

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LEISHMANIA INFANTUM'UN FARKLI ANTİJEN KOMBİNASYONLARINI  
İÇEREN POLİ(LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT) NANOPARTİKÜLLERİNİN  
SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE VİSSERAL LEISHMANİASİS'E KARŞI AŞI  
ADAYI OLARAK ETKİNLİKLERİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO* İNCELENMESİ**

**ÖZLEM AYŞE TOSYALI**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI  
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN  
DR. ÖĞR. ÜYESİ MELAHAT BAĞIROVA**

**İSTANBUL, 2018**

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LEISHMANIA INFANTUM'UN FARKLI ANTİJEN KOMBİNASYONLARINI  
İÇEREN POLİ(LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT) NANOPARTİKÜLLERİNİN  
SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE VİSSERAL LEİSHMANİASİS'E KARŞI AŞI  
ADAYI OLARAK ETKİNLİKLERİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO* İNCELENMESİ**

Özlem Ayşe TOSYALI tarafından hazırlanan tez çalışması 25.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

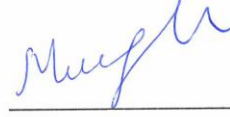
Dr. Öğr. Üyesi Melahat BAĞIROVA  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

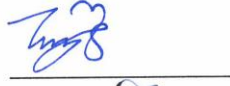
Dr. Öğr. Üyesi Melahat BAĞIROVA  
Yıldız Teknik Üniversitesi



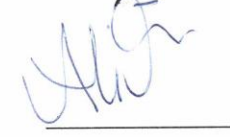
Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV  
Yıldız Teknik Üniversitesi



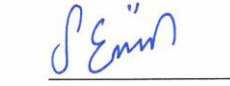
Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ  
Acıbadem Üniversitesi



Prof. Dr. Yaşar Ali ÖNER  
İstanbul Aydın Üniversitesi



Doç. Dr. Serap DERMAN  
Yıldız Teknik Üniversitesi



Bu tez çalışması, 213S148 nolu Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'nın 1003 Projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

## ÖNSÖZ

---

Lisansüstü eğitimim boyunca bana laboratuvarlarının kapısını açıp başarılı bir şekilde tezimi tamamlama imkan sağlayan ve ayrıca akademik bilgisi ve tecrübesi ile bana destek olan çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Melahat BAĞIROVA'ya, çalışmalarım boyunca aynı ilgi ve desteği gösteren değerli hocam Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e, teşekkürü borç bilirim. Çalışmalarım boyunca benden manevi desteğini ve yardımlarını esirgemeyen omuz omuza çalıştığım hem arkadaşım hem hocam Arş. Gör. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a yürekten teşekkür ediyorum.

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünün kurulmasını sağlayan hocalarımız Sayın Prof. Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE'ye ve Sayın Prof. Dr. Huriye KUZU'ya ve bu çalışmanın yerine getirilmesine imkan sağlayan Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına, Fen Bilimleri Enstitüsüne, Biyomühendislik Bölümü Başkanına ve bölümümüzün değerli öğretim üyeleri ile asistanlarına,

Çalışmama maddi olarak destek sağlayan ve beni onurlandıran Türkiye Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a ve Tezin *in vivo* çalışma kısımlarını gerçekleştirdiğim Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezine'ne;

Teze katkılarından dolayı tez izleme komitesinde yer alan değerli hocalarım Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ'e ve Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e ve TÜBİTAK projesinde yer alan hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Zeynep AKDESTE'ye ve ablam gibi sevdiğim Doç. Dr. Serap DERMAN'a;

Hem deneysel çalışmalarına katkıları hem de dostluklarıyla yanımda olan Mehmet AYDOĞDU'ya ve Tayfun ACAR'a ve ayrıca tüm hücre kültürü ve doku mühendisliği laboratuvarındaki arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Beni bugünlere getiren, maddi manevi her anlamda sabır ve özveri ile yanımda olan sevgili annem Fatma Ufku ÖZYILMAZ ve rahmetli canım babam Kadir ÖZYILMAZ'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca bana evinin kapılarını açıp destek ve sevgisini esirgemeyen abim Taner ÖZYILMAZ'a, her ne kadar uzakta da olsa bana her daim destek olan abim Tayfun ÖZYILMAZ'a ve son olarak, anlayış ve destekleri için eşim Eren TOSYALI'ya tüm kalbimle sonsuz teşekkürler.

Aralık, 2018

Özlem Ayşe TOSYALI

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	x
KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ .....	xvi
ÖZET .....	xvii
ABSTRACT.....	xx
<b>BÖLÜM 1</b>	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	5
1.3 Hipotez.....	6
<b>BÖLÜM 2</b>	
GENEL BİLGİLER .....	8
2.1 Aşı.....	8
2.2 Leishmaniasis .....	11
2.1.1 Kütanöz leishmaniasis (KL).....	12
2.1.2 Mukokutanöz leishmaniasis (MKL).....	13
2.1.3 Visseral Leishmaniasis (VL) .....	14
2.3 <i>Leishmania</i> Parazitleri, Morfolojisi ve Yaşam Döngüsü.....	15
2.3.1 <i>Leishmania</i> Parazitleri.....	15
2.3.2 Parazitlerin Morfolojisi .....	16
2.3.3 Parazitlerin Hayat Döngüsü .....	18
2.3.3.1 Promastigot Formdan Amastigot Forma Geçiş .....	18
2.3.3.2 Amastigot Formdan Promastigot Forma Geçiş .....	19
2.4 Vektör.....	20
2.5 Leishmaniasis’de İmmünite .....	20
2.6 Visseral Leishmaniasis İmmünitesi .....	25
2.7 Parazit Konak Etkileşimi ve Konak İçerisinde Hayatta Kalma Stratejileri .....	27
2.8 Visseral Leishmaniasis Tanısı .....	30

2.9	Visseral Leishmaniasis'in Tedavisi.....	32
2.10	Aşının Gerekliliği .....	38
2.11	Geliştirilmiş Anti-Leishmaniyal Aşı Adayları.....	39
2.11.1	Birinci Jenerasyon Aşılar .....	39
2.11.1.1	Ölü <i>Leishmania</i> Aşıları .....	41
2.11.1.2	Zayıflatılmış Canlı (Attenüe) <i>Leishmania</i> Aşıları .....	42
2.11.2	İkinci Jenerasyon Aşılar .....	43
2.11.2.1	Membran / Yüzey antijenlerine Dayalı Aşı Hedefleri .....	43
2.11.2.2	Dendritik Hücre Temelli Aşılar.....	46
2.11.2.3	Anti-tatarcık Tükürük (Salya) Proteinlerine Dayalı Aşı Hedefleri .....	47
2.11.3	Üçüncü Jenerasyon Aşılar.....	47
2.12	Adjuvanlar.....	48
2.12.1	Geleneksel Adjuvanlar .....	49
2.12.1.1	Freund adjuvanları .....	49
2.12.1.2	Alum .....	49
2.12.1.3	Bacillus Calmette–Guérin (BCG) .....	50
2.12.1.4	İnterlökin 12 (IL-12).....	50
2.12.1.5	Metillenmemiş dinükleotid (CpG) .....	51
2.12.2	Nanopartiküller .....	51
2.12.2.1	Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) Temelli Nanoparçacıklar ile Aşılama.....	53

### BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	57	
3.1	Materyal.....	57
3.1.1	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler .....	57
3.1.2	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri .....	59
3.1.3	Çözeltilerin Hazırlanması .....	63
3.1.3.1	PBS Tampon Hazırlanması .....	63
3.1.3.2	RPMI 1640 Medyumun Hazırlanması .....	63
3.1.3.3	DMEM Medyumun Hazırlanması .....	63
3.1.3.4	Beyin Kalp İnfüzyon (BHI) Medyumun Hazırlanması.....	63
3.1.3.5	Coomassie Brilliant Blue Reaktifinin hazırlanması .....	64
3.1.3.6	MTT Solüsyonunun Hazırlanması .....	64
3.1.3.7	Nitrik Oksit (NO) için Griess Reaktifinin Hazırlanması .....	64
3.1.3.8	NO için Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	64
3.1.3.9	ELISA için Kaplama Çözeltisi (pH: 9,6).....	65
3.1.3.10	ELISA için Substrat Tamponu (pH:10,4).....	65
3.1.3.11	ELISA için Substrat Çözeltisi .....	65
3.1.3.12	ELISA için PBS/Tween20 Çözeltisi .....	65
3.1.3.13	ELISA için PBS/Tween20/milk Çözeltisi.....	65
3.2	Metot .....	65
3.2.1	Hücrelerin Kriyobanktan Çıkarılması .....	65
3.2.1.1	J774 Hücre Hattının Kriyobanktan Çıkarılması .....	65
3.2.1.2	L929 Fibroblast Hücre Hattının Kriyobanktan Çıkarılması.....	66
3.2.1.3	MONI/EP126 <i>L. infantum</i> Suşunun Kriyobanktan Çıkarılması.....	66

3.2.2 Hücre Hatlarının Kültürü ve Kriyoprezervasyonu .....	66
3.2.2.1 J774 Hücre Hattının Kültürü ve Kriyoprezervasyonu .....	66
3.2.2.2 Fibroblast (L929) Hattının Kültürü ve Kriyoprezervasyonu .....	67
3.2.3 Tripın Mavisini boya ile Hücre Canlılığının Tayin Edilmesi ve Hücre Sayımı .....	67
3.2.3.1 MONI/EP126 <i>L.infantum</i> Kültürünün Kültürünün Yapılması ve Devamlı Kültürünün Elde Edilmesi.....	68
3.2.3.2 ParazitlerinThoma Lamında Sayımı .....	70
3.2.4 <i>L. infantum</i> Promastigotlarından Antijen Elde Edilmesi .....	70
3.2.4.1 Dondurup/Çözme Yöntemi ile <i>L. infantum</i> Antijeninin Elde Edilmesi	70
3.2.4.2 Otoklavlama Yöntemi ile <i>L. infantum</i> Antijeninin Elde Edilmesi .....	71
3.2.4.3 EP 126 <i>L.infantum</i> Parazitlerinden LPG İzolasyonu .....	71
3.2.5 İkili Emülsiyon (w/o/w) Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Nanopartikül Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	74
3.2.5.1 Nanopartiküllerin İkili Emülsiyon Çözücü Uçurma (w/o/w) Yöntemi ile Hazırlanması.....	75
3.2.5.2 Nanopartiküllerin Yıkınması ve Saflaştırılması.....	76
3.2.5.3 Elde Edilen Partiküllerin Karakterizasyonu .....	76
3.2.5.4 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması.....	76
3.2.5.5 Enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanması .....	76
3.2.5.6 Yükleme veriminin hesaplanması .....	77
3.2.5.7 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi .....	77
3.2.5.8 Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi.....	77
3.2.5.9 Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi.....	78
3.2.5.10 <i>In vitro</i> Salım Çalışmaları .....	78
3.2.6 J774 ve L929 Hücre Hatları Üzerinde Toksisitenin MTT Yöntemi ile İncelenmesi.....	78
3.2.7 Nanoformülasyonlarının Makrofajların Nitrik Oksit (NO) Üretimi Üzerindeki Etkinliğinin İncelenmesi.....	80
3.2.8 Nanopartiküler Formülasyonlara Maruz Kalan Makrofajların (J774) Ürettikleri Sitokin Seviyelerinin İncelenmesi.....	81
3.2.9 Deney Hayvanlarının İmmünizasyonunda Kullanılmak Üzere Nanopartiküler Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması.....	82
3.2.10 Hazırlanan Nanopartiküler Formülasyonlar ve Antijenler ile Deney Hayvanlarının İmmünizasyonu .....	83
3.2.11 Aşı Formülasyonlarının BALB/C Farelere Enjekte Edilmesi.....	84
3.2.12 BALB/C Farelerden Serum Örneklerinin Alınması .....	85
3.2.13 ELISA (Enzyme-linked İmmunosorbent Testi) ile Serum Örneklerindeki Antikor Miktarının Tayini.....	86
3.2.14 Balb/c Farelerin Enfektif <i>L.infantum</i> Promastigotlarıyla Enfekte Edilmesi .....	87
3.2.15 Giemsa Boyama ve Mikro Kültür Yöntemi (MKY) ile Kandan Parazit Varlığının İncelenmesi.....	87
3.2.16 Enfektivitesinin Hesaplanması .....	88
3.2.17 Farelerin Sakrifiye Edilmesi ve Organlarının Ayrılması .....	89
3.2.18 Karaciğer ve Dalaktan Yayma Hazırlanması ve Enfeksiyonun	

İncelenmesi .....	90
3.2.19 Dalaktan Sitokin Üretiminin Değerlendirilmesi .....	92
3.2.19.1 Interlökin 12 (IL-2) Miktarının ELISA İle Ölçümü.....	93
3.2.19.2 Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) Miktarının ELISA İle Ölçümü .....	94
3.2.19.3 Interlökin 4 (IL-4) Miktarının ELISA İle Ölçümü.....	95
3.2.19.4 Interlökin 10 (IL-10) Miktarının ELISA İle Ölçümü.....	95
3.3 İstatistik Analiz.....	95
<b>BÖLÜM 4</b>	
<b>DENEYSEL SONUÇLAR .....</b>	<b>96</b>
4.1 <i>In Vitro</i> Çalışma Sonuçları.....	96
4.1.1 Makrofaj (J774) Hücre Kültürü Yapılması .....	96
4.1.2 <i>L. infantum</i> Promastigotlarını Kültürünün Yapılması .....	97
4.1.3 <i>L. infantum</i> (EP 126) Promastigotlarını Büyük ölçekli Kültürünün Yapılması.....	98
4.1.4 <i>L. infantum</i> Parazitlerinden İzole Edilen LPG Molekülünün Karakterizasyonu.....	99
4.1.4.1 İnce Tabaka Kromatografisi .....	99
4.1.4.2 Protein Açısından Saflığın Tayininin İncelenmesi .....	99
4.1.4.3 Fenol Sülfürik Asit Yöntemi ile LPG Miktarının Belirlenmesi .....	100
4.1.4.4 LPG Molekülünün Amicon Filtreli Santrifüj Tüplerinde Saflaştırılması.....	101
4.1.5 Polimerik Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu .....	102
4.1.5.1 Reaksiyon Verimi, Yükleme Verimi ve Enkapsülasyon Etkinliği Sonuçları.....	102
4.1.5.2 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi .....	104
4.1.5.3 Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi.....	106
4.1.5.4 Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi.....	107
4.1.5.5 Hazırlanmış Nanoformülasyonlarının <i>In vitro</i> Salım Etkinliğinin İncelenmesi.....	109
4.1.6 Nanoformülasyonların J774 ve L929 Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksitesinin İncelenmesi .....	110
4.1.7 Uygulanan Aşı Formülasyonlarının Makrofajların Nitrik Oksit Üretimi Üzerindeki Etkinliğinin İncelenmesi .....	111
4.1.8 Nanoformülasyon Uygulanan Makrofajların Ürettikleri Sitokin Miktarları İncelenmesi .....	112
4.2 <i>In Vivo</i> Çalışma Sonuçları .....	116
4.2.1 Nanoformülasyon ile İmmünize Edilmiş Fare (BALB/c) Serumlarında Antikor Seviyelerinin İncelenmesi .....	116
4.2.2 Deney Hayvanlarında Enfeksiyon Kontrolü .....	117
4.2.3 Giemsa Boyama ve Mikro Kültür Yöntemi (MKY) ile Kandan Parazit Varlığının İncelenmesi .....	118
4.2.4 Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonu ve Karaciğer ve Dalaktan Leishman Donovan Unit (LDU) Değerlerinin Hesaplanması.....	120
4.2.5 İmmünize Farelerin Dalaklarındaki Sitokin Seviyelerinin Tayin Edilmesi	123



BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 127

KAYNAKLAR ..... 137

EK-A

ETİK KURUL TUTANAĞI ..... 163

ÖZGEÇMİŞ ..... 164

## SİMGE LİSTESİ

---

A <sub>260</sub>	260 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri
A <sub>280</sub>	280 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri
Cc	Santimetre küp
cm	Santimetre
cm <sup>2</sup>	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

---

AIDS	Edinilmiş bağışık yetersizliği hastalığı
APC	Antijen sunan hücreler
CD4 <sup>+</sup>	CD4 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit
CD8 <sup>+</sup>	CD8 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit
CFA	Complete Freund's Adjuvan
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
ÇLA	Çözünür <i>Leishmania</i> Antijeni
DCM	Diklorometan
DH	Dendritik hücreler
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Test
EP126	<i>Leishmania infantum</i> suşu
FBS	Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
Gp63	<i>Leishmania</i> yüzey membran metaloproteazı
HCl	Hidrojen klorür
HEPES	N-2-hidroksi etilpiperazin N-2 etansulfonik asit
IgA	İmmünoglobulin A
IgD	İmmünoglobulin D
IgE	İmmünoglobulin E
IgG	İmmünoglobulin G
IgM	İmmünoglobulin M
IL-12	İnterlökin 12
IL-4	İnterlökin 4
IL-10	İnterlökin 10
INOS	İndüklenebilir Nitrik oksit sentaz
IFN-γ	İnterferon gama
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Potasyum fosfat (di)
KCl	Potasyum klorür
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum fosfat (mono)
KL	Kütanöz leishmaniasis

LPG	Lipofosfoglikan
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
MHC	Major histokompabilite kompleks
MKL	Mukokütanöz leishmaniasis
MKY	Mikro kültür yöntemi
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid
MW	Moleküler Ağırlık (Molecular Weight)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Monosodyum fosfat
NaHCO <sub>3</sub>	Sodyum bikarbonat
NaN <sub>3</sub>	Sodyum azid
NK	Doğal öldürücü hücreler (Natural Killer cells)
NO	Nitrik Oksit
NP	Nanopartikül
OD	Optik Yoğunluk (Optical Density)
OLA	Otoklavlanmış <i>Leishmania</i> Antijeni
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate buffered saline)
pH	Potansiyel hidrojen
PLGA	Poli (D,L-laktik ko-glikolik asit)
PNNP	Para-Nitrofenilfosfat
PO	Polioksidonyum
RPM	Bir dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-1640
TGF-β	Transforming growth factor P (transforme büyüme faktörü beta)
Th1	T helper 1 (Yardımcı T hücre yanıtı alt sınıf 1)
Th2	T helper 2 (Yardımcı T hücre yanıtı alt sınıf 2)
TMP	Timidin monofosfat
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa
UV	Ultraviyole
VL	Viseral leishmaniasis
ZnCl <sub>2</sub>	Çinko klorür

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	<i>Leishmania</i> parazitlerinin sınıflandırılması [83] ..... 16
Şekil 2.2	Promastigote ve amastigote morfolojilerinin ve <i>Leishmania</i> yaşam döngüsünün farklı hücre tiplerinde şematik gösterimi [91] ..... 17
Şekil 2.3	Parazitlerin hayat döngüsü [106] ..... 19
Şekil 2.4	<i>Leishmania</i> enfeksiyonlarının immunopatogenesi [161] ..... 25
Şekil 2.5	Visseral Leishmaniasisde immünite [170] ..... 27
Şekil 2.6	Leishmaniasis'in tedavisinde onaylanmış ilaçlar [205] ..... 38
Şekil 2.7	Nanopartikül tabanlı aşı ile bağışıklık yanıtlarının indüksiyonu [306] ..... 53
Şekil 2.8	PLGA molekülünün biyobozunurluğu [306] ..... 56
Şekil 3.1	Kademeli olarak <i>L. infantum</i> kültürünün yapılması ve biyomasın elde edilmesi ..... 69
Şekil 3.2	Biyoreaktörde büyük ölçekli parazit üretimi ..... 69
Şekil 3.3	Amicon filtreli santrifüj tüplerinde LPG molekülünün saflaştırılması işlemi 73
Şekil 3.4	Fenol Sülfürik asit yöntemi için standart ve örnekler ..... 74
Şekil 3.5	Liyofilize edilmiş bir miktar örneğin karbon bant üzerine aktarılması ve örneğin altın kaplanması ..... 77
Şekil 3.6	Formazan kristallerinin oluşumu ..... 79
Şekil 3.7	NO reaksiyonu ..... 80
Şekil 3.8	Farelerin intraperitoneal enjeksiyonu ..... 85
Şekil 3.9	Farelerden kan alımı ..... 86
Şekil 3.10	MKY yöntemi ..... 88
Şekil 3.11	Farelerden dalak ve karaciğerin çıkarılması ..... 89
Şekil 3.12	Karaciğer ve Dalak tartımları ..... 90
Şekil 3.13	Dalaktan yağ ve diğer tutunan dokuların uzaklaştırılması ..... 91
Şekil 3.14	Karaciğer ve Dalaktan yayma örneklerinin hazırlanması ..... 92
Şekil 3.15	Dalaktan splenostlerin izolasyonu ..... 93
Şekil 3.16	Dalaktan izole edilmiş splenositlerin mikroskop görüntüsü (10X) ..... 93
Şekil 3.17	Kit yardımı ile sitokin deneylerinin yapımı ..... 94
Şekil 4.1	Makrofaj (J774) ve Fibroblast (L929) hücre kültürü görüntüsü (10X) ..... 97
Şekil 4.2	Kültür ortamında bulunan <i>L. infantum</i> promastigotların invert mikroskoptaki görüntüsü (20X) ..... 98
Şekil 4.3	İnce tabaka kromatografisi uygulaması ve pozitif sonuç alınan fraksiyonların (33-36) gösterimi ..... 99
Şekil 4.4	Protein (BSA) kalibrasyon grafiği ..... 100
Şekil 4.5	Fenol sülfürik asit yöntemi için hazırlanan standart eğri grafiği ..... 100

Şekil 4.6	Amikon filtreli tüpte LPG molekülünün saflaştırılması sonucu TLC .....	101
Şekil 4.7	Kolon sonrası amicon filtreli tüplerde santrifüj edilen LPG örneklerinin GPC analizi (Siyah pik: üst fazdaki örneği, yeşil pik: alt fazdaki örneği, kırmızı pik: kolon sonrası santrifüjlenmeyen örneği) .....	102
Şekil 4.8	ÇLA ve OLA antijenlere ait BCA yöntemi standart eğrileri (A570nm).....	103
Şekil 4.9	Nanoformülasyonu SEM görüntüsü A. (ÇLA)PLGA, B. (OLA)PLGA, C. (LPG)PLGA D. (ÇLA-LPG)PLGA ve E. (OLA-LPG)PLGA.....	105
Şekil 4.10	Nanoformülasyonların boyut analizi sonucu A. (ÇLA)PLGA, B. (OLA)PLGA, C. (LPG)PLGA D. (ÇLA-LPG)PLGA ve E. (OLA-LPG)PLGA.....	106
Şekil 4.11	PLGA nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu .....	108
Şekil 4.12	ÇLA ve LPG antijenleri ile F4 (ÇLA-LPG) nanoformülasyonu FT-IR spektrumları.....	108
Şekil 4.13	OLA ve LPG antijenleri ile F5 (OLA-LPG) nanoformülasyonu FT-IR spektrumları.....	109
Şekil 4.14	Nanoformülasyonların kontrollü salım dinamiği .....	109
Şekil 4.15	Nanoformülasyonların farklı konsantrasyonlarının L929 hücrelerinin canlılığına etkisi .....	110
Şekil 4.16	Nanoformülasyonların farklı konsantrasyonlarının J774 hücrelerinin canlılığına etkisi .....	111
Şekil 4.17	Antijen kombinasyonları ve nanoformülasyonlara maruz kalan makrofajların ürettikleri IL-12 miktarındaki değişim .....	114
Şekil 4.18	Antijen kombinasyonları ve nanoformülasyonlara maruz kalan makrofajların ürettikleri IFN- $\gamma$ miktarındaki değişim.....	114
Şekil 4.19	Antijen kombinasyonları ve nanoformülasyonlara maruz kalan makrofajların ürettikleri IL-4 miktarındaki değişim .....	115
Şekil 4.20	Antijen kombinasyonları ve nanoformülasyonlara maruz kalan makrofajların ürettikleri IL-10 miktarındaki değişim.....	115
Şekil 4.21	Aşı formülasyonları uygulamadan önce (kontrol) ve uygulandıktan sonra fare serumlarındaki antikor seviyeleri .....	117
Şekil 4.22	Kontrol grubunda bulunan farelerde yara oluşumu öncesi tüy dökülmeleri .....	118
Şekil 4.23	Kontrol grubu farelerin kan smear örneklerinde amastigot görüntüsü ...	120
Şekil 4.24	Kontrol grubu farelerin karaciğer smear örneğinde amastigot görüntüsü .....	121
Şekil 4.25	Farklı formülasyonlarda immünize edilip enfekte edilen farelerin karaciğer LDU değerleri .....	122
Şekil 4.26	Farklı formülasyonlarda immünize edilip enfekte edilen farelerin dalak LDU değerleri .....	122
Şekil 4.27	Farklı formülasyonlarda immünize edilip enfekte edilen farelerin karaciğer ve dalak örneğinde parazit yükünün yüzde azalma değeri.....	123
Şekil 4.28	Aşı formülasyonları ile immunize fare gruplarında ve kontrol grubunda IL-12 sitokin yanıtları.....	125
Şekil 4.29	Aşı formülasyonları ile immunize fare gruplarında ve kontrol grubunda IFN- $\gamma$ sitokin yanıtları .....	125
Şekil 4.30	Aşı formülasyonları ile immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-10 sitokin yanıtları.....	126

Şekil 4.31 Aşı formülasyonları ile immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-4 sitokin yanıtları..... 126

## ÇİZELGE LİSTESİ

---

	Sayfa
Çizelge 3.1	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler..... 57
Çizelge 3.2	Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve besiyerleri ..... 59
Çizelge 3.3	Nanopartiküllerin eldesinde kullanılan antijen çeşitleri ve miktarları ..... 75
Çizelge 3.4	NO standartlarının hazırlanması ..... 81
Çizelge 3.5	Formülasyonlar ve 1 mg nanopartikül içindeki antijen miktarları ..... 83
Çizelge 3.6	İmmünizasyon Grupları ..... 84
Çizelge 4.1	Nanopartiküller için reaksiyon verimi sonuçları ..... 103
Çizelge 4.2	Nanoformülasyonların boyut, zeta potansiyeli ve PDI değerleri ..... 107
Çizelge 4.3	Nanoformülasyon uygulanmış Makrofaj hücrelerinin ürettiği NO miktarı ..... 112
Çizelge4.4	Mikrokültür yönteminde alandaki parazit yoğunluğu ..... 119



**LEISHMANIA INFANTUM'UN FARKLI ANTİJEN KOMBİNASYONLARINI İÇEREN POLİ(LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT) NANOPARTİKÜLLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE VİSSERAL LEİSHMANİASİS'E KARŞI AŞI ADAYI OLARAK ETKİNLİKLERİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO* İNCELENMESİ**

Özlem Ayşe TOSYALI

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Melahat BAĞIROVA

Leishmaniasis, *Leishmania* türündeki zorunlu hücre içi parazitlerin neden olduğu tropikal bir hastalık olup Dünya'nın ve Türkiye'nin en önemli halk sağlığı problemlerinden biridir. Dünyada 350 milyon kişi bu hastalığa yakalanma riski altındadır. Hastalık Türkiye'nin de içinde olduğu 98 ülkede endemik olup, enfekte kişilerin sayısı ise 12 milyondur. Özellikle Suriye'de meydana gelen iç savaşlar nedeniyle Güneydoğu Anadolu bölgemizde olgu sayısı oldukça artmış durumdadır. Sağlık bakanlığı verilerine göre 2012-2017 arasında Suriyeli misafirlerde 8.513 Kutanöz Leishmaniasis vakası tespit edilerek tedavileri yapılmıştır. Hastalığın ülkemizde ve dünyada yaygın olmasının başlıca nedenleri; iklim değişiklikleri, hastalığın vektörlerinde kullanılan insektisitlere, parazitlerde ise ilaçlara karşı dirençliliğin gelişmesidir.

Tüm bunlar Leishmaniasis'e karşı aşının geliştirilmesinin oldukça önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Günümüze kadar üç jenerasyonda aşı adayları geliştirilse de, her birinin farklı dezavantajları nedeniyle henüz etkin ve güvenilir bir aşı elde edilmesi mümkün olmamıştır. Birinci nesil grubuna dahil olan aşılar öldürülmüş parazit antijenleriyle veya zayıflatılmış canlı (attenüe) *Leishmania* parazitlerinden oluşmaktadır. Attenüe aşılar, parazitin tekrar aktifleşebilme olasılığı olduğundan risk

taşımaktadır. Bu nedenle kullanımı sınırlıdır. Çözünür *leishmania* (ÇLA) ve otoklavlanmış *leishmania* antijenleri (OLA) gibi antijenler yapısında birçok hedef protein içerdiğinden birçok MHC ile etkileşim olanağı sağlayıp yüksek immün yanıt oluşturabilmektedir. Bunun yanında elde edilmesi kolay ve maliyeti düşüktür. Ancak bu antijenler de tek başlarına ve günümüze kadar çeşitli adjuvanlarla birlikte kullanımı düşük koruma derecesi sergilemiştir. Buna göre de bu antijenlerinin oluşturduğu immün yanıtı arttırabilmek için daha uygun adjuvanların araştırılması oldukça önemlidir. İkinci jenerasyon aşılar daha çok parazitin yüzey molekülleri, hücre içi molekülleri, strese duyarlı molekülleri ve metabolik yollardaki diğer birçok biyomoleküller antijen olarak kullanılmıştır. Bunlar içerisinde Lipofosfoglikan (LPG) parazitin yüzeyinde en çok bulunan immünojen bir moleküldür. Ancak tek başına subunit antijenler de yeterli immün yanıt oluşturamamaktadır. Üçüncü nesil içerisinde yer alan DNA aşıları ise nispeten kolay üretilebilmeleri, yönlendirilmesi kolay, immünojen olmaları taşınmasında birçok geni bir araya getirebilme olanağı sağlaması nedeniyle avantajlıdır. Ancak birçoğunun etkinliğinin düşük olması ve yeterli koruma sağlayamaması ve maliyet gibi nedenler dezavantajlarını oluşturmaktadır.

Laboratuvarımızda daha önce TÜBİTAK projesi kapsamında tamamlanan çalışmada ilk kez olarak *Leishmania* parazitlerinin immünojenik yüzey moleküllerinden olan LPG'nin (poliakrilikasit) PAA ile konjugatının *in vivo* modellerde %80 koruma sağladığı ve böylece önemli bir aşı adayı olduğu ortaya konulmuştur. Ancak son zamanlarda nanoteknolojide meydana gelen gelişmeler aşı çalışmalarına yeni bir boyut getirmiştir. Nanopartiküler, antijenlerin biyolojik sistemde degrades olmadan, kontrollü ve efektif olarak salımını ile hedefe yönelik taşınımına olanak sağlamaktadır. Özellikle kombinasyon şeklinde birden fazla antijenin aynı antijen sunucu hücre tarafından alınması nanopartiküler antijen taşıyıcı sistemin en önemli avantajlarından biridir. Taşıyıcı sistem olarak biyoyumlu, biyobozunur ve aynı zamanda adjuvan özelliğe sahip FDA onaylı PLGA (poli laktik-ko glikolik asit) nanopartikülleri sıkça kullanılmaktadır. Literatürü incelediğimizde çözünür ve otoklavlanmış *leishmania* antijenini ile lipofosfoglikan ikili antijen kombinasyonu içeren PLGA nanopartikülleri ve immünojenik özellikleriyle ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Buna göre de bu tez çalışmasının amacı, *L.infantum* parazitlerinden izole edilen lipofosfoglikan molekülünün çözünür *leishmania* antijeni veya otoklavlanmış *leishmania* antijeni ile kombinasyon halinde FDA onaylı PLGA nanopartiküllerine enkapsüle edilmesi, karakterizasyonu ve elde edilen nanoformülasyonların etkinliğinin *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmesiyle dünyada ve ülkemizde Visceral Leishmaniasis'e karşı yeni nesil aşı adayı formülasyonların geliştirilmesidir. Tezin amaç ve hedefine uygun olarak çalışma kapsamında, tüm parazit antijenini içeren ÇLA ve OLA ile parazit yüzeyinde bol miktarda bulunan immünojen özellikli LPG molekülü elde edilmesi için parazitin biyoreaktörde büyük ölçekli kültürü yapıp biyomasdan elde edilmiştir. Daha sonra biyomasdan elde edilen antijenler PLGA içerisine enkapsüle edilmiştir. Ardından oluşturulan nanoformülasyonların karakterizasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen hem tek başına LPG, ÇLA ve OLA antijenlerini içeren PLGA nanoformülasyonları (F1, F2 ve F3) hem de ÇLA-LPG ve OLA-LPG ikili antijen içeren PLGA nanoformülasyonlarının (F4 ve F5) toksisitesi J774 makrofaj ve L929 fibroblast hücre kültüründe MTT yöntemi ile incelenmiştir. Ardından toksik olmadığı belirlenen formülasyonların makrofaj hücre kültüründe sitokin ve Nitrik Oksit (NO) üretme potansiyeli incelenmiştir. Daha sonra bu

nanofarmülasyonların aşı adayı olarak koruyucu etkinlikleri *in vivo* olarak fareler üzerinde incelemek için iki hafta aralıklarla immünizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve oluşan antikor miktarı deney hayvanlarının serum örneklerinden ELISA ile belirlenmiştir. İmmünizasyonların ardından her bir gruptaki fareler *L.infantum* parazitleri ile enfekte edilmiştir ve enfeksiyonun kontrolü Giemsa boyama ve mikro kültür yöntemi ile takip edilmiştir. Bir ay sonra kontrol grubunda enfeksiyonun tespit edilmesinin ardından fareler sakrifiye edilerek; dalak ve karaciğer parazit yükü (LDU) belirlenmiştir. Ayrıca farelerin dalak lenfositleri izole edilmiş ve lenfositlerden salgılanan IL-4, IL-10, IL-12 ve IFN- $\gamma$  sitokinleri ticari bir kit yardımıyla tayin edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, incelenen farklı konsantrasyonlarda F4 ve F5 nanofarmülasyonlarının J774 makrofaj ve L929 fibroblast hücre kültüründe kontrole kıyasla 500  $\mu\text{g/ml}$ 'a kadar anlamlı bir toksik etki göstermediği saptanmıştır. Formülasyonların, makrofajların NO üretmeleri üzerindeki etkinliği incelendiğinde ise, makrofaj hücrelerinde NO üretimine en fazla etkiyi kontrole kıyasla NO üretimini 15 kat arttıran F4 nanofarmülasyonu ve 20 kat arttıran F5 nanofarmülasyonun gösterdiği saptanmıştır. Benzer şekilde aşı formülasyonları uygulanan makrofaj hücrelerinin ürettiği IL-12 ve IFN- $\gamma$  sitokin seviyelerinin kontrol grubuna göre, 4-6 kat arasında arttırırken tek başına antijen kombinasyonlarıyla anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bunun nedeninin, PLGA nanopartiküllerinin içerisindeki antijenlerin zamanla 72 saatlik kısa süre sonunda yalnızca az miktarda antijenin ortama salınması olabilir. IL-4 ve IL-10 seviyelerinde anlamlı bir değişikliğin meydana gelmediği belirlenmiştir. IL-12 ve IFN- $\gamma$  sitokinlerinin Th1 yanıtını, IL-4 ve IL-10 sitokinlerinin ise Th2 yanıtını indüklediği bilinmektedir. IL-12 ve IFN- $\gamma$  seviyelerinin kontrole göre yüksek olması immün yanıtın Th1 tipi yönünde gelişebileceğini düşündürmektedir. Daha sonra tüm nanofarmülasyonlar Balb/c fareler üzerinde incelendi. En yüksek antikor seviyesi F5 nanofarmülasyonu uygulanan gruplarda gözlenmiştir. Ayrıca farelerin sakrifikasyonunun ardından F4 ve F5 formülasyonu ile immünize edilen deney hayvanlarında parazit enfeksiyonuna karşı sırasıyla yaklaşık %75 ve %78 koruma sağlandığı gözlenmiştir. İncelenen bir diğer parametre dalak hücrelerindeki sitokin seviyeleridir. F4 ve F5 nanofarmülasyonlarının IL-12 için sırasıyla 9 ve 15, IFN- $\gamma$  sitokin için ise sırasıyla yaklaşık 10 ve 18 kat arttırdığı, diğer yandan IL-4 seviyelerinde herhangi bir değişikliğin olmadığı ve IL-10 değeri ise F5 formülasyonu için kontrole nazaran 2 kat azalma gösterdi. Elde edilen sonuçlara göre, her iki formülasyonun da farelerde gerek antikor seviyesini gerek parazit yükünde meydana gelen azalma gerekse de Th1 immün yanıtı indükleyen IL-12 ve IFN- $\gamma$  sitokin seviyelerini arttırması, bu aşı formülasyonlarının immünojenik özelliklerini net bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu sonuç uygulanan aşı formülasyonlarının hücresel ve humoral yanıtı tetikleyerek organlardaki parazit enfeksiyonunu önemli derecede engellediği düşündürmektedir. Böylece bu tez çalışması kapsamında Dünyada ve Ülkemizde ilk kez olarak, Visseral Leishmaniasis'e karşı etkinliği *in vitro* ve *in vivo* kanıtlanmış ÇLA-LPG ve OLA-LPG ikili antijen kombinasyonu içeren PLGA temelli yeni nesil nanoaşı formülasyonları geliştirilmiş oldu.

**Anahtar Kelimeler:** *L.infantum*, PLGA, Nanopartikül, Aşı, Sitokin

**SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* AND *IN VIVO*  
INVESTIGATION OF EFFECTIVENESS AS VACCINE CANDIDATE AGAINST  
VISCERAL LEISHMANIASIS OF POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID)  
NANOPARTICLES CONTAINING COMBINATION OF DIFFERENT ANTIGENS  
OF *LEISHMANIA INFANTUM***

Özlem Ayşe TOSYALI

Department of Bioengineering

Ph.D. Thesis

Advisor: Assist. Prof Dr. Melahat BAĞIROVA

Leishmaniasis, one of the serious public health problems of Turkey and the world, is a tropical disease which is obligatory intracellular *Leishmania* parasites. Through the world, nearly 350 million people are under the risk of this disease. The disease is also in Turkey, where endemic in 98 countries, the number of people infected is 12 million. The number of incidents in the Southeastern Anatolia region has increased considerably due to the civil wars especially in Syria. Climate change, the development of resistance to the drugs and also many mammals have a disease reservoir play a major role in this widespread disease. In addition, the problems in the diagnosis of the disease, the difficulties in treatment and the development of resistance clearly reveal the necessity of an effective and safe vaccine the against the disease. Even though vaccine candidates have been developed in three generations to date, still there is no an effective and safe vaccine because of their different disadvantages. Vaccines from the first generation group consist of killed parasite antigens or attenuated *Leishmania* parasites. The attenuated vaccines were risky as the parasite was likely to be reactivated. Therefore, its use is limited. Due to the contain many target proteins in their structure, soluble *leishmania* (SLA) and autoclaved *leishmania* antigens (ALA) can interact with many MHC molecules and produce a high immune response. Besides this,

it is easy to obtain and low cost. However, these antigens alone and/or with the use of various adjuvants to date showed a low degree of protection. So, in order to increase the immune response of these antigens, it is very important to investigate more appropriate adjuvants. Second generation vaccines based on mostly surface molecules, intracellular molecules, stress sensitive molecules and many other biomolecules in metabolic pathways as an antigen. Among these, lipophosphoglycan (LPG) is a molecule that is most immunogenic and abundant in parasite surface. However, subunit antigens alone cannot produce adequate immune responses. DNA vaccines in the third generation are advantageous because they are relatively easy to produce, easy to direct, and have the ability to combine many genes in their transport. However, reasons such as low efficiency and not being able to provide adequate protection and also cost factors are DNA vaccines' disadvantages. Recent advances in nanotechnology have brought a new dimension to vaccine studies. Nanoparticles allow controlled and effective release of antigens without degradation in the biological system and their targeted transport. In particular, the combination of multiple antigens in the form of the same antigen presenting cell is one of the most important features of the nanoparticle antigen-carrying system. FDA-approved PLGA (poly lactic co-glycolic acid) nanoparticles are commonly used as carrier systems due to their biocompatible, biodegradable and also adjuvant properties. When we review the literature, there is no study about PLGA nanoparticles and immunogenic properties of soluble and autoclaved *leishmania* antigen combination with lipophosphoglycan. Accordingly, the aim of this thesis is to encapsulate the lipophosphoglycan molecule isolated from *L.infantum* promastigotes in combination with soluble *leishmania* antigen or autoclaved *leishmania* antigen to FDA-approved PLGA nanoparticles, to investigate the effectiveness of the nanoformulations *in vitro* and *in vivo* against visceral leishmaniasis. In this thesis, the parasite cultured in a bioreactor in order to obtain biomass for isolation of SLA, ALA and LPG antigens. The obtained antigens used as both single and binary combination to be encapsulated into PLGA. The characterization of the nanoformulations was then performed using different devices. The amount of antigen and the release profile of the nanoformulations were determined using the UV-spectrophotometer. Both LPG, SLA and ALA antigens alone (F1, F2 and F3) and SLA-LPG and ALA-LPG binary antigens (F4 and F5) encapsulated in PLGA was investigated for toxicity by MTT method in J774 macrophage and L929 cell culture. The potential for the production of cytokine and nitric oxide (NO) was investigated in macrophage cell culture. Immunization was carried out at two week intervals to investigate protective activities of these nanoformulations as a vaccine candidate *in vivo*, and the amount of antibody level was determined by ELISA from the serum samples of the experimental animals. After 8 immunizations, mice in each group were infected with *L.infantum* parasites and control of infection was monitored by Giemsa staining and micro-culture method. One month later after the detection of infection in the control group, the mice were sacrificed; The parasite load (LDU) in the spleen, liver and bone marrow were determined. In addition, IL-4, IL-10, IL-12 and IFN- $\gamma$  cytokines secreted from lymphocytes were determined by a commercial kit. According to the results, it was found that the different concentrations of nanoformulations in J774 macrophage and L929 cell culture did not show a significant toxic effect up to 500  $\mu\text{g/ml}$  compared to the control. When the effectiveness of the formulations on the NO production of

macrophages was examined, it was found that the highest effect on NO production in macrophage cells was F4 nanoformulation which increased NO production by 15-fold and F5 nanoformulation which increased 20-fold compared to control. Similarly, vaccine formulations increased the levels of IL-12 and IFN- $\gamma$  cytokines produced by macrophage cells to 4 to 6 fold compared to the control group, while no significant difference was observed with antigen combinations alone. The reason for this may be the release of only a small amount of antigens into the medium after 72 h of short time in time the antigens within the PLGA nanoparticles. There was no significant change in IL-4 and IL-10 levels. IL-12 and IFN- $\gamma$  cytokines are known to induce Th1 response and IL-4 and IL-10 cytokines induce Th2 response. High levels of IL-12 and IFN- $\gamma$  levels suggest that the immune response may develop in the Th1-type. The all groups were then examined on Balb/c mice. The highest antibody level was observed in F5 nanoformulation groups. In addition, it was observed that 75% and 78 % protection against parasitic infection in experimental animals immunized with respectively F4 and F5 formulation following sacrifice of mice. Another examined parameter is cytokine levels in spleen cells. It was found that F4 and F5 nanoformulations increased 9 and 15 fold for IL-12 level and 10 and 18 fold for IFN- $\gamma$  cytokine, respectively. On the other hand, no change was observed for IL-4 levels and 2-fold decrease IL-10 levels shown in F5 nanoformulation compared to control. According to the results obtained, both F4 ve F5 nanoformulations clearly demonstrate the immunogenicity of these vaccine formulations in which both the increase in antibody level and IL-12 and IFN- $\gamma$  cytokine levels inducing the Th1 immune response and also decrease the parasite load in mice are evident. This result suggests that the administered vaccine formulations significantly inhibit the parasite infection in the organs by inducing cellular and humoral response. Thus, for the first time in this study, nanoformulations containing binary *leishmania* antigens such as SLA-LPG and ALA-LPG for the first time have been shown to have significant potential as a vaccine candidate against visceral leishmaniasis *in vitro* and *in vivo*.

**Keywords:** *L.infantum*, PLGA, Nanoparticles, Vaccine, Cytokine

#### 1.1 Literatür Özeti

Hastalığın önlenmesi, tedaviden çok daha etkili ve daha az maliyetlidir. Bu nedenle aşının geliştirilmesi, hastalıkların önlenmesinde en önemli ve güçlü bir araçtır. Yeni stratejiler geliştirilerek gelecekte aşılarda güvenliği, verimliliğini ve istikrarını artırılabilir [1], [2]. Leishmaniasis, paraziter hastalıkları arasında ikinci sırada yer alır ve dişi kum sineklerinin (phlebotomine sandfly) memeliyi ısırması sonucu ortaya çıkan protozoon hastalığıdır. Hastalığın üç farklı klinik formu mevcuttur. Bunlar kütanöz, mükokütanöz ve visseral'dir. Dünyanın tropik ve subtropik bölgelerinde yaygın olarak görülen bu hastalık, yeterince rapor edilmemekle birlikte ciddi morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Bu hastalık, Okyanusya kıtası hariç tüm kıtalarda bulunur ve Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 yılı raporuna göre, hastalık 102 ülkede görülmekte olup VL vakalarının % 90'ının Bangladeş, Brezilya, Etiyopya, Hindistan, Güney Sudan ve Sudan'da meydana geldiği, KL vakalarının ise yaklaşık % 70'inin Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, Kosta Rika, Etiyopya, İran, Sudan ve Suriye'de meydana geldiği belirtilmiştir [3],[4]. Dünyada 12 milyon bireyin bu hastalık ile enfekte olduğu ve her yıl bunlara 1,5 milyon kütanöz leishmaniasis, 500 bin visseral leishmaniasis yeni olgunun eklendiği tahmin edilmektedir. Türkiye'de ise her yıl yaklaşık 5 bin KL vakası bildirilmektedir. Hastalığın özellikle Çukurova ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde hiperendemik olarak seyrettiği bilinmektedir. Ayrıca Suriye'de yaşanan iç savaş nedeniyle yaklaşık 3 milyon mültecinin ülkemize göç etmesine bağlı olarak hastalığın epidemiyolojik durumu ülkemiz için daha da kritik hale gelmiştir [5], [6]. 2009 ve 2015 yılları arasında Türkiye'de Leishmaniasis pozitif 263 hasta ile yapılan

bir epidemiyolojik çalışmada hastaların % 66.15'inin Türk,% 33.46'sının Suriyeli, % 0.38'inin ise Afgan olduğu gösterilmiştir. Çalışmada hastalardan izole edilen türlerin ise *Leishmania tropica* ve *Leishmania infantum* olduğu tespit edilmiştir [7].

