J., (2003). "Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys, using a recombinant histone H1 antigen", *Journal of Infectious Diseases*, 188: 1250-1257.
- [164] Solioz, N. Blum-Tirouvanziam, U. Jacquet, R. Rafati, S. Corradin, G. Mauël, J. ve Fasel, N., (1999). "The protective capacities of histone H1 against experimental murine cutaneous leishmaniasis", *Vaccine*, 18: 850-859.
- [165] Ghosh, A. Madhubala, R. Myler, P.J. ve Stuart, K.D., (1999). "< i> Leishmania donovani:</i> Characterization and Expression of< i> ORFF</i>, a Gene Amplified from the LDI Locus", *Experimental parasitology*, 93: 225-230.
- [166] Jain, M. ve Madhubala, R., (2008). "Characterization and localization of ORFF gene from the LD1 locus of< i> Leishmania donovani</i>", *Gene*, 416: 1-10.
- [167] Dole, V.S. Raj, V.S. Ghosh, A. Madhubala, R. Myler, P.J. ve Stuart, K.D., (2000). "Immunization with recombinant LD1 antigens protects against experimental leishmaniasis", *Vaccine*, 19: 423-430.
- [168] Tewary, P. Sukumaran, B. Saxena, S. ve Madhubala, R., (2004). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides are potent enhancers of protective immunity in mice immunized with recombinant ORFF leishmanial antigen", *Vaccine*, 22: 3053-3060.
- [169] Jaffe, C.L. ve Zalis, M., (1988). "Use of purified parasite proteins from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis", *Journal of Infectious Diseases*, 157: 1212-1220.

- [170] Soto, M. Requena, J. Quijada, L. Guzman, F. Patarroyo, M. ve Alonso, C., (1995). "Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis", *Immunology letters*, 48: 23-28.
- [171] Iborra, S. Carrión, J. Anderson, C. Alonso, C. Sacks, D. ve Soto, M., (2005). "Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice", *Infection and immunity*, 73: 5842-5852.
- [172] Iborra, S. Parody, N. Abánades, D.R. Bonay, P. Prates, D. Novais, F.O. Barral-Netto, M. Alonso, C. ve Soto, M., (2008). "Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice", *Microbes and Infection*, 10: 1133-1141.
- [173] Tolson, D.L. Jardim, A. Schnur, L.F. Stebeck, C. Tuckey, C. Beecroft, R.P. Teh, H.-S. Olafson, R.W. ve Pearson, T.W., (1994). "The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation", *Infection and immunity*, 62: 4893-4899.
- [174] Iniesta, V. Corraliza, I. Carcelén, J. Gómez Gordo, L. Fernández-Cotrino, J. Parejo, J.C. Carrión, J. Soto, M. Alonso, C. ve Gómez Nieto, C., (2008). "Leishmania major infection in susceptible and resistant mice elicit a differential humoral response against a total soluble fraction and defined recombinant antigens of the parasite", *Parasitology research*, 102: 887-893.
- [175] Hassan, E., (2008). "Humoral and Cellular Immune Responses to Synthetic Peptides of the *Leishmania donovani* Kinetoplastid Membrane Protein-11", *Scandinavian journal of immunology*, 48: 103-109.
- [176] Carrillo, E. Crusat, M. Nieto, J. Chicharro, C. Thomas, M.d.C. Martínez, E. Valladares, B. Cañavate, C. Requena, J.M. ve López, M.C., (2008). "Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis", *Vaccine*, 26: 1902-1911.
- [177] Saravia, N. Hazbon, M. Osorio, Y. Valderrama, L. Walker, J. Santrich, C. Cortazar, T. Lebowitz, J. ve Travi, B., (2005). "Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*", *Vaccine*, 23: 984-995.
- [178] Molano, I. Alonso, M.G.a. Miron, C. Redondo, E. Requena, J. Soto, M. Nieto, C.G. ve Alonso, C., (2003). "A *Leishmania infantum* multi-component

antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*", *Veterinary immunology and immunopathology*, 92: 1-13.

- [179] Parody, N. Soto, M. Requena, J. ve Alonso, C., (2004). "Adjuvant guided polarization of the immune humoral response against a protective multicomponent antigenic protein (Q) from *Leishmania infantum*. A CpG+ Q mix protects Balb/c mice from infection", *Parasite immunology*, 26: 283-293.
- [180] Webb, J.R. Campos-Neto, A. Ovendale, P.J. Martin, T.I. Stromberg, E.J. Badaro, R. ve Reed, S.G., (1998). "Human and Murine Immune Responses to a Novel *Leishmania* major Recombinant Protein Encoded by Members of a Multicopy Gene Family", *Infection and immunity*, 66: 3279-3289.
- [181] Webb, J.R. Campos-Neto, A. Skeiky, Y.A. ve Reed, S.G., (1997). "Molecular characterization of the heat-inducible LmSTI1 protein of *Leishmania major*", *Molecular and biochemical parasitology*, 89: 179-193.
- [182] Skeiky, Y.A. Kennedy, M. Kaufman, D. Borges, M.M. Guderian, J.A. Scholler, J.K. Ovendale, P.J. Picha, K.S. Morrissey, P.J. ve Grabstein, K.H., (1998). "LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile", *The Journal of Immunology*, 161: 6171-6179.
- [183] Borges, M.M. Campos-Neto, A. Sleath, P. Grabstein, K.H. Morrissey, P.J. Skeiky, Y.A. ve Reed, S.G., (2001). "Potent Stimulation of the Innate Immune System by a *Leishmania brasiliensis* Recombinant Protein", *Infection and immunity*, 69: 5270-5277.
- [184] Campos-Neto, A. Porrozzi, R. Greeson, K. Coler, R.N. Webb, J.R. Seiky, Y.A. Reed, S.G. ve Grimaldi Jr, G., (2001). "Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease", *Infection and immunity*, 69: 4103-4108.
- [185] Salay, G. Dorta, M. Santos, N. Mortara, R. Brodskyn, C. Oliveira, C. Barbiéri, C. ve Rodrigues, M., (2007). "Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World", *Clinical and Vaccine Immunology*, 14: 1173-1181.
- [186] Fujiwara, R.T. Vale, A.M. da Silva, J.C.F. da Costa, R.T. da Silva Quetz, J. Martins Filho, O.A. Reis, A.B. Oliveira, R.C. Machado-Coelho, G.L. ve Bueno, L.L., (2005). "Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis", *Veterinary research*, 36: 827-838.

- [187] Gradoni, L. Foglia Manzillo, V. Pagano, A. Piantedosi, D. De Luna, R. Gramiccia, M. Scalone, A. Di Muccio, T. ve Oliva, G., (2005). "Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals", *Vaccine*, 23: 5245-5251.
- [188] Liu, M.A. Wahren, B. ve Hedestam, G.B.K., (2006). "DNA vaccines: recent developments and future possibilities", *Human gene therapy*, 17: 1051-1061.
- [189] Alarcon, J.B. Waine, G.W. ve McManus, D.P., (1999). "DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents", *Advances in parasitology*, 42: 343-410.
- [190] Restifo, N. Ying, H. Hwang, L. ve Leitner, W., (2000). "The promise of nucleic acid vaccines", *Gene therapy*, 7: 89.
- [191] Xu, D. ve Liew, F., (1995). "Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*", *Immunology*, 84: 173.
- [192] Fragaki, K. Suffia, I. Ferrua, B. Rousseau, D. Le Fichoux, Y. ve Kubar, J., (2001). "Immunisation with DNA encoding *Leishmania infantum* protein papLe22 decreases the frequency of parasitemic episodes in infected hamsters", *Vaccine*, 19: 1701-1709.
- [193] Rafati, S. Salmanian, A.-H. Taheri, T. Vafa, M. ve Fasel, N., (2001). "A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of *Leishmania major*", *Vaccine*, 19: 3369-3375.
- [194] Campbell, K. Diao, H. Ji, J. ve Soong, L., (2003). "DNA immunization with the gene encoding P4 nuclease of *Leishmania amazonensis* protects mice against cutaneous leishmaniasis", *Infection and immunity*, 71: 6270-6278.
- [195] McShane, H., (2002). "Prime-boost immunization strategies for infectious diseases", *Current opinion in molecular therapeutics*, 4: 23.
- [196] Gonzalo, R.M. del Real, G. Rodriguez, J.R. Rodriguez, D. Heljasvaara, R. Lucas, P. Larraga, V. ve Esteban, M., (2002). "A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis", *Vaccine*, 20: 1226-1231.