Leishmaniasis epidemiyolojik ve klinik açıdan büyük bir öneme sahip olmasına rağmen, araştırma/geliştirme çalışmaları yeterince finanse edilmediğinden DSÖ'nce bu hastalık ihmal edilmiş hastalıklar grubuna dahil edilmiştir. Hastalık sosyo-ekonomik açıdan yetersiz, çoğunlukla sağlık hizmetlerine erişimin sınırlı olduğu coğrafi bölgelerde daha sık görülmektedir. İklim değişiklikleri, savaşlar, göç ve ayrıca hastalığın tedavisinde kullanılan terapötik seçeneklerin az ve pahalı olması, toksik özellik göstermesi hastalığın yayılmasını arttırmaktadır. VL, leishmaniasis türleri arasında en yaygın hastalıklardan biri olup, tedavi edilmediğinde, vakaların % 95'inden fazlası ölüme sonuçlanmaktadır [8], [9]. Hastalığın etkenlerinde kullanılan antileishmanial ilaçlara, vektörlerinde ise insektisitlere karşı dirençlilik gelişmiştir. Hastalığın ortadan kaldırılması ve kontrolü gibi uzun vadeli hedefler ancak bu hastalığa karşı etkin bir *leishmania* aşısının geliştirilmesi ile mümkün olabilir. Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesi çalışmaları 80 yıla yakın bir süredir devam etmektedir. Günümüze kadar leishmaniasis'e karşı üç farklı jenerasyon aşılar geliştirilmiştir [10]. Birinci jenerasyonda yer alan canlı virülans formdaki aşı (leishmanizasyon) daha sonra yerini öldürülmüş parazit antijenleri ve zayıflatılmış *Leishmania* parazitlerine bırakmıştır. Zayıflatılmış parazit antijenlerinin kullanımı parazitlerin zamanla virülanslıklarını tekrar kazanmaları ve özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde parazitlerin kısa sürede aktifleşmesine neden olabilmeleri bunların dezavantajını oluşturmaktadır. Ölü parazit antijenlerinin ise tek başlarına yeteri kadar immün yanıt oluşturamadıkları tespit edilmiştir. Bu nedenle birinci nesil aşılarla yapılan çalışmalar klinik olarak faz 3 aşamasında kalmıştır [11]. Yüzey molekülleri, hücre içi moleküller, strese duyarlı moleküller ve metabolik yollarda bulunan diğer biyomolekülleri ise ikinci jenerasyon aşıları oluşturmaktadır. Fukoz mannoz ligandı (FML) ve daha çok immünojen özelliğe sahip glikoprotein 63 (gp63), Lipofosfolikan (LPG) gibi yüzey molekülleri aşı geliştirilmesinde en çok incelenen moleküllerdendir. Üçüncü jenerasyon aşılar ise DNA temelli aşılar olup, esas avantajları kolay üretilmeleri ve stabil olmalarıdır. Ancak dezavantajları ise maliyetinin yüksek olması ve henüz faz 2a klinik aşamasında olmalarıdır [12], [13].



*Leishmania* antijeni olarak, birinci jenerasyon aşı grubunda yer alan çözünür *Leishmania* antijeni (ÇLA) ve otoklavlanmış *Leishmania* antijeni (OLA) kullanımına yönelik çalışmalar maliyet, güvenlik, antijenik özellik ve antijenin biyokimyasal bileşiminin stabilitesi açısından hala gündemdedir [14], [15]. Bunların yanında ikinci jenerasyon aşılarda önemli bir yeri olan LPG molekülü parazitin yüzeyinde baskın olarak bulunan immünojen özellikli glikokonjugattır [16], [17]. Dört temel kısımdan (kapak, fosfoglikan tekrarlayan üniteler, glikan çekirdeği ve lipit ankrajı) oluşur. Omurgalı konakçılarda LPG, *Leishmania*'yı kompleman sistemine karşı koruyarak ve fagolizozomal biyogenezi inhibe ederek virülansa katkıda bulunmaktadır. Şimdiye kadar bu önemli antijenik yapılar tek başlarına virülanslığını arttırmak için çeşitli adjuvanlarla çalışılmıştır. LPG aracılı immünizasyon mekanizmalarının henüz bilinmemesine rağmen, koruyucu özellikte olduğu gösterilmiştir. LPG'nin özellikle T hücrelerini aktive ettiği ve Th1 bağışıklık cevabını desteklediği ve böylece *Leishmania*'nın hücre içi aşamasına karşı korumaya aracılık ettiği gösterilmiştir [18], [19], [20], [21]. Laboratuvarımızda Prof. Dr. Adil Allahverdiyev öncülüğünde tamamlanan çalışmada (TUBITAK, 108S170SBAG) LPG molekülü ile PAA konjugatı başarılı bir şekilde oluşturulmuş ve bu konjugatın *in vivo* modellerde % 80 koruma sağladığı gözlenmiş ve böylece önemli bir aşı adayı olduğu ortaya konulmuştur [22], [23].

Son yıllarda nanoteknolojide meydana gelen gelişmeler aşı çalışmalarında da ümit verici sonuçlar ortaya koymaktadır. Nano boyutlarda partiküler taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesiyle sayesinde biyolojik ortamlarda antijenik yapıların degrade olmalarını önlerler, daha uzun sürede kontrollü antijen salımı ile taşıdıkları antijeni ve/veya adjuvanı Antijen Sunucu Hücrelere (ASH) daha yüksek verimlilikle sunmaları ve ayrıca birden fazla antijen çeşidinin tek bir formulasyonda barındırabilmeleri gibi önemli özellikleri vardır [24], [25]. Bu sayede *Leishmania* antijenlerinin kombinasyonlar halinde nanopartiküler sistemlere enkapsüle edilip ASH'lere aynı anda ulaştırılabilirler. Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesinde polimerik nanopartiküller, lipozomlar, katı lipit nanopartikülleri kullanılmıştır. Lipozom ve katı lipit nanopartikülleri düşük yükleme kapasiteleri, lipitin fiziksel durumunun karmaşıklığı, hazırlama yöntemleride ve uygulama sırasında stabilite problemleri gibi bazı dezavantajlar vardır [26], [27].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda polimerik nanopartiküler taşıyıcı sistem olarak polilaktik ko-glikolik asit (PLGA) sıklıkla kullanılmaktadır. PLGA vücut dokularında hidrolize olur ve doğal yoldan parçalanabilen monomerik metabolitler olan laktik asit ve glikolik asite dönüşür. Bir takım biyokimyasal ve fizyolojik reaksiyonlara katkıda bulunan laktik ve glikolik asitler normal şartlarda vücutta bulunur. Bu nedenle ilaç taşıma sistemlerinde ve biyomedikal uygulamalarda PLGA kullanımı sonrasında herhangi bir toksik etki veya yan etki görülmesine yönelik bilgiler bulunmamaktadır. PLGA nanopartikülleri, bir-iki hafta ile birkaç ay arasında değişen sürelerde antijen/adjuvan moleküllerinin sürekli salımını sağlayarak immün stimülasyonunu arttırmaktadır. FDA onaylı, biyobozunur, biyouyumlu, biyolojik maddelerle iyi etkileşim göstermesi en önemli özellikleridir ve ayrıca adjuvan olarak kullanılıp çeşitli enfeksiyon hastalıklarına karşı aşı potansiyelini arttırabildiği gösterilmektedir [28], [29]. Yapılan çalışmalar PLGA nanopartiküllerinin birden çok *leishmania* parazit antijenlerinin kombinasyonlar halinde enkapsüle edilip yüksek immün yanıt oluşturabileceğini göstermektedir. Tafaghodi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, PLGA nanopartiküllerine otoklavlanmış *leishmania majör* antijeni enkapsüle ederek, KL'ye karşı BALB/c fare modelinde yoğun Th1 koruyucu bağışıklık yanıtı oluşturduğu gösterilmiştir [30], [31]. Bir başka çalışmada, kinetoplastid membran proteini 11 (KMP-11) ile yüklenmiş olan PLGA nanopartiküllerin *in vivo* olarak KL modelinde parazit yükünü önemli ölçüde azalttığını gösterilmiştir [32]. PLGA nanopartikülleri ile yapılan aşı çalışmaları çoğunlukla KL'ye yönelik olmuştur. Ancak 2017 yılından bu yana VL'ye karşı çalışmalara da rastlamaktayız. Wang vd. Toll benzeri reseptör (TLR) 7/8 agonisti 3M-052'nin adjuvanını *Leishmania donovani* 36-kDa nükleozid hidrolaz protein antijeni (NH36) ile kombine halde PLGA mikropartiküllerine enkapsüle ederek araştırmışlar ve bu formülasyonun Th1'e bağlı bir immün yanıt ortaya çıkardığını göstermiştir [33]. Böylece literatürde ÇLA-LPG ve OLA-LPG ikili antijen kombinasyonunu içeren PLGA nanopartiküllerinin VL'ye karşı etkinliğini incelemiş herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

## 1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, *L.infantum* parazitlerinden izole edilen lipofosfoglikan molekülünün çözünür *leishmania* antijeni veya otoklavlanmış *leishmania* antijeni ile kombinasyon halinde FDA onaylı PLGA nanopartiküllerine enkapsüle edilmesi ve elde edilen nanoformülasyonların etkinliğinin *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmesiyle dünyada ve ülkemizde Visseral Leishmaniasis'e karşı yeni nesil aşı aday formülasyonların geliştirilmesidir.

Amaca ulaşmak için ;

- 1- EP126 *L. infantum* parazitlerinin manuel ve biyoreaktörde kültürünün yapılması ve parazit biyomasının elde edilmesi
- 2- Elde edilen biyomasdan Otoklavlanmış *Leishmania* antijeni (OLA) ve çözünür *Leishmania* antijeni (ÇLA) elde edilmesi
- 3- Ayrıca yine bu biyomasdan LPG molekülünün izolasyonu ve karakterizasyonun yapılması
- 4- Elde edilen antijenlerin ÇLA-LPG ve OLA-LPG antijen kombinasyonları halinde PLGA nanopartiküllerine enkapsülasyonu ve karakterizasyonunun yapılması
- 5- Nanoformülasyonların makrofaj ve Fibroblast hücre kültüründe toksisitesinin MTT yöntemi ile incelenmesi
- 6- Nanoformülasyonların makrofaj hücre kültüründe NO üretme potansiyelinin Griess reaksiyonu ile tayini
- 7- Nanoformülasyonların *in vitro* makrofaj kültüründe sitokin üretme potansiyelinin incelenmesi
- 8- *In vitro* çalışmaların sonucuna göre, en yüksek antileishmanial etkinliğe sahip, non-toksik konsantrasyonların belirlenmesi ve BALB/c farelerin nanoformülasyonlarla immünize edilmesi,
- 9- ELISA yöntemi ile farelerde oluşan antikor düzeyinin ölçümü
- 10- Yeterli immün yanıt oluşan farelerin enfektif *L. infantum* parazitleri ile enfekte edilmesi

- 11- Giemsa ve Mikrokültür yöntemi ile enfeksiyonun kontrolünün yapılması
- 12- Kontrol grubunda enfeksiyon oluşumunun ardından deney hayvanlarının sakrifiye edilmesi ve Karaciğer ve dalakta parazit yükünün (LDU) incelenmesi
- 13- Lenfositlerden salgılanan IL-4, IL-10, IL-12 ve IFN- $\gamma$  sitokinlerinin tayini

### 1.3 Hipotez

Birinci jenerasyon aşılarda içerisinde yer alan çözünür ve otoklavlanmış *leishmania* antijenleri bir çok farklı antijenik yapıyı (epitop) barındırmaları sebebiyle, çok sayıda MHC molekülü ile etkileşime girebilir ve antijen sunucu hücreler tarafından kolaylıkla tanınabilirler. İkinci jenerasyon *Leishmania* aşılarda içerisinde yer alan lipofosfolikan molekülünün ise güçlü bir immünojen özelliğe sahip olduğu ve hastalığın gelişimini engelleyen Th1 yanıtını tetikleyerek hücrel immüniteye önemli bir katkı sağladığı bilinmektedir.

Bu antijenik yapıların uzun süreli salımını sağlayacak ve aynı zamanda istenen doku ve hücrelere taşınmasına katkıda bulunacak taşıyıcı sistemlerin içerisine enkapsülasyonu ile geliştirilecek formülasyonların immün sistemin devamlı aktif durumda kalmasına ve hastalığa karşı kalıcı, uzun süreli ve daha güçlü bir koruma sağlanmasına imkân tanıyacağı düşünülmektedir. FDA onaylı bir polimer olan PLGA biyouyumlu ve biyobozunur özellik göstermesinin yanında adjuvan görevini de üstlenmesi nedeniyle son yıllarda aşı çalışmalarında taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır. Bu polimerden hazırlanan nanopartiküller kapsüle ettikleri antijenik yapıların degrades olmasını engelleyerek biyolojik sistemlerde uzun süreli kalmalarını sağlamaktadır. Aynı zamanda sürekli antijen salımını hedefleyen bu tür sistemler antijenlerin yüksek verimlilikle ASH'lere tanıtılmalarına yardımcı olmaktadır. Ayrıca bu sistemler ikili antijen kombinasyonlarının biyolojik sistemde dağılmadan aynı ASH tarafından tanınmasını da sağlamaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında, bu tez çalışması kapsamında PLGA nanopartiküllerinin sahip oldukları özellikler, LPG molekülünün ve OLA/ÇLA antijenlerinin de yüksek immünojenik yapısı dikkate alınarak, bu antijenlerin kombinasyon halinde PLGA nanopartiküllerinin içerisine yüklenmesiyle oluşturulacak formülasyonların *in vitro* ve

*in vivo* koruyucu etkinliklerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Geliştirilecek formülasyonların hem hücresel hem de hümoral yanıtı tetiklemesi ve leishmaniasise karşı uzun süreli ve güçlü bir koruma sağlamanın beklenmesi bu tez çalışmasının ana hipotezini oluşturmaktadır. Elde edilecek olumlu sonuçların visseral leishmaniasise karşı nanoteknolojiye ve taşıyıcı sistemlere dayalı yeni nesil aşı adaylarının geliştirilmesi konusunda önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1 Aşı

Aşı, hem bulaşıcı hem de bulaşıcı olmayan hastalıklara karşı tıp tarihinde büyük başarılar elde etmiştir. Patojenlerin neden olduğu bulaşıcı hastalıklar, insanların karşılaştığı en önemli zorluklardan biridir. Geçmişte, ciddi komplikasyonlara bağlı enfeksiyon hastalıkları insanlar için yüksek mortaliteye sebep olmuştur. Hastalıkları önleme amacıyla aşuların kullanılması tıp tarihinin en büyük başarısıdır. Aşular, bir bireyin immünize olduğu patojenleri tanıyan ve bertaraf eden bağışıklık tepkilerini stimüle etmek amacıyla uygulanan preparatlardır [34].

Dünya sağlık örgütü (WHO) verilerine göre bulaşıcı hastalıklara karşı aşuların geliştirilmesi, ölüm oranlarında ve aşuların stabilitesinin neden olduğu hastalık komplikasyonlarındaki kayda değer düşüş olduğunu bildirmiştir. Kayıtlara göre tıbbi müdahalelerde aşı kullanımı dakikada 5 kişinin ölmünü ve 2011-2020 yılları arasında 25 milyon ölümleri önleyebilir. Aşular, kimyasal ilaçlarla karşılaştırıldığında uzun süreli bağışıklık sağlaması, hastalığı önleyici özelliği ve iyileştirici performansı ve ilaç direncinin olmaması gibi birçok avantajı vardır [35], [36].

Genel olarak, ideal bir aşı aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır.

- i) maksimum güvenlik
- ii) uzun vadeli korumaya yol açabilecek az miktarda immunogene patojenlere karşı
- iii) fiyatın uygun olması,
- iv) önleme ve tedavide etkin ve yararlı olmalı,

v) tek bir dozda kullanılmalıdır,

vi) kolay reçete edilebilmesi,

vii) polivalent olabilir ve patojenin çeşitli yönlerine karşı koruma sağlar.

20. yüzyıldan beri, koruyucu ve tedavi amaçlı olarak, tıpta çeşitli yeni aşılarda ortaya çıkmıştır [16].

Geleneksel aşı geliştirme yaklaşımları birçok önemli hastalığın kontrolüne ve bazı durumlarda eradikasyona yol açmıştır. Ancak, başarılarına rağmen pazarda etkili bir aşısının mevcut olmadığı birçok hastalık da hala mevcuttur. Bu durum genellikle koruyucu olmayan bağışıklık yanıtlarının gelişmesi ve/veya zayıf güvenlik sorunlarının oluşması gibi birçok nedenden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, patojenlerin güvenli ve etkili alt-birimi antijenlerini belirleme kapasitesi, bu hastalıkların önlenmesi için başarılı aşılarda üretilmesi için heyecan verici gelişmedir. Bununla birlikte, yüksek derecede saflaştırılmış antijenlerin zayıf immünojenitesi nedeniyle aşı etkinliğini arttırmak için bağışıklık tepkilerinin türlerini uyaran güçlü yardımcı maddeler ile verilmeleri gerekmektedir. Ayrıca, insan kullanımına yönelik lisanslı aşılarda birkaç adjuvan kullanılmakta ise de, genellikle antijenler ile karışım olarak uygulanan bu adjuvanlar, yeni nesil aşı geliştirmek için gerekli olan bağışıklık tepkilerini sağlamayabilir [37], [38].

Son on yıllarda etkili aşılarda geliştirilmesine rağmen, aşılarda salgın ve salgın hastalıkların önlenmesi için farklı mekanizmalarla sunulmalıdır.

Aşılama tarihi, 12. yüzyıl ile 15. yüzyıl arasında yaşayan Çin ve Ortadoğu halkının gözlemleri ve deneyimleriyle başlatıldı. Bu süre zarfında, çiçek hastalığı tanısı konan hastanın cildini veya püstül sıvısını immünizasyon amacıyla kullanmışlardır. Aşılama sürecinde, insanları virüse karşı bir sonraki maruziyetine karşı korumak için çiçek virüsü kullanmışlardır. Bu süreç hastalığa karşı korunmaya yol açabilse de, hastalıkları geliştirme ve dolayısıyla ölüm riski yüksektir. Çin ve Orta Doğu'dan sonra bu tedavi yöntemi, 17. yüzyılda Avrupa gibi diğer alanlarda da gelişmiştir. Bu yöntemle ilgili ilk bilimsel çalışma, Edward Jenner tarafından yapılmıştır. E. Jenner insan Poxvirus yerine sığır çiçek hastalığı kullanarak insanları aşılamıştır ve bu aşı geliştirmenin başlangıcını oluşturmuştur. Jenner'in tarihi başarısına rağmen, mikroorganizma ve mikrobiyoloji hakkında yeterli ve temel bilgi eksikliğinden dolayı, gelecek yüzyıla kadar yeni aşılarda

yapılmamıştır. 19. yüzyılın sonlarında Louis Pasteur, Robert Koch ve Paul Ehrlich gibi bilim adamlarının yükselişi ve aşılama biliminin gelişimi aşı çalışmalarında yeni bir dönem başlamıştır. Bu dönem, patojenlere karşı yeni aşuların üretilmesine ve Dünya çapında geniş araştırmaların yapılmasına yol açmıştır [39], [40]. Bu araştırmalar sırasında, 1930'a kadar Kuduz, Tifo, Difteri, Tüberküloz, Tetanoz ve Boğmaca gibi çeşitli faktörlere karşı aşular üretilmiş ve pazarlanmıştır. 1931'de Louis Pasteur'ün birden çok teknik uygulayarak tavuk embriyosunda virüsü çoğaltarak aşuların seri üretiminin yeni bir dönemi başlatmıştır. 1930-1950 yılları arasında, özellikle II. Dünya Savaşı sırasında, askeri hedefler aşuların geliştirilmesinde yüksek motivasyon yaratmıştır. Ayrıca, bu dönemden itibaren, DSÖ ve araştırma enstitüleri gibi vakıf ve kamu kurumlarının desteği önemli ölçüde artmıştır. Polio, Japon ensefalit B ve İnfluenza'ya karşı aşular bu zamanlarda üretilmiştir. II. Dünya Savaşı'ndan sonra, aşılama programlarını hedeflemek halk sağlığını geliştirmek için evrensel bir araca dönüşmüştür. Küresel aşılama programı ve Dünya çapında aşuların tedarik edilebilmesinin ardında ilgili hastalıklara bağlı mortalite önemli ölçüde azaldı ve Çiçek hastalığı ve Çocuk felci ortadan kaldırıldı [41].

20. yüzyılın ikinci yarısında, ilişkili bilimsel bulgular taranması ve endüstriyel aşı üretimi ile yeni nesil aşuların geliştirilmesine yol açmış ve bu dönem aşı biliminin altın çağı olarak bilinmiştir. Bu dönem, 1960'lı yıllarda Kızamık, Kızamıkçık ve Kabakulak'a karşı aşular üreterek başlanmıştır ve 1970'lerde Suçiçeği aşısı üretimi ve inaktive edilmiş Japon ensefaliti ile devam etmiştir. Bu dönemden sonra, 1980'lerde, konjuge kapsüller polisakkarid ve protein aşuları geliştirilmiştir. Taşıyıcı proteinler ile konjuge aşular kullanılması, işlevsiz karbohidrat antijenlerine karşı bağışıklık yanıtı sorununu da ortan kaldırmıştır. Bu aşular, hepatit B gibi bir grup patojende immün yanıtın etkinliğini ve immünojenisite için antijenlerin güvenli kullanımını artırmıştır. Sonunda 1990 yılında, DNA aşularının geliştirilmesi ile cesur ve şaşırtıcı aşuların evrimi son aşamaya girmiştir. Bu aşı, bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan hastalıklarla başa çıkmak için umut verici bir yaklaşımdır. Bu aşuların sunumundan bu yana, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) Sıtma ve *Leishmania* gibi, insanın önleyemediği veya tedavi edemediği hastalıklara karşı aşı geliştirilmesi için büyük ilerlemeler kaydedilmiştir [42].



## 2.2 Leishmaniasis

Leishmaniasis, *Leishmania* türündeki zorunlu hücre içi parazitlerin neden olduğu tropikal bir hastalık olup Dünya'nın ve Türkiye'nin en önemli halk sağlığı problemlerinden birisidir. Leishmaniasisin visseral (VL), kutanöz (KL) ve mukokutanöz (MKL) olmak üzere 3 farklı klinik formu bulunmaktadır. Hastalık tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygındır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre Leishmaniasis, Avrupa, Afrika, Asya ve Amerika'da 98 ülkede görülmektedir. Ancak yeni vakaların %90'ından fazlası sadece 13 ülkede (Afganistan, Cezayir, Bangladeş, Bolivya, Brezilya, Kolombiya, Etiyopya, Hindistan, İran, Peru, Güney Sudan, Sudan ve Suriye) meydana gelmektedir. Dünyada 350 milyon insan bu hastalığa yakalanma riski altındadır. Her yıl 0,9 ila 1,7 milyon insanın yeni enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Bunlar içerisinde sadece küçük bir kısmı hastalığı geçirmekte ve 20.000–30.000'i ölümlerle sonuçlanmaktadır [43].

Türkiye'nin de ciddi halk sağlığı problemlerinden biri olan bu hastalık yaklaşık 20 milyon kişiyi tehdit etmektedir. Türkiye'de Ege ve Akdeniz Bölgesinde visseral form, Güney ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde kutanöz forma daha sık rastlanmaktadır [44], [45], [46].

KL olgularının %98'inin endemik olduğu Şanlıurfa, Osmaniye, Adana, Hatay, Mersin ve Kahramanmaraş kentlerinde meydana geldiği TC Sağlık Bakanlığı tarafından bildirilmiştir. Özellikle Suriye'de meydana gelen iç savaşlar sonucu son zamanlarda Suriyeli mültecilerin göç etmesi önemli derecede artmıştır [47], [48]. Bunun sonucu olarak Şanlıurfa KL için son derece endemik hale gelmiştir.

2009 ve 2015 yılları arasında Türkiye'de Leishmaniasis pozitif 263 hasta ile yapılan bir epidemiyolojik çalışmada hastalardan izole edilen türlerin ise *Leishmania tropica* ve *Leishmania infantum* olduğu tespit edilmiştir [44].

Phlebotomus ve Lutzomyia cinslerinin 98 türü, insan leishmaniasis için vektördür. Sadece dişi kum sinekleri, yumurta gelişiminin tamamlanmasında gerekli olan kan öğelerini almak için memelileri ısırır. Bazı kum sinekleri, köpekler, kemirgenler ve keseliler dahil olmak üzere geniş bir konak aralığına sahiptir, diğerleri ise esas olarak

insanlar üzerinden beslenmektedir. Buna göre, insan leishmaniasis zoonotik veya antroponotik iletim modellerine sahip olabilmektedir [49].

### 2.1.1 Kütanöz leishmaniasis (KL)

Leishmaniasisin en yaygın şekli, dünya çapında her yıl meydana gelen 0.7–3.3 milyon yeni vaka ile KL'dir. Vücudun açıkta kalan kısımlarında deri lezyonlarına, ülserlere, yaşam boyu yara izleri ve ciddi sakatlıklara neden olması nedeniyle deri leishmaniasisi olarak da bilinmektedir. Saf KL ilk olarak Eski Dünya'da Lewis ve Cunningham tarafından 1876'da tanımlanmıştır. KL'li olguların % 90 Afganistan, Brezilya, İran, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye'de meydana gelmektedir [43], [50]. 2015 yılında 3 ülkede yeni KL vakalarının üçte ikisi gerçekleşmiştir: Cezayir, Kolombiya ve Suriye Arap Cumhuriyeti. Yılda 600.000 ila 1 milyon arasında yeni vaka ortaya çıktığı tahmin edilmektedir [9]. Son yıllarda Irak, İran, Afganistan, Türkmenistan ve Suriye gibi ülkelerden politik sebepler, savaşlar, iş imkanları nedeniyle Türkiye'ye göç eden mülteci sayısının artması nedeniyle olgu sayısında artmıştır [51].

*L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. majör* ve *L. tropica* olmak üzere başlıca beş *Leishmania* türünün Eski Dünya KL (EDKL)'e neden olduğu bildirilmiştir. Diffuz KL'e ise *L. aethiopica* neden olmaktadır. *L. infantum*, *L. major* ve *L. tropica* bucal mukoza veya gırtlak lezyonlarına neden olabilmektedirler. Yeni Dünya KL (YDKL)'de ise hem *Leishmania subgenera* (*L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*) hem de *Viannia subgenera* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*) çoklu *leishmania* türleri neden olabilmektedir [50].

KL'de, parazitler deride bulunan makrofajları enfekte eder. Konakçı hücre parazitlerle dolduğunda patlar ve serbest kalan amastigotlar komşu makrofajları enfekte eder. Burada parazit kamçısını kaybederek amastigot haline dönüşür ve ikiye bölünerek çoğalırlar [3]. Kuluçka süresi 1 ila 4 hafta arasındadır ancak birkaç yıla kadar sürebilir. Enfeksiyon parazitlerin miktarına ve konağın bağışıklık sisteminin durumuna göre değişen bir zaman diliminde meydana gelir. Sıcaklığın ve şişmenin lokal olarak artması ile karakterizedir. Başlangıçta küçük kırmızı papul şeklindedir ve yavaşça ağrısız ve yumuşak veya üzeri krutlu bir nodüle dönüşür. Bu süreç kişiye göre değişir ve 2-8 hafta kadar sürer. Lezyon sayısı bir veya birden çok olabilir ve lezyonlar 1 ila 10 mm çap

aralığında, kaşıntılı olabilmektedirler [45]. KL genellikle hafif seyirlidir ve nodüller kendi kendine iyileşebilirken bazı nadir durumlarda ülserleşerek kronikleşmektedir [52], [53].

Tanısı konulan tüm hastalar tedavi edilmelisi gereklidir. Erken tedavi sayesinde enfeksiyon zinciri kırılır, yeni olguların önüne geçilerek yeni enfeksiyon alanlarının oluşması engellenebilir [54].

KL, enfekte eden *Leishmania* türüne, coğrafi konuma, hastalık rezervuarına ve konak immün sistemine göre farklı yaş dağılımındaki kişileri etkilemektedir [55] [54]. Ayrıca dünyanın çeşitli bölgelerinde KL'nin cinsiyete göre de farklılık gösterdiği bilinmektedir [56]. KL, lokalize kutanöz leishmaniasis (LKL), diffüz kutanöz leishmaniasis (DKL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olmak üzere üç farklı formda ortaya çıkmaktadır.

LKL, vücudun açıkta kalan kısımlarında cilt lezyonları ve ülserler ile kalıcı izler bırakarak karakterizedir. DKL'de, LKL'den farklı olarak tüm vücudu kapsayan ülserasyon görülmez ve nodüller daha yavaş gelişir [57].

### **2.1.2 Mukokutanöz leishmaniasis (MKL)**

Bu klinik forma neden olan türler *L. braziliensis*, *L. guyanensis* ve *L. panamensis* içeren kompleks *L. braziliensis*'e aittir. Mukokutanöz leishmaniasis vakalarının% 90'ından fazlası Bolivya'da (Brezilya), Brezilya, Etiyopya ve Peru'da görülür [58].

Nazofaringeal mukozanın invazyonuna ve tahribatına neden olur. İnvazyon yavaşça ortaya çıkar, bazen başlangıçta rahatsızlığa yol açmaz, böylece mukozal hasarın fark edilmeden ilerlemesine izin verir. Böylece hastalarda burun, ağız ve boğazdaki mukoza zarlarının kısmen veya tamamen yok sebep olabilir. Enfekte tatarcığın ısırıldığı bölgede meydana gelen yaklaşık 10 cm çapındaki nodül, papül yada vezikül benzeri lezyonlar 10 gün ile birkaç ay arasında görülebilmektedir [59]. Genellikle, lezyonlar burun mukozasında başlar ve ağız ve farenks mukozası, larinks ve burun ve dudak derisine yayılır. Hastalığın erken döneminde, mukozaya yüzeysel ülser infiltrasyonu olur. Daha sonra ülserler ilerlediğinde, sınırları nekrotik bir görünüme sahip olur ve yırtılıp ayrılır. Damak çatısı bademcikler ve küçük dil (uvula) tahrip olabilir [57]. MKL 'de hastalığın seyri, hastanın immünitesine ve parazitin immünolojisine bağlı olarak değişmekte olup hastaların %1-10'unda enfeksiyon mukozaya kadar ilerlemektedir [60], [61], [62]. Daha

sonra mukozal ülserler nazal septumun tahribatına neden olur ve dudakların ve damağın yapısında biçimsel bozulmalar meydana gelir. Enfeksiyon burun boşluğunda olduğunda, burun konkalarının atrofisi ve kötü koku ile kıkırdaklı septumun tahribi meydana gelebilir ve aşırı durumlarda ölümlere neden olabilir [63].

### 2.1.3 Visseral Leishmaniasis (VL)

Kala-azar olarak da bilinen visseral leishmaniasis, vakalarının % 95'inden fazlasında tedavi edilmezse ölümcüldür. 2015 yılında, Dünya Sağlık Örgütü'ne göre çoğu vakaların (% 90'ından fazlası) Brezilya, Etiyopya, Hindistan, Kenya, Somali, Güney Sudan ve Sudan'da görüldüğü rapor edilmiştir. Her yıl dünya çapında yaklaşık 50 000 ila 90 000 yeni VL vakası ortaya çıkmaktadır [64]. Visseral leishmaniasis vakalarının çoğu *Leishmania donovani* veya *Leishmania infantum/Leishmania chagasi* parazitlerinden kaynaklanmaktadır. Leishmaniasisin klinik bulguları hem enfekte eden parazitin türüne hem de konağın immün yanıtına bağlıdır. Risk altındaki popülasyon, okul öncesi çocukları ve bağışıklık sistemi zayıf ve yetersiz beslenen ve organ nakilleri sonucu immun depresyon oluşan bireyleri içerir [65], [66]. Son zamanlarda VL, AIDS olan veya intravenöz ilaç kullanan veya her ikisi de olan hastalarda artan sıklıkta görülmektedir. AIDS 'de immun sistemin baskılandığından dolayı hastalık kolaylıkla gelişebilmektedir. VL-HIV koenfeksiyonunda hastalık atipik lokalizasyon sergileyerek gastrointesitinal sistem ve solunum yolunda gözlenebilmektedir [67], [68], [69].

Hastalık bulaştıktan sonra kuluçka süresi 3 ila 8 ay arasında değişmektedir. Retiküloendotelial sistemdeki lezyonlar sublinik bir seyir izleyebilir. Düzensiz ateş nöbetleri, kilo kaybı, dalak ve karaciğer büyümesi ve anemi ile karakterizedir. Bunun yanında lenfadenopati, hepatomegali, splenomegali, solgunluk, anemi, lökopeni, trombositopeni, gece terlemeleri, halsizlik, iştahsızlık, asteni, kutanöz pigmentasyon ile haftalar veya aylar içinde hızla ilerleyebilir [70]. Ayrıca, etkilenen çocuklar karakteristik kronik ishal ve büyüme geriliği oluşabilir. Hindistan'da hastalarda Hiperpigmentasyon gelişebilmektedir. Bu sebeple VL'ye Hintçe "kara ateş" anlamına gelen kala-azar da denilmektedir [71], [72].

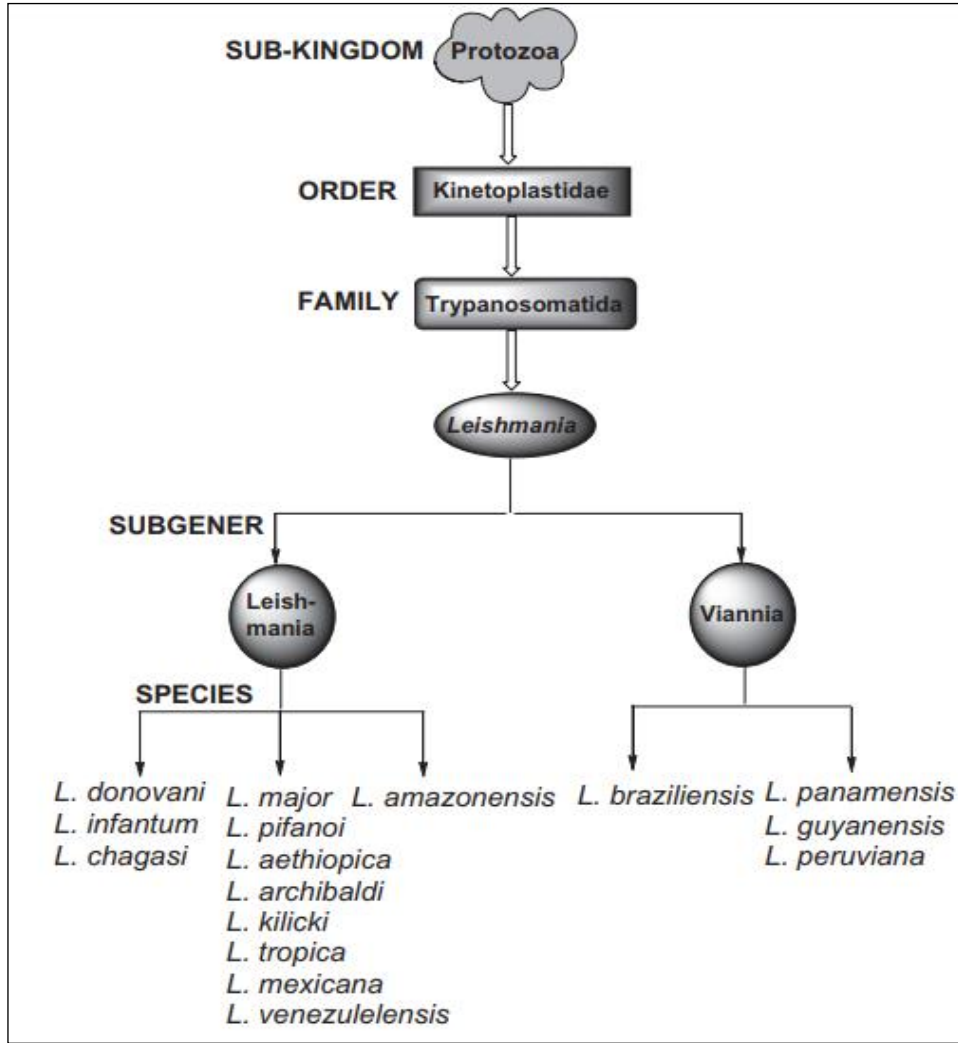
Enfekte kum sineğinin (sandfly) bireyi ısırmasıyla promastigotlar makrofajlar tarafından hücre içine alınırlar ve amastigot forma dönüşürek fagolizozomlarda

çoğalırlar. Parazitlerin hücre içinde çoğalıp yayılmasıyla karaciğer, dalak, kemik ilgi ve lenf nodülü gibi çeşitli dokularda bulunan retikuloendotelial sistem hücrelerini enfekte edebilmektedirler [73], [74].

## **2.3 *Leishmania* Parazitleri, Morfolojisi ve Yaşam Döngüsü**

### **2.3.1 *Leishmania* Parazitleri**

*Leishmania*, trypanozom ailesinin kinetoplastida sınıfına ait zorunlu hücre içi bir parazittir [75]. İnsanlar da dahil olmak üzere omurgalı konaklarında leishmaniasis adı verilen klinik ve epidemiyolojik açıdan geniş spektrumlu hastalıklara neden olmaktadır [76], . Leishmaniasislerin semptomları hafif kendiliğinden iyileşen kutanöz lezyonlardan ölümcül visseral vakalara kadar değişebilir. Parazitlerin keşfi 1900'lerin başlarında bildirilmiştir [77], [78]. Parazitlerin keşfedilmesinin ardından *Leishmania* parazitlerinin transferi ve yaşam döngüsü bilimsel olarak teyit edilmiştir [79], [80]. Günümüze kadar 20 tanesi hastalık oluşturmak üzere toplamda 30 tür tespit edilmiş ve bunlar arasında çok sayıda morfolojik olarak benzer türler ve alt türler bulunmuştur, bulunmaya da devam etmektedir. Işık mikroskopunda incelendiğinde tüm türler morfolojik olarak aynı görünse de, neden oldukları hastalıklar; epidemiyolojik, coğrafik dağılım, serolojik, immunolojik, biyokimyasal ve biyolojik özelliklerine dayanarak çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır [81]. *Leishmania* parazitlerinin taksonomisinin karmaşık olması nedeniyle tek bir kategorizasyon kabul edilememektedir [82].

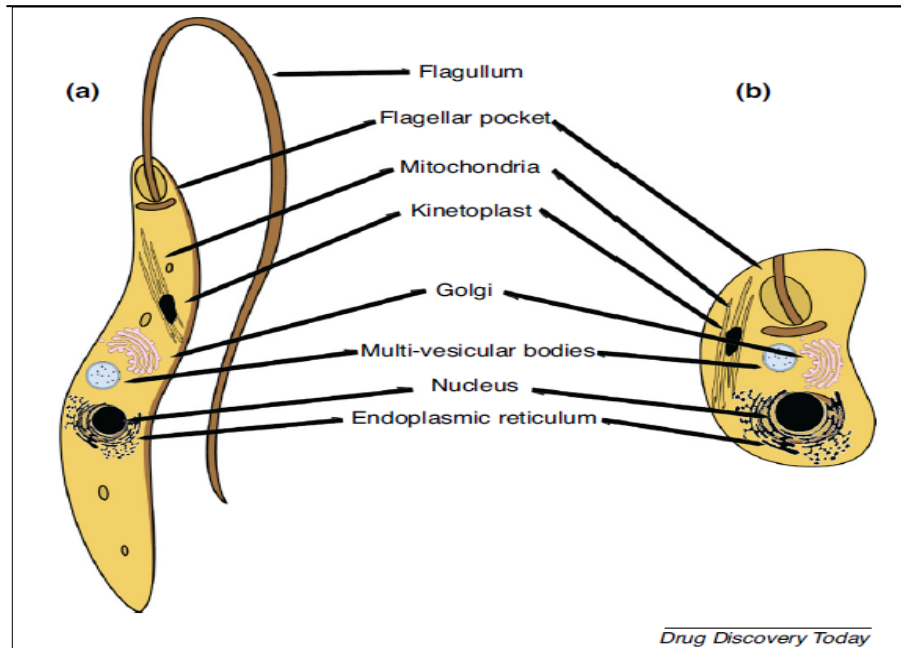


Şekil 2.1 *Leishmania* parazitlerinin sınıflandırılması [83]

### 2.3.2 Parazitlerin Morfolojisi

*Leishmania* parazitleri, memeli bir konakçı ve flebotomin kum sinekleri (Diptera: Psychodidae, alt aile Phlebotominae) vektörleri, arasında değişen bir dimorfik yaşam döngüsüne sahiptir. *Leishmania* parazitleri vektörde (kum sineği) içinde promastigot morfolojisine sahipken memeli konakçıda (insan, köpek vs) amastigot morfolojisine sahiptir [84], [85]. Parazitin morfolojisindeki bu farklılıklar organellerin fonksiyonlarındaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, *Leishmania* iki hücre şekli arasında korunmuştur ve çapraz bağlı alt-pelliküler korse mikrotübüller (mikrotübüllerin yerlerinde küçük değişiklikler) ile tanımlanmıştır. Bu dizi hücre döngüsü boyunca korunur, bu nedenle de hücre bölünmesi mikrotübüllerin mevcut

diziye eklenmesi ve uzamasına dayanır. Hücrenin çekirdeği merkezde bulunur ve çekirdek zarında porlar bulunur. Çekirdeğin ön kısmı kinetoplasttır ve flagellumun uzandığı bazal gövdeye doğrudan bağlı olan birleştirilmiş mitokondriyal DNA kütlesi içerir [86], [87]. Ayrıca sitoplazma içinde golgi aygıtı lizozom ve endoplazmik retikulum bulunur. Parazitin promastigot formu 15-20 µm boyunda, 1,5-3 µm genişliğindedir. Ön uçtan çıkan serbest bir kamçıya (flagella) sahiptir ve hareketini kamçısının doğrultusunda yapmaktadır (Şekil 2.2). Kamçı, bir çift merkez ve dokuz çift periferik fibrilden oluşan aksoneden oluşmaktadır. Parazitin amastigot formu ise memeli makrofajların içerisinde hızla çoğalmaktadır. Amastigotlar, 1–3 µm eninde, 2-5 µm boyunda olup promastigotlardan daha küçüktür. Amastigotlar, oval şekle sahiptir ve kamçısı flagellar cep içerisinde olduğundan hareketsizdirler [88]. Promastigotların amastigotlara dönüşümü salgı ve endositik yolk kompartmanlarının hücre içi dağılımındaki ve bağlı bolluğundaki değişim ile ilişkilidir. Örneğin amastigotlar çok küçük bir endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği içerirken, büyük lizozom sistemi içermektedirler [89]. Sitoplazmada arka uca yakın büyük bir nükleus ve nükleusa yakın kinetoplast bulunur (Şekil 2.2) Kinetoplast'ta çekirdekten farklı bir DNA bulunur. Kinetoplastın genetik bir devamlılığı olduğu ve çekirdekten önce bölüdüğü belirlenmiştir [90].



Şekil 2.2 Promastigot (a) ve amastigot (b) morfolojilerinin ve *Leishmania* yaşam döngüsünün farklı hücre tiplerinde şematik gösterimi [91].

### 2.3.3 Parazitlerin Hayat Döngüsü

*Leishmania* parazitleri hem omurgalı hem de omurgasız konakta iki gelişim aşaması içeren karmaşık bir yaşam-döngüsüne sahiptirler [92] .