- [197] Aguilar-Be, I. da Silva Zardo, R. de Souza, E.P. Borja-Cabrera, G.P. Rosado-Vallado, M. Mut-Martin, M. del Rosario García-Miss, M. de Sousa, C.B.P. ve Dumonteil, E., (2005). "Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis", *Infection and immunity*, 73: 812-819.
- [198] Rafati, S. Nakhaee, A. Taheri, T. Taslimi, Y. Darabi, H. Eravani, D. Sanos, S. Kaye, P. Taghikhani, M. ve Jamshidi, S., (2005). "Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*", *Vaccine*, 23: 3716-3725.
- [199] Xu, D. ve Liew, F., (1994). "Genetic vaccination against leishmaniasis", *Vaccine*, 12: 1534-1536.
- [200] Walker, P.S. Scharton-Kersten, T. Rowton, E.D. Hengge, U. Bouloc, A. Udey, M.C. ve Vogel, J.C., (1998). "Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis", *Human gene therapy*, 9: 1899-1907.
- [201] Dumonteil, E. Andrade-Narvarez, F. Escobedo-Ortegon, J. Ramirez-Sierra, M. Valencia-Pacheco, G. Flores-Serrano, A. Canto-Lara, S. ve Arjona-Torres, A., (2000). "Comparative Study of DNA Vaccines Encoding Various Antigens Against *Leishmania mexicana*", *Developments in biologicals*, 104: 135-142.
- [202] Dumonteil, E. Maria Jesus, R.-S. Javier, E.-O. ve Maria del Rosario, G.a.-M., (2003). "DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*", *Vaccine*, 21: 2161-2168.
- [203] Rosado-Vallado, M. Mut-Martin, M. García-Miss, M.d.R. ve Dumonteil, E., (2005). "Aluminium phosphate potentiates the efficacy of DNA vaccines against *Leishmania mexicana*", *Vaccine*, 23: 5372-5379.
- [204] Rodríguez-Cortés, A. Ojeda, A. López-Fuertes, L. Timón, M. Altet, L. Solano-Gallego, L. Sánchez-Robert, E. Francino, O. ve Alberola, J., (2007). "Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge", *Vaccine*, 25: 7962-7971.
- [205] Ahmed, S.B.H. Bahloul, C. Robbana, C. Askri, S. ve Dellagi, K., (2004). "A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*", *Vaccine*, 22: 1631-1639.

- [206] Gurusathan, S. Stobie, L. Prussin, C. Sacks, D.L. Glaichenhaus, N. Fowell, D.J. Locksley, R.M. Chang, J.T. Wu, C.-Y. ve Seder, R.A., (2000). "Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells", *The Journal of Immunology*, 165: 915-924.
- [207] Gurusathan, S. Prussin, C. Sacks, D.L. ve Seder, R.A., (1998). "Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection", *Nature medicine*, 4: 1409-1415.
- [208] Pinto, E.F. Pinheiro, R.O. Rayol, A. Larraga, V. ve Rossi-Bergmann, B., (2004). "Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK", *Infection and immunity*, 72: 4521-4527.
- [209] Gomes, D.C.d.O. Pinto, E.F. Melo, L.D.B.d. Lima, W.P. Larraga, V. Lopes, U.G. ve Rossi-Bergmann, B., (2007). "Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice", *Vaccine*, 25: 2168-2172.
- [210] Marques-da-Silva, E.A. Coelho, E.A. Gomes, D.C. Vilela, M.C. Masioli, C.Z. Tavares, C.A. Fernandes, A.P. Afonso, L.C.C. ve Rezende, S.A., (2005). "Intramuscular immunization with p36 (LACK) DNA vaccine induces IFN- γ production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge", *Parasitology research*, 98: 67-74.
- [211] Melby, P.C. Yang, J. Zhao, W. Perez, L.E. ve Cheng, J., (2001). "*Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis", *Infection and immunity*, 69: 4719-4725.
- [212] Ahmed, S.B.H. Touihri, L. Chtourou, Y. Dellagi, K. ve Bahloul, C., (2009). "DNA based vaccination with a cocktail of plasmids encoding immunodominant *Leishmania (Leishmania) major* antigens confers full protection in BALB/c mice", *Vaccine*, 27: 99-106.
- [213] Zanin, F.H. Coelho, E.A. Tavares, C.A. Marques-da-Silva, E.A. Silva Costa, M.M. Rezende, S.A. Gazzinelli, R.T. ve Fernandes, A.P., (2007). "Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections", *Microbes and Infection*, 9: 1070-1077.
- [214] Pal, R. Wang, S. Kalyanaraman, V. Nair, B. Whitney, S. Keen, T. Hocker, L. Hudacik, L. Rose, N. ve Mboudjeka, I., (2006). "Immunization of rhesus macaques with a polyvalent DNA prime/protein boost human

immunodeficiency virus type 1 vaccine elicits protective antibody response against simian human immunodeficiency virus of R5 phenotype", *Virology*, 348: 341-353.