#### 2.3.3.1 Promastigot Formdan Amastigot Forma Geçiş

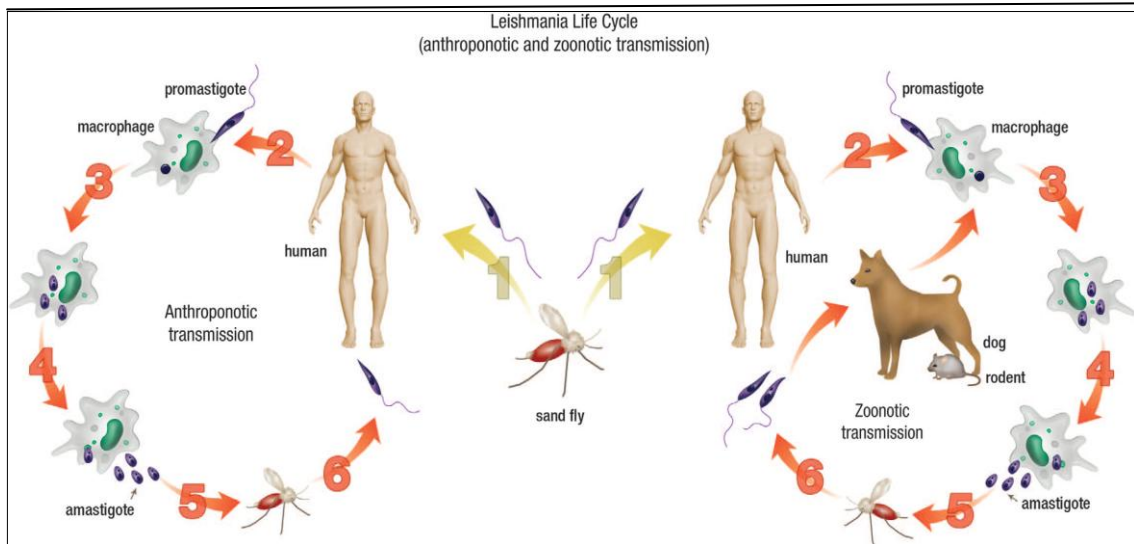
Promastigot, parazitin dışı kum sineği lümeninde bulunan proliferatif biçimidir. Enfekte kum sinekleri beslenmek için memeli bir konağı ısırduğunda, bölgeye promastigotlar enjekte edilir. Kum sineğinin neden olduğu hasar, makrofajların ısırık bölgesine toplanmasına neden olur. Metasiklik promastigotlar, oldukça hareketli hücrelerdir ve *Leishmania*, bir kolajen matrisi boyunca göç edebilmektedir [93]. Bu nedenle, *Leishmania* parazitleri, ısırık bölgesinden çok uzak yerlerde ortaya çıkması mümkündür. Makrofaj hücreleri, *Leishmania*'nın konak olarak kullandığı ve yaşadığı hücrelerdir. Konak hücre içerisine amastigot alımına aracılık eden mekanizmanın tam olarak anlaşılmasıyla birlikte parazitler, konak hücrelerinin Fc reseptörlerine bağlanırlar ve immüno globülin aracılı fagositoz yoluyla makrofajlara girerler [94], [95] . Wetzel vd. Abl2 olarak bilinen bir tirozin kinaz reseptörünün makrofajlar tarafından *L. amazonensis* amastigot alımını kolaylaştırdığını göstermiştir [96]. Makrofaj içerisinde fagolizozoma girdiğinde kamçılı, hareketli ve uzun bir hücre şekline sahip promastigot formdan farklılaşarak, artık daha küresel bir hücre gövdesine ve kısa bir kamçıya sahip olan bir amastigot formuna dönüşür. Bu dönüşüm hücre biçimindeki önemli bir değişimdir ve hücre yüzeyi hacim oranının en aza indirgenmesiyle sonuçlanır. Bu sayede parazit, parazitofor vaküolünün sert ortamına maruz kaldığı alanı azaltır. Amastigot formuna farklılaşma sırasında flagellum yapısındaki önemli değişime ek olarak, flagellum bağlantı bölgesi proteinlerinin lokalizasyonundaki değişikliklerle ilişkili flagellar cep ve boyun bölgesinin büyük bir yeniden yapılandırma oluşur. Flagellar cep boyununun kapanması da muhtemelen asidik ve proteazlarla dolu olan parazitofor vaküolün içindeki ortamdan hücrenin potansiyel olarak savunmasız bir alanının korunmasını sağlar [97], [98]. Bağışıklık tepkisinden kaçarak ikili fisyonla hücre içinde çoğalan amastigotlar hücreyi patlatarak serbest hale gelirler. Serbest hale gelen bu amastigotlar yeniden makrofajları enfekte ederek dalak, karaciğer ve kemik iliği gibi retikuloendotelial sistemin organlarına yerleşirler. Sonuç olarak konak hücre



parçalanır, parazitler serbest hale gelir ve yeni hücrelerle farklı organların dokularına yayılarak lezyonlara ve doku tahribatına neden olur [99]. Parazitin biyolojik döngüsünü 53 ila 100 gün arasında gerçekleştirdiği bilinmektedir [96].

### 2.3.3.2 Amastigot Formdan Promastigot Forma Geçiş

Amastigotlar çeşitli memeli konakçı hücre içinde bulunan proliferatif *Leishmania* formudur. Sağlıklı dişi tatarcıklar enfekte konaktan kan emerken amastigotlar ile enfekte olurlar. Kan ile alınan amastigotların bir kısmı sindirilirken, bir kısmı da makrofajdan salıverildikten sonra amastigot, hareketli bir promastigot formuna dönüşmeye başlar [100], [101]. Sineğin orta bağırsağında kamçı oluşturur ve metasiklik (enfektif) promastigot formuna dönüşürler (Şekil 2.3). Burada sıcaklık ve pH'daki değişim sebebiyle amastigottan promastigot forma farklılaşır [102], [103].



Şekil 2.3 Parazitlerin hayat döngüsü [106]

Peritrofik membran içinde çoğaldıktan sonra torasik mideye geçerek kemotaksis ile özafagus ve farinkse tutunurlar. Özafagustan ayrılan daha küçük olan metasiklik promastigotlar burdan sineğin ağız kısımlarına geçerler [104], [105]. Bu döngü tatarcığın beslenmek için bir başka konak bulup ısırmasıyla devam etmektedir.

## 2.4 Vektör

Yaklaşık 600 Phlebotominae türü bilinmektedir, bunların çoğu Eski Dünyadaki Phlebotomus cinsine ve Yeni Dünyadaki Lutzomyia'ya aittir. Bu türlerin % 10'undan azı hastalık vektörleri olarak hareket eder ve bunların sadece 30 türü halk sağlığı açısından önemlidir. İki kum sineği cinsi olan Phlebotomus ve Lutzomyia dişileri, insanlar için patojenik olan *Leishmania* türlerinin kanıtlanmış vektörleri olarak tıbbi açıdan önemlidir. Phlebotomus, Avrupa, Asya, Kuzey Afrika, Arap Yarımadası'nın kuzey ve orta kısımları ve Eski Dünya'nın diğer bölgelerine uzanan dünya ekolojik bölgelerini baskın bir cinstir. Phlebotomus, Kuzey Amerika'da çok az öneme sahipken, Lutzomyia, Latin Amerika'daki ana cinstir ve büyük bölgelerde bulunur. Kum sineklerinin yayılımı ve dağılımı, leishmaniasisin ortaya çıkışını büyük ölçüde belirlemektedir. Genel olarak, Phlebotomus (Eski Dünya sandfly türleri) çölde veya yarı kurak ekosistemlerde görülür [107]. Genellikle, kum sinekleri, insan barınağı etrafında görülürler ve gübre, dışkı, yaprak kiri ve yüksek sıcaklık ve nem içeren duvarlardaki çatlaklar da dahil olmak üzere belirli organik atıklarda beslenirler. Zamanla kum sinekleri ve leishmaniasis dağılım modelinin değiştiği görülmektedir [108].

## 2.5 Leishmaniasis'de İmmünite

Leishmaniasis hastalığında hücre aracılı immün yanıt bileşenleri ve doğal immün sistemin önemli antijen sunucu hücrelerinden olan makrofaj aktivasyonunun koordineli etkileşimi önemlidir [109], [110]. Aynı zamanda parazitin konak hücresi olan makrofaj hücreleri güçlü antimikrobiyal işlevde sahiptirler ve fagosite ettikleri *Leishmania* antijenlerini T hücrelerine sunarlar. Hastalığın kontrolü hücre aracılı immün yanıt ile düzenlenir. Bu sebeple T yardımcı hücreler, ya koruyucu ya da ilerleyici immün yanıtın oluşmasında önemli bir rol oynar. Bunun sonucunda ise hücresel ya da humoral immün yanıt oluşmaktadır. Th1 hücrelerinin proliferasyonu IL-12, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler ile sağlanmaktadır. Th2 hücrelerinin proliferasyonu ise hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır [111], [112].

Diğer doğal bağışıklık hücrelerinin de *Leishmania*'ya karşı immün yanıtta önemli rolleri bulunmaktadır. Bu hücrelerden biri olan nötrofiller, esas görevi istilacı patojenleri fagosite etmek olan primer antimikrobiyal efektör hücrelerdir. Nötrofiller hızla hasarlı

doku (tatarcığın ısırdığı bölge) bölgelerine toplanırlar. Birçok mikroorganizmaların nötrofiller sayesinde hızla öldürülebilmektedirler. Ancak bazı fırsatçı hücre içi patojenler bu hücrelerin yok edici ortamında yaşayabilmektedirler [94]. Nötrofillerin *Leishmania* parazitleri gibi hücre içi patojenleri öldürebildiği ve leishmaniasis'e karşı erken korumada rolü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [113], [114], [115]. *Leishmania donovani* amastigotları kullanılarak deney hayvanlarında yapılan bir çalışmada nötrofillerin koruma işlevine sahip olduğu gösterilmiştir. İmmün sistemde nötrofil fonksiyonu büyük olasılıkla konağın genetik geçmişi, parazit suşu ve kullanılan parazitin gelişimsel aşamasına bağlıdır [116].

Bir diğer doğal immün sistem hücresi olan Dendritik hücrelerle (DH) *Leishmania* parazitlerinin etkileşimleri ise karmaşık, tutarsız ve enfeksiyon kontrolüne veya hastalığın ilerlemesine yol açabilmektedir. DH aktivasyonunun miktarı ve kalitesi, *Leishmania* parazitlerinin gelişim aşamasına ve türü/suşuna bağlı olmasının yanı sıra DH'nin alt kümesine ve farklı çalışmalara katılan ekzojen uyarılara da bağlı olarak değişir [117], [118]. Vücutta farklı bölgelerde bulunan dendritik hücreler farklı fonksiyonlar sergilemektedirler. Örneğin deride bulunan DH'ler Langerhans hücreleri (LH) olarak bilinmektedir. Bu hücrelerde antijen sunucu hücre olduklarından *leishmania* enfeksiyonu esnasında paraziti algılar, hücre içine alır ve onları T hücrelerine sunmak üzere lenf düğümüne taşırlar [119], [120]. Bazı araştırmacılar DH'lerin leishmaniasisde birincil antijen sunucu hücreler olduğunu savunurken bazıları da lenf nodülünde yer alan DH'lerin immün yanıtı başlattığını ileri sürmektedir [121], [122]. Ancak *leishmania* parazitleri DH'lerden kaçmak için çeşitli stratejiler kullanırlar. Bu stratejilerin bazıları tüm parazit formları için aynı iken bazıları ise parazitin türüne göre farklılık göstermektedir. Bu durum belki de farklı *Leishmania* suşlarının farklı hastalıklara neden olduğunu açıklamaktadır [123]. Yapılan araştırmalarda *L. donovani* ve Güney Amerika türlerinin (*L. amazonensis*, *Leishmania brazillensis*'in) inhibe edici etkileri *L. majör* ile karşılaştırılmış ve *L. donovani* parazitlerinin, bireylerde DH olgunlaşmasını bloke ettiği gösterilmiştir [124]. Dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücreler (NK) de sitokin üretmektedirler. Uyarılmış DH'ler interlekin-12 (IL-12) üretirken, NK hücreleri interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) üretmektedir [125]. Heterodimerik yapıda bir sitokin olan IL-12, T hücreleri, NK hücreler ve makrofajlar gibi çeşitli efektör

hücrelerin aktivitesini arttırır ve ayrıca IFN- $\gamma$  gibi sitokinlerin üretimini uyararak Th1 yanıtı stimüle edebilmektedirler [126], [127]. Ayrıca bazı araştırmacılar, IL-12 'nin Th2 immün yanıt aktivasyonunu bloke ettiğine inanmaktadır [128], [129]. Enfeksiyon esnasında IL-12'nin yokluğunda Th1 hücrelerinin elimine edildiği gözlenmesi üzerine Th1 hücre popülasyonunun sürdürülmesinde IL-12'nin rolünün önemli olduğu anlaşılmıştır [130], [131], [132], [133]. *Leishmania* promastigotları dirençli ve duyarlı konakta makrofajların istila edilmesi sırasında IL-12 indüksiyonundan kaçarlar. *Leishmania*'ya karşı immün yanıtta makrofajlar, çok az IL-12 üretirler ve enfekte makrofajlar çeşitli uyaranlara karşı yanıt olarak IL -12 üretiminde azalma gösterir [134]. Farelerde (ve muhtemelen insanlarda da) koruyucu immün yanıt başlatılmasında gerekli olan IL-12 sitokininin DH'ler tarafından üretimi, *L. donovani* ve *L. majör* parazitlerinden farklı etkilenir: IL-12 üretiminde *L. majör* birincil DH'ler tarafından alınırken *L. donovani* bu hücreler tarafından alınmamaktadırlar [135], [136].

Leishmaniasis immünitesinde en önemli etmen parazite karşı koruyucu immün yanıt oluşturacak uygun antijenlerin antijen sunan hücreler (ASH'ler) tarafından sunulmasıdır. Fakat *Leishmania* parazitlerinin antijenleri (özellikle amastigot antijenleri) sayesinde konak hücreyi (CD4<sup>+</sup> hücreleri) ve diğer immün sistem hücrelerini inhibe ederler [137]. *Leishmania* parazitlerinin, majör histokompatibilite kompleksi sınıf II (MHC) gen ekspresyonunu önleyerek antijenin sunulmasını engellediğine veya MHC sınıf II molekülleri üzerinden antijenin sunulmasına müdahale ettiğine inanılmaktadır [138], [139], [140].

Sadece MHC sınıf II üzerinden antijen sunumu T hücre yanıtlarını uyarmak için yetersiz kalmaktadır. Bunun için eş-uyarıcı moleküller olan ASH üzerindeki B7-1/B7-2 ve CD40 moleküllerinin ve T hücresi üzerindeki D28 ve CD40L moleküllerinin sırasıyla birbirlerine bağlanması gerekmektedir [141]. CD40/CD40L ligasyon antijen sunucu hücreler tarafından IL-12 üretimini indüklerken IL-12 'de T hücrelerini aktive ederek IFN- $\gamma$  gibi leishmanicidal sitokinlerin üretimini uyarır [142]. Ayrıca, DH'ler tarafından IL-12 üretiminin uyarılması, muhtemelen birden fazla sinyali gerektirir ve IL-12 yanıtta katkıda bulunabilecek birçok ana bileşeni vardır [143].

T hücre bağımlı IFN- $\gamma$  sitokini, makrofajları aktive ederek iNOS regülasyonu sağlar ve böylece hücre içi parazit öldürülmesinde ve hastalık kontrolünde etkili olan Nitrik Oksit (NO) üretilir [144]. IFN- $\gamma$  üretimi olmayan farelerde (knockout) tedavi başarısız olmaktadır. Ayrıca dirençli farelerde IFN- $\gamma$  geninin veya IFN- $\gamma$  reseptörünün ligand bağlama zinciri farelerde *Leishmania* enfeksiyonuna karşı duyarlılığın artmasına yol açtığı gösterilmiştir [145]. Buna ek olarak, anti-IFN- $\gamma$  antikoru tarafından IFN- $\gamma$  nötraleştirilmesi de fareleri duyarlı hale getirmiştir [146].

IFN $\gamma$ , hücre içi parazitlerin öldürülmesi için insan makrofaj hücrelerinin aktive edilmesini sağlayabilmektedir ve eksojen IFN- $\gamma$ , insan KL tedavisini ilerletebilmektedir (Şekil 2.4). Bu bağlamda, VL hastalarda IFN- $\gamma$  etkisi sınırlı kalabilmektedir ve KL hastalarında sadece CD4<sup>+</sup> tarafından IFN- $\gamma$  üretimi, *Leishmania* antijenlerine karşı korumada yetersiz kalmıştır. Bu durum IFN- $\gamma$  sitokinin yanında diğer mekanizmalarında önemli olduğunu göstermektedir [147], [148]. Bir diğer sitokin olan TNF- $\alpha$  da çeşitli hastalıklara karşı koruma sağlamada önemli rol oynamaktadır. IFN- $\gamma$  ile birlikte bir sinerji oluşturarak iNOS aracılığı ile parazitlerin ölümünü ve hücre içi patojen çoğalmasını kontrol edilmesini sağlar [149], [150]. Deneysel modellerle yapılan çalışmalar, IL-10 sitokininin parazit devamlılığında ve patolojisinde merkezi rol oynadığını göstermiştir [151], [152]. Önceleri IL-10, bir Th2 sitokini olarak karakterize edilse de daha sonra bunun pleiotropik bir sitokin olduğu kanıtlanmıştır. IL-10, makrofajlar da dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinden salgılanmaktadır [153]. IL-10, makrofaj deaktive edilmesinde esas sitokindir ve *Leishmania* parazitlerini öldüren bu hücrelerin yeteneğini azaltır. Bu sebepten dolayı hastalığın ilerlemesinde önemli bir düzenleyici rol oynamaktadır [154].

IL-10, *Leishmania* ile enfekte kişilerin lenfositleri vasıtasıyla çeşitli immün yanıtları baskılamaktadır. IL-10'un Th1 aktivasyonu bloke ettiği ve bunun sonucunda IL-12 ve IFN- $\gamma$  sitokinlerinin salgılanması baskılanarak sitotoksik immün yanıtı indüklediği gösterilmiştir [155], [156].

Makrofajın IFN- $\gamma$  aracılı mikrop öldürücü aktivitesi üzerinde IL-10 baskılayıcı yeteneği diğer hastalıklarda da gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda IL-10 sitokininin IL-12 mekanizması ile ters çalıştığı gösterilmiştir. IL-10, IL-12 sentezini baskılayarak makrofajlardan, B hücrelerinden ve dendritik hücrelerden IFN- $\gamma$  üretimini inhibe eder

[157]. IL-12 sitokininin B7/CD28 etkileşimi ile sinerji oluşturması T hücreleri tarafından IFN- $\gamma$  üretimini indüklerken *L. donovani* ile enfekte BALB/c farelere IL-10 uygulanması, ortak uyarıcı aktiviteleri belirgin bir şekilde azaltmıştır [158]. Bununla birlikte, IL-12'nin eklenmesi veya monoklonal antikolar [159] tarafından IL-10'un nötralizasyonu lenfosit çoğalmasını ve IFN- $\gamma$  üretimini yeniden sağlamaktadır.

Yapılan çalışmalarda IL-10 blokajının VL PBMC IFN- $\gamma$  yanıtını arttırdığı ve makrofaj hücrelerinde parazit replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu durum VL'li insan patolojisindeki IL-10'un rolü desteklemektedir [156], [155]. IL-4 sitokini de Th2 yanıtta önemli bir sitokindir. Fare modelinde yapılan çalışmalarda IL-4'ün VL'de herhangi bir rolü olmadığı ancak KL'e sahip farelerde enfeksiyonu şiddetlendirdiği ortaya konmuştur [160].



karşı bağışıklık yanıtı, konakçıyı enfekte eden parazit türüne ve konakçının genetiğini bağlı olarak ortaya çıkmaktadır [163]. VL hastalarının, *Leishmania* enfeksiyonlarına yanıt olarak dokuda yerleşik makrofajlar tarafından üretilen bir pro-inflamatuar sitokin olan plazma düzeylerinde IL-8 olduğu bulunmuştur. Öte yandan, IL-15, IFN- $\gamma$  üretmek için NK hücrelerini aktive eder, IL-12'yi indükler. Makrofajların leishmaniacidal aktivitesini uyarır. Ayrıca, akut VL hastalarında IL-15 düzeyinin artması, IL-4 gibi Th2 sitokinlerini baskılayabilir. İnterlökin-18 aynı zamanda makrofajlar tarafından üretilen bir pro-inflamatuar sitokindir, NK ve T hücre hücrelerinde IFN- $\gamma$  sentezini tetikler [164].

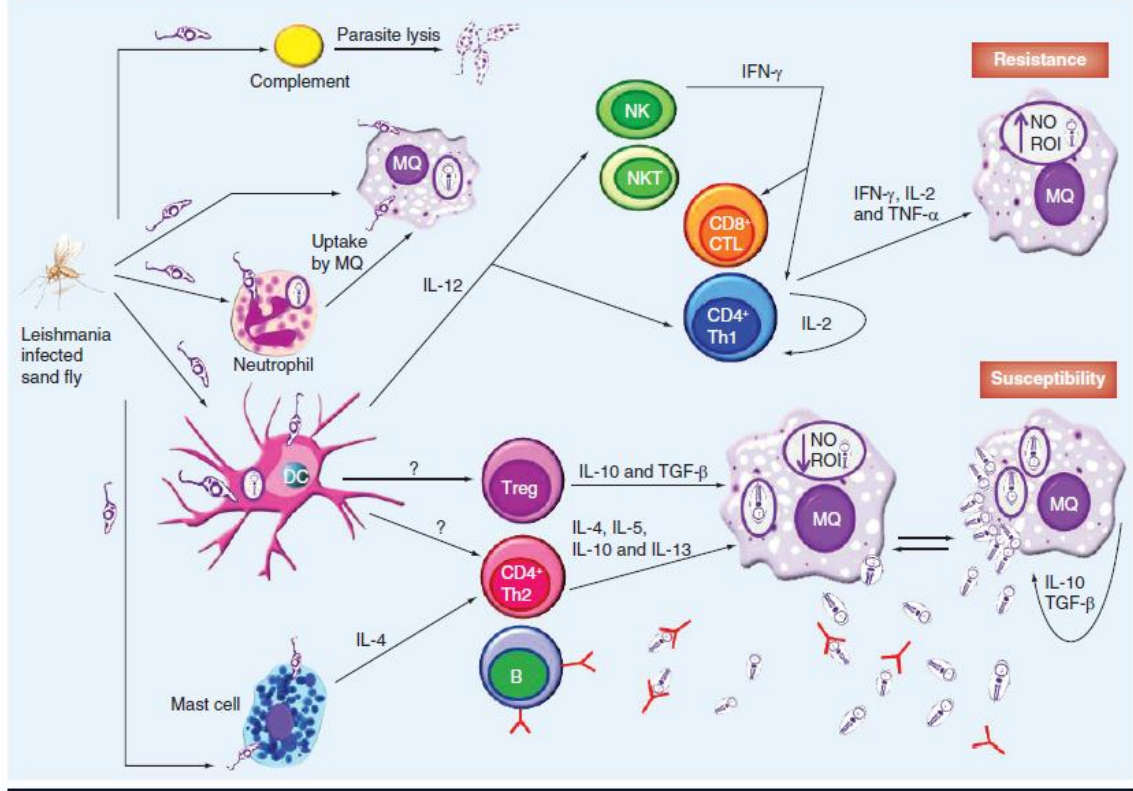
Enfeksiyona karşı immün cevabı etkileyen bazı faktörler vardır, ancak Th1 hücreleri, enfeksiyonun akıbetine karar veren başlıca önemli hücrelerdir [165].

*Leishmania* enfeksiyonuna karşı immün yanıtta hayati rolleri için düşünülen diğer hücreler makrofajlar, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreleri, T-yardımcı hücreleri, sitotoksik T hücreleri ve bu hücreler tarafından salgılanan sitokinleri içerir; CD8 hücrelerinin, makrofajları aktive eden IFN- $\gamma$ 'yi salgılayarak enfeksiyonu kontrol ettiği bilinmektedir ve aynı zamanda, enfeksiyonu kontrol etmede doğrudan katkıda bulunan ve dolayısıyla da immün immün yanıtlarının gelişimine doğru giden, doğal T hücrelerinin Th1'e farklılaşmasını teşvik eder. *Leishmania*'ya ev sahipliği yapan makrofajlar, Th1 ve NK hücrelerinden üretilen IFN- $\gamma$  tarafından aktive edilir ve bu sayede fagositoz ile parazitin öldürülmesi sağlanır (Şekil 2.5). Oponizasyonun paraziti öldürdüğü bilinmektedir, ancak leishmanial enfeksiyonda komplemanın C3 bileşeni bunu yapamaz ve yüzden aktifleşmeyen makrofajlarda parazit sağkalımı ortaya çıkar [166]. Bu durumun VL hastaların periferal kan mononükleer hücrelerinde Th1 immün yanıtta spesifik antijen eksikliği ile ilgili olduğu düşünülmektedir. VL'li hastalarda yüksek seviyede IL-10 sitokini gözlenir. IL-10'un makrofaj hücreleri üzerinde inhibitör etkisi göstermektedir ve makrofajların tepkisiz kalmasını sağlayarak sitokin aktivasyonunu engellemektedir. Ayrıca IL-10, VL'de önemli olan efektör T hücrelerinin kaybına yol açabilmektedir.

Dendritik hücreler, antijenleri CD4<sup>+</sup> T hücrelerine (T-yardımcı hücreleri) ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerine (sitotoksik T hücreleri) sunar ve T-yardımcı hücrelerin Th1 veya Th2'ye farklılaşmasını ve proliferasyonunu sağlayarak leishmanial enfeksiyonun kaderini



belirler. Antijenin CD4<sup>+</sup> T hücrelerine sunulması, IL-12 salgılanmasına yol açar ve salgılanan IL-12'de Th1 ve doğal öldürücü hücrelerinin proliferasyonunu yönlendiren makrofajları aktive eder ve de Th2 tepkilerini inhibe eder [167], [168]. Ancak akut VL'de ilk 4 hafta IL-2 ve IFN- $\gamma$  sentezlenmeyip, tedaviden sonra salgılandığı gösterilmiştir. Subakut VL'de ise IFN- $\gamma$  sentezinin çok az olduğu rapor edilmiştir [169].



Şekil 2.5 Visseral Leishmaniasisde immünite [170]

## 2.7 Parazit Konak Etkileşimi ve Konak İçerisinde Hayatta Kalma Stratejileri

Memeli konakçı içinde parazitlerin hayatta kalması, bağışıklık engellerinin kaçınma yeteneğine bağlıdır. Hücre dışı promastigotlarının çoğu makrofajlara girmeden önce kompleman faktörler tarafından öldürülürler. Hayatta kalan *Leishmania* parazitleri, dendritik hücreler ve Langerhans hücreleri, monosit /makrofaj cinsi hücrelere ve aynı zamanda insan granülosit hücrelerine yapışırlar. Parazitlerin hücrelere yapışmasına mannoz-fukoz reseptörü, fibronektin reseptörü ve C-reaktif protein reseptör gibi birçok reseptör aracılık eder. CR1, CD35, CR111, CD11b/CD18 gibi kompleman reseptörleri parazitin plazma membranında bulunan kompleman bileşenlerine bağlanır ve sonrasında kıvrımlanarak fagositoz benzeri etkileşim ile hücre içine alınırlar. Fagozom

ve endozom birleşir ve hidrolazlar, katepsin ve  $\beta$ -glukuronidaz içeren parazitofor vakuol (PV) oluşturur [171]. Hücre içi parazit olan *Leishmania*, doğrudan hümmoral immün yanıtta etkilenmez, ancak hücre aracılı immünite tarafından saldırıya yatkın hale gelir [172]. *Leishmania* parazitler, makrofaj aktivasyonu için gerekli olan IL-12 üretimini inhibe eder. Bunu takiben leishmanisidal aktivite de (indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS), nitrik oksit (NO) ve IFN- $\gamma$  yukarı regüle olduğu için) azalır. Süperoksit ( $O_2^-$ ) ve nitrik oksit (NO) üretimi iki büyük anti-leishmanial efektör mekanizmalarıdır. Parazit ile enfekte makrofajlar, esterler ile uyarıldıktan sonra oksijen radikallerini üretme kapasitesinde azalma meydana gelir. NO, *Leishmania* gibi hücre içi parazitlerin öldürülmesinde önemli bir rol oynayan toksik bir moleküldür. NO, çeşitli sitokinlerle aktive edilmiş makrofajlarda, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-arginininden sentezlenir. L-Arginin'e etki eden iki enzim vardır. Bunlardan ilki Nitrik Oksit Sentaz-II (NOS-II) olup makrofajlar tarafından salgılanarak nitrik oksit (NO) üretilmesini sağlar. Diğeri ise arginaz olup görevi L-arginininden L-ornitin ve üre oluşumunu sağlamaktır [173]. Yapılan çalışmalardaki birçok veri, enfeksiyonun erken aşamalarında *Leishmania* parazitlerinin NOS-II aktivitesini inhibe ederken, enfeksiyonun ileriki aşamalarında NOS-II üretimi arttırdığını göstermektedir [174]. Nitrik oksit sentazın, nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere üç farklı izoenzimi vardır. Yapılan çalışmalarda iNOS eksikli farelerin güçlü bir Th1 (IFN- $\gamma$ ) yanıtına rağmen *L. majör* enfeksiyonuna karşı yüksek ölçüde hassas olduğu anlaşılmış ve iNOS'un parazit kontrolünü kolaylaştırmadaki önemi bulgular ile desteklenmiştir [175].

IFN- $\gamma$  üreten Th1 hücreleri, parazite karşı uygulanacak ana silahlar arasındadır, ancak enfeksiyonda, parazit doğrudan bu hücrelerin işleyişine müdahale ederek konakçı bağışıklık mekanizmalarının üstesinden gelmektedir [172]. Hücre aracılı bağışıklık, paraziti ortadan kaldırdığı bilinen CD8 hücrelerini kullanır, fakat programlanmış hücre ölümü ifadesi nedeniyle CD8 hücreleri tükenmesi VL'de rapor edilmiştir. Parazitin immün yanıtta kaçınma mekanizmasının bir parçası da parazitin sitokin tepkilerini kendi lehine düzenlemesidir (IL-10 ve TGF- $\beta$ 'yi yukarı doğru düzenleyen) ve antijen işleme ve sunumu üzerindeki etkisi olan IL-1 ve TNF- $\alpha$ 'nın üretimini azaltıldığı da bilinmektedir [176]. İşgalci parazit çeşitli mekanizmalarla hedeflenmesi ve yok edilmesi

için tasarlanmış bağışıklık tepkilerinden başarılı bir şekilde kaçma evrimi gösterir. Bu kaçınma mekanizmaları, makrofaj fonksiyonunun modülasyonundan antijen sunumu inhibisyonu ve T hücrelerinin uyarımına kadar olan tüm stratejileri içerir [177].

*Leishmania* parazitleri hayatta kalmak için makrofaj hücresi aktivasyonunun ve T hücreleri tarafından tanınmaktan kaçmaya ihtiyaç duyar [178].

Promastigotların makrofajlara girişi, kompleman reseptörü 1 (CR1) veya 3 (CR3) yoluyla serum opsonizasyonunu takiben oluşur [179]. Promastigotlar makrofajlarda çoğalmazlar, amastigot forma dönüşürler, flagellumun kaybederler ve yüzey moleküllerinin ekspresyonunun bastırılır. Bu farklılaşma sürecinde, promastigotlar, fagozom olgunlaşmasını durdurur, bu da, LAMP1 gibi geç endozom lizozom işaretleyicilerinin gecikmeli veya azaltılmış alımını gösterir [180]. Fagozomun yeniden modellenmesi, lipid yapılarında değişiklik ile ve NADPH oksidaz kompleksinin bozulmasıyla ilişkilidir. Fare makrofajlarına virülan metasiklik promastigotların alınması, kaveola aracılığı ile girişle ilişkilendirilmiştir ve bu yol, erken lizozom füzyonundan kaçınmak için önemlidir. Ayrıca, insan makrofajları tarafından metasiklik promastigotların alınması, mannoz reseptörü pozitif kompartmanlarından ve gecikmiş lizozom füzyonundan kaçınılması ile ilişkilidir [181], [182]. Promastigotlara benzer şekilde, amastigotların hücre içine alınması, farklı serum bileşenleri (kompleman) ile opsonizasyondan etkilenebilen klasik bir fagositik işlemle oluşur [183]. Amastigotların alınmasıyla oluşturulan vakuoller, füzyona kolayca uğrar ve fagozom olgunlaşmasına bağlı belirteçler kazanır. Amastigotlar vakuolün hidrolitik ortama dirençlidir ve fagolizozom ile çoğalırlar [180]. *Leishmania*'nın fagozom olgunlaşmasını modüle etme kabiliyeti, parazitin yüzeyinde bol miktarda bulunan fosfoglikan ailesinin bir üyesi olan lipofosfoglikan (LGP) molekülüne bağlıdır. Bu molekül grubu, omurgalı konakçıda bulunmayan Gal (1,4) Man ( $\alpha$ 1-PO<sub>4</sub>-6) disakkaritlerinin tekrarlayan bir yapıya sahiptir. LPG, tek başına açillenmiş fosfoinositol ankrajı ile membrana bağlı tekrarlayan disakkaritlerin bir ana omurgasını içerir. Bu ana omurgaya ek olarak, yan zincirler L. majör ve *L. tropica* gibi *Leishmania*'nın farklı türlerindeki farklılık gösterir [184].

Bu molekül oksijen radikallerini temizlediği, Protein kinaz C (PKC)'yi inhibe ettiği ve NO üretimini makrofajlarla baskıladığı düşünülmektedir [185]. PKC, proenflamatuar

sitokinleri, NO, ve reaktif oksijen türlerini üreten makrofajların fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır [186].

Parazitin diğer yüzey moleküllerinden biri olan glikoprotein 63 (gp63) GP63 tüm *Leishmania* promastigotlarının yüzeyinde eksprese edilen 63 kDa büyüklüğünde çinko-bağımlı metalloproteinazdır ve LPG'ye oranla yaklaşık 10 kat daha az bulunmaktadır. Bu molekülün de makrofaj hücre içi sinyal kaskadını önleyerek makrofajın mikrobisidal aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir [187] [188], [189]. Parazitler, konak hücre içerisinde birçok farklı şekilde hayatta kalabilmektedir. LPG molekülü aracılığı ile fagozom- endozom füzyonunu inhibe eder [190], [191].

Bu iki molekül (LPG ve gp63) sayesinde parazitler fagolizozom içerisinde hidrolitik enzimlere dayanabilirler ve sadece bununla kalmayıp bu enzimleri inhibe edebilirler. Ayrıca kalsiyum mobilizasyonu değiştirerek sinyal iletiminin bozabilirler konak hücredeki çeşitli sinyal yollarını inhibe edebilirler. Amastigot yüzeyinde bulunan glikozilinositolfosfolipitler (GIPL) nitrik oksit üretimini inhibe edebilirler makrofajın sitokin üretimini modüle ederek ve LPG ve gp63 molekülleri sayesinde oksidatif metabolitleri inhibe edebilirler. Deneysel çalışmalarda aktif hastalık sırasında *Leishmania* antijenlerine karşı negatif gecikmiş tip aşırı hassasiyet ve non-proliferatif tepki gibi immün baskılanma (*Leishmania* antijenlere özgü) gösterilmiştir [176], [192], [193], [194], [195]. Metastiklik promastigotların prosiklik promastigotlara göre makrofaj hücresi içerisinde daha kolay hayatta kaldıkları belirtilmiştir [196].

Bu nedenle, parazitin konak içerisinde adaptasyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, paraziti ortadan kaldırmak için gerekli olan spesifik bağışıklık tepkilerini indüklemeye potansiyeline sahip etkili bir profilaktik aşının geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

## **2.8 Visseral Leishmaniasis Tanısı**

VL enfeksiyonlarının çoğu, klinik olarak, düzensiz ateş, anemi, lökopeni ve hepatosplenomegali gözlemiyle teşhis edilir. Ancak leishmaniasis'in çeşitli laboratuvar teşhis yöntemleri vardır. Bunlar arasında, mikroskopik inceleme, kültür ve tanımlama için kültür ve ardışık izoenzim analizi ile parazit tespiti veya parazit DNA'sının

(polimeraz zincir reaksiyonu, PCR) saptanması için moleküler biyoloji bazlı analizler yer almaktadır. Bu son testler daha hassastır, ancak sadece belirli merkezlerde özellikle Avrupa'da olmak üzere yüksek gelirli ülkelerde kullanılmaktadır [197], [198]. Kantitatif PCR genellikle venöz kan örnekleri yerine kemik iliği aspirasyonu kullanarak doğru tanıya izin vermektedir. Farklı PCR yöntemleri değerlendirilmiş ve mikroskopi yayma ve in vitro kültür ile karşılaştırıldığında üstün bir duyarlılık gösterdiği bulunmuştur [199].

Serolojik tanı, nadiren KL ve mukokütanöz leishmaniasis (MKL) hastalığı için kullanılsa bile, VL için daha sık kullanılan tekniktir. VL'nin tanısında dokulardan (kemik iliği, karaciğer, dalak ve lenf nodülü) elde edilen aspiratların giemsa boyanması ile makrofaj içindeki amastigotların mikroskobik olarak görüntülenebilir [200]. Mikroskobik tanının spesifikliğı yüksektir ancak dalak (%93–%99), kemik iliği(%52–%85), ve lenf nodülü (%52–%58) aspiratlarında bir birinden farklılık göstermektedir. Bir yayma örneğinde parazitleri serbest formda veya makrofajlar içinde veya daha az sıklıkla polimorfonükleer lökositlerde, tek bir hücrede 2'den 20'ye kadar değişen sayılarda ortaya çıkarılabilir. Parazit şekli oval veya piriform (oval veya yuvarlak bir çekirdek ile) ve boyu 2 ila 5 µm uzunluğunda ve 1 ila 2 µm genişliğindedir. İstisnai olarak kamçılı formlar gözlenmiştir [201].

Kan örneğinden yapılan analizler tanıda en kolay yöntem olmasına rağmen buffy tabakasında bulunan enfekte hücre sayısı azdır [71]. Allahverdiyev ve ark. tarafından geliştirilen mikrokültür yöntemi (MKY) hem KL hem de VL tanısında başarıyla uygulanmaktadır [202], [203], [204]. Bu yöntemde mikrolitre ölçeğinde kapiler tüp ve sıvı besiyeri kullanılmaktadır. Hazırlanması kolay olması ve kapiler tüplerin kullanımı ile düşük miktarda besiyeri ihtiyacı bu yöntemin en büyük avantajını oluşturmaktadır. Diğer yöntemlerle kıyaslandığında hastalığın tanısı daha kısa sürede konulabilmektedir. Kapiler tüplerde mikroaerofilik bir ortam oluşması sebebiyle örnekte bulunan az sayıdaki amastigotlar sıvı besiyerinde promastigotlara dönüşerek hızlı bir şekilde çoğaldığı gösterilmiştir. Böylece MKY'nin diğer yöntemlere kıyasla daha hassas, daha spesifik, daha duyarlı, daha hızlı ve daha ekonomik olduğu söylenebilir [202].

İmmunofloresans antikor testi (IFA), enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA), western blot, rK39 antijeni için hızlı şerit testi, doğrudan aglütinasyon tekniğı veya

lateks aglütinasyon ile *Leishmania* antijeninin saptanması dahil olmak üzere çeşitli teknikler kullanılır. Yüksek serum antikor seviyeleri hem asemptomatik hem de aktif VL'de bulunur ve birkaç yıl mevcut kalır. Bununla birlikte, bu testlerin VL-endemik bölgelerdeki spesifitesi değişkendir ve *Leishmania* / HIV ko-enfeksiyonlarında, virüsün immün baskılayıcı etkisinden dolayı tanıya yönelik serolojik yaklaşım zor olmaktadır. Aslında, bu durumlarda, serolojik testlerin sonuçları negatifse ek moleküler veya diğer parazitolojik testler gerekli olabilir. Mohapatra ve diğ. Hint viseral leishmaniasis serolojik tanısı için farklı rekombinant antijenlerin karşılaştırmalı bir değerlendirmesini gerçekleştirmiştir. rK39 (*L. chagasi*'den kinesin-ilişkili antijenin 39-aminoasit-tekrar eden immünodominant B-hücre epitopu), rK26 ve rK9 ile karşılaştırıldığında en uygun antijen olduğu sonucuna varmışlardır. Bu son antijen, VL'nin doğru teşhisi için rK39'a ek olarak kullanılabilir. rK39 strip testin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla % 94 ve % 95 olarak tahmin edilmektedir [73]. Klinik semptomlarla birlikte rK39 immüno-kromatografik hızlı testi yaygın olarak kullanılırken, özellikle endemik bölgelerde asemptomatik enfeksiyonlar için moleküler ve serolojik testlerin kombinasyonunun kullanımı yararlıdır. Rekombinant *L. infantum* ısı şoku proteini (83) (rHsp83) ile gerçekleştirilen ELISA yöntemi, KL, MKL ve VL'nin teşhisi için rutinde doğrulayıcı bir testtir [9].

## 2.9 Visseral Leishmaniasis'in Tedavisi

Leishmaniasisin tedavi başarısızlığı giderek artan küresel bir sorun olduğu için eski ve Yeni Dünya leishmaniasis için tedavi kılavuzlarının yeniden değerlendirilmesi gerekmektedir. Tedavi başarısızlığının temel belirleyicisi ilaç direnci olmasına rağmen, küresel HIV/AIDS salgını ve bunun bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri de bu olaya katkıda bulunur [205], [206].

Günümüzde doğal ve sentetik moleküllerden elde edilen beş ilaç kullanılarak VL tedavi edilmektedir. Bunlar, pentavalent antimonials, amfoterisin B (AmpB), miltefosin, paromomisin ve pentamidindir. Bu ilaçlar, farklı keşif kökenleri, benzersiz yapılar ve farklı eylem tarzlarına sahiptir [207].

Leishmaniasise karşı antimonun aktivitesi, ilk olarak 1900'lü yılların başında antimon (III) potasyum tartaratin mukokutanöz leishmaniasise karşı etkili olduğu tespit

edilmiştir. Daha sonra, leishmaniasisin visseral formuna karşı etkinlik gösterildiği rapor edilmiştir. Ancak ciddi toksisiteye neden olması kullanımını sınırladığıdır. Pentavalent antimon (V), daha güvenli bir form olup VL için kullanılan ilk ilaçtır [208]. Bu ilaç, 20. yüzyılın ilk yarısından bu yana leishmaniasis tedavisinde dünya çapında başarıyla kullanılmıştır. Ancak son 10-20 yıldır Hindistan'ın Kuzey Bihar şehrinde ilaca karşı klinik direncin artışı gözlenmiştir. *Leishmania* ayrıca bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde fırsatçı parazit olarak da ortaya çıkabilir. Kemoterapi, genellikle asemptomatik olgularda uygulanmadığı halde, hastalığın yönetilmesinde temel yaklaşımdır. Günümüzde iki tip organo-antimon (V) kompleksleri ticari olarak temin edilebilir: Glucantime® (meglumin antimoniat) ve Pentostam® (sodyum stibogluconat). Pentavalent antimon'un etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber iki ana iki ana felsefe mevcuttur. İlk görüşe göre Sb (V)'in Sb (III)'e parazit veya enfekte olmuş hücreler (konak) tarafından indirgenmesi sonucu aktif ajan oluşumuna dayanmaktadır [209], [210]. İkincisi ise aktif tür olarak Sb(V) olduğunu varsaymaktadır. İlk modelde, Sb (V) *Leishmania* ile enfekte olmuş konakçı hücrelere girer ve lizozom (sistein ve sisteinilis) içinde tiyollere ve parazite (tripanotiyon) maruz kalır ki bu durumda Sb (V)'in Sb'ye (III)'ye biyo dönüşümünü sağlar. Dönüştürme işlemi, hücre dışı promastigotlardansa hücre içi amastigot ortamını yansıtan in vitro düşük pH'da daha etkilidir [211]. Antimonit redüktaz [212] ve tiyol bağımlı redüktaz 1 [213] da dönüşüm sürecine dahil olduğu ileri sürülmektedir. Birkaç çalışma, indirgenmiş Sb (III)'ün oluşturulduğunda aşağı akış (down regüle) sonuçlarını açıklamıştır. Sb (III) sülfhidril kısımları içeren biyomolekülleri güçlü bir şekilde bağlar. Bu özelliğe dayanarak, Sb (III) 'ün tripanotiyon ile konjuge çiftler oluşturduğu bildirilmiştir. Tripanotiyon, konak içerisinde oksidasyon stresine karşı parazitleri koruyan bir virülans faktörüdür [214]. Konjugasyon, tripanotiyonun antioksidan aktivitesini inaktive eder. Önerilen bir başka Sb (III) mekanizması, tripanotiyonun redüktaz'ın (TryR) inhibisyonunu içerir [215]. TryR, tripanotiyonu indirgeyici bir durumda tutmak için oksidize tripanotiyonu geri dönüştüren bir enzimdir. Önerilen başka bir senaryo, Sb'nin (III), aktive edicideki çinkoyu değiştiren ve DNA replikasyonu ve onarımı ile ilgili çeşitli alt-işlevlere müdahale eden bir CCHC çinko parmak proteini olan HEXBP proteinine bağlanmasını içerir [216].

ikinci modelde, Sb (V) pentavalent form, *Leishmania*'ya karşı doğrudan etkinlik gösterir [217].

1955 yılında Venezüella'da *Streptomyces noclosus*'tan izole edilen doğal bir antibiyotik olan Amfoterisin B (AmpB), antifungal ve antiparazitik aktiviteleri olan bir makrolid polien metabolitidir. Günümüzde AmpB, sistemik *Candida albicans* ve *Aspergillus fumigatus* enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılmaktadır ve özellikle fungal enfeksiyonlara karşı immün yetmezlikli hastalara karşı etkilidir. Bununla birlikte, AmpB'nin kullanımı, nefrotoksisite [218] ve hematotoksisite gibi ciddi yan etkilerle sınırlıdır. Son zamanlarda, kan dolaşımındaki serbest AmpB konsantrasyonunu düşüren bazı formüller, toksisiteyi azaltmak için araştırılmıştır. AmpB'nin ilk antilishmanyal aktivitesi 1960'ların başlarında bildirilmiştir. Halen, AmpB'nin (AmBisome®) lipozomal formülasyonu, VL'yi tedavi etmek için intravenöz olarak uygulanmaktadır ve tek doz terapisi için % 95'lik bir ilaç oranına sahiptir [219]. AmBisome®'un yüksek maliyeti gelişmekte olan ülkelerdeki hastalar için sınırlayıcı bir faktördür. Dünya Sağlık Örgütü ve AmBisome® üreticisi Gilead'in, tedavinin fiyatını (50 mg ampül başına 18 dolar) azaltmak için yapılan görüşmelere rağmen, tedavi hala pahalıdır [220], [221]. AmpB, iki ana çekirdek yapısal bileşen içerir: bir makrolakton halka ve C19 pozisyonunda bir glikosile olan bir miyoamindir. Makrolakton halkasında, yedi konjuge çift bağ, sert bir omurga olarak işlev görürken hidrofilik hidroksil grupları, halkanın diğer tarafını karakterize eder. Mikozaamin grubu C3 'pozisyonunda bir anjin grubu içerir ve lakton halkasındaki C16 pozisyonundaki bir karboksilik asit ile birlikte bileşiğin amfoterik özelliğine yol açar. Bu yapısal nitelikler AmpB'nin tedavi edicikarakteri ile güçlü bir şekilde ilgilidir. Lakton halkasındaki C28 ve C29 pozisyonları arasında sadece bir çift bağ ile farklılık gösteren oldukça benzer bir bileşik olan Amphotericin A, anti-enfektif aktiviteyi önemli ölçüde azaltmıştır [222]. AmpB, tercihen insan kolesterolünden ziyade parazitin ergosterolüne bağlanır. Genel olarak bu bağlanmada, ergosterol ile AmpB'nin makrolid halkasındaki polyene streç arasında hidrofobik bir etkileşim esastır. AmpB'deki sterolun C3 hidroksil grubu ve mikozaamin içindeki fonksiyonel gruplar arasında etkileşimin olduğu hipotezi bağlanma için çok önemlidir. Bu özelliklere dayanarak, mekanizmasını açıklamak için bazı modeller oluşturulmuştur. AmpB'nin etkisi için en kapsamlı olarak incelenen ve yaygın olarak kabul edilen model, parazit



zarındaki gözeneklerin oluşumudur. Gözenekler, iyonlar, su ve glikoz moleküllerinin, parazit ya da mantarın ölümüne yol açan, lipit iki tabakasından geçmesine izin verir.. Lipit tabakasinda iki tip kanal oluşturulabilir. Birinci tipte, tek taraflı bir gözenek oluşturarak, zarı yaymak için sadece bir AmpB molekülü gereklidir. İkinci tipte iki AmpB, iki taraflı bir gözenek oluşturur [223]. Geçtiğimiz birkaç on yıl boyunca, modelleri destekleyen kapsamlı deneysel veriler üretildi. Her iki model de temel olarak *in vitro* çalışmalardan elde edilen biyofiziksel kanıtlara dayanmaktadır ve *Leishmania* ile ilgili araştırmalar sınırlı kalmıştır. Bu nedenle, hücresele seviyede *Leishmania*'ya karşı AmpB'nin etkisini daha da aydınlatılması önemlidir.

Miltefosin, ilk olarak 1980'lerde meme kanseri metastazları ve solid tümörler için bir tedavi olarak geliştirilen bir alkilfosfokolin sınıfı moleküldür [224]. Aynı dönemde, miltefosinin *in vitro* antileishmanyal aktivitesi de ortaya çıkarılmıştır [225]. Daha sonra Hindistan hükümeti, Dünya Sağlık Örgütü ve bir ilaç firması ortak projesinde, Miltefosin ile ilgili Faz II ve Faz III klinik çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. 2002 yılında, miltefosin VL için ilk oral tedavi olarak uygulanmıştır. Miltefosinin kimyasal adı heksadesil 2- (trimetil-azaniumil) etil fosfattır. Miltefosin, uzun bir alkil zinciri ve apolar fosfokolin grubu ile amfifilik özellik göstermektedir. Edelfosine, ilmofosine ve perifosine gibi diğer yapısal olarak benzer bileşikler, anti layışmanya faaliyetlerine sahiptir. Miltefosine'nin antileishmanial aktivitesi, eter fosfolipid metabolizması, GPI bağlantı biyosentezi ve sinyal iletimi üzerine etkiyi içerir. *L. donovani*'nin miltefosine maruz kalması sonucu fosfatidil kolin içeriğinde önemli bir azalma ve fosfatidil etanolamin içeriğinde bir artışa sahip olduğu gösterilmiştir [226]. Miltefosin, DNA etiketlemesi ile gözlemlenen *L. donovani*'de apoptosis benzeri bir ölüm fenotipini indüklemiştir. Miltefosin, membran potansiyelini depolarize ederek ve muhtemelen parazitin apoptoza bağlı ölümüyle ilişkili olan sitokrom c oksidazı inhibe ederek mitokondriyal fonksiyonu etkilediği gösterilmiştir [227].

*Streptomyces krestomuceticus*'dan izole edilen bir amino glikozit antibiyotik olan Paromomisin, amebiyazis ve kriptosporidyoz gibi bağırsak enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılır. Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı bakterisidal aktivite göstermektedir [228]. Paromomisinin antileishmanial aktivitesi ilk olarak 1960'larda tanımlanmıştır [229].

Paromomisin Hindistan'da faz IV klinik çalışmada % 94,6'lık tedavi orana sergilemiştir ve halen VL'nin tedavisinde kullanılan parenteral bir formülasyondur. Bununla birlikte, paromomisinin oral yolla alındığında zayıf bir şekilde emilir bu da ilacın sadece kas içi enjeksiyonlarla kullanılması sınırlamasını getirir. *Leishmania*'daki paromomisin etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Membran akışkanlığının değiştirilmesi ve mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkileri gibi olası mekanizmalar önerilmiştir.

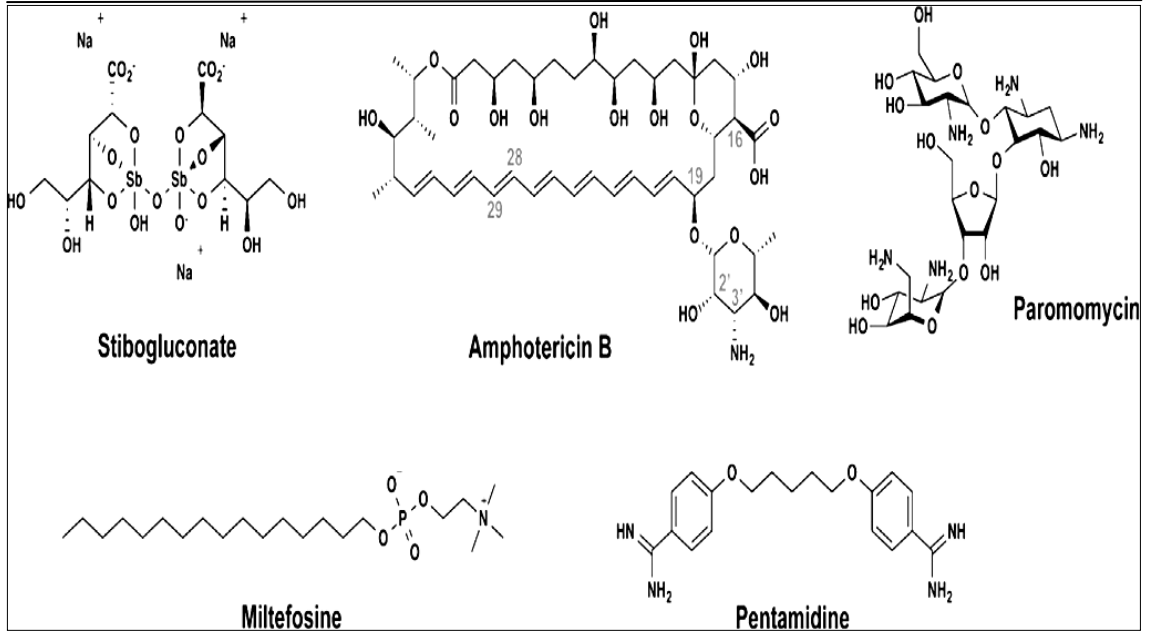
*Leishmania*'daki ribozomal alt birimler saflaştırılmış ve daha sonra paromomisine maruz bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlar göre *Leishmania*'daki etki mekanizmasının bakterilerdekine benzeyebileceğini göstermektedir. Paromomisine dirençli *L. donovani* ve normal (wild-type) *L. donovani* türleri arasındaki proteome farklılıklarının analiz edildiğinde, dirençli parazitlerde ribozomal proteinlerin yukarı regülasyonu gözlenmiştir. Bu sonuç *Leishmania* parazitlerinin protein sentezi mekanizmasında paromomisin etkisinin olduğunu göstermektedir [230].

1930'larda, sentetik insülin analogları geliştirme çabaları sonucu diguanidin bazlı bir bileşik üretildi. Bu bileşiğin, daha sonra, Trypanosome enfeksiyonuna karşı anti protozoal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur; bu, daha sonra, antiparazitik aromatik diamidinlerin, örneğin, aspentamidin gibi keşfine yol açmıştır. VL tedavisinde halen inatçı hastalar için pentavalent antimonial tedavi sonrası Pentamidin ikinci sırada kullanılmaktadır. Artan tedavi başarısızlığı ve ciddi derecede toksisite oluşu, ilacın kullanımında düşüşe neden olmuştur [209].

Pentamidinin kimyasal ismi 4-[5-4-karbam-imidoilfenoksi] pentoksil benzen karboksimidamiddir. Yapısında simetrik şekilli aromatik diamidinler, arasında beş karbon zinciri bulunan eter bağlantılarıyla birbirine bağlıdır. *Leishmania* ve diğer Kientoplastidlerde pentamidinin birincil etkisi iyi anlaşılmamıştır, fakat yapısal özellikler ve deneysel sonuçlar, aktif transport sisteminin ve mitokondrinin inhibisyon bölgeleri olduğunu göstermektedir. Pentamidin alım mekanizmaları arasında arjinin ve poliamin gibi iki enerji bağımlı transport sistemini içerdiği varsayılmıştır [231].

Her iki transpot substratın yapısal özellikleri, nitrojen atomunun katyonik özelliklerinin ortak özelliğini pentamidin ile paylaşır. Bununla birlikte yapılan bir dizi deney,

pentamidinin, bir substrattan ziyade arginin ve poliamin taşıyıcılarının bir inhibitörü olarak davrandığını göstermiştir. Deneysel olarak türetilmiş bir pentamidin dirençli *L. donovani* suşunda, parazitin mitokondriyal membran potansiyelinde azalma olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmada doğal (wild-type) parazitlerin mitokondrilerinde birikme görülmesine karşın, dirençli parazitlerde görülmemiştir, bu da pentamidinin parazitin mitokondrisi üzerinde lokalize olduğunu ve hareket ettiğini göstermektedir. İlerleyen araştırmalarda Pentamidin'in,  $Ca^{2+}$ 'nin akışını indükleyen ve parazitin apoptoza bağlı ölümünde önemli derecede artışa yol açan solunum zinciri kompleks II'yi inhibe ettiğini gösterilmiştir [232]. Mitokondriyal membran potansiyelinin bütünlüğü dışında, bir diğer olası hedef mitokondriyal replikasyon sistemidir. Pentamidin bileşiğin yüklü amidin grubu ile DNA'nın adenini ve timin kalıntıları arasındaki etkileşimler yoluyla duplekslenen DNA'nın küçük oluşuna bağlanır. Bu bağlanma, kinetoplasttaki DNA'nın enzimlerine müdahale eder. Pentimidine, *Trypanosoma equiperdum*'da, muhtemelen, topoizomeraz II aktivitesinin inhibisyonu yoluyla, mini çemberlerin çift iplikli kopmalarını indükler. Topoizomeraz II aktivitesinin inhibisyonu, *Leishmania panamensis* ve *L. donovani*'de de gözlemlendi. Bu inhibisyonun ardından apoptozisin tipik belirtileri olan mitokondriyal membran potansiyeli, sitokrom C'nin serbest bırakılması, metakaspaz aktivasyonu ve DNA fragmentasyonu izlemektedir [233]. Genel olarak, pentamidin, mitokondri üzerinde hareket ederek, solunum zinciri kompleksini etkileyerek veya replikasyon sürecini inhibe ederek programlanmış hücre ölümünü desteklemektedir.



Şekil 2.6 Leishmaniasis'in tedavisinde onaylanmış ilaçlar [205]

## 2.10 Aşının Gerekliliği

Leishmaniasis tedavisinin yüksek maliyetli oluşu, ilaçların toksisitesi ve günümüzde mevcut mutasyonlar sebebiyle ilaçlara karşı artan parazit direnci gibi çeşitli terapötik zorluklar nedeniyle dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olarak ortaya çıkmıştır. Bilimsel topluluğun VL aşısı geliştirmesi ile ilgili karşılaştığı temel zorluklar, insan popülasyonundaki parazit ve heterojenite tarafından kullanılan evrim kaçınma mekanizmalarını içerir. Bir aşının geliştirilmesi beş farklı aşamadan oluşur: hazırlanan aşının keşif, klinik öncesi gelişimi, klinik gelişimi, tescil ve satış sonrası değerlendirme. Bu beş adımlı protokol birçok faktör tarafından sınırlandırılabilir, bunlar arasında ana güçler şunlardır:

- Gelişim maliyeti: Bir aşı geliştirmenin yüksek maliyeti, aşı geliştirme programını engelleyen önemli bir sınırlayıcı faktör olmuştur, ancak birçok kuruluş bu alanda araştırmayı teşvik etmek için finansman sağlamaktadır.
- Siyasi katılım: İhmal edilen tropikal hastalıklar temel olarak yoksul toplulukları etkileyen gelişmekte olan ülkelere lokalizedir. Bu sebeple özel şirketler bu alanda kalkınma için kamu kaynaklarının katılımını gerektiren çok fazla kar bulamazlar.

İdeal bir anti-leishmania aşısının sahip olması gereken önemli özellikler arasında güvenlik, düşük maliyet, üretim kolaylığı, sağlamlık, uzun süreli T-hücre yanıtları ve hem profilaktik hem de terapötik etkinlik bulunmaktadır. VL-spesifik aşının geliştirilmesi önemli bir küresel sağlık önceliği olmaya devam etmektedir. Bu bağlamda birinci ve ikinci jenerasyon aşılarda geliştirilmesi ve denemeleri de dahil olmak üzere bilimsel topluluklar tarafından önemli çabalar sarf edilmiştir [234].

## **2.11 Geliştirilmiş Anti-Leishmaniyal Aşı Adayları**

Hastalığın oluşumundan önce önlenmesi, tedaviden çok daha etkili ve daha az maliyetlidir. Bu nedenle aşı, hastalıkların önlenmesi ve aşılamanın geliştirilmesi için insanlar için en önemli ve güçlü bir araçtır. Bu nedenle de hastalığın ortadan kaldırılması ve kontrolü gibi uzun vadeli hedeflerde etkili ve güvenilir bir *leishmania* aşısının geliştirilmesi acil bir ihtiyaç olmaktadır. Ayrıca aşılama sırasında ve sonrasında meydana gelen hücresel ve humoral olaylar ile ilgili çalışmaların eksikliği Leishmaniasisin kontrolünde aşının önemini vurgulamaktadır. Bir aşı modelinin oluşturduğu immün yanıtın anlaşılması, koruma mekanizmasının aydınlatılması için ön koşuldur. Şimdiye kadar Leishmaniasis'in hiçbir türüne karşı insanlar için etkin ve güvenilir bir aşı geliştirilememiştir. Leishmaniasise karşı fare modellerinde koruyucu özellikte birçok aşı adayı geliştirilmesine rağmen insanlarda kullanılabilir bir aşı geliştirilmesinin zor olduğu kanıtlanmıştır. Ancak Leishmune®'in iki lisanslı köpek aşısının başarısı; Brezilya'daki Leishmune® ve Leishtec (Leishmune®: FML-saponin formülasyonu; Leishtec: *L. donovani* A2 protein-adenovirüs), bilim insanlarını insan leishmaniasis aşısının geliştirilmesi için teşvik etmiştir. CaniLeish® (LiESP / QA-21) aşısı bu listede bir sonraki sıradadır ve bu da tam bir yıl boyunca devam eden Th1 dominant bağışıklık yanıtını göstermiştir [235], [236]. Günümüze kadar geliştirilmiş olan leishmaniasis aşılarda; birinci jenerasyon, ikinci jenerasyon ve üçüncü jenerasyon olmak üzere 3 ana başlık altında toplanmaktadır [234], [237].

### **2.11.1 Birinci Jenerasyon Aşılar**

Leishmaniasis alanındaki ilk aşı çalışmaları 1940'larda başlamıştır. Leishmanizasyon olarak bilinen bu en eski yöntemde sağlıklı bireyin deri altı bölgesine virülen

*Leishmania* parazitleri uygulanır. Sovyetler Birliği, Asya ve Orta Doğu'daki ilk denemelerde % 100 etkinlikle başarılı sonuçlar elde etmiştir. Bununla birlikte, canlı aşuların kullanımı ile bağlantılı olarak güvenlik sorunları ve aynı zamanda çocuklarda tetanoz, difteri ve boğmaca gibi diğer aşuların uygulanmasında bağışıklık bastırıcı aktivitesi ve büyük kontrolsüz deri lezyonlarının gelişmesi nedeniyle uygulanması sonlandırılmıştır. Canlı virulan formdaki aşı (leishmanizasyon) daha sonra, öldürülmüş parazit antijenleriyle veya canlı zayıflatılmış *Leishmania* parazitlerinden oluşan birinci kuşak *Leishmania* aşuları ile değiştirildi [238], [11]. Aşı olarak öldürülmüş parazitler ilk kez Brezilyalı bilim adamları tarafından geliştirilmiştir. Daha sonra Mayrink ve meslektaşları tarafından güvenli ve immünojen olan öldürülmüş *Leishmania* antijenlerini içeren aşı geliştirilmiş, ancak çok az koruma derecesi sağlamıştır. Convit vd. 1990'lı yılların başlarında, öldürülmüş *Leishmania amazonensis* veya *Leishmania mexicana* ile Bacillus Calmette Gue´rin kullanılarak KL tedavisi için kombine bir yaklaşım kullanılmıştır ve yüksek tedavi oranı elde etmiştir (>% 95) [239]. Bu öldürülmüş aşular, basit ve nispeten kolay oluşu nedeniyle gelişmekte olan ülkelerde düşük maliyetle üretilebilmektedir. Bununla birlikte, kültürlenmiş parazitlerden elde edilen aşuların standardizasyonunun zorluğunun olması tescillenme işlemlerinde potansiyel bir engel oluşturmaktadır. Koruyucu etkinliğinin tekrarlanabilirliği hakkında da şüphelidir. Öldürülmüş parazit aşısını kullanan yeni (Ekvador, Kolombiya, Brezilya) ve eski (Sudan ve İran) dünya ülkeirnde bir dizi randomize çalışmada gösterilmiştirki, aşının koruma sağlaması için gerekli olan uzun süreli bağışıklık yanıtı sağlanamamıştır. Birinci kuşak aşuların profilaktik çalışmalarının aksine, terapötik çalışmalar çok cesaret verici sonuçlar vermiştir [240]. Bu durum birinci jenerasyon leishmaniasis aşularının terapötik amaçlar için faydaları olduğu gerçeğini haklı çıkarmaktadır [241].

*Leishmania* parazitlerinin canlı zayıflatılmış formu bir başka aşı şeklidir. Bu aşı formu daha az virulan *Leishmania* parazitleri formu elde etmek için genetik olarak modifiye edilmiş ancak yine de immünojenitesini korumuştur. Bu türde bir aşı doğal enfeksiyonları yakından taklit eder ve böylece canlı virulan parazitlerle ilişkili tehdit olmadan benzer bağışıklık tepkileri üretirler. Bu aşı formu temel olarak parazit tarafından gerekli olan gerekli genlerin değiştirilmesi ya da çıkarılmasıyla üretilir, dolayısıyla parazitleri knock out olarak adlandırılır. Bu alandaki ilk yenilik *Leishmania*

majöründe redüktaz timidilat sentaz geni bulunmayan nakavt parazitlerinin elde edilmesiyle ve farelerde önemli bir koruma sağladığı, ancak yeterli koruma primatlarda oluşmadığı gözlemlenmiştir. Ancak canlı aşılarda tekrar virülanslığını kazanmaları nedeniyle kullanılmamaktadır [242].

#### **2.11.1.1 Ölü *Leishmania* Aşılı**

Öldürülmüş tüm *Leishmania* promastigotlarda KL ve VL'ye karşı profilaktik ve terapötik aşı adayı olarak araştırılmıştır. Bu aşılı ile ilk defa 1940'lı yılların başlarında Brezilya'da çalışılmıştır. Daha sonra öldürülmüş parazit antijenleri tek başına veya adjuvan ile kombinasyon halinde faz-I, II ve III çalışmalarında test edilmeye başlanmıştır [243], [244]. Otoklavlanmış *Leishmania* antijeni ve BCG adjuvan ile oluşturulan aşı formülasyonunun KL insidansını 18-78% oranında azaldığı tespit edilmiştir [245].

Otoklavlanmış *leishmania major* antijeni ile BCG adjuvanı aşı adayı olarak sağlıklı gönüllülerde kütanöz ve viseral leishmaniasise karşı test edilmiş ve güvenli bulunmuş ancak yeterli koruma sağlamadığı açıklanmıştır. Bununla birlikte, öldürülmüş *L. amazonensis* ile BCG birlikte kullanıldığında lokalize kütanöz leishmaniasisli hastalarda karşı % 95 den fazla iyileşme gözlenmiş ve tedavinin Th1 immün yanıt ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. *L. braziliensis*, *L. guyanensis* ve *L. amazonensis*'den oluşan bir üç-değerli preparat Ekvator'da yapılan bu çalışmada kütanöz leishmaniasise karşı önemli bir koruma sağlandığı belirtilmiştir. Aşı adayı olarak BCG ile birlikte öldürülmüş *L. braziliensis* parazitinin kullanımı köpeklerde ve mukokutanöz hastalarda koruyucu immün yanıt oluşturduğu gösterilmiştir [246]. Benzer çalışmalar İran, Sudan ve Ekvator'da yapılmıştır. Beş farklı ölü *leishmania* antijeni kullanılarak yapılan bir çalışmada aşının *leishmania* deri testi (LST) ölçümü ile güvenli ve immünojenik olduğu gösterilirken %50 koruma sağladığı bildirilmiştir [247]. Ölü *L. major* ile BCG kombinasyonu kullanılarak *L. donovani* parazitleeine karşı koruma sağlanmıştır. Benzer bir çalışmada köpek ve hamster modellerinde ölü *L. major* kullanılarak *L. donovani* enfeksiyona karşı başarılı koruma elde edilmiş ve bu sonuç insan denemeleri için bir başlangıç olmuştur [248]. Yapılan bir başka çalışmada ise ölü *L. braziliensis* antijeni, kum sineği tükürük bezi ekstraktı ve saponin içeren bir aşı formülasyonunun *L. chagasi* enfeksiyonuna karşı anti-Leishmanial IgG izotiplerinde artışı olduğu gösterilmiştir [249].

Nagill ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada otoklavlanmış *Leishmania donovani* ve ısı ile öldürülmüş *Leishmania donovani* antijenin hücre aracılı ve hümmoral immün yanıtı indükleme potansiyeli değerlendirmişler. Isı ile öldürülmüş parazit antijeni ve otoklavlanmış parazit antijeni ile aşılamanın farelerde gecikmiş tip aşırı duyarlılık (GTAD) yanıtı önemli ölçüde indüklenmiş olduğunu göstermişler. Böylece ısı ile öldürülmüş parazit antijeni ve otoklavlanmış parazit antijeninin hücre aracılı immün yanıtı tetikleyebilme potansiyeli olduğunu göstermişlerdir [15], [250] .

#### **2.11.1.2 Zayıflatılmış Canlı (Attenüe) *Leishmania* Aşıları**

Zayıflatılmış parazitler, virüent parazitlerle benzer şekilde konakçı hücreler tarafından alınır ve hastalığa neden olmadan uygun bir immün yanıtın uyarılması için uzun süre immün yanıtın devamını sağlarlar. Bu durum konak hücrede parazit antijenlerine karşı güçlü immün yanıtın oluşmasına izin vermektedir. Zayıflatılmış *Leishmania* aşıları, gentamisinli medyumda uzun süreli kültüre edilerek, radyasyon uygulayarak, kimyasal mutagenез ve son zamanlarda geliştirilmiş olan *Leishmania* genomundan genlerin silinmesi yöntemleriyle elde edilebilmektedir [4], [251]. Bu türde elde edilen parazitlerle fare ve hamsterlarda yapılmış çalışmalarda adjuvan kullanılmadan da iyi koruma sağladığı kanıtlanmış olsa da parazitlerin virulans faktörlerinin geri dönüşümü konusu tartışmalıdır [252].

Dihidrofolat redüktaz eksik olan *L. majör* aşısı, bir primat modelinde çalışılmış ve koruyucu immün yanıtta başarısız olmuştur [253]. Zayıflatılmış parazitlerin öngördüğü sınırlı koruma, bu tür aşılardan konak hücre tarafından hızla ortadan kaldırılması olabilmektedir. Ancak sistein proteinaz genleri veya lpg1 genleri gibi diğer virülans genlerin hedeflenerek silinmesi ile parazitler attenüe edilse de hastalığa neden olabilmektedir [254]. Attenüe organizmalarda IFN- $\gamma$  ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık ölçümü yapıldığında indüklenen korumanın Th1 yanıt ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak zayıflatılmış organizmaların kullanımı, doğal enfeksiyonun benzeri immün yanıtı yol açabildiğinden avantajlıdır [255]. Ancak, zayıflatılmış parazitlerin kullanılmasındaki temel sorun büyük ölçekli kullanımında güvenlik ile ilgili endişelerin olmasıdır.



## 2.11.2 İkinci Jenerasyon Aşılar

*Leishmania*'ya karşı geliştirilmiş ikinci nesil aşılar, rekombinant proteinlerden poliproteinlere kadar geniş bir kategori içerir. Bu aşılar, genetiği değiştirilmiş parazitlerden (ilaca duyarlı genlerin ilavesiyle birlikte nakavt veya intihar kasetleri) parazit antijenlerini ifade eden ve taşıyıcı olarak kullanılan rekombinant bakterilere veya virüslere kadar geniş çapta değerlendirilmiştir. Çeşitli proteinler veya lipofosfoglikan (LPG) gibi saflaştırılmış *Leishmania* subfraksiyonlarını içeren ikinci nesil aşıların diğer formları vardır. Bütün bu formlar immünoprofilaktik ve/veya immünoterapötik aşı olarak kullanılmalarını engelleyen bir veya daha fazla kısıtlamaya sahiptir [16], [256].

### 2.11.2.1 Membran / Yüzey antijenlerine Dayalı Aşı Hedefleri

*Leishmania* parazitleri yaşam döngüsü boyunca farklı yüzey molekülü bileşimi gösterirler. Hem prosiklik hem de metasiklik promastigotların yüzeyi, glikoproteinler ve parazitin hayati yapısal bileşenini oluşturan glikosilfosfatidilinositol (GPI) ile yüzey membranına bağlanan diğer glikosile moleküller tarafından kaplanır [257].

#### Lipofosfoglikan (LPG)

*Leishmania* hücre yüzeyi yoğun bir glikokalik kaplamaya sahiptir, yüzey molekülleri GPI bağlayıcıları (ankrajları) veya gp63 ve PPG'ler gibi GPI ile ilişkili moleküller tarafından bağlanır. Saflaştırılmış LPG, Toll-benzeri reseptörleri (TLR) tetikleyen ve aynı zamanda konakçı hücrelerde pro-enflamatuar ve sinyal yollarına müdahale ettiği bilinen bir patojen-ilişkili moleküler model molekülü (PAMP) olarak kabul edilmiştir. Buna ek olarak, proteinleri bağlı olmayan ancak parazit yüzeyine bol miktarda GPI bağlı glikosilinositolfosfolipidler (GIPL'ler) vardır. LPG, en önemli ve kompleks glikofosfolipittir. Bu karmaşık glikolipid dört ana kısımdan oluşur: bir korunmuş 1-O-alkil-2-lipo-fosfatidil (miyo) inositol membran bağlayıcısı, korunmuş bir difosfoheptasakkarit çekirdek yapısı, türe özgü yan zincirleri taşıyan tekrarlayan fosfosakkarit birimleri (fosfoglikan veya PG) değişken, genellikle mannoz bakımından zengin olan başlık kısımlarından oluşur [257].

LPG molekülü, parazitin hayatta kalmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. LPG molekülü sayesinde makrofaj içerisinde hidrolitik enzimlerden ve oksidatif strese karşı korunur bunun yanında fagolizozomal füzyonu önleyerek makrofaj aktivasyonunu inhibe eder ve parazit konak içerisinde kompleman sisteminden korunur [258]. LPG, leishmaniasise karşı tanımlanmış ilk moleküler aşı adayıdır. *L. donovani* LPG'si ile yapılan çalışmalarda bu molekül umut verici bir aşı aday olarak önerilmiştir [259].

İmmün yanıt olarak LPG molekülü incelendiğinde metasiklik formdaki parazitlerin LPG molekülleri, iNOS üreterek, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  üretiminin artmasına neden olmakta ve makrofajlarda leishmanisidal efektör mekanizmasına aracılık etmektedir. Ayrıca fare modelinde *L. majör* enfeksiyonlara karşı koruma sağlamıştır [260]. Yapılan bir çalışmada LPG ile poliakrilik asit kombinasyon halinde fare modelinde aşı olarak kullanılmıştır ve herhangi bir toksik etki olmaksızın potansiyel bir aşı geliştirmek için daha fazla çalışılması gerektiğini vurgulanmıştır. Bacillus Calmette-Guerin ile birlikte LPG'nin farelerde ve aynı zamanda hamster modelinde Th1 immün yanıtını arttırdığı gösterilmiştir [261]. Laboratuvarımızda Prof. Dr. Adil Allahverdiyev yürütücülüğünde daha önce yaptığımız çalışmamızda (TUBITAK, 1085170SBAG-4007) iki farklı LPG konsantrasyonunda (35 ve 70 ug) LPG-PAA konjugatı başarılı bir şekilde oluşturulmuştur. Hazırlanan bu konjugatın deney hayvanları üzerindeki etkinliği, LPG/PAA ve LPG/Freund fiziksel karışımları ile karşılaştırmalı olarak incelendi. LPG-PAA konjugatının %70-80 aralığında koruma sağladığı gözlenirken, tek başına LPG molekülünün %50 koruma sağladığı gösterilmiştir [23].

### **Kinetoplastid membran protein 11**

Kinetoplastid membran protein 11 (KMP-11), 11-kDa molekül ağırlığında yüzey membranında en çok bulunan glikoproteinlerinden biridir ve LPG molekülü ile zayıf etkileşimlerle (kovalent olmayan) bir arada bulunur. 276 bp'lik gen bölgesinden kodlanan bu 11-kDa proteini, promastigot ve amastigot formları boyunca eksprese edilen bir dominant membran glikoproteinidir, ancak yüzey ekspresyonu amastigotlarda ve metasiklogenez sırasında metasiklik promastigotlarda artar [262], [263]. Bu protein, layşmanyazinin immünolojisinde hayati bir işleve sahip olduğu bilinmektedir ve güçlü bağışıklık tepkisini indükleme kabiliyeti nedeniyle potansiyel bir

aşı adayı olarak önerilmiştir. DNA aşısı formunda, KMP-11'in hem antimon duyarlı hem de dirençli virülan *L. donovani* suşlarına karşı etkili olduğu bilinmektedir. Bir başka çalışmada antimona dirençli ve dayanıklı parazitlerde, IL-4 ve NO'nun DNA aşısı olarak KMP-11'in kullanımı üzerindeki rolü açıklanmıştır. Paraziti öldürmek için bağışıklık sisteminin başlıca sitokinleri olan IFN-g ve TNF- $\alpha$ , NO üretmek için iNOS ile birlikte çalışır ve böylece paraziti yok etmek için bağışıklık yanıtını kuvvetlendirir [264]. Bu durum, KMP-11'in T hücre proliferasyonu uyarıcısı ve bağışıklık yanıtı düzenleyicisi olduğunu kanıtlar.

### **Fukoz Mannoos Ligandı (FML)**

Başka bir molekül, fukoz mannoos ligandı (FML) olarak adlandırılan bir 36-kDa'lık bir glikoproteindir. DNA veya doğal rekombinant aşı formunda farelerde koruyucu antijen olduğu belgelenmiştir. Hamster, fare ve köpeklerde immünojenik, immünoprofilaktik ve immünoterapötik potansiyeli olan ve Leishmanie olarak piyasada bulunan Faz III çalışmalarında başarılı olan lisanslı köpek aşısıdır [265].

### **gp63, gp46/PSA, HASPB**

Glikoprotein 63, ya da leishmanolysin (ya da majör yüzey proteaz), makrofajlar içine parazit girişine aracılık eden, fagositozu ve makrofaj içinde hayatta kalmayı arttıran kinetoplastidlerin yüzeyinde bulunan bir çinko metaloproteazdır. Leishmaniasis'e karşı geliştirilmiş ilk rekombinant antijen gp63'tür. *L. donovani*, *L. chagasi* ve *L. infantum* gibi VL'ye neden olan farklı türler arasında GP63'ün korunmuş olduğunun doğrulanmış olması, GP63-bazlı aşılarda başarılı bir şekilde uygulanabileceğini göstermektedir [266] [267], [268].

Ayrıca, gp63'ün proteinaz aktivitesi, komplement aktivasyon sürecinin kontrol edilmesinde önemli bir rol oynar. Böylece bir şekilde, paraziti kompleman-aracılı lizis ile başa çıkma direnci sağlar. Parazitler, IFN-g sinyalinin anahtar regülatörü olan JAK-STAT yolağından makrofajın uyarılmasında yeterince etkilidirler. Bu nedenle, gp63, parazitin hayatta kalmasında ve beslenmesinde önemli bir moleküldür denilebilir ve *Leishmania* enfeksiyonuna karşı aşılama için bir aday olarak önerilebilir [269].

Gp46 olarak da bilinen PSA, parazitin her iki yaşam evresinde bolca eksprese edilen yüzey glikozinositol fosfolipid-bağlı glikoproteindir. PSA'nın, kompleman aracılı lizise karşı direnç kazandırmaktan sorumlu olduğu için parazit için önemli bir araç olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda, adjuvan ile kombinasyon halinde koruyucu bir immün tepkisi uyandırabilir. PSA-2'ye karşı reaktivite gösteren hücrelerin yüksek düzeyde IFN- $\gamma$  ürettiği bilinmektedir. Bu nedenle leishmaniasis'e karşı Th1 doğal bağışıklık yanıtı oluşturur [270].

HASPB türü olarak bilinen *Leishmania*'ya özgü hidrofilik asilatlanmış yüzey proteinleri (HASP'ler), yalnızca parazitin enfektif olduğu aşamasında (metasiklik promastigotlar ve amastigotlar) plazma zarında eksprese edilir. Bu proteinin membrandaki lipidlerle etkileşimi henüz iyi şekilde anlaşılmamış olsa da aşı adayı olarak davranma yetenekleri iyi gösterilmiştir.

Rekombinant yöntemler ile elde edilen subunit aşılı ile ilgili fare modellerinde artan sayıda deneysel çalışmalar yapılsada bu yaklaşımlarla köpeklerde etkili sonuçlar alınamamıştır [271].

### **2.11.2.2 Dendritik Hücre Temelli Aşılar**

Çeşitli sistemik ve mukozal bölgelerdeki antimikrobiyal immün tepkilerini başlatan, güçlendiren ve sürdüren önemli antijen sunan hücreler olarak DH'nin rolü hakkındaki yeni bilgiler, yeni aşılama stratejilerinin geliştirilmesine temel oluşturabilir [272], [273].

*L. majör* lizatı ile *ex vivo* olarak puls yapıldıktan sonra epidermal Langerhans hücrelerinin, duyarlı BALB/c farelerinin uzun süreli korumasını indüklediğini göstermiştir. DH bazlı aşının yol açtığı sağlam bağışıklık, *Layşmanya*'ya özgü T hücresi belleğinin oluşturur. Langerhans hücrelerinin parazit antijenine maruz kalması, IL-12 ekspresyonunun önemli bir yukarı regülasyonuna yol açar ve bu da Th1 hücre aracılı immüniyeti desteklemektedir [274]. DH'nin ayrıca, *Leishmania* amastigotes veya promastigotes tarafından hücrel invazyona doğrudan yanıt olarak IL-12 salgıladığı da gösterilmiştir. VL'ye karşı hedeflemiş DH aşılı, parazit-spesifik Th1 yanlı uzun süreli koruma sağlamaktadır [275]. Çözünür *Leishmania donovani* antijenleri ile DH'lerin adoptif göçü, Ag-spesifik IFN- $\gamma$  üretimine neden olmaktadır.

### 2.11.2.3 Anti-tatarcık Tükürük (Salya) Proteinlerine Dayalı Aşı Hedefleri

Leishmaniasis, enfekte tatarcığın tükürüğü içerisindeki parazitleri memeliyi ısırarak kan emmesi sırasında bulaştırmasıyla meydana gelir. Eski dünya *Leishmania* parazitleri *Phlebotomus* cinsi kum sinekleri aracılığı ile bulaşırken, Yenidünya parazitleri *Lutzomyia* cinsi sinekler aracılığı ile bulaşmaktadır. Bu nedenle de immün yanıtı tetikleyen tükürük bileşenlerine karşı dolaylı olarak anti-Leishmanial immüniteyi arttırabilmektedir. Kum sineğinin tükürüğü, farmakolojik olarak aktif moleküllerin geniş bir repertuarını içerir [276]. Bu moleküller, insanlar, köpekler ve farelerde yüksek immünojenik olarak kabul edilir. Bu tükürük proteinleri ayrıca parazitin konak içerisinde korunmasını sağlayan bazı *Leishmania* kökenli antijenleri de içerir. Tükürük bezi homojenatında yer alan iki ana tükürük proteini: maxadılan ve PpSP15 *L. major*'a karşı farelerde koruyucu olduğu kanıtlanmıştır. Maxadılan, *Lutzomyia longipalpis*'in tükürüğünde bulunur ve burada moleküle karşı bağışıklık, şiddetli enfeksiyonun nötralizasyonuna yol açar. Ayrıca maxadılanın TH2 tepkileri (IL-6, IL-10 ve TGF- $\beta$ ) ile ilişkili sitokinleri etkilediği, fakat TH1 sitokinlerini (IL-12p70 ve TNF) ve NO'ı downregüle ettiği bilinmektedir. *Phlebotomus papatasi*'den elde edilen PpSP15, fare modellerinde (vahşi tip ve B-hücre eksikliği) hücrel bağışıklık yanıtını sağlama yeteneğine sahiptir. Promastigot salgılayıcı jel (PSG) veya *L. mexicana*'dan kimyasal olarak tanımlanmış sentetik glikozasin, enfekte olmuş kum sineklerinin ısırığına karşı önemli bir koruma sağlamaktadır. Ancak her ikisi de (PSG veya glikoaksin), bağışıklık sağlamada etkili olmamıştır [277].

### 2.11.3 Üçüncü Jenerasyon Aşılar

Genetik mühendisliği alanındaki ilerlemeler rekombinant aşıların geliştirilmesine yol açmıştır. DNA bazlı aşılar, bir hedef proteini kodlayan genin ekspresyon vektöründe klonlandığı üçüncü kuşak aşısı oluşturur. Proteinler, ikinci nesil aşılar (rekombinant proteinler) kıyasla daha stabil ve daha immünojenik olmasıyla daha iyi koruma derecesi sağlayabilmektedir [278]. İlk DNA aşısı olan glikoprotein 63 (gp63) önemli seviyelerde CD4 yanıtı oluşturmuştur. Aktif C (LACK) ve promastigot yüzey antijeni-2 (PSA-2) reseptörleri için *Leishmania* homologu gibi DNA aşısı olarak kullanılan parazitten türetilmiş başka moleküller vardır. Bu alandaki en son gelişmeler arasında aşı adayı olarak *leishmania* hemoglobin reseptörünün yer alır ve DNA aşıları, heterolog prime-

boost aşılması, oligodeoksinükleotitlerin (ODN) ve sitokinlerin eklenmesi gibi çeşitli modifikasyonlar da üçüncü nesil aşılarda gözlenmektedir. Test edilen bir başka antijen, *L. donovani*'nin sodyum stibogluconate duyarlı ve dirençli klinik izolatlarında salgılanan ve aynı zamanda yüzey-bağlı formlar olarak bulunan ve farklı olarak salgılanan Proteofosforglikanlar (PPG'ler) 'dir. *L. donovani*'nin PPG geninin yapısını ve işlevini açıklamak için, antijenik determinantların çoğunluğunu içeren 16 kb'lik N-terminal alanının bir kısmı dizisi, hamsterlerde (*Mesocricetus auratus*) DNA aşısı adayı olarak değerlendirilmiş ve *L. donovani* enfeksiyonunda PPG-DNA aşısı Th1 tipi immünoprotektif yanıtı göstermiştir [279].

Son olarak, DNA aşılarının insanlarda kullanımının kabul edilmesi için aşı gelişiminin erken evrelerinde güvenlik sorunlarına dikkat edilmelidir.

## 2.12 Adjuvanlar

Adjuvan'ın kelime anlamı "yardım etmek" demektir. İmmünolojide adjuvanlar, 1920'lerin başlarında kullanılmaya başlanmıştır. Doğal yada sonradan kazanılmış bağışıklığın aktivasyonu aracılığıyla zayıf immünolojik özellik gösteren antijenlerin etkinliğinin arttırılmasında kullanılmaktadır. Günümüze kadar çeşitli adjuvanlar geliştirilmiş olsa da etki mekanizmaları, büyük ölçüde gizemli kalmıştır. Tam olarak, adjuvanların immün yanıtı nasıl arttırdığı bilinmemektedir. Adjuvanın özellikleri arasında (a) ASH'lere antijen taşınmasını sağlayabilmesi, (b) ASH'lerin aktivasyon durumunu teşvik edebilir (c) ASH'ler tarafından antijenin işlenmesi ve sunumu arttırabilir (d) antikör aviditesini modüle eder ve (e) hücre aracılı immün yanıtı stimüle etmesi bulunmaktadır.

Adjuvanlar, bileşen kaynaklarına, fizyokimyasal özelliklerine veya etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilirler. Modern aşılarda yaygın olarak bulunan iki adjuvan sınıfı aşağıdaki gibidir:

- Antijenlere karşı tepkileri arttırmak için bağışıklık sistemi üzerinde doğrudan etki gösteren immünostimulanlar.

Bu sınıfta yer alan ve en sık kullanılan adjuvanlar Freund adjuvanları (tamamlanmış Freund adjuvanı, CFA ve tamamlanmamış Freund yardımcı maddesi, IFA), alum

bileşikleri, difosforil lipid A, muramildipeptit, monosit koloni uyarıcı faktör, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör, saponinler (QS, QuilA) interlökin 12 ve CpG-oligonükleotit bulunmaktadır [280], [255], [281], [282] [283].

- Antijene karşı spesifik immün tepkisini arttırmak için kontrollü salım yapabilen taşıyıcı sistemlerdir. Bu sistemler ayrıca immüno-uyarıcıları sunmaya da hizmet edebilir.

Bu sınıfta ise mineral tuzları, emülsiyonlar, lipozomlar, virozomlar (influenza hemaglutinin ve fosfolipidler gibi viral proteinlerden yapılan nanopartiküller), biyolojik olarak parçalanabilen polimer mikroküreler ve bağışıklık uyarıcı kompleksler.

## **2.12.1 Geleneksel Adjuvanlar**

### **2.12.1.1 Freund adjuvanları**

Bunlar içerisinde, Freund adjuvanları sıklıkla kullanılır. Freund adjuvan enjekte edilen antijenin yavaş salınmasını sağlar ve bu adjuvan içerisinde mevcut olan mikobakterilerin patojenle ilişkili moleküler desenleri, toll-benzeri reseptör (TLR) gibi patojen tanıyan reseptörler ile etkileşime girmesi sonucu T hücrelerinin aktivasyonu ve çoğalması sağlanır. CFA'nın mikobakteryum bileşeni, özellikle enjekte edilen antijene karşı gecikmiş tipte aşırı hassasiyet reaksiyonunun başlatılması ile sonuçlanan, Th1 yolağını aktive eder [284]. Ayrıca, kan sisteminde Mac-11 olgunlaşmamış myeloid hücre çoğalması ile karakterize edilen bazı sistemik etkileri gözlenmiştir. IFA mycobacterium içermez ve humoral immün yanıt ile doğru orantılı olan Th2 yolağını aktive eder. Bununla birlikte, Freund adjuvan içinde mevcut olan parafin yağının parçalanamadığı ve toksisite problemlerine neden olduğu gösterilmiştir [285].

### **2.12.1.2 Alum**

Alum olarak adlandırılan, alüminyum tuzu bazlı adjuvanlar, alüminyum oksihidroksit (alüminyum hidroksit jeli olarak anılır), alüminyum hidroksifosfat (alüminyum fosfat jeli olarak anılır) veya alüminyum hidroksi sülfat gibi çeşitli tescilli tuzlara dayanan kristal olmayan jellerdir [286]. Alum, insan kullanımı için lisanslı olan birkaç adjuvandan

biridir. Öldürülmüş parazitler ile birlikte kullanıldığı çalışmada *L. donovani* enfeksiyonuna karşı belirgin bir direnç sergilermiştir [287].