- [215] Xiao-wen, H. Shu-han, S. Zhen-lin, H. Jun, L. Lei, J. Feng-juan, Z. Ya-nan, Z. ve Ying-Jun, G., (2005). "Augmented humoral and cellular immune responses of a hepatitis B DNA vaccine encoding HBsAg by protein boosting", *Vaccine*, 23: 1649-1656.
- [216] Tapia, E. Pérez-Jiménez, E. López-Fuertes, L. Gonzalo, R. Gherardi, M.M. ve Esteban, M., (2003). "The combination of DNA vectors expressing IL-12+ IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK", *Microbes and infection/Institut Pasteur*, 5: 73.
- [217] Rafati, S. Zahedifard, F. Azari, M.K. Taslimi, Y. ve Taheri, T., (2008). "< i> Leishmania infantum</i>: Prime boost vaccination with C-terminal extension of cysteine proteinase type I displays both type 1 and 2 immune signatures in BALB/c mice", *Experimental parasitology*, 118: 393-401.
- [218] Sukumaran, B. Tewary, P. Saxena, S. ve Madhubala, R., (2003). "Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with< i> Leishmania donovani</i>", *Vaccine*, 21: 1292-1299.
- [219] D'Andrea, A. Rengaraju, M. Valiante, N.M. Chehimi, J. Kubin, M. Aste, M. Chan, S. Kobayashi, M. Young, D. ve Nickbarg, E., (1992). "Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells", *The Journal of experimental medicine*, 176: 1387-1398.
- [220] Szabo, S.J. Jacobson, N.G. Dighe, A.S. Gubler, U. ve Murphy, K.M., (1995). "Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling", *Immunity*, 2: 665-675.
- [221] Scott, P., (1993). "IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity", *Science (New York, NY)*, 260: 496.
- [222] Scott, P. Natovitz, P. Coffman, R.L. Pearce, E. ve Sher, A., (1988). "Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens", *The Journal of experimental medicine*, 168: 1675-1684.

- [223] Skeiky, Y.A. Coler, R.N. Brannon, M. Stromberg, E. Greeson, K. Thomas Crane, R. Campos-Neto, A. ve Reed, S.G., (2002). "Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL^{< sup>®} adjuvant", *Vaccine*, 20: 3292-3303.</sup>
- [224] Badaro, R. Lobo, I. Nakatani, M. Muiños, A. M Netto, E. Coler, R.N. ve Reed, S.G., (2001). "Successful use of a defined antigen/GM-CSF adjuvant vaccine to treat mucosal leishmaniasis refractory to antimony: a case report", *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 5: 223-232.
- [225] Lin, R. ve Jones, T.C., (1997). "Vaccine Adjuvants: A New Hope for Effective Immunizations", *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 1: 106.
- [226] Badaro, R. Nascimento, C. Carvalho, J. Badaro, F. Russo, D. Ho, J. Reed, S. Johnson Jr, W. ve Jones, T., (1994). "Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reverses neutropenia and reduces secondary infections in visceral leishmaniasis", *The Journal of infectious diseases*: 413-418.
- [227] Murray, H.W. Berman, J.D. Davies, C.R. ve Saravia, N.G., (2005). "Advances in leishmaniasis", *The Lancet*, 366: 1561-1577.
- [228] Shoenfeld, Y. ve Isenberg, D.A., (1988). "Mycobacteria and autoimmunity", *Immunology today*, 9: 178-182.
- [229] Milstien, J.B. ve Gibson, J., (1990). "Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety", *Bulletin of the World Health Organization*, 68: 93.
- [230] Toledo, H. Baly, A. Castro, O. Resik, S. Laferté, J. Rolo, F. Navea, L. Lobaina, L. Cruz, O. ve Míguez, J., (2001). "A phase I clinical trial of a multi-epitope polypeptide TAB9 combined with Montanide ISA 720 adjuvant in non-HIV-1 infected human volunteers", *Vaccine*, 19: 4328-4336.
- [231] Oliveira, G.A. Wetzel, K. Calvo-Calle, J.M. Nussenzweig, R. Schmidt, A. Birkett, A. Dubovsky, F. Tierney, E. Gleiter, C.H. ve Boehmer, G., (2005). "Safety and enhanced immunogenicity of a hepatitis B core particle Plasmodium falciparum malaria vaccine formulated in adjuvant Montanide ISA 720 in a phase I trial", *Infection and immunity*, 73: 3587-3597.
- [232] Collins, W.E. Barnwell, J.W. Sullivan, J.S. Nace, D. Williams, T. Bounngaseng, A. Roberts, J. Strobert, E. McClure, H. ve Saul, A., (2006). "Assessment of transmission-blocking activity of candidate Pvs25 vaccine using gametocytes

from chimpanzees", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 74: 215-221.

- [233] Reed, S.G. Bertholet, S. Coler, R.N. ve Friede, M., (2009). "New horizons in adjuvants for vaccine development", *Trends in immunology*, 30: 23-32.
- [234] Kaslow, D.C. Bathurst, I.C. Lensen, T. Ponnudurai, T. Barr, P.J. ve Keister, D.B., (1994). "Saccharomyces cerevisiae recombinant Pfs25 adsorbed to alum elicits antibodies that block transmission of Plasmodium falciparum", *Infection and immunity*, 62: 5576-5580.
- [235] Glenny, A. Buttle, G. ve Stevens, M.F., (1931). "Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: Toxoid precipitated with alum", *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 34: 267-275.
- [236] Eickhoff, T.C. ve Myers, M., (2002). "Workshop summary. Aluminum in vaccines", *Vaccine*, 20: S1.
- [237] Gupta, R. Rost, B. Relyveld, E. ve Siber, G., (1995). "Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds", *Pharmaceutical biotechnology*, 6: 229.
- [238] Verthelyi, D. Kenney, R.T. Seder, R.A. Gam, A.A. Friedag, B. ve Klinman, D.M., (2002). "CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates", *The Journal of Immunology*, 168: 1659-1663.
- [239] Kumar, S. Jones, T.R. Oakley, M.S. Zheng, H. Kuppusamy, S.P. Taye, A. Krieg, A.M. Stowers, A.W. Kaslow, D.C. ve Hoffman, S.L., (2004). "CpG oligodeoxynucleotide and Montanide ISA 51 adjuvant combination enhanced the protective efficacy of a subunit malaria vaccine", *Infection and immunity*, 72: 949-957.
- [240] Sohrabi, Y. ve Mahmoud, R., (2005). "Evaluation of immune response against leishmaniasis in resistance C57 BL/6 mice immunized with liposomes containing autoclaved Leishmania major with BCG", *Cell Mol. Biol. Lett*, 10: S98.
- [241] Holbrook, T.W. Cook, J.A. ve Parker, B.W., (1981). "Immunization against Leishmania donovani: glucan as an adjuvant with killed promastigotes", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 30: 762.
- [242] Midtlyng, P., (1997). "Vaccinated fish welfare: protection versus side-effects", *Developments in biological standardization*, 90: 371.
- [243] Sharples, C.E. Shaw, M.-A. Castes, M. Convit, J. ve Blackwell, J.M., (1994). "Immune response in healthy volunteers vaccinated with BCG plus killed

leishmanial promastigotes: antibody responses to mycobacterial and leishmanial antigens", *Vaccine*, 12: 1402-1412.

- [244] Kensil, C. Wu, J. ve Soltysik, S., (1995). "Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21", *Pharmaceutical biotechnology*, 6: 525.
- [245] Osebold, J., (1982). "Mechanisms of action by immunologic adjuvants", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181: 983.
- [246] Panaro, M. Acquafredda, A. Lisi, S. Lofrumento, D. Mitolo, V. Sisto, M. Fasanella, A. Trotta, T. Bertani, F. ve Consenti, B., (2001). "Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes", *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 24: 187-195.
- [247] Dyakonova, V.A. Dambaeva, S.V. Pinegin, B.V. ve Khaitov, R.M., (2004). "Study of interaction between the polyoxidonium immunomodulator and the human immune system cells", *Int Immunopharmacol*, 4: 1615-1623.
- [248] Dambaeva, S.V. Mazurov, D.V. Golubeva, N.M. D'Yakonova V, A. Pinegin, B.V. ve Khaitov, R.M., (2003). "Effect of polyoxidonium on the phagocytic activity of human peripheral blood leukocytes", *Russ J Immunol*, 8: 53-60.
- [249] Chereshevnev, V.A. Shilov, Y.I. Cheresheva, M.V. Platova, L.A. Badanina, O.N. Osotov, S.V. ve Ponomareva, T.B., (2000). "Effects of Polyoxidonium on Phagocytic Cell Functions. Experimental and Clinical Estimation of Potential Inclusion of Polyoxidonium in Complex Therapy in Penetrating Eye Injury", *Russ J Immunol*, 5: 39-52.
- [250] Monakhov, A. Anisimov, V. Barchuk, A. ve Semiletova, Y., (2010). "Evaluation of clinical and cytogenetic efficiency of immunotherapy with polyoxidonium in patients with skin melanoma", *Immunology*: 133.
- [251] Chandrasekhar, V., (2005). *Inorganic and organometallic polymers*: Springer New York.
- [252] Hara, M., (1992). *Polyelectrolytes: science and technology*: CRC.
- [253] Hileman, R.E. Fromm, J.R. Weiler, J.M. ve Linhardt, R.J., (1998). "Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins", *Bioessays*, 20: 156-167.