#### **2.12.1.3 Bacillus Calmette–Guérin (BCG)**

Bağışıklık kuvvetlendirici özelliğe sahip olduğu bilinen *Mycobacterium bovis* BCG, 1920'lerden beri tüberküloza karşı bir aşı olarak kullanılmıştır. Aşılamalarda BCG uygulaması problemler oluşturmuş olmasına rağmen, insan kullanımı için en uygun Th1-indükleyici adjuvandır. İnflamatuar artrit ve otoimmün reaksiyonlar dahil olmak üzere BCG kullanımı ile yan etkiler veya komplikasyonlar bildirilmiştir [288]. BALB/c farelerin BCG intravenöz olarak aşılandığında aşının *L. donovani* amastigotlarına karşı koruyucu ve tedavi edici olduğu bulunmuştur. Kontroller ile karşılaştırıldığında BCG ile aşılanmış farelerde parazit yükü anlamlı derecede düşük düzeyde gözlenmiştir. VL'ye karşı benzer bir girişim hamster modelinde denendiğinde hastalık şiddetlenmiş ve hayvanları hastalığa karşı korumada başarısız olmuştur [288].

Levamisol, siklosporin A, *C. parvum*, glukan, MDP türevleri ve saponinler gibi diğer bazı immün-uyarıcılar non-spesifik olarak makrofajları aktive etme yetenekleri nedeniyle büyük oranda kullanılmaktadır [289], [290], [291], [292].

#### **2.12.1.4 İnterlökin 12 (IL-12)**

En başarılı görülen adjuvanlardan biri olarak görülen çözümler sitokinler, Th1 immün yanıtı stimüle ettiği bilinmektedir. Bunlar içerisinde yer alan IL-12, Th1 bağışıklık tepkilerinin, indüklenmesi ve sürdürülmesi için önemlidir. IL-12, *L. donovani* enfeksiyonuna karşı erken yanıtta önemli bir komponenttir. IL-12 KL'ye karşı etkili bir adjuvan olduğu gösterilse de, *L. donovani* ile enfekte fare modelinde etkisiz olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca IL-12'nin kullanılmasının sınırlayan en önemli faktör, yüksek maliyetli olmasıdır. IL-12 pahalı ve üretiminin zor olmasıyla beraber insanda adjuvan olarak kullanılması hala tartışmalıdır[293]. IL-12'nin adjuvan potansiyeli, çözümler *Leishmania* antijeni kullanılarak murin modellerinde belgelenmiştir ve hastalığa karşı tam bir koruma göstermiştir [294]. Tersine, Vervet maymunu kullanan çalışmalarda, bir insan rekombinant IL-12 preparatının düşük dozları, IL-12 olmayan antijenleri alan hayvanlara benzer şekilde hücrel bağışıklıkta küçük bir artışa neden olmuştur[295].



### 2.12.1.5 Metillenmemiş dinükleotid (CpG)

Yeni adjuvanlar arasında yer alan metillenmemiş CpG oligonükleotidleri belirli bakteriyel DNA dizileridir. Metillenmemiş dinükleotid (CpG motifleri) ihtiva eden özel DNA dizileri, B hücreleri ve dendritik hücreleri aktive eder ve makrofajlar tarafından sitokin üretimini uyarır. Farelerde güçlü immünostimülatör ajanlar olarak görev yapar ve antijenler ile birlikte uygulandığında hem humoral hem de hücrel immün tepkilerini artırır [296]. CpG motiflerinin IL-12 ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin üretimini indüklemesi Th1 immün yanıtta artışa neden olur. Bu da *Leishmania* aşılar için adjuvan olarak CpG motiflerini cazip hale getirmektedir [297].

### 2.12.2 Nanopartiküller

*Leishmania* aşılarının geliştirilmesinde bağışıklık tepkilerini etkileyen farklı parametreler arasında adjuvan(lar) kritik role sahiptir. Uygun bir antijen ile bir araya getirilmesi, erken, kuvvetli, uzun süreli ve *leishmania* antijenine spesifik hücrel immün tepkisini indükleyebilmesi için adjuvanların geliştirilmesi çok önemlidir. Bununla birlikte, yukarıda bahsedilen geleneksel adjuvanlar, aşı uygulamasından sonra ciddi yan etkiler ortaya çıkabilmektedir ve bu adjuvanların insan kullanımı için mutlak etkinlik ve güvenlik garanti etmemektedir.

Çeşitli partiküller adjuvanlar veya taşıyıcı sistemler *leishmania* aşılarında kullanılmıştır. Bunlar arasında lipozomlar, mikroparçacıklar, immünstimüle edici kompleksler ve adjuvanlı lipopeptitler tarafından oluşturulan miseller örnek olarak verilebilir [298].

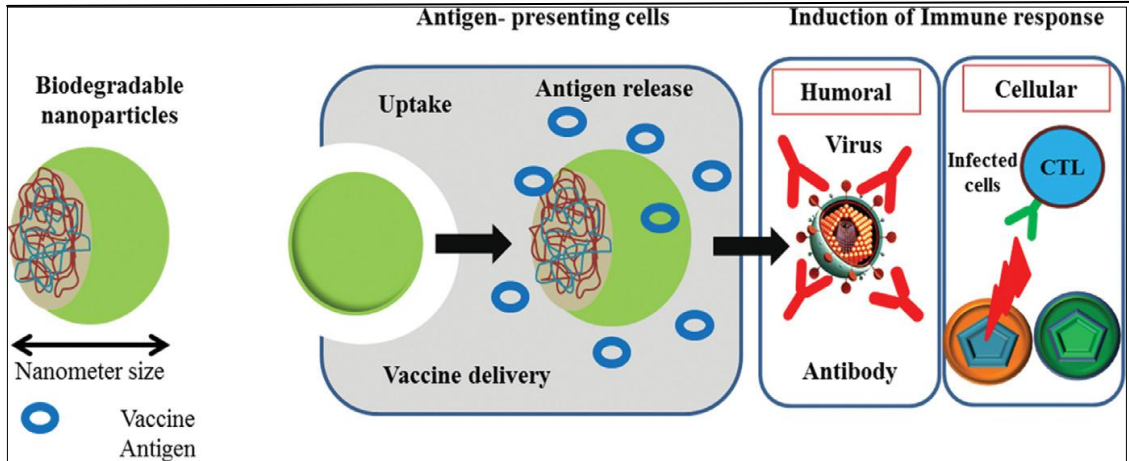
Nanopartiküller (NP), 1-1000 nm civarında boyutlara sahip, doğal veya sentetik polimer yapısında olabilen ve hazırlama yöntemine bağlı olarak nanoküre veya nanokapsül formunda oluşabilen katı yapılardır. Çok çeşitli ilaçlar (hidrofilik ve hidrofobik küçük ilaçlar), genler, antijenler ve biyolojik makromoleküller gibi maddeler nanopartikül içerisinde çözündürülerek, hapsedilerek, yüzeyine adsorbe edilerek veya kimyasal olarak sisteme bağlanarak kontrollü salımları yapılabilmektedir. Nanopartiküller taşıdıkları moleküllerin aynı zamanda belirli organlara, dokulara veya hücrelere hedefli bir şekilde dağıtılmasına imkan sağlar [299].

Biyolojik olarak bozunabilir polimerik nano taşıyıcı sistemler, kolayca antijen sunucu hücreler tarafından alındıkları için immünomodülatör ajanların geliştirilmesinde de önemli bir potansiyele sahiptir. Çeşitli çalışmalarda, nano taşıyıcı sistemlerin taşıdıkları antijeni ve/veya adjuvanı Antijen Sunucu Hücrelere (ASH) daha yüksek verimlilikle sundukları gösterilmiş ve tek başına antijen/adjuvan uygulamasına oranla daha yüksek immün yanıtların elde edildiği tespit edilmiştir [300].

Boyut, şekil ve zeta-potansiyeli gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak NP'lerin ASH'ler ile etkileşimi değişim göstermektedir. Nanopartiküller, daha büyük partiküllerle kıyaslandığında makrofajlar tarafından daha etkin bir şekilde alınmaktadır ASH'ler tarafından nanopartikül alımı için en uygun boyut hala tartışılmaktadır. Patojenlerle aynı büyüklüğe sahip olan nanopartiküllerin ASH'ler tarafından kolaylıkla tanınabildikleri (Şekil 2.7) ve immün yanıt oluşturabildikleri düşünülmektedir. [301], [302].

Virüs boyutundaki (20-200 nm) NP'ler dendritik hücreler tarafından kolayca alınırken, mikron boyutuna (0.5-5 µm) sahip parçacıklar ise makrofajlar tarafından alınmaktadır.

Biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan sentetik polimerler; poli (laktik asit), poli (glikolik asit), poli (ε-kaprolakton), poli (hidroksibutirat) ve bunların kopolimerleri gibi alifatik poliesterleri içerir. Bunların arasında, poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kopolimeri, güvenilirlik, biyouyumluluk ve biyobozunurluk gibi önemli özellikleri nedeniyle aşı çalışmalarında geniş çapta araştırılmıştır [303], [304], [305].



Şekil 2.7 Nanopartikül tabanlı aşı ile bağışıklık yanıtlarının indüksiyonu [306]

### 2.12.2.1 Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) Temelli Nanoparçacıklar ile Aşılama

Uygun partikül boyutu ve kapsülleme verimliliği nedeniyle, poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), biyobozunur polimerik matrislerin en başarıyla kullanılanlarından biridir.

PLGA nanopartikülleri aşağıda belirtilen önemli özellikleri nedeniyle aşılama çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır:

- (i) biyobozunurluk ve biyoyumluluk,
- (ii) parenteral uygulama için FDA ve Avrupa Tıp Kurumu onaylı,
- (iii) farklı ilaç türlerini (hidrofilik veya hidrofobik küçük moleküller veya makromoleküller) kapsülleme özelliğine sahip olması,
- (iv) bozunmaya karşı ilacın/antijenin korunması,
- (v) sürekli salım olasılığı,
- (vi) biyolojik maddelerle daha iyi etkileşim ve/veya gizlilik sağlamak için yüzey modifikasyonuna imkan sağlaması,
- (vii) nanoparçacıkları belirli organlara veya hücrelere hedefleme imkanı [29], [28].

PLGA vücut dokularında hidrolize olur ve doğal yoldan parçalanabilen monomerik metabolitler olan laktik asit ve glikolik asite dönüşür (Şekil 2.8). Bir takım biyokimyasal ve fizyolojik reaksiyonlara katkıda bulunan laktik ve glikolik asitler normal şartlarda vücutta bulunur. Bu nedenle ilaç taşıma sistemlerinde ve biyomedikal uygulamalarda

PLGA kullanımı sonrasında herhangi bir toksik etki veya yan etki görülmez. PLGA nanopartikülleri, bir-iki hafta ile birkaç ay arasında değişen sürelerde antijen ve adjuvan moleküllerinin sürekli salımını sağlayarak immün stimülasyonunu artırır [307]. Proteinler, peptidler, lipopeptitler, hücre lizatları, virüsler veya plasmid DNA gibi çok sayıda antijen PLGA nanopartiküllerinde başarıyla formüle edilmiştir [308]. Aşılamada, antijenlerin uzun süreli salımı, daha etkili bağışıklık tepkileri sağlayabilir, ayrıca tolerans riskinden de kaçınılabilmektedir. Antijenin hedef bölgelere sürekli ve kontrollü salımı ile artırılmış bir antijen stabilitesi, daha iyi immünojenlik ve immünoestimülasyon etki sağlamaktadır. MHC I kompleksleri vasıtasıyla antijen sunumu, CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin sitotoksik bir fenotip kazanmasına neden olduğundan, tümör ve bulaşıcı hastalıkların kontrolü için önemlidir. Aşılar ve kanser immünoterapisi için kullanılan PLGA nanoparçacıkları, MHC I kompleksleri vasıtasıyla CD8<sup>+</sup> T hücrelerine çapraz olarak eksojen antijenler sağlayabilir. PLGA nanopartiküllerinin, dendritik hücreler tarafından alındıktan sonra MHC I yoluna erişme özelliğine sahip olduğu görülmektedir [309].

PLGA nanopartikülleri, bir antijenin, farklı antijen kombinasyonlarının veya daha da önemlisi, aynı partiküldeki antijenlerin ve adjuvanların kombinasyonu içeren taşıyıcı sistemler olarak işlev görebilir. Aynı türdeki hücrelerin eşzamanlı olarak hedeflenebilmesi için antijenler ve adjuvanların aynı parçacık tarafından birlikte verilmesi gerektiği gösterilmiştir. Ayrıca çok düşük doz antijen içeren PLGA nanopartikülleri ve adjuvanlar bile güçlü T hücre yanıtlarına neden olabilmektedir. Bu moleküllerin daha düşük dozlarının kullanılması, yalnızca adjuvanların kullanımıyla ilişkili potansiyel yan etkilerin en aza indirgenmesi için değil, aynı zamanda ekonomik açıdan da avantajlı olmaktadır. Çeşitli antijenler ve adjuvanlar PLGA nanoparçacıklarına başarıyla kapsüllenmiştir. PLGA parçacıkları Hepatit B yüzey antijeni, VMP001 sıtma proteini, HIV antijenleri, tümör ile ilişkili antijenler ve tümör lizatı dahil olmak üzere geniş bir yelpazede protein ve peptid antijenlerinin sunulması için kullanılmıştır [310].

Laboratuvarımızda CAPE ve (CAPE) PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotları ve amastigotları üzerindeki antileishmanial etkileri in vitro araştırılmış ve karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. CAPE ve (CAPE) PLGA NP'lerinin, *L. infantum* promastigotları ve amastigotları üzerinde önemli inhibe edici etkiler gösterdiği, buna karşılık serbest NP'lerin herhangi bir anlamlı antileishmanial etkinlik göstermediği saptanmıştır. Öte

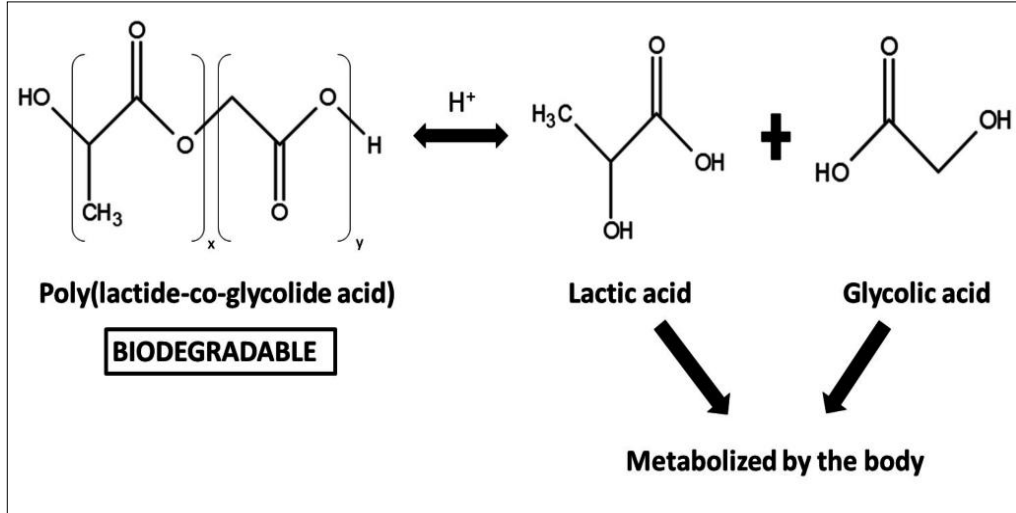
yandan, (CAPE) PLGA NP'lerinin, her iki parazit formunda üstün antileishmanial aktiviteye sahip olduğu ve makrofajların nitrik oksit üretimini kuvvetli şekilde tetiklediği saptanmıştır [311].

H. Van de Ven vd. yaptıkları çalışmada VL'yi tedavi etmek için aescin yüklü PLGA NP'lerin etkinliklerini *in vitro* incelemiştir. Nanopartikül içerisine boya konularak konfokal mikroskopi ile internalizasyonun görselleştirilmesi sağlanmıştır. GFP-transfekte *Leishmania donovani* ile enfekte J774A.1 makrofajlardaki floresan ve nil kırmızı etiketli 200-400 nm boyut aralığında PLGA NP'lerin intravenözden sonra RES'un makrofajları tarafından kolaylıkla alındığı gözlenmiştir. Etkili hücresel alım sayesinde IC50 değerinde *L. infantum* amastigotlarında iki kat azalma olduğu rapor edilmiştir [312].

Tafaghodi vd. yaptıkları çalışmada otoklavlanmış *Leishmania major* antijeni (ALM) içeren PLGA nanoküreleri ile ALM ve CpG-ODN adjuvanı içeren PLGA nanokürelerinin, *L. major* enfeksiyonuna karşı BALB/c fareler üzerindeki koruyucu etkinliklerini karşılaştırmalı olarak incelemiştir. İncelenen formülasyonlar içerisinde (ALM+CpG-ODN) PLGA nanokürelerinin fareler üzerinde en yüksek korumayı sağladığı gösterilmiştir [31].

Wang vd. Toll benzeri reseptör (TLR) 7/8 agonisti 3M-052'nin adjuvanlığını *Leishmania donovani* 36-kDa nükleozid hidrolaz protein antijeni (NH36) ile kombine halde araştırmışlardır. NH36 ve 3M-052, ayrı gruplar halinde poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) mikropartiküllerinde (MP'ler) kapsüllenmiştir. Kemik iliği kaynaklı dendritik hücrelerin (IL-12 salgısı ile ölçülmüş) *in vitro* uyarımı, 3M-052'nin (serbest veya mikropartikül formüle edilmiş) konsantrasyona bağlı olarak 2 mg/ml konsantrasyonda immünoestimulan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. BALB/c farelerindeki immünojenite çalışmalarında, mikropartikül ile formüle edilmiş NH36 ve 3M-052, Th1 ile ilişkili IgG2a ve IgG2b antikorlarının yüksek seviyede üretimini sağlamış ve IFN $\gamma$ 'yi üreten splenositlerin sayısını artırmıştır. Mikropartiküllerin içerisine enkapsüle edilmiş NH36 ve 3M-052'nin, Th1'e bağlı bir immün yanıt ortaya çıkarması, bu formülasyonun leishmaniasis aşılı için bir adjuvan olarak kullanılma potansiyelini göstermektedir [33]. Santos vd. son zamanlarda, kinetoplastid membran proteini 11 (KMP-11) ile yüklenmiş olan PLGA nanopartiküllerin *in vivo* olarak parazit yükünü önemli ölçüde azalttığını göstermişler. Rekombinant antijen içeren PLGA nanopartiküllerinin *in vitro*

immünojen etkinlikleri *Leishmania braziliensis* ile enfekte edilmiş makrofaj modellerinde çalışılmıştır. Makrofajların KMP-11 yüklü PLGA nanoparçacıkları ile inkübasyonuna bağlı olarak, parazit yükünün önemli ölçüde azaldığı saptanmış ve buna paralel olarak, artmış nitrik oksit, süperoksit, TNF- $\alpha$  ve IL-6 üretiminde artış gözlemlenmiştir [32].



Şekil 2.8 PLGA molekülünün biyobozunurluğu [306]

**DENEYSEL ÇALIŞMALAR****3.1 Materyal****3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler**

Çizelge 3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler

<b>EKİPMAN VE SARF MALZEME</b>	<b>MARKA</b>
<b>Saf su cihazı</b>	<b>ELGA</b>
<b>Karbondiyoksitli inkübatör</b>	<b>New Brunswick scientific CO-150 37°C</b>
<b>Soğutmalı inkübatör</b>	<b>FrioCell 111 25 °C</b>
<b>İnvert mikroskop</b>	<b>Olympus CKX41</b>
<b>Işık Mikroskobu</b>	<b>Leita</b>
<b>Santrifüj</b>	<b>Eppendorf, Thermo Micromax RF</b>
<b>Manyetik karıştırıcı</b>	<b>Heidolph MR3000</b>
<b>pH metre</b>	<b>HANNA instruments</b>
<b>Hassas terazi</b>	<b>Precisa Gravimetrics AG</b>

Çizelge 3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler (devam)

<b>Hava akımlı kabinler (Laminar flow )</b>	<b>Thermo Scientific Hera safe, Faster BH- EN 2006</b>
<b>Vortex</b>	<b>LMS(laboratuvarı medical supplies) VTX-3000L</b>
<b>Su banyosu (2 adet)</b>	<b>GFL</b>
<b>Isıtıcıli karıştırıcı</b>	<b>Heidolph instruments</b>
<b>ELISA çoklu plaka yıkama cihazı</b>	<b>Thermo</b>
<b>Dondurucular</b>	<b>Beko(+4,-20°C), Arçelik(+4-20°C), GFL(-40°C)</b>
<b>-195°C azot tankı ve azot taşıma tankları</b>	<b>DMC air liquid systems</b>
<b>Otoklav (2 adet)</b>	<b>Kerman, HIRAYAMA</b>
<b>UV-spektrofotometre</b>	<b>Jasco V-530</b>
<b>ELISA çoklu plaka okuyucu</b>	<b>Multiscan Ascent</b>
<b>Homojenizatör</b>	<b>Bandelin</b>
<b>Zeta Sizer</b>	<b>NanoS</b>
<b>SEM</b>	<b>Zeis</b>
<b>GPC</b>	<b>Viscotek</b>
<b>Sonikatör</b>	<b>Bondelin, Sonopuls</b>
<b>Liyafilizatör</b>	<b>Telstar Cryodos</b>
<b>Fraksiyon Toplayıcı</b>	<b>Bio-rad 2110</b>



Çizelge 3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler (devam)

10, 50, 100, 1000 µl'lik mikropipetler	Thermo, Pippetman
1-10, 10-100, 100-1000 µl 'lik tek kullanımlık pipet uçları	AxyGen
Santrifüj tüpleri 1, 2, 15, 50 ml.	Eppendorf , IsoLAB
ELISA 24, 48 ve 96 kuyulu plakalar	TPP
Hücre kültürü flaskları 25cm <sup>2</sup> ve 75 cm <sup>2</sup> lik	TPP
Pipet tabancası	Thermo
Serolojik pipetler -1,5,10 ml	Blau Brand Germany
Kriyotüpler	TPP
Süzgeç (40 µm)	BD Falcon
50-1000ml'lik otoklavlanabilir cam şişeler	ISOLAB, SCHOTT
1-2,5-5-10-50 ml'lik enjektör	Ayset
0,22 µm ve 0, 45 µm'lik şırınga filtreleri	MILLIPORE, Sartorius

### 3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

Çizelge 3.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve besiyerleri

MADDE ADI	MARKA
RPMI-1640 (Fenol redli ve fenol redsiz) besiyerleri	GIBCO Invitrogen
DMEM (Fenol redli ve fenol redsiz) besiyerleri	GIBCO Invitrogen

Çizelge 3.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve besiyerleri (devam)

<b>FBS-fetal bovine serum</b>	<b>GIBCO Invitrogen</b>
<b>HEPES</b>	<b>AppliChem</b>
<b>Gentamisin</b>	<b>Sigma</b>
<b>Tripsin</b>	<b>Biochrom</b>
<b>EDTA</b>	<b>Merck</b>
<b>L-glutamin</b>	<b>Sigma</b>
<b>Penisilin streptomisin</b>	<b>Sigma</b>
<b>Oxoid Brain Heart Infusion Broth</b>	<b>Biological Industries</b>
<b>Hemin</b>	<b>Sigma</b>
<b>Adenozin</b>	<b>Sigma</b>
<b>DMSO</b>	<b>Sigma</b>
<b>Thiazoly blue tetrazolium bromide(MTT)</b>	<b>Sigma</b>
<b>Sodyum klorür</b>	<b>Sigma</b>
<b>Tripan mavisi</b>	<b>Biologycal Industry</b>
<b>Sodyum hidroksit</b>	<b>Riedel De Haen</b>
<b>Hidroklorik asit</b>	<b>Merck</b>
<b>Disodyum hidrojen fosfat</b>	<b>Riedel De Haen</b>

Çizelge 3.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve besiyerleri (devam)

<b>Potasyum dihidrojen fosfat</b>	<b>Riedel De Haen</b>
<b>Sodyum dodesil sülfat (SDS)</b>	<b>Merck</b>
<b>N-(1-Naftil)Etilendiamin</b>	<b>Merck</b>
<b>Sodyum Nitrit</b>	<b>Merck</b>
<b>Fosforik Asit</b>	<b>Riedel De Haen</b>
<b>Sülfanilamit</b>	<b>Merck</b>
<b>Chloroform Extra Pure</b>	<b>Merck</b>
<b>TLC silica gel</b>	<b>Merck</b>
<b>immersiyon yağı</b>	<b>Fluka</b>
<b>Albumin from bovine serum</b>	<b>Fluka</b>
<b>Phenol solution for molecular biology</b>	<b>Sigma</b>
<b>PROPANOL EXTRA PURE-2,5L</b>	<b>Merck</b>
<b>Orcinol -5g 10g</b>	<b>Sigma</b>
<b>Ammonium Acetate Extra Pure</b>	<b>Merck</b>
<b>Octyl-Sepharose® CL-4B</b>	<b>Sigma</b>
<b>Dichloromethane Puriss., Meets Analytical Specification Of Ph. Eur., NF, ≥99% (GC)</b>	<b>Sigma</b>
<b>Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide), Lactide:Glycolide (50:50), MOL. WT. 30,000-60,000</b>	<b>Sigma</b>
<b>Poly(Vinyl Alcohol), 98-99% Hydrolyzed, Average MW 31,000-50,000</b>	<b>Sigma</b>
<b>Yağsız süt tozu</b>	<b>AppliChem</b>

Çizelge 3.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve besiyerleri (devam)

<b>Anti-Mouse Polyvalen Ig (IgG, IgM, IgA)</b>	<b>Anti-Mouse Polyvalen Ig (IgG, IgM, IgA)</b>
<b>Sodyum bikarbonat, NaHCO<sub>3</sub></b>	<b>Merck</b>
<b>Potasyum klorür</b>	<b>Carlo Erba</b>
<b>Magnezyum klorür, MgCl<sub>2</sub></b>	<b>Fluka</b>
<b>Çinko Klorür, ZnCl<sub>2</sub></b>	<b>Fluka</b>
<b>Sodyum azid, NaN<sub>3</sub></b>	<b>Sigma</b>
<b>Potasyum hidroksit, KOH</b>	<b>Merck</b>
<b>Dipotasyum fosfat, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>Sigma</b>
<b>Monopotasyum fosfat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>Sigma</b>
<b>Sodyum di hidrojen fosfat mono hidrat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	<b>Merck</b>
<b>Disodyum hidrojen fosfat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>Merck</b>
<b>Sodyum dodesil sülfat (SDS)</b>	<b>Sigma</b>
<b>Metanol</b>	<b>Merck</b>
<b>Formalin</b>	<b>Sigma</b>
<b>Paranitrofenil fosfat (PNNF)</b>	<b>Sigma</b>
<b>ELISA kıt Mouse IL-4</b>	<b>Affimetrix</b>

Çizelge 3.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve besiyeleri (devam)

<b>ELISA kıt Mouse IL-10</b>	<b>Affimetrix</b>
<b>ELISA kıt Mouse IL-12</b>	<b>Affimetrix</b>
<b>ELISA kıt Mouse IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Affimetrix</b>

### **3.1.3 Çözeltilerin Hazırlanması**

#### **3.1.3.1 PBS Tampon Hazırlanması**

200 mg KCl, 800 mg NaCl, 240 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tartılıp 900 ml deiyonize suda çözüldürüldü. pH 7,4'e ayarlandıktan sonra son hacim deiyonize suyla 1 litreye tamamlandı. 1 atm basınç, 121°C sıcaklık ayarlanmış otoklavda cam şişeler içerisinde temiz otoklavda 20 dakika süre ile steril edildi.

#### **3.1.3.2 RPMI 1640 Medyumun Hazırlanması**

500 ml L-glutaminli RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) içerisine antibiyotik olarak 2,5 ml gentamisin (10 mg/ml) eklenerek stok besiyeri hazırlandı. Kültürde kullanılmak üzere buradan 45 ml alınıp 5 ml FBS eklenerek %10 FBS içeren besiyeri hazırlandı ve +4°C'de steril bir şekilde muhafaza edildi.

#### **3.1.3.3 DMEM Medyumun Hazırlanması**

500 ml L-glutaminli DMEM (Dulbecco's modification of Eagle medium) içerisine antibiyotik olarak 2,5 ml penisilin streptomisin (10 mg/ml) eklenerek stok besiyeri hazırlandı. Kültürde kullanılmak üzere buradan 45 ml alınıp 5 ml FBS eklenerek %10 FBS içeren besiyeri hazırlandı ve +4°C'de steril bir şekilde muhafaza edildi.

#### **3.1.3.4 Beyin Kalp İnfüzyon (BHI) Mediyumun Hazırlanması**

1 L besiyeri hazırlamak için, liyofilize haldeki beyin kalp infüzyon besiyerinden 37 g tartıldı ve üzerine distile su ilave edilerek homojen hale getirildi. Ardından 15 dakika

121°C'de otoklavda sterilizasyonu yapıldı. Besiyerine ilave edilecek katkı maddeleri olan hemin ve adenozin için stok çözeltileri hazırlandı. Hemin 25 mg tartılarak, 500 µl 1 N NaOH içinde çözüldü ve distile su ile 50 ml'ye tamamlanıp otoklavlandı. Adenozin ise 0,1 g tartılarak 37,5 mL distile suda çözüldü ve filtre edilerek steri hale getirildi. Önceden hazırlanmış steril 1 L BHI besiyerine 10 ml adenozin ve 10 ml hemin ilave edildi.

### **3.1.3.5 Coomassie Brilliant Blue Reaktifinin Hazırlanması**

0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etil alkol, 100 mL %85 fosforik asit ve distile su 1000 mL'lik balon jodede karıştırıldı. Boya çözüldükten sonra üzerine saf su eklenerek 1000 mL'ye tamamlandı. Karanlıkta 1 gece karıştırılarak bekletildi ve son olarak filtre kağıdından süzülerek kullanıldı.

### **3.1.3.6 MTT Solüsyonunun Hazırlanması**

MTT tuzu PBS içerisinde çözüldürüldü. Kullanılacak MTT prosedürüne uygun olarak önce hassas terazide 10 mg/ml için 20 mg MTT tartılıp PBS ile 2 ml'ye tamamlandı. Vortekste çalkalanarak iyice çözüldükten sonra steril edilmek üzere 0,22 µm'lik sırınga filtreden geçirildi. MTT ışığa karşı hassas olduğu için, bu işlemler karanlıkta yapıldı.

### **3.1.3.7 Nitrik Oksit (NO) için Griess Reaktifinin Hazırlanması**

20 ml distile suya 2,5 ml fosforik asit eklendi. Bunun içerisine sırayla 0,1 g N-(1-Naftil)Etilendiamin ve 1 g Sülfanilamit eklenerek karıştırıcıda çözünmesi sağlandı. Son olarak çözelti distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

### **3.1.3.8 NO için Standart Çözeltilerin Hazırlanması**

Kalibrasyon grafiği elde etmek için standart madde olarak Sodyum Nitrit kullanıldı. Bunun için 10 ml distile su içinde 0,345 g Sodyum Nitrit çözülerek 500 µM stok çözelti hazırlanmış oldu. Elde edilen stok çözeltilerden 0-100 µM aralığında standartlar hazırlandı.

### **3.1.3.9 ELISA için Kaplama Çözeltisi (pH: 9,6)**

0,79 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,46 g NaHCO<sub>3</sub> , 0,1 g NaN<sub>3</sub> tartılarak 400 ml distile su içinde çözüldü. pH'ı 9,6'ya ayarlandıktan sonra distile su ile 500ml'ye tamamlandı.

### **3.1.3.10 ELISA için Substrat Tamponu (pH:10,4)**

0,02 g ZnCl<sub>2</sub>, 0,04 g MgCl<sub>2</sub>, 1,5 g Glisin tartılarak 150 ml distile suda çözüldü. pH; 10,4'e ayarlandı ve son hacim 200 ml'ye tamamlandı.

### **3.1.3.11 ELISA için Substrat Çözeltisi**

25 mg paranitrofenil fosfat( PNFF) 25 ml substrat tamponunda çözündürüldü.

### **3.1.3.12 ELISA için PBS/Tween20 Çözeltisi**

PBS çözeltisine %0,05 (v/v) olacak şekilde Tween20 eklenerek hazırlandı. Kuyucuk başına 100 µl eklendi.

### **3.1.3.13 ELISA için PBS/Tween20/milk Çözeltisi**

PBS/Tween20 çözeltisine %2 oranında süt tozu eklenerek hazırlandı. Her kuyuya 100 µl eklendi.

## **3.2 Metot**

### **3.2.1 Hücrelerin Kriyobanktan Çıkarılması**

#### **3.2.1.1 J774 Hücre Hattının Kriyobanktan Çıkarılması**

Kriyobankta kriyotüp içerisinde muhafaza edilen J774 Hücre hattından 1 tüp çıkartılıp 37°C su banyosunda hafifçe çalkalanarak çözündürüldü. Çözünen hücre süspansiyonu 5 ml %10 FBS'li RPMI 1640 besiyeri içeren falkon tüpüne alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant çözelti döküldükten sonra geriye kalan hücre pelleti 3ml besiyeri ile yavaşça pipetaj yapılarak resüspanse edilip besiyeri (%10 FBS'li RPMI 1640) konulmuş 25 cm<sup>2</sup>lik flaslara ekim yapıldı.

### **3.2.1.2 L929 Fibroblast Hücre Hattının Kriyobanktan Çıkarılması**

Kriyobankta kriyotüp içerisinde muhafaza edilen L929 hücrelerinden 1 tüp çıkartılıp 37°C su banyosunda hafifçe çalkalanarak çözündürüldü. Daha sonra içinde 5 mL %10 FBS'li DMEM besiyeri bulunan santrifüj tüpleri içine alınarak, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti 5 mL %10 FBS'li DMEM ile yavaşça resüspanse edilip 25 cm<sup>2</sup>'lik flaska ekim yapıldı.

### **3.2.1.3 MONI/EP126 L. infantum Suşunun Kriyobanktan Çıkarılması**

Kriyobanktan çıkarılan kriyotüp içerisindeki hücreler 37°C'lik su banyosunda çalkalanarak sıvı içerisinde çözündürüldü. Donuk hücre süspansiyonu çözünür çözünmez 7 ml %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyeri konulmuş flaska yavaşça aktarıldı.

## **3.2.2 Hücre Hatlarının Kültürü ve Kriyoprezervasyonu**

### **3.2.2.1 J774 Hücre Hattının Kültürü ve Kriyoprezervasyonu**

Kriyobankımızdan çıkarılan J774 makrofaj hücre hatlarının kültürü, ilk aşamada RPMI 1640 +%10 FBS içeren 25 cm<sup>2</sup>'lik steril kültür flaskalarında gerçekleştirildi. Kültür %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 37°C de inkübe edildi. Kültürün durumu ters mikroskop ile günlük kontrol edildi. Hücrelerin flaskın yüzeyini kapladığı tespit edildiğinde makrofajların pasajı yapıldı. Hücrelerin flask üzeyinden kaldırılması işlemi tripsin yardımı ile gerçekleştirildi. Bunun için önce flask içerisindeki besiyeri boşaltıldı ve flask PBS ile 2 defa yıkandı. 2 ml Tripsin-EDTA eklenerek 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Hücreler yüzeyden ayrıldığı mikroskop ile gözlendikten sonra sonra 5 ml RPMI 1640 (%10 FBS) içeren falkon içerisine aktarılıp 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülüp tüpün dibindeki hücre pelletinden total hücre sayısı tripan mavisi adı verilen boya yardımıyla hesaplandı. Daha sonra steril 25 cm<sup>2</sup>'lik flask içine yeni hazırlanmış %10 FBS'li RPMI besiyeri eklendi ve sayımı yapılmış olan hücre pelletinden 1-2x10<sup>6</sup> hücre/ml olacak şekilde flaska ekimi yapılp, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C etüvde inkübasyona bırakıldı.

Geriye kalan santrifüj tüpünün dibinde hücrelerden kriyobank oluşturmak üzere sıvı azot tankına konulmadan önce dondurma çözeltisiyle 1:1 oranında yavaşça



pipetajlanarak 2 ml'lik kriyotüp içerisine aktarıldı. Buzdolabında +4°C'de bir saat bekletildikten sonra -20°C'de 2 saat, ardından -40°C'de bir gece bekletilip sıvı azot tankına yerleştirildi.

### **3.2.2.2 Fibroblast (L929) Hattının Kültürü ve Kriyoprezervasyonu**

Kültürü yapılan L929 hücreleri flaskın yüzeyini yeteri kadar kapladığında hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve 2 kez PBS ile yıkandı. 1,5 ml tripsinden flaska eklendi ve 5 dakika beklendi. Hücrelerin flaskın yüzeyini tamamen ayrıldığı mikroskop ile gözlemlendikten sonra 5 mL %10 FBS'li DMEM içeren 15 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Oda sıcaklığında 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ayrılarak tüpün dibindeki hücre pelletinden total hücre sayısı tripan mavisi boyası yardımıyla hesaplandıktan sonra steril 25 cm<sup>2</sup>'lik flask içine yeni hazırlanmış %10 FBS içeren DMEM besiyeri eklendi. Santrifüj tüpünün içindeki resüspanse edilmiş hücrelerden 1-2x10<sup>6</sup> hücre/ml olacak şekilde otomatik mikropipet ile çekildi ve taze besiyeri içeren flaska eklendi ve %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C etüvde inkübasyona bırakıldı.

### **3.2.3 Tripan Mavisi boya ile Hücre Canlılığının Tayin Edilmesi ve Hücre Sayımı**

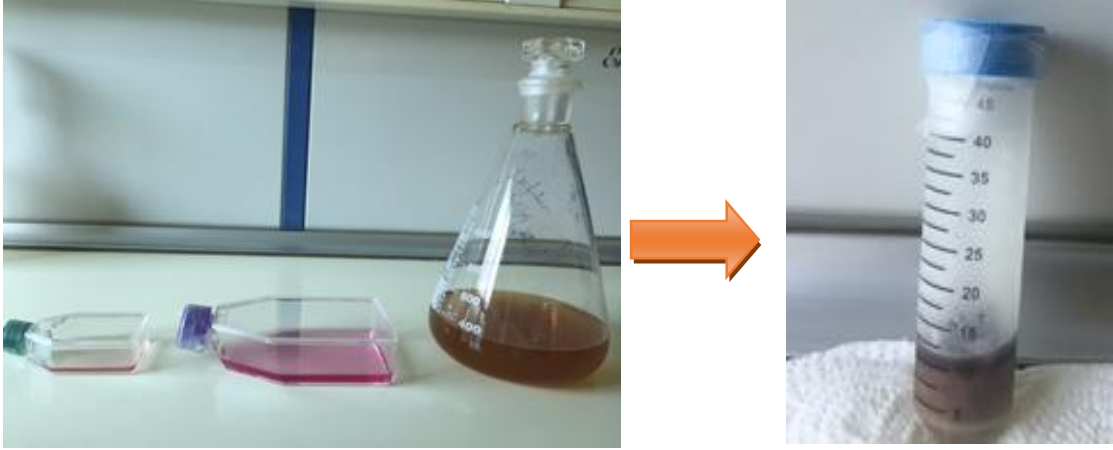
Tripan mavisi, ölü hücreleri boyayan ve böylece mikroskopta parlak görünümlü canlı hücre sayısını tespit etmekte kullanılan bir boyadır. Hücrelerin kullanılmadan önce sayımı, tripan mavisi ile thoma lamında yapıldı. Sayımın kolay yapılması için 50 kat seyreltme yapıldı. Kültür flaskı içerisindeki besiyeri boşaltıldı ve PBS ile 2 defa yıkandı. 2 ml Tripsin-EDTA eklenerek 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra 5 ml RPMI 1640 (%10 FBS) içeren besiyeri içerisinde 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ayrılarak tüpün dibindeki hücre pelleti besiyeri ile 1ml tamamlanarak resüspanse edildi. Bu hücre süspansiyonundan 2 µl alınarak eppendorf tüpü içerisine konuldu. 1:1 oranı için üzerine 48 µl tripan mavisi çözeltisi ve 50 µl besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Thoma lamına 10 µl hücre süspansiyonundan yayıldı. Ters mikroskopta parlak boyanmamış hücreler sayıldı ve böylece kültürün canlılık oranı hesaplandı.

### 3.2.3.1 MONI/EP126 *L.infantum* Kültürünün Kültürünün Yapılması ve Devamlı Kültürünün Elde Edilmesi

Kriyobankımızda mevcut olan VL etkeni *L.infantum* promastigotlarının (MONI/EP126), kültürü RPMI 1640 besiyerlerinde 27°C soğutmalı etüvde gerçekleştirildi. Parazitlerin gelişimi ve morfolojik durumu ters mikroskopta incelendi. Kültürün pasajı haftada iki kez yapıldı. Pasaj öncesi kültürden örnek alındı, ortamın pH'ı parazitlerin morfolojileri, hareketlilikleri incelendi ve sayımları yapıldı. Flaska 7 ml besiyeri eklendi ve üzerine  $3 \times 10^5$  parazit/ml olacak şekilde kültürden parazit ekimi yapıldı. *Leishmania* promastigotlarının kültürü bu şekilde devam ettirildi (Şekil 3.3).

Aşı formülasyonları hazırlanmasında kullanılmak üzere çözünür *Leishmania* antijeni (ÇLA), otoklavlanmış *Leishmania* antijeni (OLA) ve lipofosfoglikan (LPG) antijenlerinin izole edilecek olması nedeniyle büyük miktarlarda parazit biyomasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için küçük ölçekli *Leishmania* parazit kültürünün yapılmasının ardından *Leishmania* parazitlerinin büyük ölçekli kültürünün yapıldı.

Büyük ölçekli kültürde kademeli ölçek büyütme işlemi gerçekleştirildi. Kültürün büyütülmesinde besiyeri olarak ekonomik olması nedeniyle BHI kullanıldı. Öncelikle 25 cm<sup>2</sup>'lik flaskta pasajı gelen yani  $10^7$  parazit/ml sayısına ulaştığında *L.infantum* promastigotlarının 75 cm<sup>2</sup>'lik flaska aktarıldı. Üzerlerine 30 ml %5 FBS'li RPMI 1640 besiyeri eklendi. 24 saatlik aralıklarla parazitlerin sayımları yapıldı. 75 cm<sup>2</sup>'lik flasktaki parazit kültürü  $10^7$  parazit/ml'e ulaştığında, parazitler 1L'lik erlene aktarıldı (Şekil 2). Üzerine 350 ml BHI besiyeri eklendi. Dört gün sonra üzerine taze besiyeri eklenerek hacmi iki katına çıkarıldı. İnkübasyon süresi boyunca, homojen bir ortam sağlanması için erlendeki parazit kültürü orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Bu şekilde her seferinde 4 erlenle çalışıldı. 3 erlende bulunan kültürler, parazitin yüzey antijeni olan LPG molekülünün en yoğun görüldüğü safha olan metasiklik evreye ulaştıklarında 50 ml'lik falkonlarda + 4°C'de 4000 rpm'de 25 dk santrifüj edildi. Falkonlarda bulunan pellet 1 ml PBS ile yıkanarak 50 ml'lik falkonda toplandı. Daha sonra +4°C'de 4000 rpm'de 15'dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pellet 50 ml'lik falkonda biriktirildi ve parçalama işlemi olana kadar -20°C'de saklandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Kademeli olarak *L. Infantum* kültürünün yapılması ve biyomasın elde edilmesi

Geriye kalan 1 erlendeki parazitler (ml de  $10^7$  parazit) ise biyoreaktörde çoğaltılması için kullanılmıştır. Biyoreaktör için parazitin ml deki sayısı  $10^6$  olacak şekilde BHI besiyeri kullanıldı. Parazitlerin biyoreaktördeki günlük durumları, sıcaklığı, pH'ı hergün kontrol edildi (Şekil 3.2). Parazitlerin sayısı ml'de  $15 \times 10^7$  ulaştığında biyomas elde etmek için yukarıda anlatılan işlemler tekrar edildi. Elde edilen biyomas parçalama işlemi olana kadar  $-20^\circ\text{C}$ 'de saklandı.