- [254] Trabelsi, S. ve Langevin, D., (2007). "Co-adsorption of carboxymethyl-cellulose and cationic surfactants at the air-water interface", *Langmuir*, 23: 1248-1252.
- [255] Bromberg, L., (2001). "Interactions among proteins and hydrophobically modified polyelectrolytes", *Journal of pharmacy and pharmacology*, 53: 541-547.
- [256] Dilgimen, A.S. Mustafaeva, Z. Demchenko, M. Kaneko, T. Osada, Y. ve Mustafaev, M., (2001). "Water-soluble covalent conjugates of bovine serum albumin with anionic poly (< i> N</i>-isopropyl-acrylamide) and their immunogenicity", *Biomaterials*, 22: 2383-2392.
- [257] Schiessel, H. ve Blumen, A., (2003). "Theory of dilute polyampholyte solutions in external electrical fields", *Macromolecular theory and simulations*, 6: 103-143.
- [258] Gardon, J., (1965). "Encyclopedia of polymer Science and technology", Vol. 3Wiley, New York: 833.
- [259] Oechsner, M. ve Keipert, S., (1999). "Polyacrylic acid/polyvinylpyrrolidone bipolymeric systems. I. Rheological and mucoadhesive properties of formulations potentially useful for the treatment of dry-eye-syndrome", *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 47: 113-118.
- [260] Bell, C. ve Peppas, N., (1995). "Biomedical membranes from hydrogels and interpolymer complexes", *Biopolymers II*: 125-175.
- [261] Yoshida, K. Sokhakian, S. ve Dubin, P., (1998). "Binding of polycarboxylic acids to cationic mixed micelles: Effects of polymer counterion binding and polyion charge distribution", *Journal of colloid and interface science*, 205: 257-264.
- [262] Kirkpatrick, C.J. Peters, K. Hermanns, M. Bittinger, F. Krump-Konvalinkova, V. Fuchs, S. ve Unger, R.E., (2005). "In vitro methodologies to evaluate biocompatibility: status quo and perspective", *Itbm-Rbm*, 26: 192-199.
- [263] Elcicek, S. Bagirova, M. ve Allahverdiyev, A.M., (2012). "Generation of avirulent Leishmania parasites and induction of nitric oxide production in macrophages by using polyacrylic acid", *Exp Parasitol*, 133: 237-242.
- [264] Allahverdiyev, A.M. Bagirova, M. Elcicek, S. Koc, R.C. Baydar, S.Y. Findikli, N. ve Oztel, O.N., (2011). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new host cell in latent leishmaniasis", *Am J Trop Med Hyg*, 85: 535-539.

- [265] Kolodziej, H. ve Kiderlen, A.F., (2005). "Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells", *Phytochemistry*, 66: 2056-2071.
- [266] Honoré, S. Garin, Y.J.F. Sulahian, A. Gangneux, J.P. ve Derouin, F., (1998). "Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection", *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 21: 231-239.
- [267] Kabanov, V. Mustafaev, M. Nekrasov, A. Norimov, A. ve Petrov, R., (1984). "Critical nature of the effect of the degree of polyelectrolyte polymerization on immunostimulating properties]", *Doklady Akademii nauk SSSR*, 274: 998.
- [268] Petrov, R. Kabanov, V. Khaitov, R. Mustafaev, M. ve Norimov, A., (1986). "Effect of heparin on the immunogenicity of electrostatic covalent albumin complexes with synthetic polyions. Immunogenicity of the triple covalent complex polyelectrolyte-protein-heparin]", *Molekuliarnaia genetika, mikrobiologiya i virusologiya*: 30.
- [269] Chereshnev, V. Iushkov, B. Danilova, I. Chereshneva, M. Khramtsova, Y. Chishi, M. ve Artashjan, O., (2005). "Polyoxidonium and Tamerit influence on the regenerator processes in tissues with different recovery ability", *IMMUNOLOGIJA-MOSKVA-MEDITSINA*-, 4: 199.
- [270] Dyakonova, V.A. Dambaeva, S.V. Pinegin, B.V. ve Khaitov, R.M., (2004). "Study of interaction between the polyoxidonium immunomodulator and the human immune system cells", *International immunopharmacology*, 4: 1615-1623.
- [271] Yim, E.S. Zhao, B. Myung, D. Kourtis, L.C. Frank, C.W. Carter, D. Smith, R.L. ve Goodman, S.B., (2009). "Biocompatibility of poly (ethylene glycol)/poly (acrylic acid) interpenetrating polymer network hydrogel particles in RAW 264.7 macrophage and MG-63 osteoblast cell lines", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91: 894-902.