Şekil 3.2 Biyoreaktörde büyük ölçekli parazit üretimi

### 3.2.3.2 Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı

Formalin hareketli parazitlerin thoma lamında fikse hale gelip sayılması kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle %2'lik formalin kullanılarak parazitlerin fikse edilmesi sağlanmış oldu. Kültürden 10 µl örnek alındı ve 1:10 oranında %2'lik formalinle karıştırılarak 3-5 dakika bekletildi. Daha sonra Thoma lamında aşağıdaki formül kullanılarak sayım yapıldı:

$$\text{Parazit sayısı/ml} = \text{Ortalama hücre sayısı} \times \text{Sulandırma katsayısı} \times \text{Thoma lamı sabiti} \quad (3.1)$$

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

Sulandırma katsayısı: Sayım için yapılan sulandırma katsayısı

Thoma lamı sabiti: 10.000

### 3.2.4 *L. infantum* Promastigotlarından Antijen Elde Edilmesi

#### 3.2.4.1 Dondurup/Çözme Yöntemi ile *L. infantum* Antijeninin Elde Edilmesi

Çözünür *Leishmania* antijeni (ÇLA) için daha önce büyük ölçekle elde edilen parazit pelletinden 1ml alınıp PBS ile 1 ml tamamlandı. Elde edilen hücre süspansiyonu 5dk boyunca sıvı azotta dondurulur sonrasında 5 dk boyunca 37°C su banyosunda çözündürüldü. İşlem 5 kez tekrar edildi. Elde edilen lizat çözünmeyen kısımların ayrılması için 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.

$$\text{Protein derişimi} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = (1.5 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260}) \times \text{Sulandırma katsayısı} \quad (3.2)$$

Süpernatanttaki protein miktarı için 280nm (A280) ve 260nm (A260) dalga boylarındaki absorbans UV-Spektrofotometrede ölçüldü ve protein miktarı aşağıdaki formül ile belirlendi :

Sulandırma katsayısı: Ölçüm için yapılan sulandırma katsayısı

A<sub>280</sub>: Protein çözeltisinin 280 nm'deki absorbans değeri

A<sub>260</sub>: Protein çözeltisinin 260 nm'deki absorbans değeri

Süpernatant antijen olarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

### 3.2.4.2 Otoklavlama Yöntemi ile *L. infantum* Antijeninin Elde Edilmesi

Otoklavlanmış *Leishmania* antijeni (OLA) için daha önce büyük ölçekle elde edilen parazit pelletinden 1ml alınıp PBS ile 1ml tamamlandı. Elde edilen hücre süspansiyonu penisilin şişelerine aktarıldı. Daha sonra 121 °C 1.1 atm basınç altında 15 dk süreyle otoklavlama işlemine tabi tutuldu. ml'deki antijenik protein miktarı UV-Spektrofotometre yardımıyla ölçüldü. Kullanılincaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

### 3.2.4.3 EP 126 *L.infantum* Parazitlerinden LPG İzolasyonu

#### EP 126 *L.infantum* Kültüründen Elde Edilen Peletin Parçalanması

-20°C'de kullanılmak üzere muhafaza edilen biyomas buzu çözdürülemedi için soğuk su banyosunda çevire çevire eritildi. Biyomas homojen olarak çözüldükten sonra her birine 3 ml gelecek şekilde toplam 8 tane 50 ml'lik falkon tüplere aktarıldı. Üzerlerine 11 ml önceden hazırlanan 2:1 oranında klorofom/metanol karışımı eklendi. Her bir tüpteki parazit kütlesi sonikatörle 50 voltta 1 dk boyunca buz içinde parçalandı ve daha sonra 1 saat süresince dinlendirildi. Beklemenin ardından örnekler 4000 rpm'de ve 4°C'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar uzaklaştırılarak pelletlerin üzerine 15 ml önceden hazırlanmış %9'luk isopropanol eklendi. Vorteksenerek çözdürülen pelletler buz içerisinde sonikatör ile 1 dk boyunca 50 voltta parçalandı. 1 saat beklemenin ardından 14000 rpm de 4°C'de 25 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrı bir yerde toplandı. Pellet üzerine yeniden 15 ml %9'luk isopropanol eklenerek parçalama ve santrifüj işlemleri aynen uygulandı. Bu parçalama işlemi toplamda üç kere tekrarlandı. Daha sonra süpernatantlar bir yerde toplanıp, liyafilizatörde kurutulmak üzere -40°C'e kaldırıldı.

Örneğin üzerine %25'lik 1-propanol eklenir ve etanol/kurubuz banyosunda dondurulur. Ardından oda sıcaklığında erimeye bırakılır. 14000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir. Süpernetant bir behere toplanır. Süpernatanta aşağıdaki formüle göre 0.1 M amonyum asetat çözeltisi eklenir. Bu şekilde örnek kolon kromatografisine hazır hale getirilir.

$$[(\text{Örnek hacmi} \times \%25) / \%5] - \text{örnek hacmi} = \text{ml } 0,1 \text{ M amonyum asetat} \quad (3.3)$$

### **Örneklerin Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması**

Parçalanmış hücre süspansiyonundan LPG molekülünün saflaştırılması için hidrofobik etkileşime dayalı ayırımı sağlayan oktil-sefaroze kolonu kullanılmıştır. Bunun için öncelikle, yaklaşık 15 ml oktil sefaroze dolgu maddesi 15 cm × 1.5 cm olan kolonun (BIO-RAD) % 80'ini dolduracak şekilde, kolonun içerisine konuldu. Daha sonra kolonun şartlandırılması için, kolondan %5 1-propanol/0,1 M amonyum asetat çözeltisi geçirildi. Kolonun musluğu açılarak solvent akışı sağlandı. Kolon %5 1-propanol/0,1 M amonyum asetat çözeltisi ile dengelendikten sonra, LPG örneğinin yüklenmesi için hazır duruma geldi. Daha önceden hazırlanmış olan LPG içeren örnek kolona yüklendikten sonra bir gece bu şekilde bekletildi. Bu işlem sırasında LPG'nin hidrofobik grupları, hidrofobik oktil gruplarına bağlandı. Ertesi gün yıkama çözeltisi olarak 50 ml %5 1-propanol/0,1 M amonyum asetat çözeltisi kolondan geçirildi ve yıkama çözeltisi bir behere toplandı.

Kontaminantlar (polar moleküller) kolondan yıkandıktan sonra, oktil gruplarına hidrofobik olarak bağlanmış moleküller kolondan elue edildi. Bunun için sırasıyla; kolon hacmi kadar 50 ml % 10-50 aralığında 1-propanol (0,1 M amonyum asetat içerir) geçirildi ve tüm fraksiyonlar toplandı.

Kolon kromatografisinin ardından kollektörde toplanan örneklerin karakterizasyon işlemine geçildi. Öncelikle tüm fraksiyonlar içlerindeki karbonhidrat varlığının tespit edilmesi için ince tabaka kromatografisi ile incelendi. Daha sonra protein kontaminasyonu tayini için spektrofotometrik analiz ve LPG miktarının tayini için Fenol Sülfirik Asit yöntemi uygulandı.

### **İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile LPG Varlığının Saptanması**

İnce tabaka kromatografisinde; silika kaplı kağıtlara her fraksiyondan 2 µl örnek damlatıldı ve kurutuldu. Kağıt üzerine orkinol çözeltisi püskürtüldü ve 100°C'de 15 dakika tutuldu.

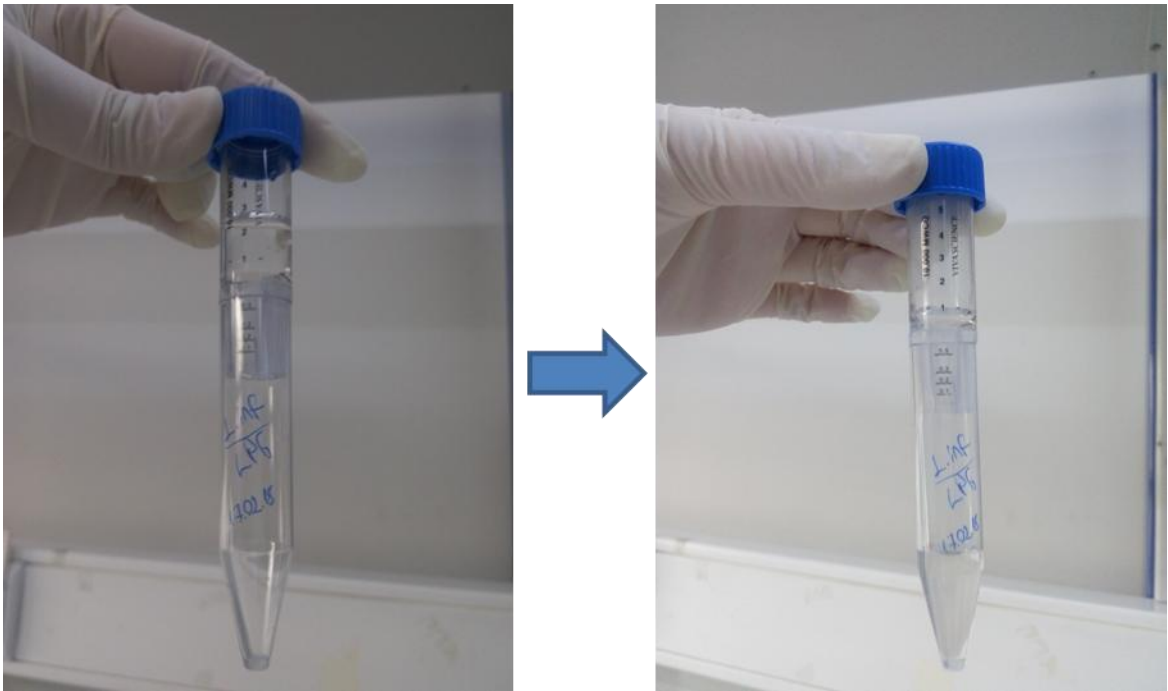
### **Protein Açısından Saflığın Tayini**

Protein Açısından Saflığın Tayininde; Standart eğri oluşturmak için BSA (bovine serum albumin) stok çözeltisinden derişimi 0, 20, 40, 60, 80, 100 mg/l olacak şekilde hazırlanan (%0,9'luk NaCl'de) standart çözeltilerin absorbanları (280 nm'de) ölçülerek konsantrasyona karşı absorban grafiği çizildi.

Deney tüpüne ise analizi yapılacak LPG'den 10µl konuldu ve üzerine %0.9'luk NaCl eklendi. Spektrofotometre küvetlerine hazırlanan örnekten 1 ml koyuldu. Tüm örnekler ve standart çözeltileri için absorbands değerleri spektrofotometre cihazı ile 280 nm dalga boyunda ölçüldü.

### **LPG Molekülünün Amicon Filtreli Santrifüj Tüplerinde Saflaştırılması**

Büyük ölçekte amicon filtreli santrifüj tüplerinde saflaştırılma yapılmadan önce düşük konsantrasyonda LPG alınarak ön deneme yapıldı. Metot optimize edildikten sonra geriye kalan tüm LPG örneği için aynı işlemler yapıldı. Bu amaçla, 1 ml distile su filtreli santrifüj tüpüne konuldu ve üzerine oktil-sefaroze kolon kromatografisi sonrası elde edilen LPG'den 1 mg/ml konsantrasyonunda örnek eklendi ve pipetaj yapıldı. Tüp daha sonra +4°C'de 3500 rpm'de 10 dk boyunca santrifüjleme işlemine tabii tutuldu (Şekil 3.3). Santrifüj sonrası tüpe 1 ml distile su konulup pipetaj yapıldı ve tekrar santrifüjlendi. Bu işlem 10 kez tekrar edildi. Son olarak elde edilen alt faz ve üst faz örneklerine TLC yapıldı ve örnekler GPC'de analiz edildi.



Şekil 3.3 Amicon filtreli santrifüj tüplerinde LPG molekülünün saflaştırılması işlemi

### **Fenol Sülfürik Asit Yöntemi**

Fenol sülfürik asit metodu karbonhidratların varlığını tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Yöntemde standart olarak 1 mg/ml glikoz çözeltisi kullanıldı ve bu

çözeltiden 10, 20, 40, 60 ve 80 µl alınarak distile su ile 100 µl'ye tamamlandı. Kör çözelti olarak 100 µl su kullanıldı. LPG içeren örnekten 50 µl alınıp 100 µl'ye tamamlandı. Her bir örneğe ve standarda %80 fenol solüsyonundan 50 µl eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Ardından 2 mL % 98'lik konsantre sülfürik asit eklenip 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi (Şekil 3.4) ve her bir örneğin 490 nm'de UV'de absorbansı ölçüldü. Çıkan sonuçtan standart eğri yapıldığında bu eğriden CHO miktarı ölçülmüş olmaktadır.

LPG miktarını hesaplamak için “ $\mu\text{g LPG} = 1.25 \times \mu\text{g CHO}$ ” formülü kullanıldı. Şeker miktarına bağlı olarak oluşturulan standarda göre, saf LPG'nin içerdiği şeker miktarı hesaplandı.



Şekil 3.4 Fenol Sülfürik asit yöntemi için standart ve örnekler

### 3.2.5 İkili Emülsiyon (w/o/w) Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Nanopartikül Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Nanoformülasyonların hazırlanmasında ikili emülsiyon çözücü uçurma (w/o/w) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde ilk olarak etkin maddenin sulu çözeltisi polimeri içeren organik faz içerisinde dağıtılır. Elde edilen w/o emülsiyonu dış sulu faz içerisinde emülsifiye edilerek w/o/w ikili emülsiyonu elde edilir. Elde edilen w/o/w emülsiyonu,



antijen çözeltilisini içeren polimer çözeltisi damlacıklarını oluşturur ve çözücü buharlaştırıldıktan sonra, antijenin sulu çözeltilisini içeren nanopartikül süspansiyonu elde edilir. Bu süspansiyon santrifüjlenerek nanopartiküller elde edilir, su ile yıkama yapıldıktan sonra kurutlan nanopartiküller liyofilize olarak kurutulur ve daha sonra kullanılmak üzere donduruldu. Bu tez çalışması kapsamında hazırlanan Otoklavlanmış *Leishmania* antijen (OLA), çözücü *Leishmania* antijen (ÇLA) ve Lipofosfoglikan (LPG) kullanılarak nanopartiküler sistemler hazırlandı. Hazırlanan nanoformülasyonlarda kullanılan antijen türleri ve miktarları aşağıdaki çizelgede (Çizelge 3.3) verildi.

### 3.2.5.1 Nanopartiküllerin İkili Emülsiyon Çözücü Uçurma (w/o/w) Yöntemi İle Hazırlanması

Enkapsüle edilecek antijenler (her bir formülasyon için miktarları çizelge 3.3'de verilmiştir) 1 ml suda çözüldü, her bir formülasyon için 100 mg PLGA polimeri kullanıldı ve polimer 2,5 ml diklorometanda (DCM) çözüldü. Sulu fazdaki antijen çözeltisi organik fazdaki polimer çözeltisi ile karıştırıldı ve karışım 100 W sonikasyon altında 90 sn boyunca emülsiyon edildi. Elde edilen tekli emülsiyon 10 ml % 3 w/v polivinilalkol (PVA) çözeltisi üzerine eklendi. Aynı sonikasyon şartları uygulanarak elde edilen ikili emülsiyon (w/o/w) 35 ml % 0,1 w/v PVA üzerine eklenerek 350 rpm'de gece boyunca karışmaya bırakıldı. Nanopartiküllerin eldesinde kullanılan antijenlerin bilgileri Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Nanopartiküllerin eldesinde kullanılan antijen çeşitleri ve miktarları

Nanoformülasyon Kodu	Kullanılan Antijen Adı	Kullanılan Antijen Miktarı	Kullanılan Polimer Miktarı
-	-	-	100 mg
F1	LPG	50 mg	100 mg
F2	ÇLA	50 mg	100 mg
F3	OLA	50 mg	100 mg

F4	ÇLA +LPG	25 mg+25 mg	100 mg
F5	OLA +LPG	25 mg+25 mg	100 mg

### 3.2.5.2 Nanopartiküllerin Yıkınması ve Saflaştırılması

Elde edilen nanopartikül süspansiyonları 9000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi ve üst fazlar enkapsüle olmamış antijenin hesaplanabilmesi için ayrıldı. Pellet üzerine 35 ml distile su eklenerek yıkandı ve tekrar 9000 rpm’de 30 dakika santrifüjlendi. Yıkama işleminin 3 kere tekrarlanması ardından elde edilen tüm üst fazlar birleştirilerek yüklenmemiş antijen miktarı tayin edilmek üzere ayrıldı. Dipte kalan katı nanopartiküller liyofilize edilerek kurutuldu.

### 3.2.5.3 Elde Edilen Partiküllerin Karakterizasyonu

Elde edilen nanopartiküller öncelikle reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesinin tayini gibi analizler ile incelendi. Daha sonrasında nanopartiküllerin detaylı karakterizasyon işlemleri için sırası ile boyut, zeta potansiyel ve çoklu dağılım indeksleri, SEM analizi, FT-IR analizi gerçekleştirildi.

### 3.2.5.4 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması

Üretilen nanopartiküllerin reaksiyon veriminin hesaplanması için elde edilen katı nanopartiküller tartıldı. Her bir nanopartikül için reaksiyon verimi hesaplandı.

$$\text{Reaksiyon Verimi } \% = \frac{\text{Üretilen Nanopartikül miktarı (mg)}}{\text{Kullanılan PLGA+Antijen Miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.4)$$

### 3.2.5.5 Enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanması

Enkapsülasyon etkinliği hesaplanması için her bir antijene ait kalibrasyon eğrisi kullanıldı. Üst fazların UV ölçümleri ÇLA ve OLA için 280 nm’de gerçekleştirildi. LPG için ise Fenol Sülfürik Asit yöntemi uygulandı. Enkapsülasyon etkinliği elde edilen UV değerlerine karşılık kalibrasyon eğrilerinden madde miktarlarının tayin edilmesi ile hesaplandı.

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği } \% = \frac{\text{Enkapsüle edilmiş antijen miktarı (mg)}}{\text{Başlangıç antijen miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.5)$$

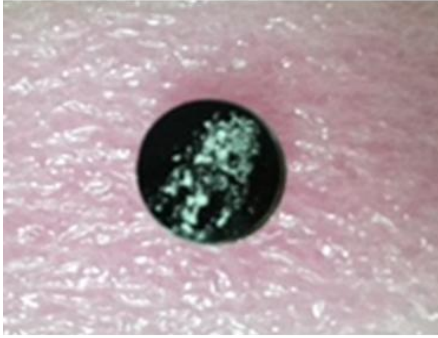
### 3.2.5.6 Yükleme veriminin hesaplanması

Yükleme verimi aşağıda verilen formüle göre, enkapsüle edilen antijen miktarının üretilen nanopartikül miktarına bölümü ile hesaplandı.

$$\text{Yükleme Verimi \%} = \frac{\text{Enkapsüle edilmiş antijen miktarı (mg)}}{\text{Üretilen nanopartikül miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.6)$$

### 3.2.5.7 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

Farklı antijenlerin yüklenmesi ile üretilen nanopartiküllerin yüzey morfolojileri ve şekilleri taramalı elektron mikroskopisi yöntemi ile incelendi. Çift taraflı karbon band üzerine yerleştirilen toz halindeki nanopartiküller öncelikle altın kaplama işleminden geçirildi daha sonrasında ise Zeiss EVO® LS 10 (Germany) model SEM mikroskop ile 5 kV da vakum altında morfolojik olarak incelendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Liyofilize edilmiş bir miktar örneğin karbon bant üzerine aktarılması ve örneğin altın kaplanması

### 3.2.5.8 Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi

Elde edilen nanopartiküllerin partikül boyutları; Dinamik Işık Saçılması yöntemiyle 4,0 mV He-Ne lazer lamba (633 nm) ile donatılmış Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) cihazında 25 °C'de  $\pm 0,1$  °C hassasiyeti ile gerçekleştirilmiştir. Tüm analizler otomatik modda ve 3 tekrar ile yapılmıştır. Zeta potansiyel ölçümleri ise kapiler kuvvetlerde Elektroforetik Işık Saçılması tekniği kullanılarak yine aynı cihazda 25 °C'de  $\pm 0,1$  °C hassasiyeti ile ve 3 tekrarda gerçekleştirilmiştir. Boyut ve Zeta potansiyel ölçümü için nanopartikül üretimi ile elde edilen süspansiyonlar 1/30 oranında seyreltildi ve gerekli ölçümler Malvern-Zetasizer NanoZS cihazı ile gerçekleştirildi.

### 3.2.5.9 Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi

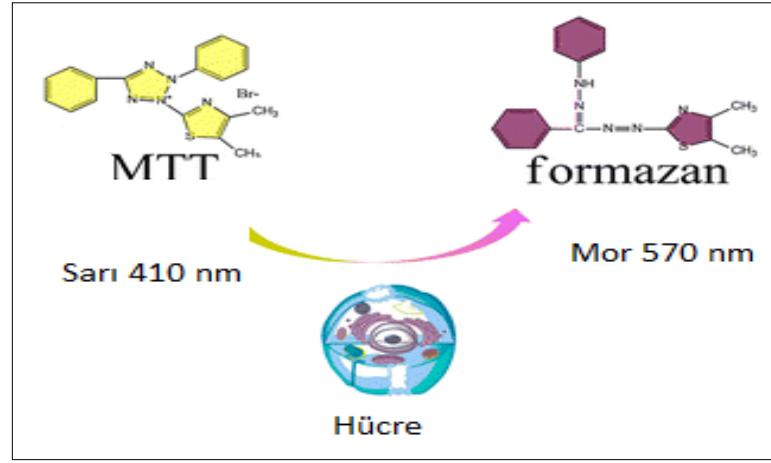
Elde edilen nanopartiküllerin fonksiyonel gruplarının analizi IR-Prestige 21 FTIR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçümler PLGA ve tüm nanoformülasyon için cihaz ATR modunda kullanılarak gerçekleştirildi. Herbir örnek için 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  dalgaboyu aralığında 4  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlükte ve 16 tarama ile gerçekleştirildi. Elde edilen spektrumlar boş PLGA NP ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

### 3.2.5.10 *In vitro* Salım Çalışmaları

*In vitro* salım çalışmaları nanopartiküllerin fizyolojik ortamı benzeri olan fosfat tampon çözeltisinde (pH=7.4) çözülmesi ile gerçekleştirildi. Salım için üretilen nanopartiküllerden 10'ar mg tartılıp 10 ml PBS tamponunda (pH=7.4) 37 °C'da karıştırıcılı inkübatörde (150 rpm) yatay olarak çalkalanarak gerçekleştirildi. Seçilen belirli zamanlarda (1 saat, 2 saat, 3 saat, 1, 2, 3, 4, 7, 12, 15, 19, 26, ve 30. gün) salım ortamı 9000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek üst fazın alınması ve yerine yeni salım ortamının konulması ile salım çalışması yürütüldü. Elde edilen salım ortamından nanopartikül içerisinden salının antijen miktarı analiz edilmiştir. Her bir analiz sonucu kümülatif olarak toplanarak salım çalışması sonlandırıldı.

### 3.2.6 J774 ve L929 Hücre Hatları Üzerinde Toksisitenin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) yönteminin prensibi, canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enziminin laktatı, prövata yükseltgerken açığa çıkan  $\text{NADH}^+$ 'nın sarı renkli MTT tuzunu mor renkli formazana ürününe dönüştürmesine dayanır (Şekil 3.6). Oluşan mor renkli formazan kristalleri çözündürülür ve absorbansı okunur. Absorbans değeri, canlılık ile doğru orantılıdır. Dolayısıyla canlı hücrelerin sayısı arttıkça absorbans yüksek çıkarken, canlılık azaldıkça absorbans da azalır.



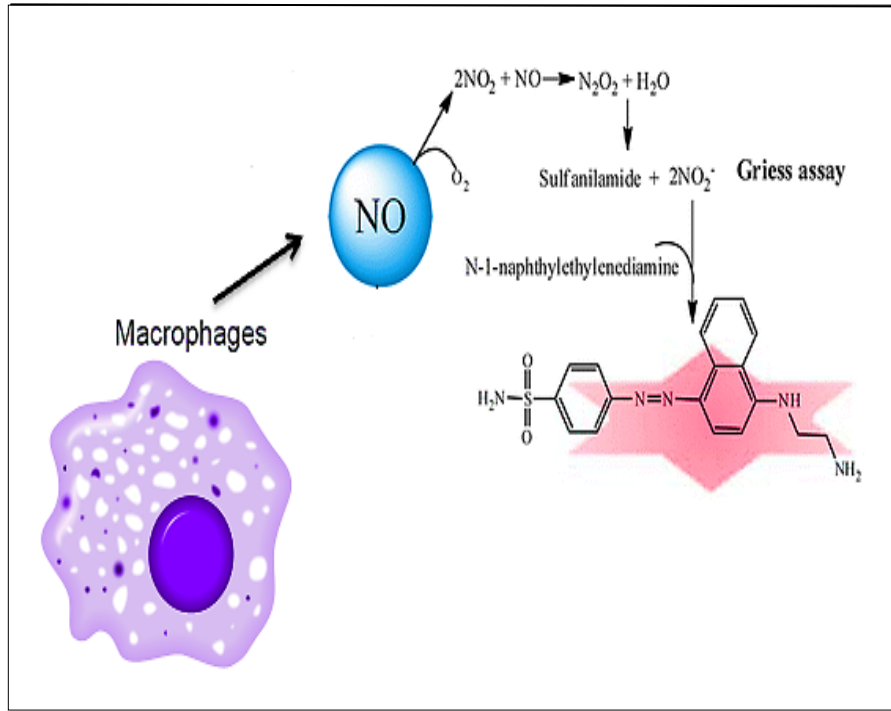
Şekil 3.6 Formazan kristallerinin oluşumu

Deneylerde kullanılacak PLGA NP, (ÇLA)PLGA, (OLA)PLGA, (LPG)PLGA, (ÇLA-LPG)PLGA ve (OLA-LPG)PLGA nanoformülasyonlarının hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkiye sahip olup olmadıklarını incelemek için MTT testi yapıldı.

Sitotoksikite testleri L929 hücresi ve *Leishmania* parazitleri için konak hücre olan J774 (makrofaj) hücrelerinde incelendi. Daha önce sayımı yapılan makrofaj ve fibroblast hücreleri ayrı ayrı 96 kuyucuklu plaklara kuyu başına 100  $\mu\text{l}$ 'de  $10^4$  hücre olacak şekilde ekildi. Hücre dağılımının eşit olduğu mikroskop ile incelendikten sonra, hücrelerin kuyucuklara tutunması için  $37^\circ\text{C}$ 'lik %5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde 24 saat inkübe edildi. 24 saatin ardından her bir nanoformülasyon konsantrasyonu 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Tüm örneklerin her konsantrasyonu için 4 tekrarlı çalışıldı. Tüm plakalar  $37^\circ\text{C}$ 'lik %5  $\text{CO}_2$  içeren etüvde 48 saat inkübe edildi. 10  $\text{mg}/\text{ml}$  konsantrasyonunda MTT çözeltisinden kuyu başına 10  $\mu\text{l}$  eklendi ve  $37^\circ\text{C}$ 'de 4 boyunca inkübasyona bırakıldı. Mor renkli formazan kristallerinin oluşumu invert mikroskopla incelendi. MTT reaksiyonu durdurmak için 100  $\mu\text{l}$  DMSO eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilip formazan kristallerinin çözüldüğü kontrol edildi. Aynı işlemler hücre bulunmayan sadece besiyeri konulmuş 96 kuyucuklu kuyularda antijen ve nanoformülasyonların plaklar eklenmesiyle kontrol grubu olarak gerçekleştirildi. Son olarak absorbans, 570 nm'ye ayarlanmış ELISA okuma cihazı yardımıyla gerçekleştirildi.

### 3.2.7 Nanoformülasyonlarının Makrofajların Nitrik Oksit (NO) Üretimi Üzerindeki Etkinliğinin İncelenmesi

NO ölçümü prensibi, spektrofotometrik olarak griss reaksiyonuna dayanarak yapılmaktadır. Bu reaksiyon iki adımda gerçekleşir ilk adımda Nitrik, Sülfanilamit ile etkileşerek diazonyum iyonu oluşur. Oluşan bu iyonlarda N-(1-Naftil)Etilendiamin ile etkileşerek kromoforik bir boya türüne (azo) dönüşür (Şekil 3.7). Son olarak oluşan pembemsi rengin absorbanansı 540 nm'de ölçülür.



Şekil 3.7 NO reaksiyonu

Sitotoksosite deneylerinin ardından, hücreler üzerinde toksik olmadıkları belirlenen nanopartikül formülasyonlarının makrofajların NO üretmeleri üzerindeki etkinliklerinin belirlendi. Bu amaçla, (ÇLA)PLGA, (OLA)PLGA, (LPG)PLGA, (ÇLA-LPG)PLGA, (OLA-LPG)PLGA nanoformülasyonları deney grubu ve PLGA nanopartikülleri ve PBS kontrol olarak kullanıldı. Bunun için,  $1 \times 10^5$  J774 makrofaj hücresi mikropaklara ekildi. 24 saat inkübasyonun ardından, nanopartiküllerin ve antijenlerin toksik olmayan konsantrasyonları hücreler üzerinde uygulandı. Hücreler 72 saat boyunca bu konsantrasyonlarda antijen kombinasyonlarına ve nanoformülasyonlara maruz bırakıldı. Bu sürenin ardından, tüm kuyucuklardaki süpernatantlar toplanarak ependorf tüplerine alındı. Nanopartiküllere maruz kalan ve kalmayan makrofajların ürettikleri

nitrik oksit miktarı Griess Reaksiyonu kullanılarak tespit edildi. Standartlardan ve NO ölçümü yapılacak kültür ortamından 50 µl alınarak 96 kuyulu plaka eklendi. Bu örneklerin üzerine 50 µl Griess reaktifi eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edildi. Son olarak 540 nm’de absorbans alındı. Standartların absorbans değerleriyle kalibrasyon eğrisi çizilir ve bu eğri yardımıyla örneklerdeki nmol/ml cinsinden NO miktarı belirlendi.

Standartlar ise aşağıdaki çizelge 3.4’de gösterildiği gibi hazırlandı.

Çizelge 3.4 NO standartlarının hazırlanması

Standart No	Nitrat Konsantrasyonu (µM)	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	-	-

### 3.2.8 Nanopartiküler Formülasyonlara Maruz Kalan Makrofajların (J774) Ürettikleri Sitokin Seviyelerinin İncelenmesi

Bu amaçla, IL-12, IFN-γ, IL-10 ve IL-4 sitokinleri incelendi. Formülasyonların makrofaj hücrelerindeki sitokin yanıtlarını incelemek için öncelikle  $1 \times 10^5$  J774 makrofaj hücresi 96 kuyucuklu mikropatlara ekildi. Bir gecelik inkübasyonun ardından, nanopartiküllerin ve antijenlerin sitokin testinde kullanılacak konsantrasyonu 500 µg/ml hücreler üzerinde uygulandı. Hücreler 72 saat boyunca bu konsantrasyonda antijen ve nanopartiküllere maruz bırakıldı. Bu sürenin ardından, tüm kuyucuklardaki süpernatantlar toplanarak eppendorf tüplerine alındı.

Makrofaj hücrelerinin oluşturduğu sitokin yanıtları ticari olarak temin edilen kit yardımıyla gerçekleştirildi.

Yıkama Tamponu (20X); 50 ml stoktan alındı ve distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı(1X).

Assay Tamponu (20X); 2,5 ml stoktan alındı ve distile su ile 47,5 ml'ye tamamlandı (1X).

Biotin Konjugat; 1:100 oranında assay tampon ile seyreltildi.

STREPTAVİDİN-HRP;1:200 oranında assay tampon ile seyreltildi.

Fare IL-12p70 Standart; Stok 400 pg/ml, Fare IFN- $\gamma$ , Fare IL-4 ve Fare IL-10

Kullanılacak kuyular 400  $\mu$ l yıkama tampon (1X) ile 2 kez yıkandı ve 10-15 dk bekletildi. Kuyular bir havlu üzerine boşaltıldı. Standart olarak kullanılacak tüm kuyulara ve blank kuyularına 100  $\mu$ l örnek seyreltme tamponundan eklendi. Örnekler için kullanılacak kuyulara 50  $\mu$ l örnek konuldu. Biotin Konjugat hazırlandı ve tüm kuyulara 50  $\mu$ l eklendi. Plate oda sıcaklığında (18-25°C) 2 saat bekletildi. Daha sonra tüm kuyular 4 kez 400  $\mu$ l yıkama tampon (1X) ile yıkandı ve ardından Streptavidin-Hrp çözeltisinden tüm kuyulara 100  $\mu$ l eklendi. Plate oda sıcaklığında (18-25°C) 1 saat bekletildi. Ardından tüm kuyular 4 kez 400  $\mu$ l yıkama tampon (1X) ile yıkandı. Yıkamanın ardından TMS substrat çözeltisinden tüm kuyulara 100  $\mu$ l eklendi. Plate oda sıcaklığında karanlıkta 10 dk inkübe edildi. En konsantre standart (std 1) koyu mavi olduktan sonra tüm kuyulara 100  $\mu$ l durdurma solüsyonundan eklendi. Hemen 450 nm'de ELISA okuyucuda okuma yapıldı.

### **3.2.9 Deney Hayvanlarının İmmünizasyonunda Kullanılmak Üzere Nanopartiküler Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması**

Deney hayvanlarının immünizasyonunda kullanılacak nanoformülasyonlar aşağıdaki çizelgede görüldüğü şekilde hazırlandı. Hazırlanan formülasyonlar için kullanılan nanopartikül miktarı, enkapsüle edilen antijen miktarı ve 1 mg nanopartikül içindeki antijen miktarları hesaplandı.



Çizelge 3.5 Formülasyonlar ve 1 mg nanopartikül içindeki antijen miktarları

Nanopartikül No	Nanopartikül Adı	Enkapsüle Edilen Antijen (mg)	Üretilen nanopartikül (mg)	Antijen miktarı (mg Nanopartikül)
-	Boş np (PLGA)	-	93	-
F1	(LPG)PLGA	4,2	31,2	0,13
F2	(ÇLA)PLGA	15,7	93,1	0,16
F3	(OLA)PLGA	9,5	31,2	0,13
F4	(ÇLA-LPG)PLGA	LPG: 3,2	56	LPG: 0,056
		ÇLA: 6,9		ÇLA: 0,12
F5	(OLA-LPG)PLGA	LPG: 3,5	28	LPG: 0,12
		OLA: 8,1		OLA: 0,28

### 3.2.10 Hazırlanan Nanopartiküler Formülasyonlar ve Antijenler ile Deney Hayvanlarının İmmünizasyonu

Deney hayvanları ile ilgili uygulamalar Bezmialem Vakıf Üniversitesi Araştırma Merkezi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. 6-8 haftalık dişi Balb/c fareler 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda tutuldu.

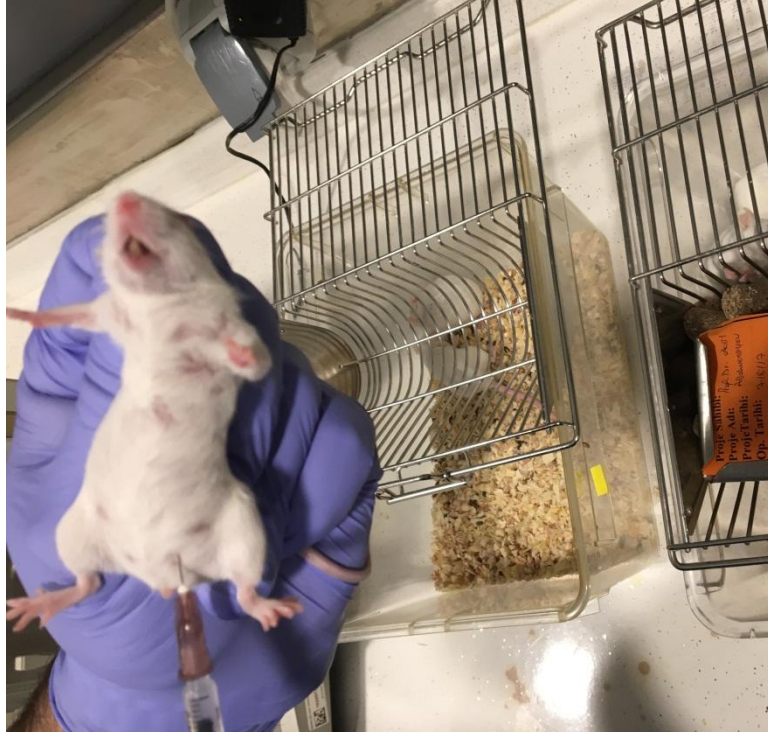
*In vitro* elde edilen sonuçlar doğrultusunda, nanopartiküllerde bulunan antijen miktarlarına dayanarak aşı formülasyonları hazırlandı. Bunun için, her bir fareye ÇLA için 200 µl'de 150 µg, OLA için 200 µl'de 180 µg ve LPG için 200 µl'de 120 µg olacak tartılıp homojen şekilde çözümlenerek formülasyonlar hazırlandı. Aşağıdaki çizelgede immünizasyon grupları sunulmuştur.

Çizelge 3.6 İmmünizasyon Grupları

<b>No</b>	<b>İmmünizasyon Grupları</b>
1	PBS
2	PLGA NP
3	ÇLA-LPG
4	OLA-LPG
5	(LPG)PLGA NP
6	(ÇLA)PLGA NP
7	(OLA)PLGA NP
8	(ÇLA-LPG)PLGA NP
9	(OLA-LPG)PLGA NP

### 3.2.11 Aşı Formülasyonlarının BALB/C Farelere Enjekte Edilmesi

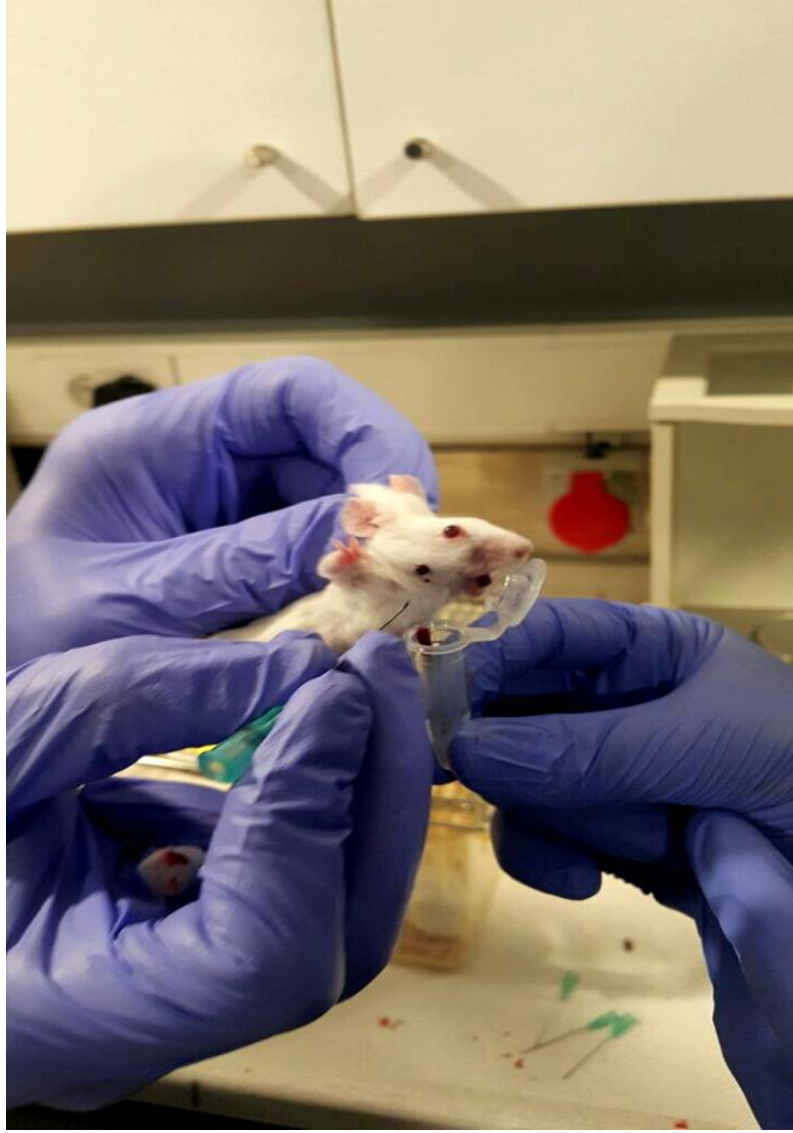
Enjekte edilecek aşı formülasyonları daha önce bahsedildiği gibi 100 µl PBS içerisinde hazırlandı. Hazırlanan aşı formülasyonları farelere intraperitoneal olarak enjekte edildi (Şekil 3.8). Enjeksiyonun ardından, oluşan antikor yanıtını incelenmek için iki haftada bir farelerden serum örnekleri alındı.



Şekil 3.8 Farelerin intraperitoneal enjeksiyonu

### 3.2.12 BALB/C Farelerden Serum Örneklerinin Alınması

Kan örnekleri, submandibular bölgeden ependorf tüpler içerisine alındı (Şekil 3.9). Tüm hayvanlardan kan alımını işleminin ardından tüpler, 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar diğer ependorf tüplerine alıktlandı ve ELISA yöntemi ile analiz edilinceye kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Farelerden kan alma işlemi şimdiye kadar 16 hafta boyunca iki haftada bir olacak şekilde devam ettirildi.



Şekil 3.9 Farelerden kan alımı

### **3.2.13 ELISA (Enzyme-linked İmmunosorbent Testi) ile Serum Örneklerindeki Antikor Miktarının Tayini**

Her bir fare grubuna uygun olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklar antijenlerle (ÇLA, OLA, LPG, ÇLA-LPG, OLA-LPG) kaplandı. Bunun için her bir kuyuda 1 µg antijen olacak şekilde, 0,05 M karbonat kaplama çözeltisi (coating buffer, pH: 9,6) içerisinde antijenler hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiden her kuyucuğa 100 µl eklendi ve bir gece +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bir gece inkübasyondan sonra plaklar PBS /Tween20 ile ELISA plaka yıkama cihazında 3 kez yıkandı. %2'lik olacak şekilde kaplama solüsyonu içerisinde süt tozu eklenerek hazırlanan çözeltiden plaklara 100 µl eklenerek 37°C'de örnek 1 saat inkübe edildi. Böylece plaklarda antijen ile kaplanmayan boş yerler de kaplanmış olur.

Süt tozu ile 1 saat inkübasyonun ardından plaklar 3 kez PBS/Tween 20 ile yıkandı. Farelerden alınan serum örnekleri 1:50 oranında % 2'lik süt tozu içeren PBS/Tween20 ile seyreltildi. Negatif kontrol grupları ve deney gruplarından seyreltilen serumlar kuyulara 100 µl olacak şekilde eklendi. 37°C'de bir saat inkübasyondan sonra plaklar 3 kez PBS/Tween 20 ile yıkandı. Ardından 1:1000 oranında PBS/Tween20 ile seyreltilen anti-mouse polivalen Ig (IgG, IgM, IgA) çözeltisinden her kuyuya 100 µl eklendi. Bir saat 37°C'de oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından plaklar 5 kez PBS/Tween 20 ile ELISA plaka yıkama cihazında yıkandı. Plakların yıkamasının ardından PNNF substrat çözeltisinden (1mg/ml) 100 µL kuyulara eklendi ve 45 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Daha sonra 405 nm'de ELISA okuyucuda absorbanlar ölçüldü.

#### **3.2.14 Balb/c Farelerin Enfektif *L.infantum* Promastigotlarıyla Enfekte Edilmesi**

*In vitro* ortam koşullarında enfektivitesi ve virülansı arttırılmış amastigot-makrofaj kültüründen elde edilen *L. infantum* promastigotları ( $1 \times 10^7$ ) ile Balb/c farelerin intraperitoneal enjeksiyon yapıldı. Enfeksiyonun üzerinden geçen 1., 2., ve 4. haftalarda farelerden kan örnekleri alınıp Giemsa ve mikro kültür yöntemi ile parazit varlığı incelendi.

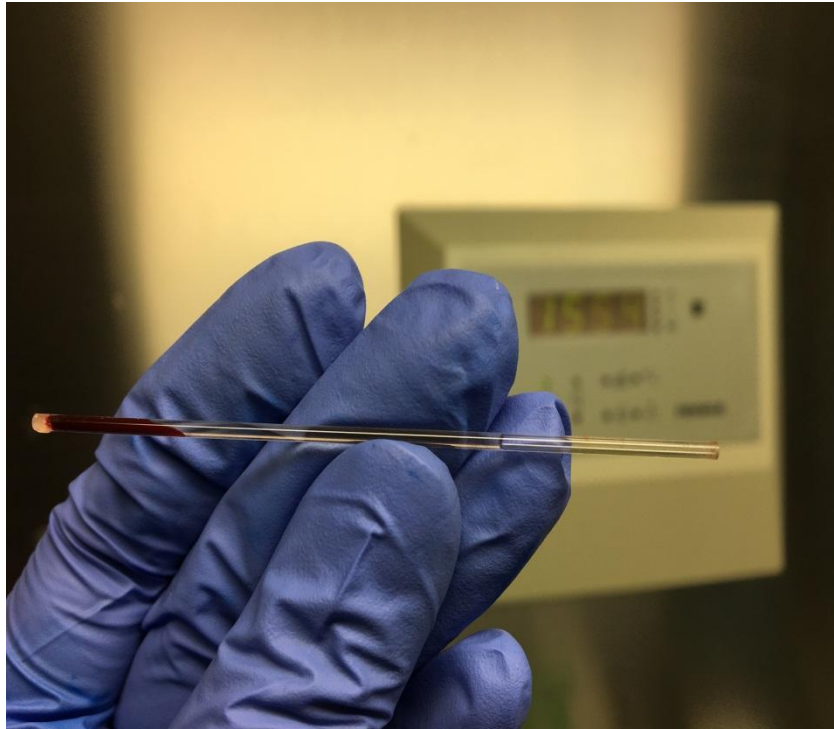
#### **3.2.15 Giemsa Boyama ve Mikro Kültür Yöntemi (MKY) ile Kandan Parazit Varlığının İncelenmesi**

Giemsa boyaması için kan örneklerinden 10 µl alınarak alkolle temizlenmiş lam üzerine yayma yapıldı. Lam üzerindeki örnek kurutuldu ve metanol ile 5 dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Yayma örnekleri kurutuldu ve 1:10 oranında sulandırılmış Giemsa boyası kullanılarak 30 dakika oda sıcaklığında boyama işlemi gerçekleştirildi. Giemsa ile boyanmış örnekler yıkandı ve kurutuldu. Son olarak ışık mikroskopunda (100x) immersiyon yağı kullanılarak incelendi.

Mikro kültür yönteminde kullanılmak için yukarıda bahsedildiği gibi kapiler tüplere alınan 60 µl kan örneği 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Serum bulunan üst fazı ile eritrositlerin bulunan alt faz arasında kalan buffy coat tabakası mikropipet yardımı ile alındı. %20 FBS içeren RPMI 1640 besiyerine alınan örnek, mikrokapiler tüplere

aktarıldı (Şekil 3.10). Kapiler tüplerin kenarları mum yardımı ile kapatılarak 27°C soğutmalı etüvde inkübe edildi. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu takiben mikrokapiler tüpler mikroskopta incelendi.

Sonuç olarak, kontrol gruplarındaki farelerden elde edilen kan örneklerinde parazit varlığının tespit edilmesi ve farelerde Leishmaniasis'e özgü lezyonların oluşmaya başlaması hastalık gelişmekte olduğunun bir göstergesi olarak kabul edildi. Kontrol grubunda lezyonların oluşmaya başlamasının ardından tüm gruplardaki farelerden örnekler alınarak hastalık gelişimindeki farklılıklar kıyaslı olarak incelendi.



Şekil 3.10 MKY yöntemi

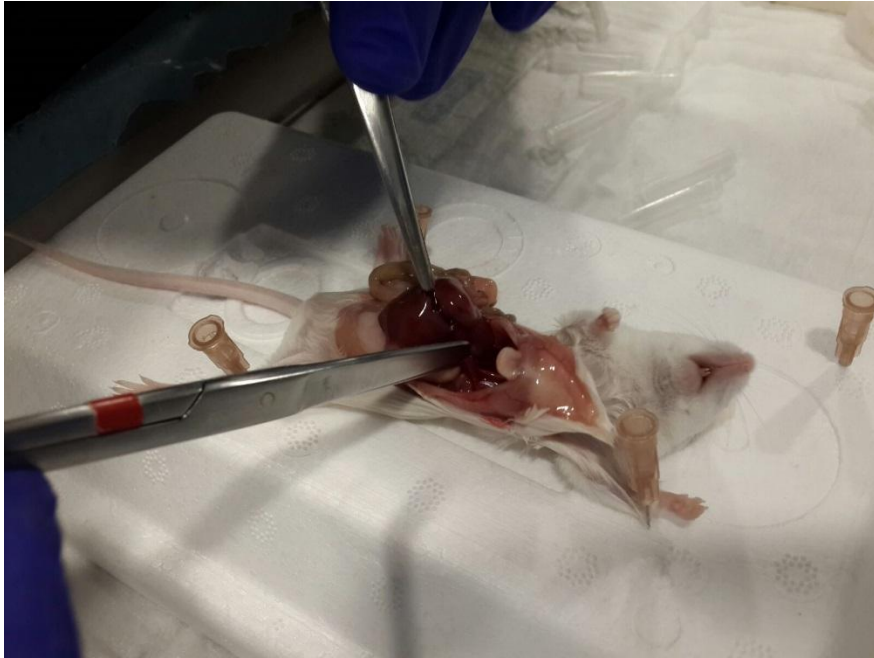
### 3.2.16 Enfektivitesinin Hesaplanması

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

$$\%Ei = 100 - \left( \frac{\text{İmmunize Farelerin Enfeksiyon İndeksi}}{\text{Kontrol Grubunun Enfeksiyon İndeksi}} \times 100 \right) \quad (3.7)$$

### 3.2.17 Farelerin Sakrifiye Edilmesi ve Organlarının Ayrılması

Kontrole göre yüksek immün yanıt oluşan tüm fareler, son immünizasyonunun ardından servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Sırtüstü yatırılan farenin derisi göğüs bölgesinden steril makas ve pens yardımıyla kesildi (Şekil 3.11). Daha sonra farenin periton boşluğu açılarak karın bölgesinin sol alt kısmından dalak çıkartıldı. Organların hızla ve travmatize etmeksizin steril olarak tartımları yapıldı (Şekil 3.12).



Şekil 3.11 Farelerden dalak ve karaciğerin çıkarılması



Şekil 3.12 Karaciğer ve Dalak tartımları

### 3.2.18 Karaciğer ve Dalaktan Yayma Hazırlanması ve Enfeksiyonun İncelenmesi

Sakrifiye edilen her farenin dalak ve karaciğeri alınıp tartıldı. 5 ml RPMI 1640 (%10 FBS) içeren 15ml'lik falkona koyulan dalaktan yağ ve diğer tutunan dokulardan steril makas ve pens ile uzaklaştırıldı (Şekil 3.13). Dalak steril şekilde 5 ml fenol redsiz RPMI 1640 içeren 100 mm petri kabına alındı. Enjektör içerisine 1 ml RPMI 1640 dolduruldu ve dalağa birkaç bölgeden enjekte edilip petri kabı içerisinde yıkanarak organ içerisinde kalmış fazla kan uzaklaştırıldı. Dalak ve karaciğerin kesilen parçalar RPMI-1640 içinde yıkandı ve kesik kısımları lam üzerine sürülerek yayma hazırlandı (Şekil 3.14). Karaciğerden ve dalaktan Leishman-Donovan Unit'in (LDU) hesaplanması için yayma hazırlandı.

Bunun için yayma örnekleri metanolde fikse edilip Giemsa boyama ile boyandı. Yaymalar immersiyon yağı ile mikroskopik (100x) olarak incelendi.

Her lam için en az 200 hücre incelendi ve hücrelerin içindeki parazitler sayıldı.

\*Parazit yükü Leishman-Donovan Units (LDU) kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

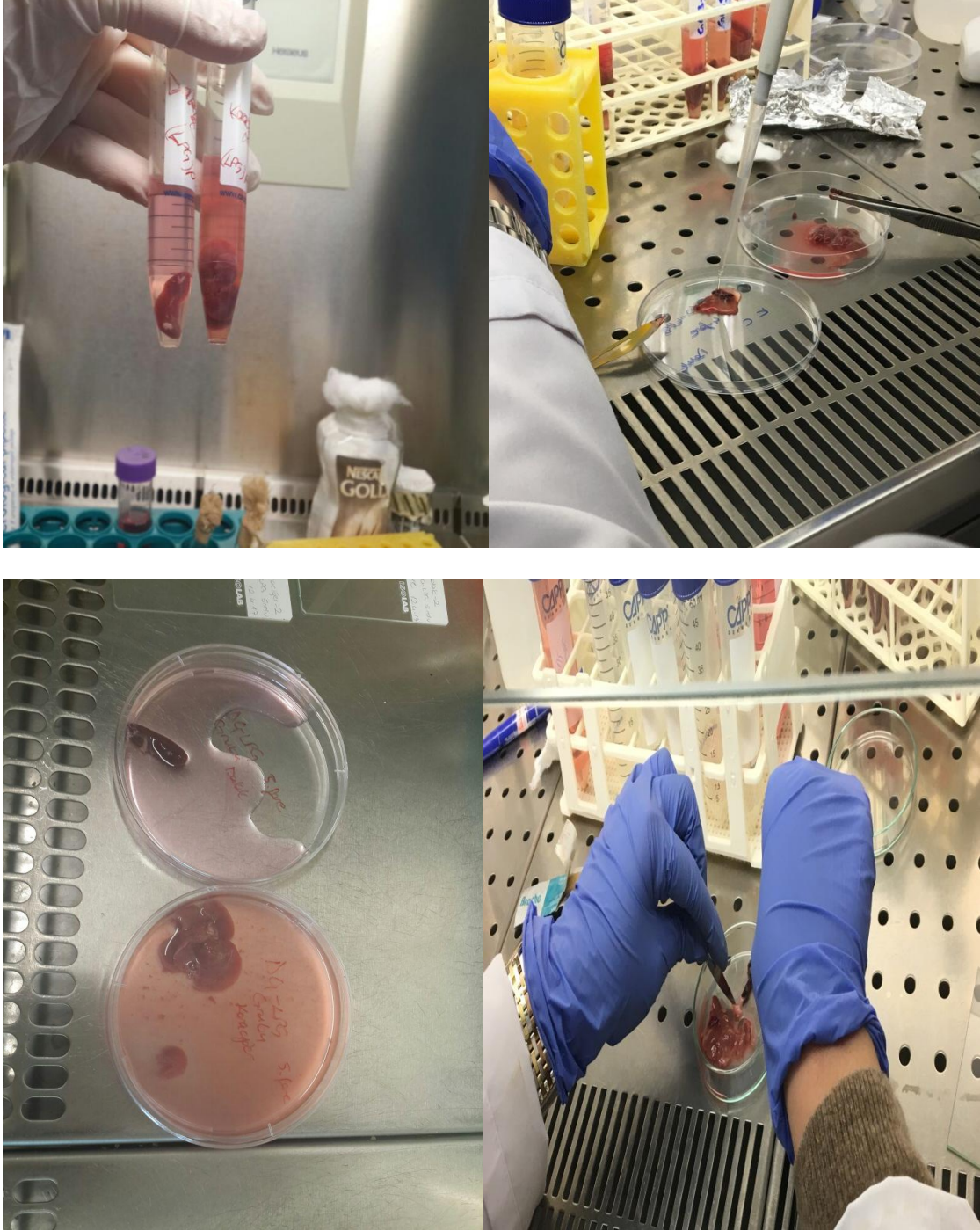
$$LDU = \frac{\text{Amastigot sayısı}}{\text{Karaciğer hücre çekirdeği}} \times \text{Milligram Cinsinden Organ Ağırlığı} \quad (3.8)$$

\*LDU değeri kullanılarak ise parazit sayısındaki % düşüş aşağıdaki formülle hesaplandı:

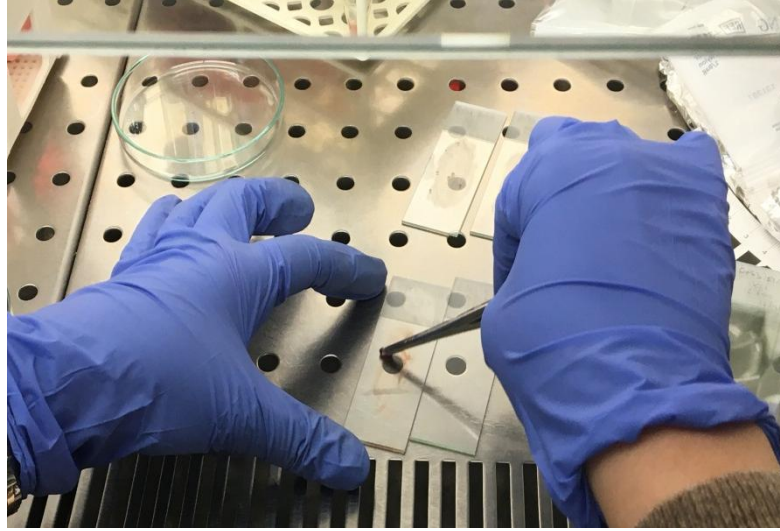


$$100 - \left[ \frac{(\text{immunize Grubun LDU Değeri})}{(\text{Kontrol Grubunun LDU Değeri})} \times 100 \right]$$

(3.9)



Şekil 3.13 Dalaktan yağ ve diğer tutunan dokuların uzaklaştırılması



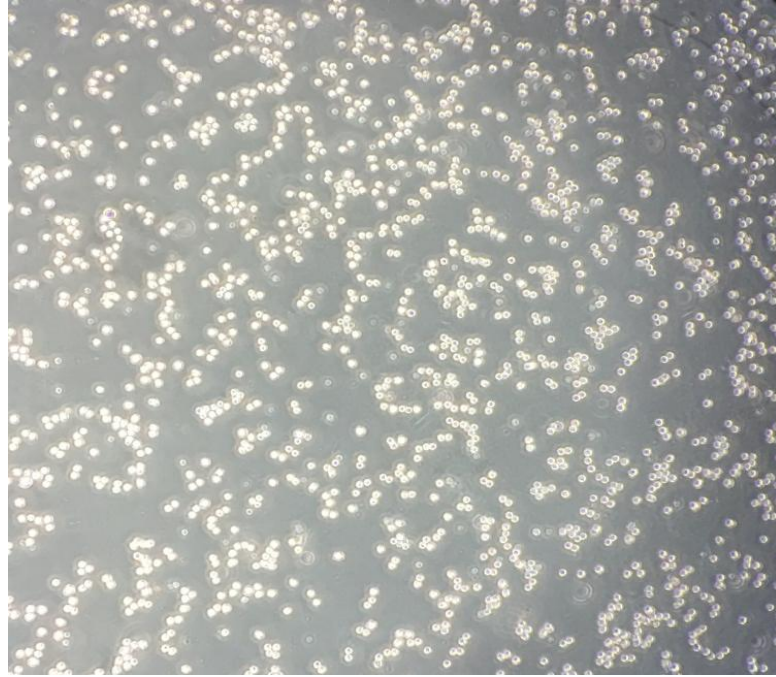
Şekil 3.14 Karaciğer ve Dalaktan yayma örneklerinin hazırlanması

### 3.2.19 Dalaktan Sitokin Üretiminin Değerlendirilmesi

Yıkanıp parçalanmış olan dalağın bir parçası yayma işlemi için kullanılmıştı. Geriye kalan kısmı 40 µm'lik filtre içerisinde steril bir enjektörün tersi ile iyice ezildi ve besiyeri ile yıkanarak hücreler filtreden süzüldü (Şekil 3.15). Süzülen hücrelerin thoma lamında sayımı yapıldıktan sonra  $1 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde fenol redsiz RPMI-1640 (%10 FBS) içeren 24 kuyulu plaklara ekildi (Şekil 3.16). Kültür ortamında her aşı grubu için antijenle uyarılmış ve uyarılmamış olmak üzere iki grup oluşturuldu. Uyarılmış gruplar için 10 µg LPG, ÇLA, OLA, LPG-ÇLA ve LPG-OLA kullanıldı, diğer gruplara ise sadece PBS eklendi. Daha sonra %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 37°C'de 72 saat süreyle inkübe edildikten sonra süpernatant toplandı ve sitokin ölçümü için -20° C'de saklandı.



Şekil 3.15 Dalaktan splenositlerin izolasyonu

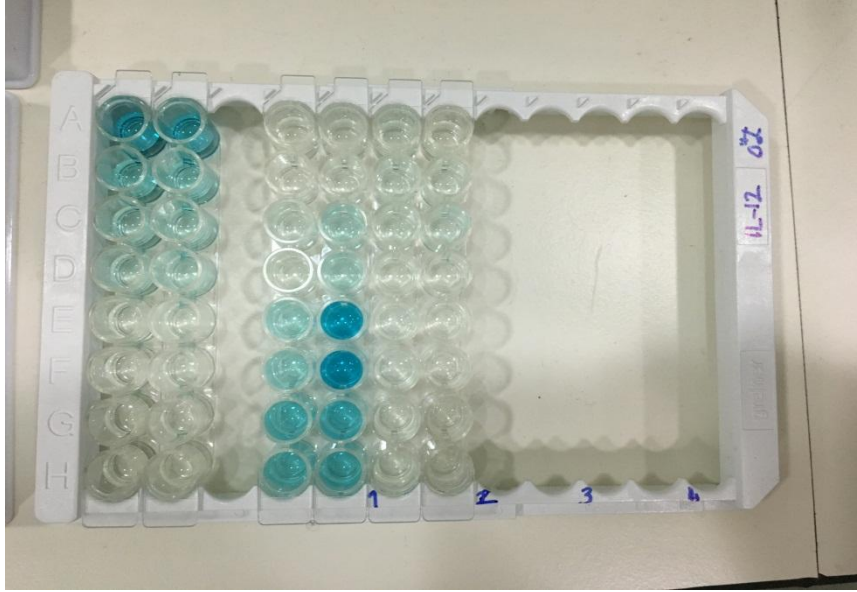


Şekil 3.16 Dalaktan izole edilmiş splenositlerin mikroskop görüntüsü (10X)

### 3.2.19.1 Interlökin 12 (IL-2) Miktarının ELISA ile Ölçümü

Anti-IL-12 kaplı olan ELISA plaklara ilk olarak Standart diluent ile 1,5, 3, 6, 12 ve 24 pg/ml olacak şekilde seyreltilmiş standartlardan 50 µl örneklerden (antijen ile uyarılmış ve uyarılmamış lenfosit kültüründen alınan süpernetant) ise 40 µl eklendi. Daha sonra örnekler üzerine Biotin- anti-mouse IL-12'den 10 µl eklendi. Ardından hem standartları hem de örnekleri içeren kuyucuklara Streptavidin-HRP solüsyonundan 50 µl eklendi ve

Biotin-Streptavidin bağlanması için 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından plak, yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Daha sonra tüm kuyucuklara kromagen A ve B çözeltilerinden sırayla 50'şer µl eklendi ve 37°C'de 10 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyonu takiben tüm kuyucuklara enzim substrat reaksiyonunu durdurmak için durdurma çözeltisinden 50 µl eklendi ve 450 nm'de ELISA mikroplak okuyucuda absorban ölçüldü (Şekil 3.17).



Şekil 3.17 Kit yardımı ile sitokin deneylerinin çalışılması

### 3.2.19.2 Interferon-γ (IFN-γ) Miktarının ELISA İle Ölçümü

Anti-IFN-γ kaplı olan ELISA plaklara ilk olarak Standart diluent ile 15, 30, 60, 125, 250, 500 ve 1000 pg/l olacak şekilde seyreltilmiş standartlardan 50 µl örneklerden (antijen ile uyarılmış ve uyarılmamış lenfosit kültüründen alınan süpernetant) ise 40 µl eklendi. Daha sonra örnekler üzerine Biotin-anti-mouse IFN-γ'dan 10 µl eklendi. Ardından hem standartları hem de örnekleri içeren kuyucuklara Streptavidin-HRP solüsyonundan 50 µl eklendi ve Biotin-Streptavidin bağlanması için 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından plak, yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Daha sonra tüm kuyucuklara kromagen A ve B çözeltilerinden sırayla 50'şer µl eklendi ve 37°C'de 10 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyonu takiben tüm kuyucuklara enzim substrat reaksiyonunu durdurmak için durdurma çözeltisinden 50 µl eklendi ve 450 nm'de ELISA mikroplak okuyucuda absorban ölçüldü.

### **3.2.19.3 Interlökin 4 (IL-4) Miktarının ELISA İle Ölçümü**

Anti-IL-4 kaplı olan ELISA plaklara ilk olarak Standart diluent ile 75, 150, 300, 600 ve 1200 ng/l olacak şekilde seyreltilmiş standartlardan 50 µl örneklerden (antijen ile uyarılmış ve uyarılmamış lenfosit kültüründen alınan süpernetant) ise 40 µl eklendi. Daha sonra örnekler üzerine Biotin- anti-mouse IL-4'den 10 µl eklendi. Ardından hem standartları hem de örnekleri içeren kuyucuklara Streptavidin-HRP solüsyonundan 50 µl eklendi ve Biotin-Streptavidin bağlanması için 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından plak, yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Daha sonra tüm kuyucuklara kromagen A ve B çözeltilerinden sırayla 50'şer µl eklendi ve 37°C'de 10 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyonu takiben tüm kuyucuklara enzim substrat reaksiyonunu durdurmak için durdurma çözeltilerinden 50 µl eklendi ve 450 nm'de ELISA mikropalak okuyucuda absorban ölçüldü.

### **3.2.19.4 Interlökin 10 (IL-10) Miktarının ELISA İle Ölçümü**

Anti-IL-10 kaplı olan ELISA plaklara ilk olarak Standart diluent ile 100, 200, 400, 800 ve 1600 ng/l olacak şekilde seyreltilmiş standartlardan 50 µl örneklerden (antijen ile uyarılmış ve uyarılmamış lenfosit kültüründen alınan süpernetant) ise 40 µl eklendi. Daha sonra örnekler üzerine Biotin- anti-mouse IL-10'dan 10 µl eklendi. Ardından hem standartları hem de örnekleri içeren kuyucuklara Streptavidin-HRP solüsyonundan 50 µl eklendi ve Biotin-Streptavidin bağlanması için 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından plak, yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Daha sonra tüm kuyucuklara kromagen A ve B çözeltilerinden sırayla 50'şer µl eklendi ve 37°C'de 10 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyonu takiben tüm kuyucuklara enzim substrat reaksiyonunu durdurmak için durdurma çözeltilerinden 50 µl eklendi ve 450 nm'de ELISA mikropalak okuyucuda absorban ölçüldü.

## **3.3 İstatistik Analiz**

*In vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonuçlarında anlamlılık ANOVA ve student t-test kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm veriler Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 19.0 for Windows) ile değerlendirilmiş ve  $p < 0.05$  istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## DENEYSEL SONUÇLAR

### 4.1 *In Vitro* Çalışma Sonuçları

#### 4.1.1 Makrofaj (J774) Hücre Kültürü Yapılması

Deneylerde kullanılacak J774 Makrofaj hücre hattının kültürleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi hücreler kültür alanını eşit dağılımlı kaplamış, morfolojik olarak intak ve uzantıları normaldir.



Şekil 4.1 Makrofaj (J774) ve Fibroblast (L929) hücre kültürü görüntüsü (10X)

#### 4.1.2 *L. infantum* Promastigotlarını Kültürünün Yapılması

LPG, ÇLA ve OLA gibi aşı antijenlerini elde edebilmek için öncelikle *L. infantum* kültürü gerçekleştirilmiştir. Invert mikroskopta incelenen hücrelerin hareketliliğinin aktif olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Kültür ortamında bulunan *L. infantum* promastigotların invert mikroskoptaki görüntüsü (20X)

#### 4.1.3 *L. infantum* (EP 126) Promastigotlarını Büyük ölçekli Kültürünün Yapılması

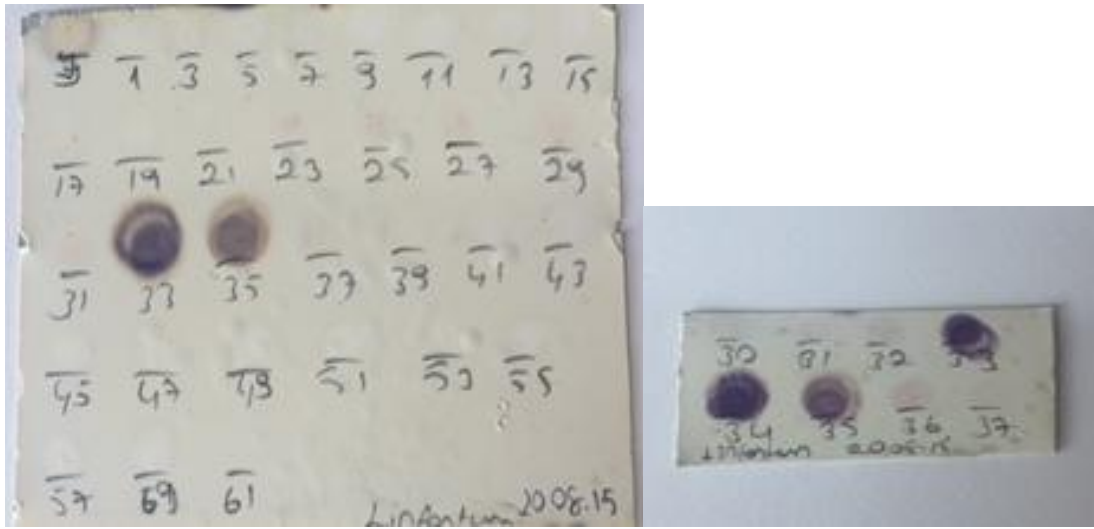
*Leishmania* parazitlerinden yeterli miktarda antijenlerin elde edilebilmesi için büyük miktarda parazit biyomasına ihtiyaç duyulmaktadır. Buna bağlı olarak küçük ölçekte aktif ve düzgün morfolojiye sahip promastigotlar (8-10 milyon/ml parazit) ölçek büyötmeye gidilerek önce 1 litrelik erlenmayere sonra da biyoreaktör sistemine geçildi. Elde edilen sonuçlara göre biyoreaktörde parazitlerin çoğaltılmasının parazit miktarına ve ortamın pH'ına bağlı olduğunu göstermektedir. Ancak erlenmeyerden farklı olarak burada parazitlerin sayısının 9 günlük kültür boyunca devamlı olarak arttığı ve pH değerinin ise sabit kaldığı saptanmıştır. 9. günün sonunda parazit sayısı 15 milyon/ml'ye ulaşmıştır. Erlenmeyerdeki büyük ölçekli kademeli parazit kültüründe parazit sayısının maksimum 10 milyon/ml'e ulaşmış olması nedeniyle, biyoreaktörde gerçekleştirilen büyük ölçekli kültürün daha verimli olduğu gözlemlenmiştir. Optimize edilmiş biyoreaktörde her büyük ölçekli parazit kültürünün yapılması sonucunda yaklaşık 10 ml parazit pelleti elde edildi. Maksimum parazit sayısına ulaşıldığı anda biyoreaktör sonlandırıldı ve kültürde bulunan parazitler santrifüj edilerek biyomas haline getirildi.



#### 4.1.4 *L.infantum* Parazitlerinden İzole Edilen LPG Molekülünün Karakterizasyonu

##### 4.1.4.1 İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi sonucuna göre, kapiler tüp ile TLC kağıdına uygulanan fraksiyonlara orkinol püskürtülmesinden sonra renk oluşumunun (mor renk) görülmesi fraksiyonun karbonhidrat varlığı yönünden pozitif olduğunu göstermektedir. Fraksiyonlarda oluşan mor renk, bu fraksiyonlarda glikokonjugat varlığını göstermektedir. Yapılan kromatografi sonrasında pozitif sonuç (mor renk oluşan) çıkan 33-36 aralığındaki fraksiyonlar toplandı (Şekil 4.3). Bu fraksiyonlardan bir kısım örnek analiz için ayrıldı, geri kalanı ise liyofilize edildi.

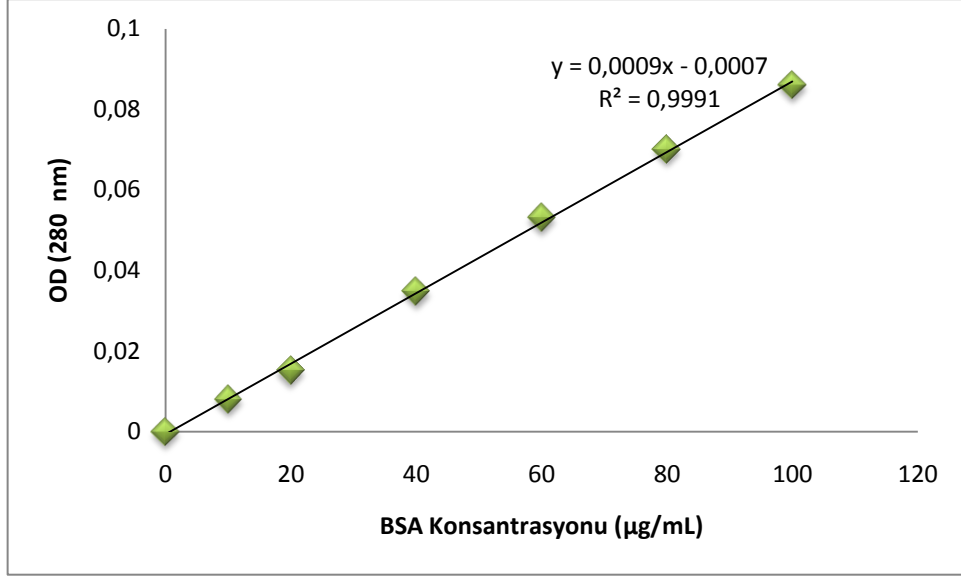


Şekil 4.3 İnce tabaka kromatografisi uygulaması ve pozitif sonuç alınan fraksiyonların (33-36) gösterimi

##### 4.1.4.2 Protein Açısından Saflığın Tayininin İncelenmesi

TLC sonrası toplanan pozitif fraksiyonlarda protein kirliliğini belirlemek amacıyla UV-spektrofotometre cihazında örneklerin 280 nm'deki absorbansı alındı. Kalibrasyon grafiği oluşturmak için BSA (bovine serum albumin) stok çözeltisinden derişimi 0, 20, 40, 60, 80, 100 mg/l olacak şekilde % 0,9'luk NaCl'de hazırlandı ve standart çözeltilerin absorbansları okutularak konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi (Şekil 4.4).

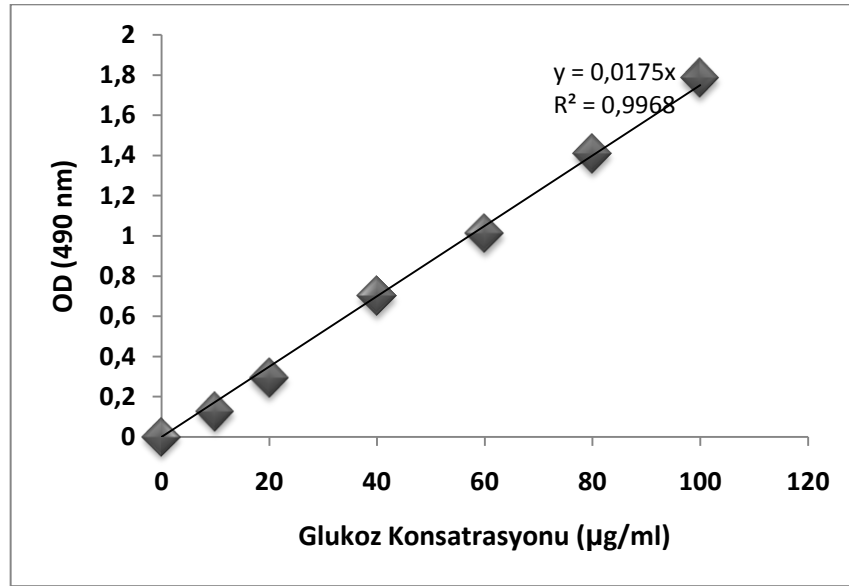
Elde edilen kalibrasyon grafiği yardımı ile örnek içerisinde protein miktarı hesaplandığında eser miktarda protein varlığı tespit edildi.



Şekil 4.4 Protein (BSA) kalibrasyon grafiği

#### 4.1.4.3 Fenol Sülfürik Asit Yöntemi ile LPG Miktarının Belirlenmesi

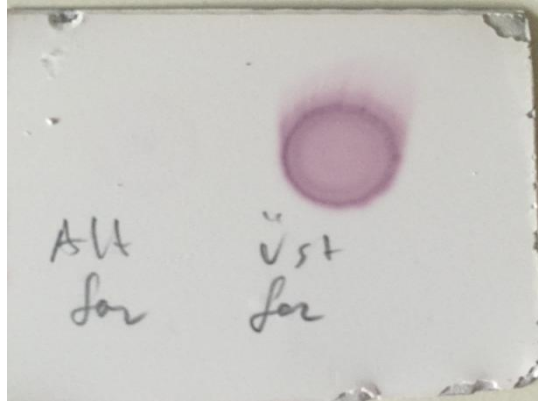
Fenol sülfürik asit yönteminde de LPG molekülünün sahip olduğu şeker ünitelerinin varlığı analiz edildi. Bu yöntemde monosakkaritlerin indirgen yapıya sahip olmaları nedeniyle asidik ortamda şekerlerin indirgenip fenol ile reaksiyonları sonucunda kahverengi bileşikler oluşturması prensibinden yararlanıldı. Kolon ile saflaştırılan LPG moleküllerinin 490 nm'de absorban değerleri okundu (Şekil 4.5). Her bir izolasyon ve saflaştırma sonrasında bu yöntem uygulanarak miktar tayini yapıldı.



Şekil 4.5 Fenol sülfürik asit yöntemi için hazırlanan standart eğri grafiği

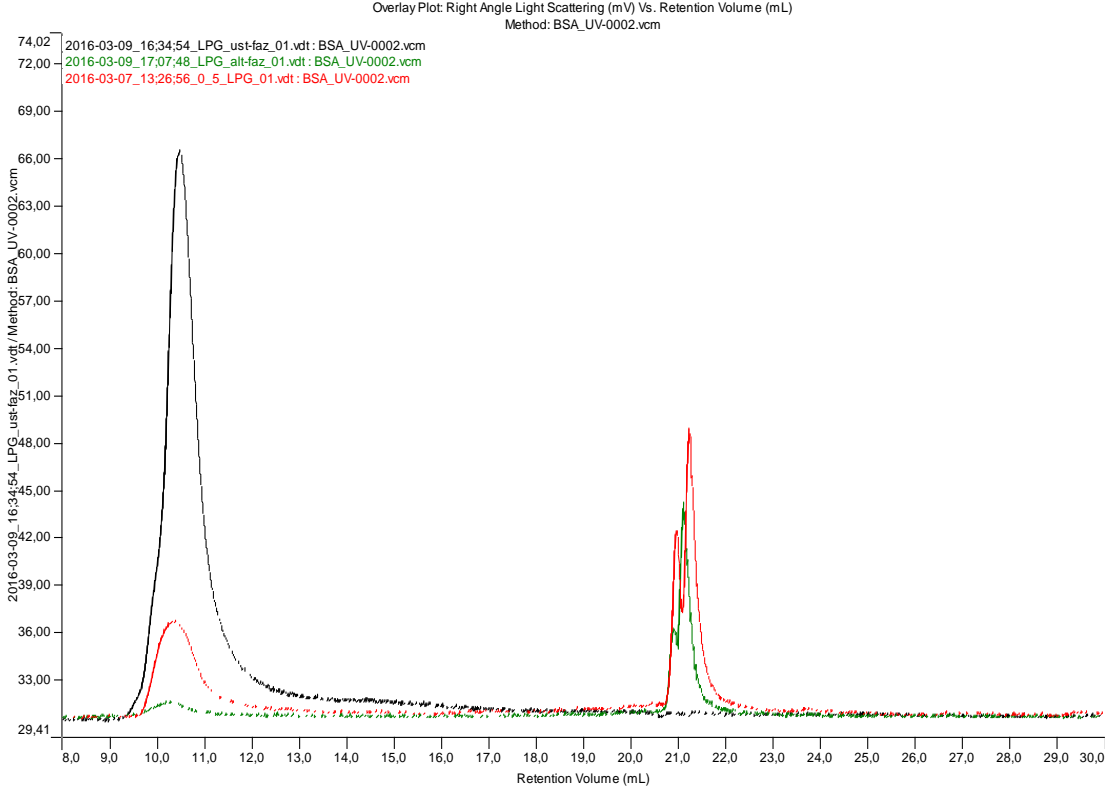
#### 4.1.4.4 LPG Molekülünün Amikon Filtreli Santrifüj Tüplerinde Saflaştırılması

İnce Tabaka Kromatografisi ve Fenol Sülfirik Asit yöntemleri kullanılarak karbonhidrat varlığı tayin edilmiş örnekteki LPG'nin molekül ağırlığının tayin edilebilmesi için Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) cihazına yüklendi. Elde edilen GPC sonuçlarına göre saflaştırılan LPG izolatında, LPG molekülünün yanı sıra, düşük moleküler ağırlığa sahip tuz kalıntılara rastlandı (Şekil 4.6). Bu kalıntıların temizlenmesi ve LPG izolatlarının saflaştırılması için, örnekler 50 kDa MWCO (Molecular Weight Cut Off) değerli amikon filtreli santrifüj tüplerinden (Sartorius) geçirildi.



Şekil 4.6 Amikon filtreli tüpte LPG molekülünün saflaştırılması sonucu TLC

Şekil 4.6'de görüldüğü üzere, TLC sonuçlarına göre amikon filtreli tüplerde santrifüj sonrası üst fazda LPG olduğu tespit edilirken, alt fazda LPG'ye rastlanmamıştır. Alt faz ve üst fazdan alınan örneklerin GPC cihazına yüklenmesi sonucu elde edilen sonuçlar da TLC sonuçlarını doğrulamaktadır (Şekil4.7).



Şekil 4.7 Kolon sonrası amicon filtreli tüplerde santrifüj edilen LPG örneklerinin GPC analizi (Siyah pik: üst fazdaki örneği, yeşil pik: alt fazdaki örneği, kırmızı pik: kolon sonrası santrifüjlenmeyen örneği)

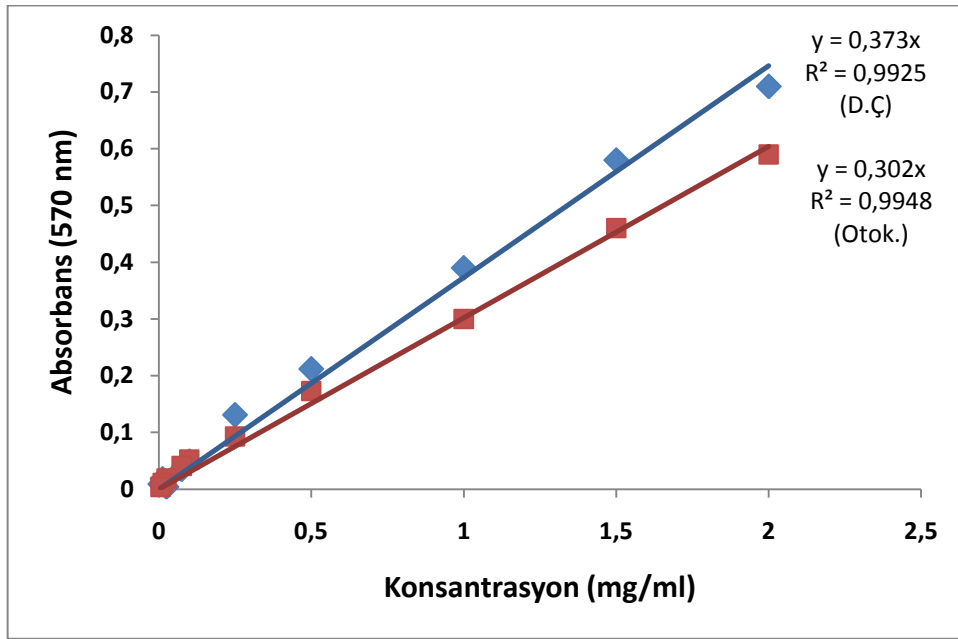
Şekilden de görüleceği üzere, örnekteki tuz kalıntılarına ait pikler kolon sonrası elde edilen ve santrifüj işlemi yapılmadığında yeniden gözlemlendi. Buna karşılık, santrifüj yapılan ve tüpünün üst kısmından alınan örneklerde yalnızca LPG molekülünün pik verdiği tespit edildi (siyah pik). Benzer şekilde tüpün alt kısmından alınan örneğe yapılan analiz sonucunda tuz kalıntılarına ait piklere rastlanırken LPG moleküne ait pik gözlenmemektedir (yeşil pik). Bu durum, santrifüj işlemi sonucu LPG molekülünün üst fazda kaldığını, buna karşılık tuz artıklarının filtreden geçerek alt haznede biriktiğini göstermektedir. Böylelikle izole edilen LPG molekülü yanında bulundurduğu tuz kalıntılarından arındırıldı.

#### 4.1.5 Polimerik Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

##### 4.1.5.1 Reaksiyon Verimi, Yükleme Verimi ve Enkapsülasyon Etkinliği Sonuçları

Sentezlenen nanopartiküllerin reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği ve yükleme verimi sonuçları aşağıdaki çizelgede sunuldu.

İkili emülsiyon yöntemi ile nanopartiküllerin elde edilmesinin ardından her bir nanoformülasyon kurutulup tartımları alındı. Ayrıca nanoformülasyonların yıkanması ve saflaştırılması aşamasında oluşan üst fazlardan nanofarmülasyonlarda (F1, F2, F3, F4 ve F5 ) LPG molekülünün yükleme veriminin hesaplanması için Fenol-Sülfürik asit yöntemi uygulanmıştır. Ancak yapılan bu analizlerde sonuç elde edilemedi. Bu sebeple GPC yardımıyla üst fazlardaki LPG miktarı hesaplandı ve Çizelge 4.1’de sunuldu. ÇLA ve OLA antijenleri ise bikenikonik asit yöntemi (BCA) ile tayin edildi.



Şekil 4.8 ÇLA ve OLA antijenlere ait BCA yöntemi standart eğrileri (A570nm)

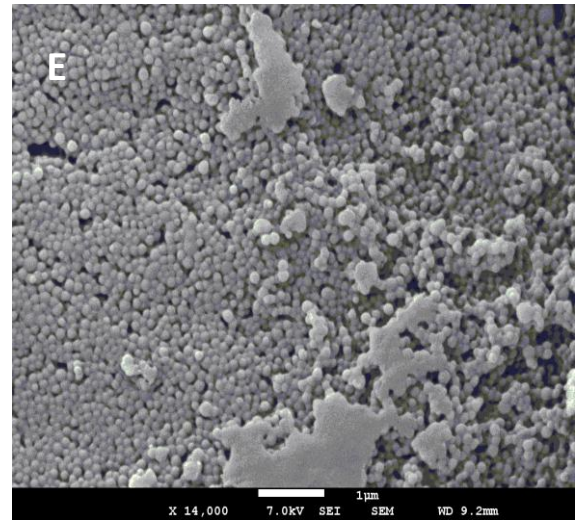
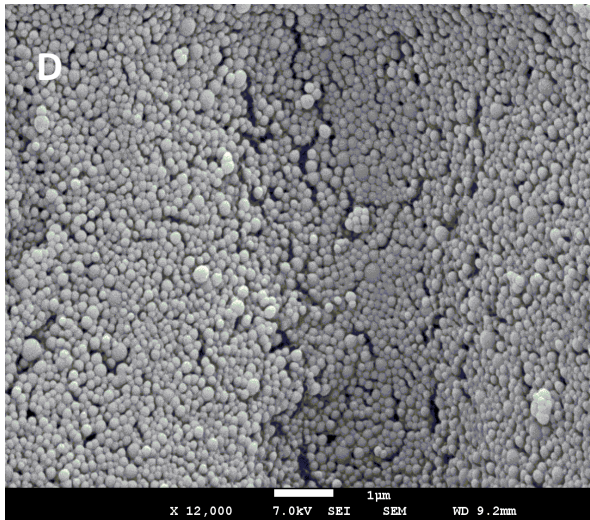
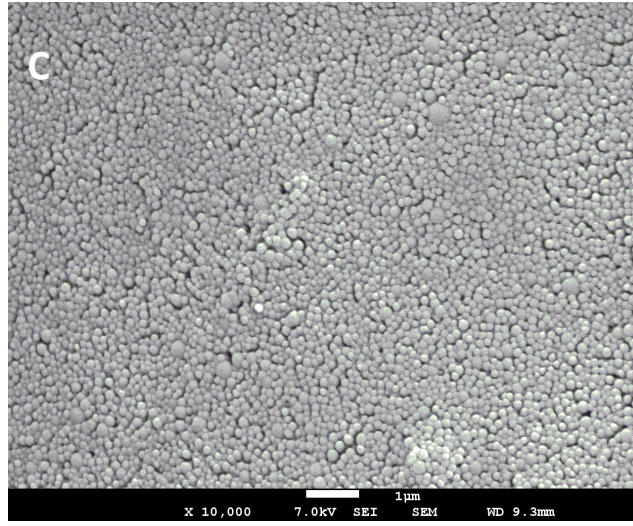
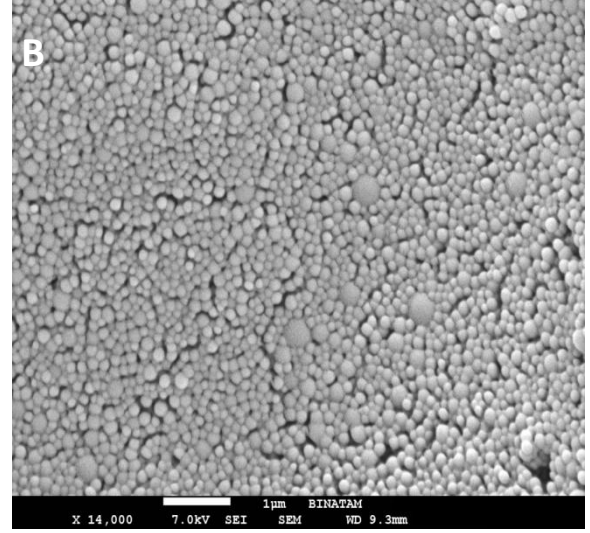
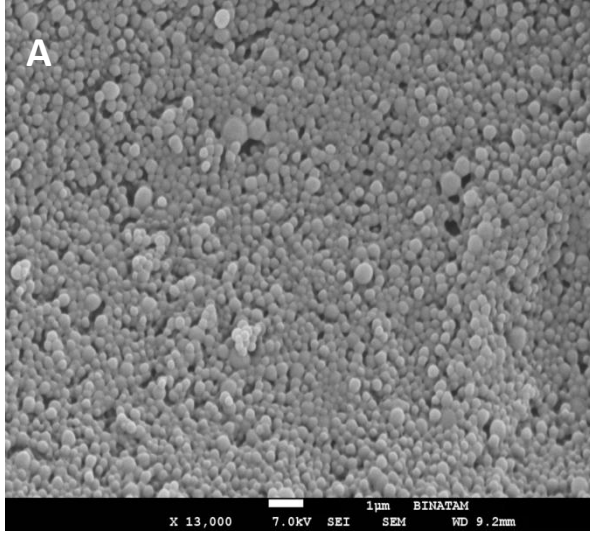
Çizelge 4.1 Nanopartiküller için reaksiyon verimi enkapsülasyon etkinliği ve yükleme verimi sonuçları

Nanoformülasyon kodu	Elde edilen nanopartikül miktarı (mg)	Reaksiyon verimi (%)	Enkapsüle olan antijen miktarı (mg)	Enkapsülasyon etkinliği (%)	Yükleme verimi (%)
PLGA NP	44,61	44,61	-	-	-
F1	56	37,33	4,2	8,4	16,86
F2	93,10	62,07	15,7	31,4	18,83

<b>F3</b>	67,90	45,27	9,5	19,1	14,1
<b>F4</b>	28	18,67	LPG: 3,2 ÇLA: 6,9	12,8	LPG: 5,6
				27,6	ÇLA: 12
<b>F5</b>	64,7	43,13	LPG: 3,5 OLA: 8,1	14,0	LPG: 12
				32,4	OLA: 28

#### 4.1.5.2 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

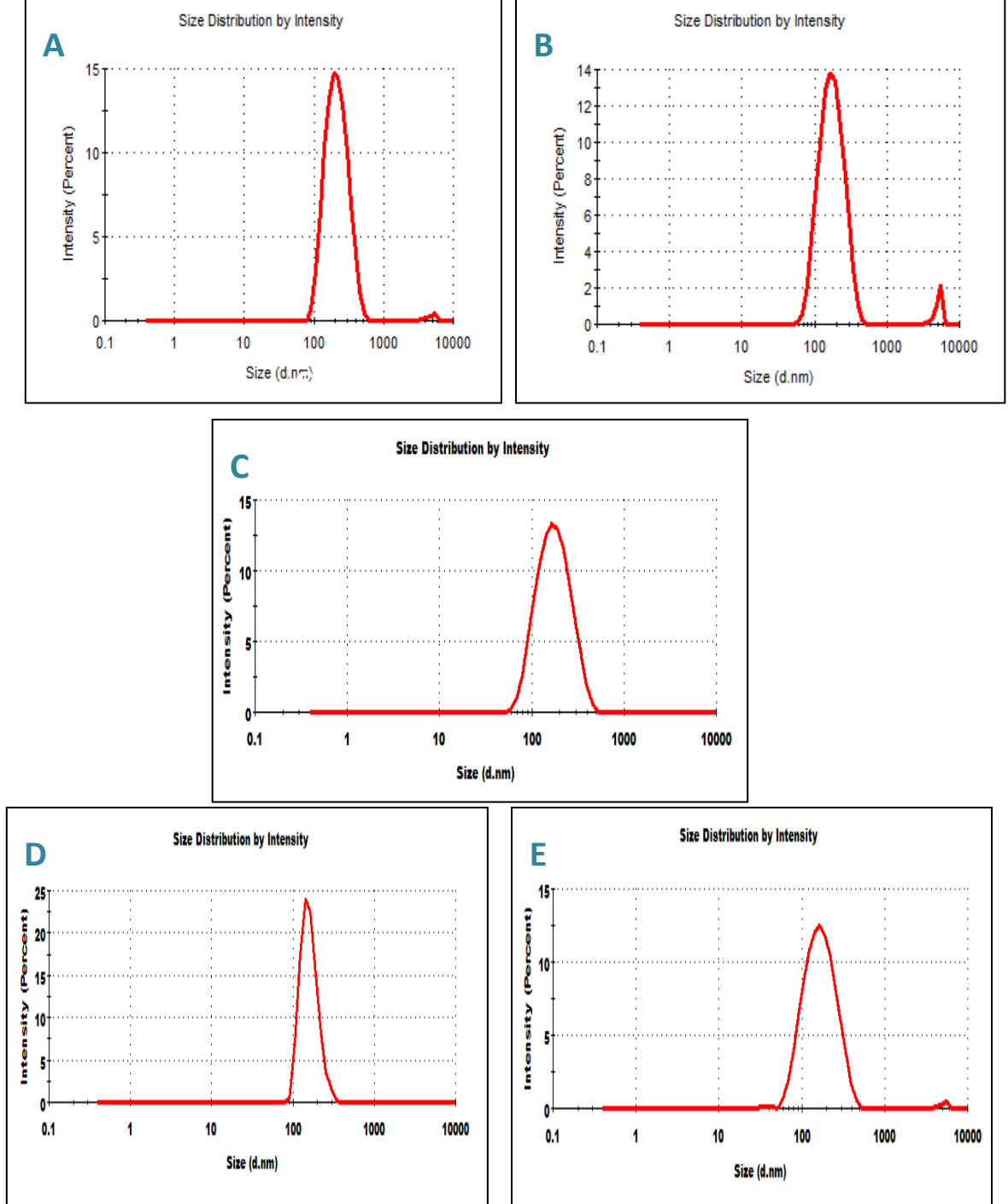
SEM analizi sonucu elde edilen görüntüler değerlendirildiğinde nanopartiküllerin küresel ve pürüzsüz bir morfolojide olduğu, boyut dağılımlarının genel olarak dar bir aralıkta olduğu görüldü. Sentezlenen nanoformülasyonların SEM görüntüleri aşağıda sunuldu (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Nanoformülasyonu SEM görüntüsü A. (ÇLA)PLGA, B. (OLA)PLGA, C. (LPG)PLGA D. (ÇLA-LPG)PLGA ve E. (OLA-LPG)PLGA

#### 4.1.5.3 Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi

Nanoformülasyonların Işık saçılmasına (Intensity) ait boyut analizi sonuçları Şekil 4.10'da görülmektedir.