ETİK KURUL TUTANAĞI

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

SAYI: 2012/06
KONU: Sn. Prof. Dr. Adil M. Allahverdiyev

16.01.2012

Sayın Prof. Dr. Adil M. Allahverdiyev,

Başlığı “İmmunostimulan Polimerler İle Avirulent Parazitlerin Geliştirilmesi ve Viseral Leishmaniasise Karşı Aşı Etkinliğinin İncelenmesi” olan projeniz 16.01.2012 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve deneklerin sakrifikasyonu sırasında uygulanacak maddenin dozunun belirtilmesi kaydıyla onanmıştır.

Prof. Dr. Erhan Ayşan
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet Belce
Üye

Prof. Dr. Serdar Üşümez
Üye

Doç. Dr. Ülkan Kılıç
Üye

Yrd. Doç. Dr. Mahmut Gürkan
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer Uysal
Üye

Uzm. Vet. Hek. Ozgur Inan
Üye

Muhsin Ceylan
Üye

Ahmet Sivil
Üye

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Serhat ELÇİÇEK
Doğum Tarihi ve Yeri : 1983/MARDİN
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :serhatelcicek@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	YTÜ	2009
Lisans	Biyomühendislik	Ege Üniversitesi	2006
Lise	Matematik-Fen	Dr. Kemal Naci Ekşi Lisesi	2001

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2009-Halen	Fırat Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

Makale

1. Elcicek, S., Bagirova, M. and Allahverdiyev, A.M.,(2012). Generation of Avirulent Leishmania Parasites and Induction of Nitric Oxide Production in Macrophages by Using Polyacrylic Acid Exp Parasitol.
- 2 - Allahverdiyev, A.M., Bagirova, M., Elcicek, S., Koc, R.C., and Oztel, O.N. (2011). Effect of Human Urine on Cell Cycle and Infectivity of Leishmania Species Promastigotes *In Vitro*. Am J Trop Med Hyg 85, 639-643.
- 3 - Allahverdiyev, A.M., Koc, R.C., Ates, S.C., Bagirova, M., Elcicek, S., and Oztel, O.N. (2011). Leishmania tropica: The effect of darkness and light on biological activities *in vitro*. Exp Parasitol 128, 318-323.
- 4 - Allahverdiyev, A.M., Bagirova, M., Cakir-Koc, R., Elcicek, S., Oztel, O.N., Canim-Ates, S., Abamor, E.S., and Yesilkir-Baydar, S. (2012). Utility of the Microculture Method in Non-Invasive Samples Obtained from an Experimental Murine Model with Asymptomatic Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 87, 81-86.
- 5 - Allahverdiyeva, A.M., Bagirova, M., Elcicek, S., Oztel, O.N., Koc, R.C., Novruzova, M., and Ates, S.C. (2012). Growth of Leishmania tropica Promastigotes in Urine Samples of Different Genders and the Role of Citrate in Culture. Rom Biotech Lett 17, 6999-7004.
- 6 - Ates, S.C., Bagirova, M., Allahverdiyev, A.M., Baydar, S.Y., Koc, R.C., Elcicek, S., Abamor, E.S., and Oztel, O.N. (2012). Detection of antileishmanial antibodies in blood sampled from blood bank donors in Istanbul. Future Microbiol 7, 773-779.
- 7 - Allahverdiyev, A.M., Bagirova, M., Elcicek, S., Koc, R.C., Baydar, S.Y., Findikli, N., and Oztel, O.N. (2011). Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Host Cell in Latent Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 85, 535-539.

Bildiri

1 - Allahverdiyev A., Bagirova M., Elcicek S. , Oztel O. N., Cakir R., Novruzova M., The Effect of Urine Samples of Different Genders on Growth of *L.tropica* Promastigotes, Eurasia Congress of Infectious Diseases (EACID), pp. 176, (2009)

2 - Allahverdiyev A. M., Bağırova M., Yeşilkır S., Elçiçek S., Çakır R., Fındıklı N., Adipose-derived Stem Cells (ADSCs) As A New Host Cell of Leishmania Parasites, Eurasia Congress of Infectious Diseases, (2009)

3 - Allahverdiyev A., Bagirova M., Elcicek S., Cakir R, Oztel O. N. , The Study of Viability of Leishmania Promastigotes Under The Light Conditions *In vitro* , 4th World Congress on Leishmaniasis, (2009)

4 - Allahverdiyev A.M., Bagirova M.I., Abamor E.S., Cakir Koc R., Elcicek S., Rafailovich M. (2010). A New Approach In Treatment Of Leishmaniasis: Nanoparticles And Nanoparticle-Containing Compounds, The First Congress of the Euro-Asian Society for Infectious Diseases Russia, St. Petersburg, ISSN 2072-6732 .p.133.

5 - Elcicek S., Bagirova M.I., Allahverdiyev A.M. (2010), Effect Of Polyacrylic Acid On The Infectivity Of Leishmania Promastigotes *In Vitro*. The First Congress of the Euro-Asian Society for Infectious Diseases Russia, St. Petersburg, ISSN 2072-6732 .p.134.

Kitap

1 - Adil M. Allahverdiyev, Malahat Bagirova, Serhat Elcicek, Rabia Cakir Koc, Sezen Canim Ates, Serap Yesilkir Baydar, Serkan Yaman, Emrah Sefik Abamor and Olga Nehir Oztel (2012) Dehydrogenases: Chapter 4: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Malaria: A Method to Detect Primaquine-Induced Hemolysis *in vitro* ISBN 978-953-307-019-3, Hard cover, 354 pages, Publisher: InTech

2 - Adil M. Allahverdiyev, Malahat Bagirova, Olga Nehir Oztel, Serkan Yaman, Emrah Sefik Abamor, Rabia Cakir Koc, Sezen Canim Ates, Serhat Elcicek and Serap Yesilkir Baydar (2012) Dehydrogenases: Chapter 1: Aldehyde Dehydrogenase: Cancer and Stem Cells. ISBN 978-953-307-019-3, Hard cover, 354 pages, Publisher: InTech.

Proje

- 1 - "İstanbul'daki Kan Merkezlerinden Elde Edilen Donör Kan Örneklerinde, Yeni ve Klasik Tanı Yöntemleri ile Leishmania'nın İncelenmesi", BAP Proje No: 29-07-04-01 (Araştırmacı)
- 2 - "Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular", Şemsiye Proje, Proje No: 25-DPT-07 04-01, 2004 -2008. (Bursiyer)
- 3 - "Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesinde polimerlere dayalı yeni bir yaklaşım: LPG polimer konjugatları", TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu 1001 nolu proje, Proje No: 108S170.(Bursiyer)
- 4 - Yüzeyi Fonksiyonlaştırılmış Karbon Nano-Tüplerle Takviyeli Alümina Ve Hidroksiapatit Esaslı Nano-Yapılı Seramiklerin Üretimi Ve Karakterizasyonu, TÜBİTAK Proje No:108T651.(Bursiyer)
- 5 - Göksu Vadisi ve Deltasında Ekoloji Temelli Doğa Eğitimi, TÜBİTAK 4004 Projesi, Proje No:110B045

ÖDÜLLERİ

- 1 - Poster Birincilik Ödülü:2-6 Kasım 2009 yılında Serhat Elçiçek, Melahat Bağirova, Adil M. Allahverdiyev 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Poliakrilik Asite Maruz Kalmış L. infantum Promastigotlarının J774 Makrofaj Hücrelerine Enfektifliğinin İncelenmesi.
- 2 - Poster Ödülü:1-4 Ekim 2009 yılında A. M. Allahverdiyev, M. Bağirova, S. Yeşilkır, S. Elçiçek, R. Çakır, N. Fındıklı. Eurasia Congress of Infectious Diseases (EACID) , Bakü, Adipose-derived stem cells (ADSCs) as a new host cell of Leishmania parasites adlı sunuma ULUSLARARASI ÜÇÜNCÜLÜK ÖDÜLÜ