Şekil 4.10 Nanoformülasyonların boyut analizi sonucu A. (ÇLA)PLGA, B. (OLA)PLGA, C. (LPG)PLGA D. (ÇLA-LPG)PLGA ve E. (OLA-LPG)PLGA



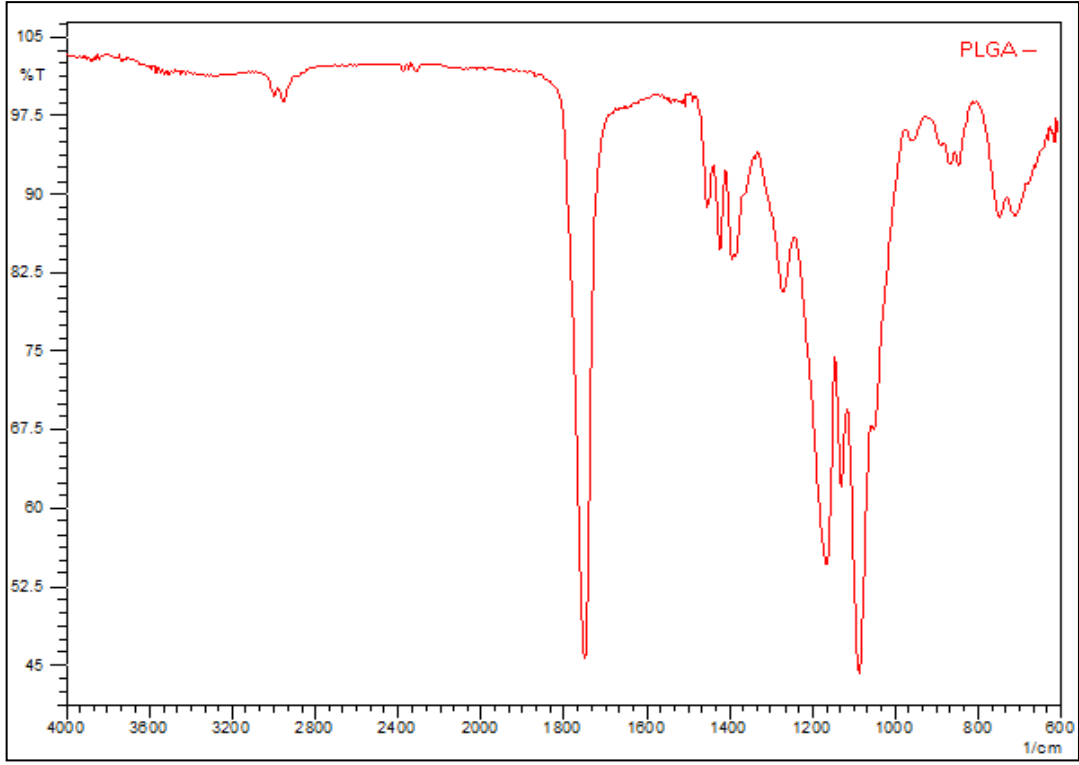
Zeta potansiyel nanopartiküllerin kararlılığını etkileyen önemli parametrelerden biridir. Üretilen nanopartiküllerin negatif yüklü olduğu ve zetapotansiyel değerlerinin  $-24,7 \pm 2,20$  mV ile  $-34,2 \pm 0,01$  mV arasında değiştiği görülmektedir (Şekil 4.10). Ölçülen negatif zeta potansiyel değeri nanopartiküllerin yüzeyindeki karboksil gruplarından (PLGA'ya ait) ve stabilizatör olarak kullanılan polivinilalkol (PVA)'den kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda yüksek negatif zeta potansiyeli nanopartikülün suda yada fizyolojik ortamda dispersiyonunu arttırmaktadır.

Çizelge 4.2 Nanoformülasyonların boyut, zeta potansiyeli ve PDI değerleri

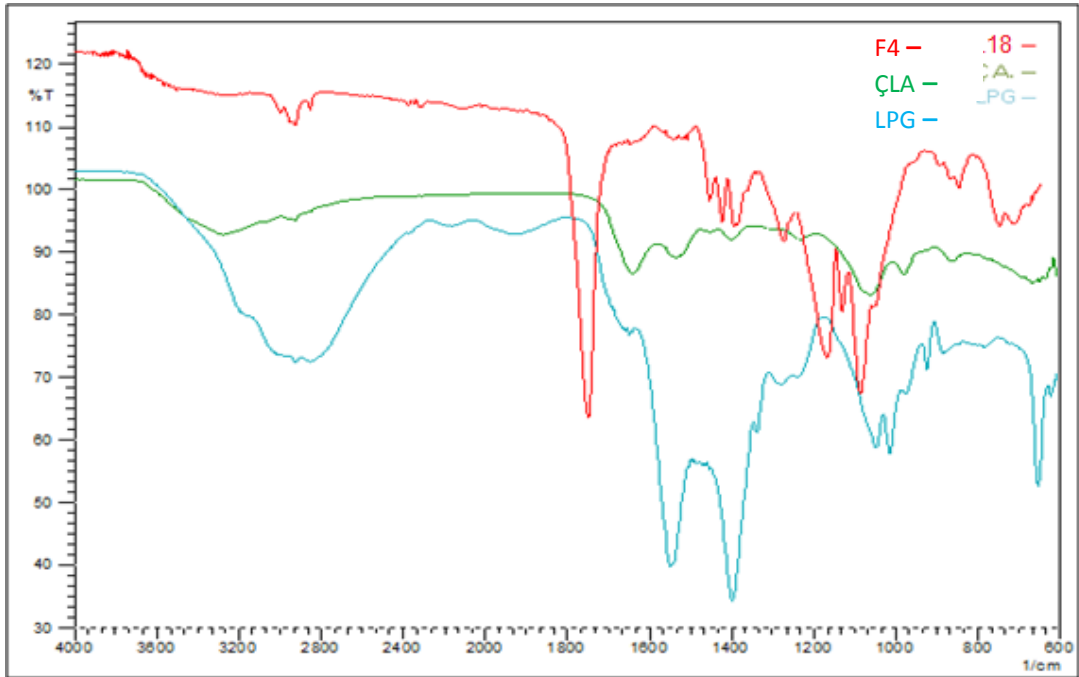
<b>Nanoformülasyon kodu</b>	<b>Z-Ave (nm) Ortalama Boyut</b>	<b>Zeta-Potansiyel (mV)</b>	<b>Çoklu Dağılım İndeksi (PDI)</b>
<b>PLGA NP</b>	$154,4 \pm 2,19$	$-27,6 \pm 0,89$	$0,182 \pm 0,035$
<b>F1</b>	$159,3 \pm 2,07$	$-34,2 \pm 0,99$	$0,142 \pm 0,01$
<b>F2</b>	$316,3 \pm 76,39$	$-24,7 \pm 2,20$	$0,464 \pm 0,088$
<b>F3</b>	$199,1 \pm 8,40$	$-25,9 \pm 1,40$	$0,372 \pm 0,061$
<b>F4</b>	$306,9 \pm 26,25$	$-28,0 \pm 1,36$	$0,403 \pm 0,079$
<b>F5</b>	$252,8 \pm 2,65$	$-30,9 \pm 1,67$	$0,187 \pm 0,024$

#### 4.1.5.4 Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi

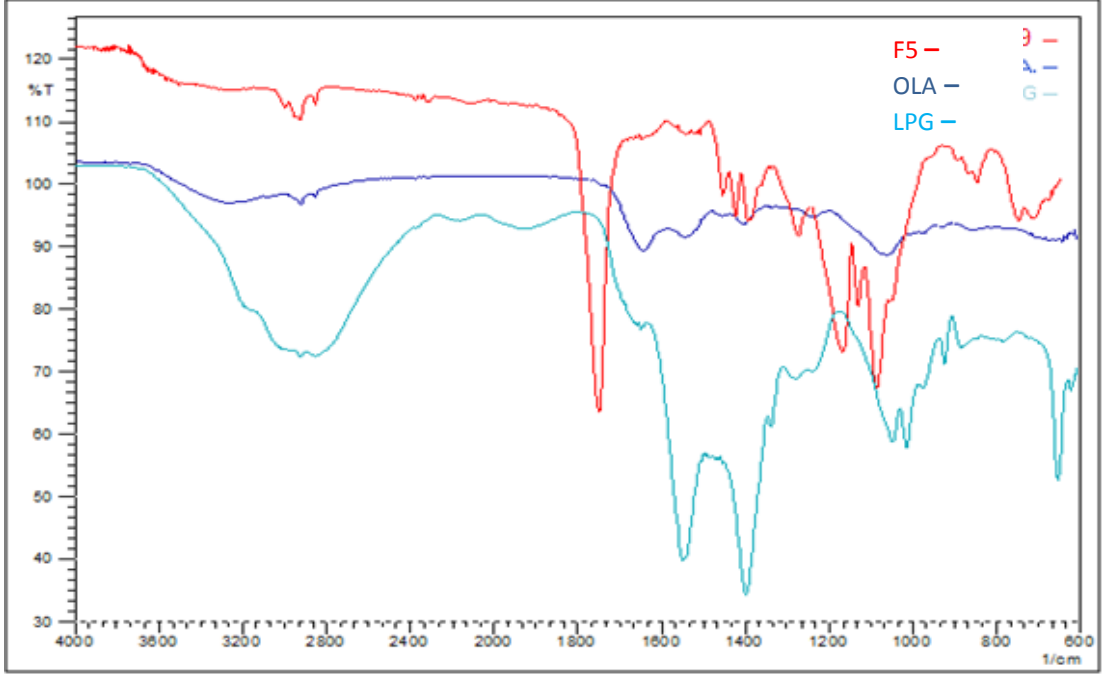
FTIR analizi sonucu elde edilen, antijen yüklü PLGA nanoformülasyonlarına ait spektrumlar, antijen içermeyen boş PLGA NP ile karşılaştırmalı olarak incelendi. Elde edilen farklı nanoformülasyona ait FTIR spektrumları aşağıdaki grafiklerde sunuldu (Şekil 4.11-4.13). Şekillerden görüleceği üzere, herhangi bir antijen içermeyen PLGA NP'den elde edilen spektrumun, nanoformülasyonlarla benzer özellikler gösterdiği anlaşılmaktadır.



Şekil 4.11 PLGA nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu



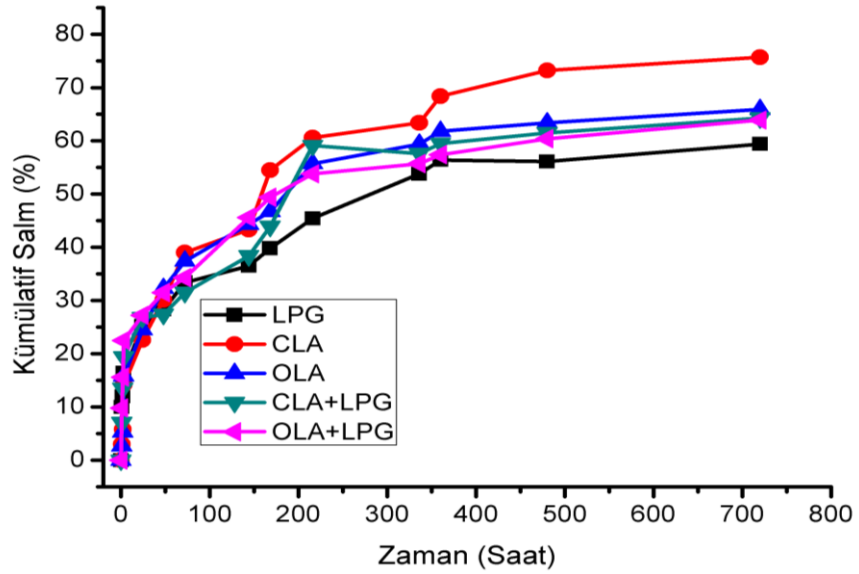
Şekil 4.12 ÇLA ve LPG antijenleri ile F4 (ÇLA-LPG) nanoformülasyonu FT-IR spektrumları



Şekil 4.13 OLA ve LPG antijenleri ile F5 (OLA-LPG) nanoformülasyonu FT-IR spektrumları

#### 4.1.5.5 Hazırlanmış Nanoformülasyonlarının In vitro Salım Etkinliğinin İncelenmesi

Nanoformülasyonlar (F1, F2, F3, F4 ve F5), fizyolojik ortam koşullarında (pH=7.4) 37 °C'da karıştırıcılı inkübatörde yatay olarak çalkalanarak inkübe edildi. Seçilen belirli zamanlarda salım ortamından antijen miktarı analiz edilerek aşağıdaki salım grafiği elde edildi. Her bir analiz sonucu kümülatif olarak toplanarak salım çalışması gerçekleştirildi.

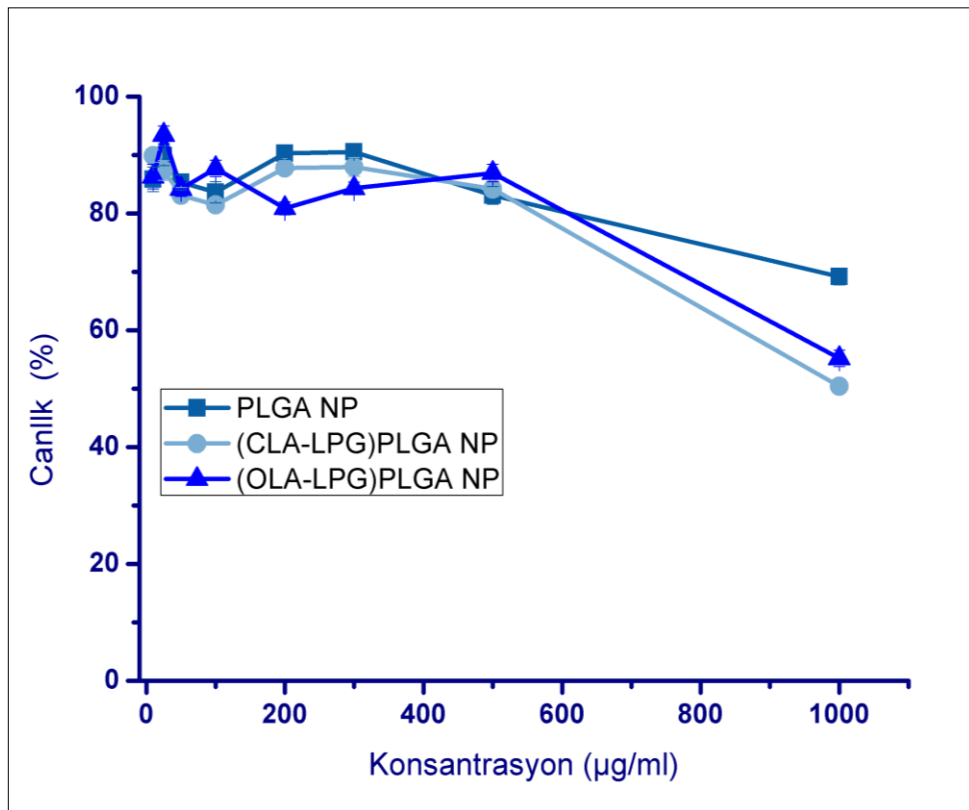


Şekil 4.14 Nanofromülasyonların kontrollü salım dinamiği

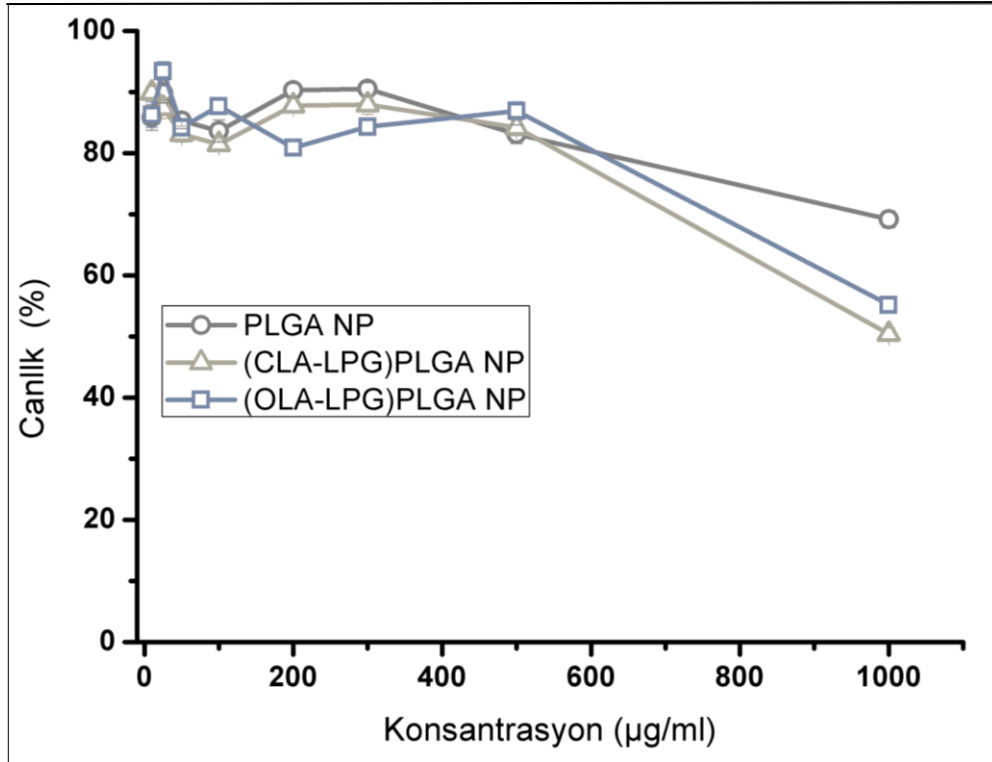
Şekil 4.14'den de görüldüğü gibi çeşitli antijenlerle enkapsüle edilmiş nanofarmülasyonların *In vitro* ortamda salımlarının gerçekleştiği ve 30 günde antijenlerin yaklaşık % 59,4 ile % 75,7 aralığında salındığı tespit edildi.

#### 4.1.6 Nanoformülasyonların J774 ve L929 Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksitesinin İncelenmesi

Sentezlenen formülasyonların ilk olarak fare makrofaj hücreleri (J774) ve Fibroblast (L929) üzerindeki toksik etkisi MTT yöntemi ile incelendi. Deneylerde nanopartiküllerin 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300 ve 500, 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarının toksisiteyi incelendi. Aşağıdaki grafiklerde nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlarına maruz kalan hücrelerdeki canlılık değerleri sunulmaktadır (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16). Grafiklerden de görüleceği üzere, nanopartiküllerin incelenen konsantrasyonlarında hem L929 hem de J774 hücreleri üzerinde 500 µg/ml'ye kadar toksik etkiye neden olmadığı tespit edildi ( $p < 0,05$ ).



Şekil 4.15 Nanoformülasyonların farklı konsantrasyonlarının L929 hücrelerinin canlılığına etkisi



Şekil 4.16 Nanoformülasyonların farklı konsantrasyonlarının J774 hücrelerinin canlılığına etkisi

#### 4.1.7 Uygulanan Aşı Formülasyonlarının Makrofajların Nitrik Oksit Üretimi Üzerindeki Etkinliğinin İncelenmesi

Yapılan sitotoksisite çalışmaları sonrasında, nanopartikül formülasyonlarının makrofajların nitrik oksit üretme potansiyelleri incelendi. Çalışmada tekli antijenleri içeren nanoformülasyonlar (F1, F2 ve F3) ve LPG ve ÇLA antijenlerinin kombinasyonunu içeren PLGA nanopartikülleri (F4) ve LPG ve OLA antijenlerinin kombinasyonunu içeren PLGA nanopartikülleri (F5) kullanıldı. Kontrol grubu olarak PBS ve PLGA NP kullanıldı. Bu formülasyonların 500 µg/ml'lik konsantrasyonuna maruz kalan hücrelerde oluşan nitrik oksit miktarları hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre aşı formülasyonlarının uygulandığı gruplarda üretilen NO miktarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığı tespit edildi. Herhangi bir aşı formülasyonuna maruz kalmayan gruptaki makrofajların ürettikleri NO miktarı 4 ng/ml olarak ölçürken, boş nanopartikül 6 ng/ml, tek başına antijenleri içeren F1, F2 ve F3 nanoformülasyonlarına maruz kalan makrofajlarda üretilen NO miktarlarının sırasıyla 34±1,90, 25±2,32 ve 23±1,43 ng/ml ve

antijen kombinasyonlarını içeren F4 ve F5 nanoformülasyonları için sırasıyla  $56\pm3,21$  ng/ml ve  $71\pm3,84$  ng/ml ölçüldü. İncelenen formülasyonlar içerisinde en yüksek etkinliği OLA ve LPG antijenlerini içeren F5 nanoformülasyonun gösterdiği tespit edildi. Bu formülasyona maruz kalan makrofajlardaki nitrik oksit üretiminin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 20 kat arttığı, tek başına antijen nanoformülasyonları ile kıyaslandığında ise yaklaşık 3 katlık bir artış gözlemlendi (Çizelge 4.3). F4 nanoformülasyonu kontrole göre yaklaşık 15 kat artış gösterdi. Bu formülasyon tek başına antijenleri içeren F1 ve F2 nanoformülasyon ile kıyaslandığında sırasıyla 1,5 ve 2 kat artış sergiledi.

Çizelge 4.3 Nanoformülasyon uygulanmış Makrofaj hücrelerinin ürettiği NO miktarı

Nanoformülasyonlar	Formülasyonun İçerdiği Antijenler	Makrofajların Ürettiği NO Miktarı (ng/ml)
<b>Kontrol</b>	-	$4\pm0,98$
<b>PLGA NP</b>	-	$6\pm1,24$
<b>F1</b>	LPG	$23\pm1,43$
<b>F2</b>	ÇLA	$34\pm1,90$
<b>F3</b>	OLA	$25\pm2,32$
<b>F4</b>	ÇLA-LPG	$56\pm3,21$
<b>F5</b>	OLA-LPG	$71\pm3,84$

#### 4.1.8 Nanoformülasyon Uygulanan Makrofajların Ürettikleri Sitokin Miktarları İncelenmesi

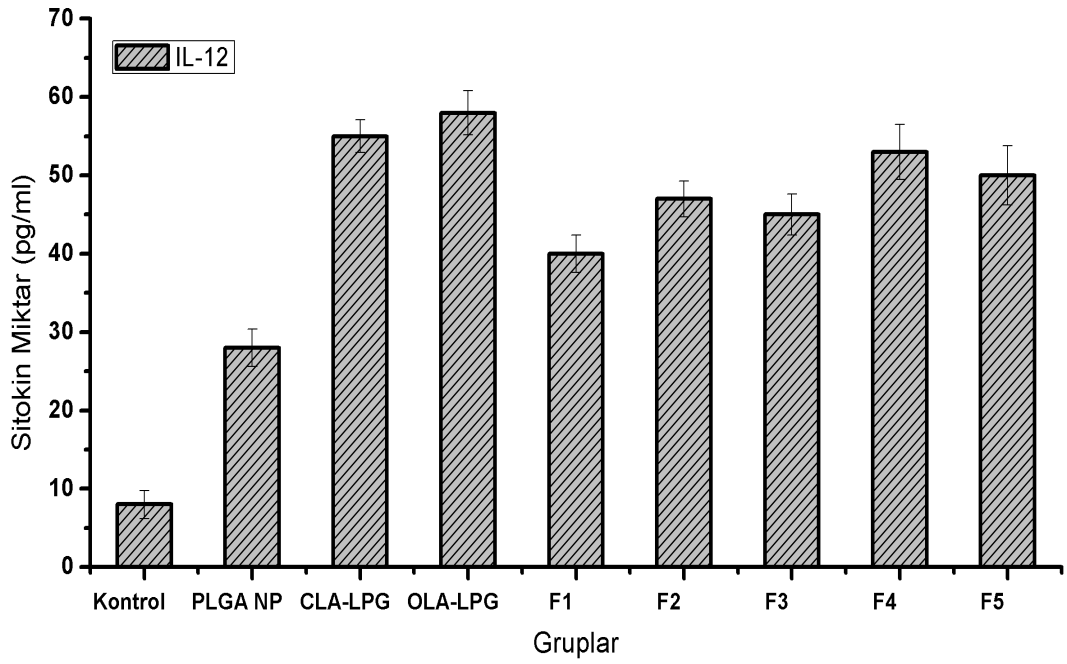
Aşı formülasyonları ile ilgili bir diğer *in vitro* çalışma, bu formülasyonların uygulanmış olduğu makrofaj hücrelerinde sekrete edilen sitokinlerin tayinidir. F1, F2, F3, F4 ve F5 nanoformülasyonların  $500 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonları makrofajlar üzerinde uygulandı

ve süpernatantlardaki IL-4, IL-10, IL-12 ve IFN- $\gamma$  sitokin miktarı kantitatif olarak ticari ELISA kitleri (ebioscience) kullanarak tespit edildi.

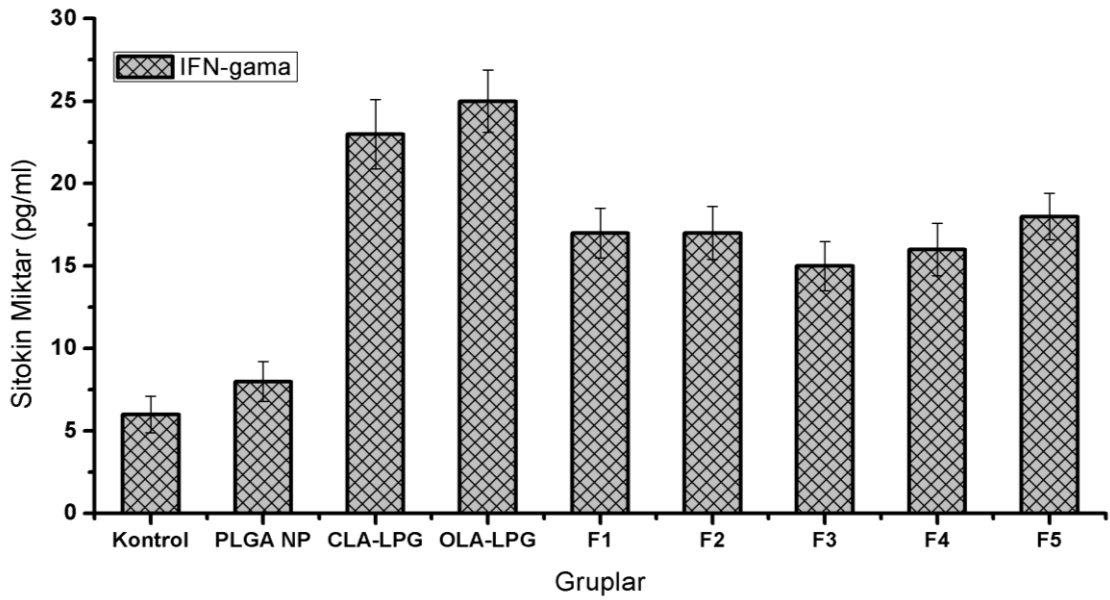
Enkapsüle edilmemiş ÇLA-LPG ve OLA-LPG antijenlerin uygulandığı makrofaj hücrelerinin ürettikleri IL-12 seviyesinin enkapsüle edilen antijenlerin uygulandığı gruba kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır. Hem tek başına hem de kombinasyon halinde kapsülasyonu gerçekleştirilen antijenlerin ise makrofaj hücrelerinin ürettikleri IL-12 seviyesini aynı düzeyde etkilediği belirlendi. Tüm nanoformülasyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında IL-12 seviyesini yaklaşık 4 - 6 kat arasında arttırdığı gözlemlendi. En yüksek IL-12 seviyesi kontrol grubuna göre 6 katlık artışla, OLA-LPG antijenin uygulandığı makrofajların ürettikleri gözlemlendi. Bir diğer sitokin olan IFN- $\gamma$  seviyeleri incelendiğinde, benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir. Tek başına antijen uygulamasına maruz kalan makrofajların enkapsüle edilmiş antijenlere maruz kalan makrofajlara kıyasla daha fazla oranda IFN- $\gamma$  sentezledikleri görüldü. Antijen içeren nanoformülasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında, en yüksek etkinliği F5 nanoformülasyonu gösterdi. Bu formülasyonla muamele edilen makrofajların IFN- $\gamma$  seviyesini kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 3 kat arttırdıkları saptandı ( $p < 0.01$ ).

Diğer yandan makrofajların ürettikleri IL-4 ve IL-10 seviyesi incelendiğinde ise kontrol grubu dahil tüm gruplarda hemen hemen eşit düzeyde olduğu ve sırasıyla yaklaşık 17 pg/ml ve 25 pg/ml tespit edildi.

Elde edilen tüm bu sonuçlar, antijenlerin PLGA nanopartiküllerinin içerisine kapsüllenmesiyle oluşturulan formülasyonların makrofajların ürettikleri IL-12 ve IFN- $\gamma$  seviyelerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttırdığını göstermektedir. Buna karşılık, bu formülasyonlara maruz kalan makrofaj hücrelerinin ortama saldıkları IL-4 ve IL-10 sitokin seviyeleri kontrol grubuyla kıyaslandığında eşit düzeyde kaldığı ortaya çıkmıştır (Şekil 4.17-4.20).

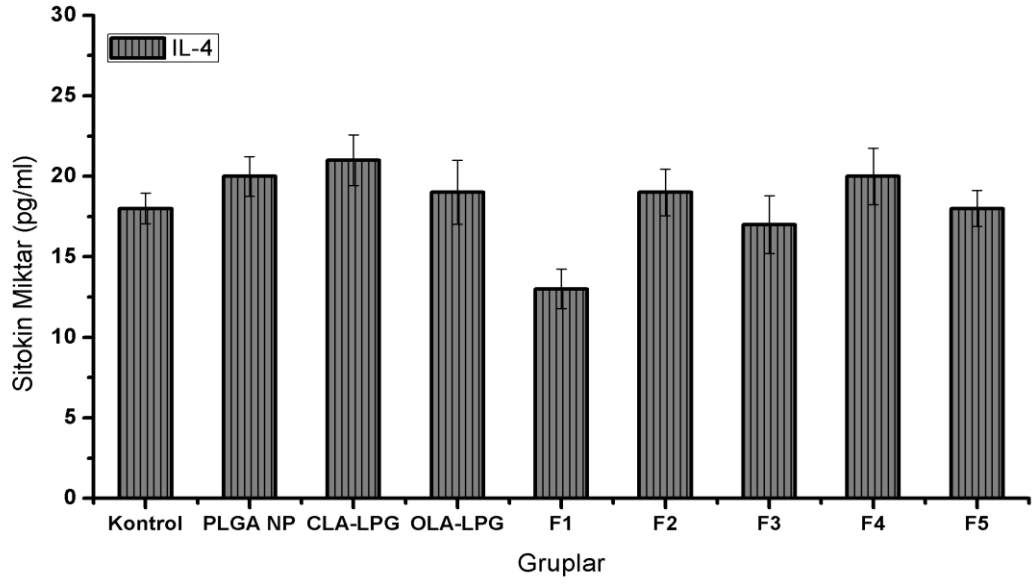


Şekil 4.17 Antijen kombinasyonları ve nanoformülasyonlara maruz kalan makrofajların ürettikleri IL-12 miktarındaki değişim

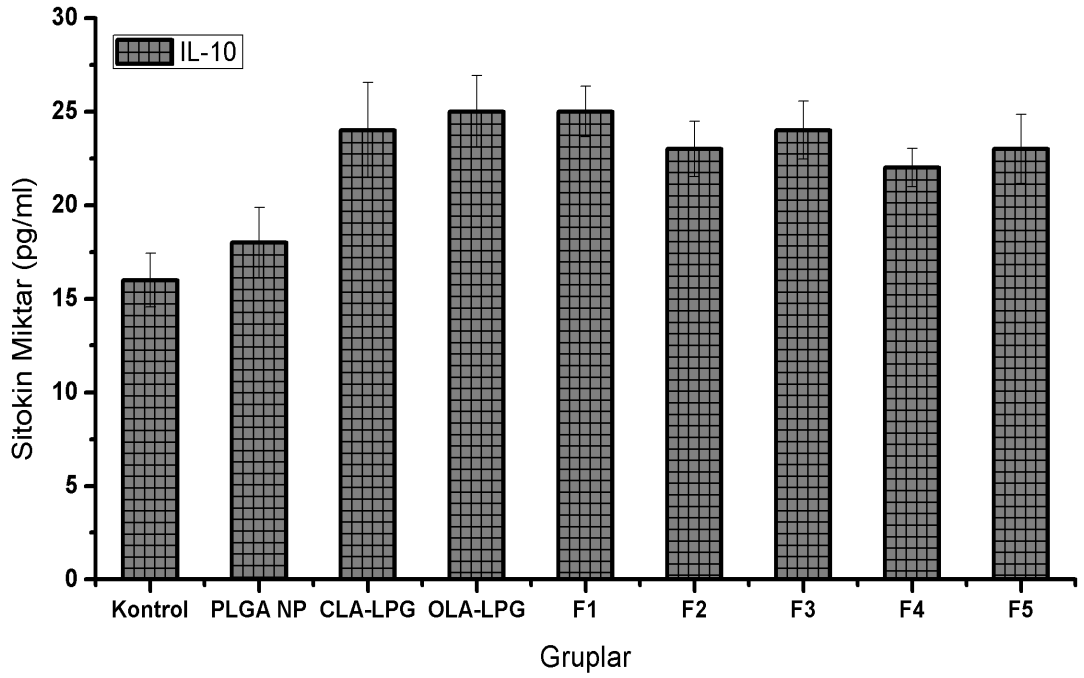


Şekil 4.18 Antijen kombinasyonları ve nanoformülasyonlara maruz kalan makrofajların ürettikleri IFN- $\gamma$  miktarındaki değişim





Şekil 4.19 Antijen kombinasyonları ve nanoformülasyonlara maruz kalan makrofajların ürettikleri IL-4 miktarındaki değişim



Şekil 4.20 Antijen kombinasyonları ve nanoformülasyonlara maruz kalan makrofajların ürettikleri IL-10 miktarındaki değişim

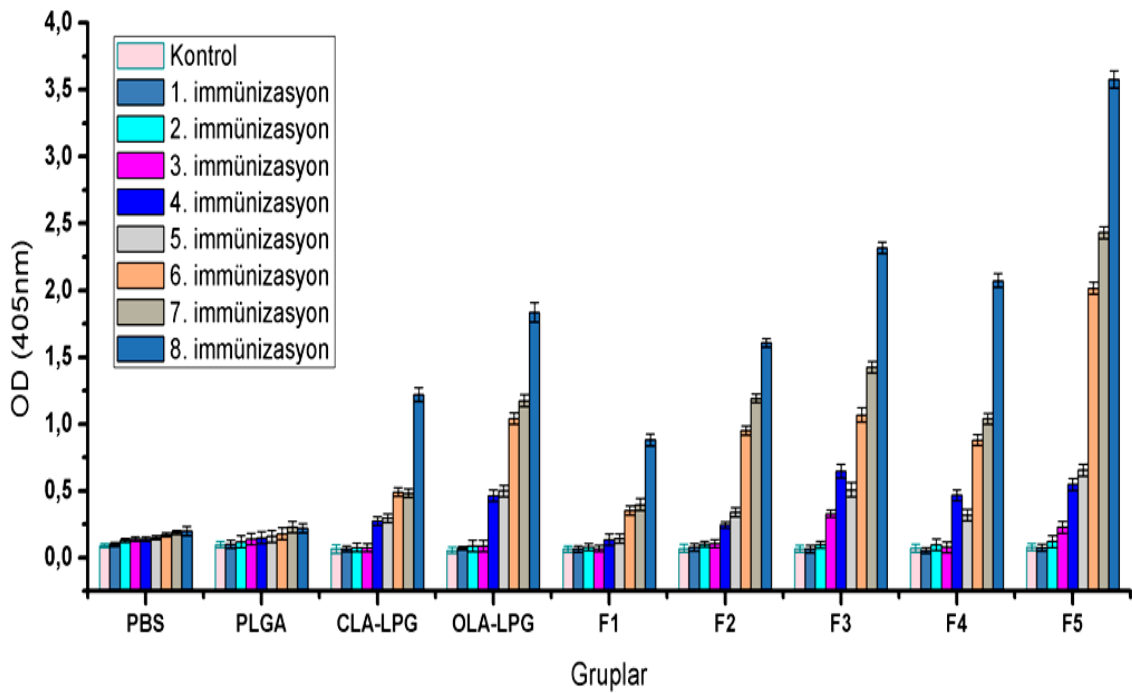
## 4.2 *In Vivo* Çalışma Sonuçları

### 4.2.1 Nanoformülasyon ile İmmünize Edilmiş Fare (BALB/c) Serumlarında Antikor Seviyelerinin İncelenmesi

Balb/c fareler iki hafta arayla toplamda 8 kez ÇLA-LPG, OLA-LPG antijenleri, tekli antijen nanoformülasyonları (F1, F2, F3) ve antijen kombinasyonları içeren nanoformülasyonlar (F4 ve F5) ile immünize edildi. Kontrol grubu olarak PBS ve antijen içermeyen PLGA NP kullanıldı. Her immünizasyon öncesinde farelerden kan alınarak, serum örneklerindeki antikor miktarları ELISA ile incelendi. ELISA sonucunda aşı formülasyonlarının fare serumlarındaki antikor seviyelerinin absorbans değerleri grafik halinde Şekil 4.21’de sunuldu. İlerleyen immünizasyon sürecinde kontrol grupları hariç tüm fare gruplarının kan örneklerindeki antikor yanıtlarının kademeli olarak arttığı tespit edildi. Tüm deney gruplarında 6. immünizasyon sonrasında antikor yanıtlarında önemli oranda bir artış meydana geldi. Bu artış 8. immünizasyon sonrasında en yüksek düzeye çıkmıştır. Bu gruplar içerisinde antikor yanıtlarında en yüksek oranda artış (OLA-LPG)PLGA grubunda gözlemlendi. Bu gruptaki farelerin 8. İmmünizasyon sonrasında kanlarındaki antikor seviyeleri, 6. İmmünizasyon sonrasına göre yaklaşık 2 kat arttığı saptandı. Aynı zamanda (OLA-LPG)PLGA formülasyonu uygulanan farelerin antikor yanıtları, OLA-LPG antijenlerine maruz kalan gruplar ile kıyaslandığında yaklaşık 1,5 kat, tek başına OLA ve tek başına LPG antijenlerini içeren nanoformülasyonlarına kıyaslandığında ise sırasıyla 2 ve 3,5 kat daha fazla olduğu da gözlemlendi ( $p < 0.01$ ). Ayrıca (OLA-LPG)PLGA formülasyonu bir diğer ikili antijen kombinasyonunu içeren (ÇLA-LPG)PLGA nanoformülasyon ile kıyaslandığında yaklaşık 2 katlık bir artış sergiledi (Şekil 4.21).

Bu sonuçlar incelendiğinde nano taşıyıcı sistemlerin tek başına antijen uygulamalarına göre daha yüksek oranda immün cevabı tetiklediğini görülmektedir ( $p < 0.01$ ). Ayrıca antijen yüklü PLGA nanopartikülleriyle immünize edilmiş farelerde meydana gelen antikor miktarındaki artış kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde artış göstermesi nedeniyle, 8. İmmünizasyonun ardından immünizasyon işlemleri sonlandırıldı. İmmünizasyon işlemlerinin ardından immünize fareler virulent *L.infantum*

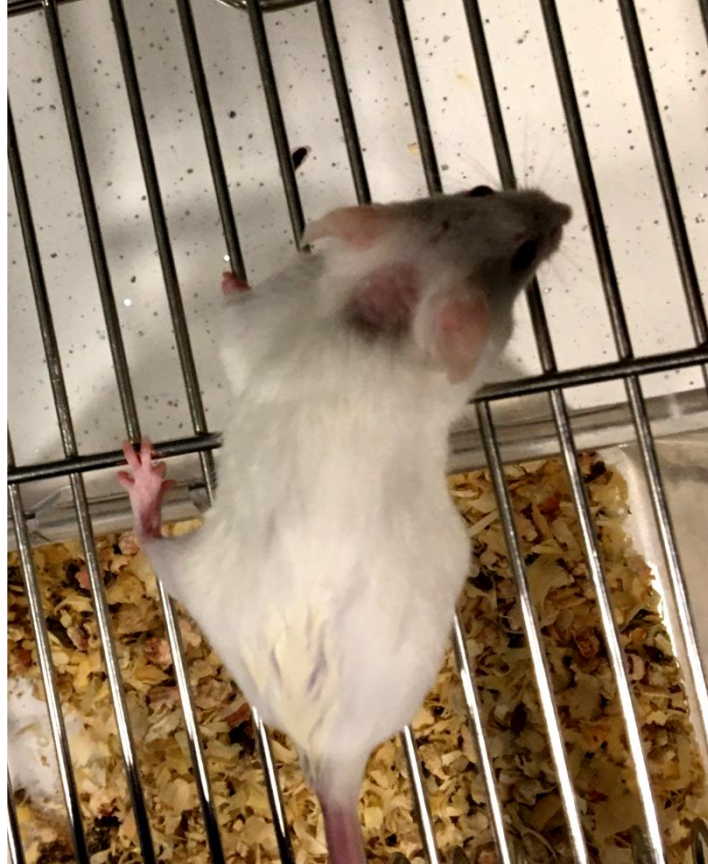
promastigotlarıyla enfekte edildi ve aşı formülasyonlarının fareler üzerindeki koruyucu etkinliklerinin belirlendi.



Şekil 4.21 Aşı formülasyonları uygulamadan önce (kontrol) ve uygulandıktan sonra fare serumlarındaki antikor seviyeleri

#### 4.2.2 Deney Hayvanlarında Enfeksiyon Kontrolü

Tüm fare gruplarında hastalık gelişimi, enfeksiyonun üzerinden geçen bir aylık periyot içerisinde her hafta yapılan gözlemsel kontrollerle incelendi. Enfeksiyonun üzerinden geçen 1 aylık süre sonucunda kontrol grubunda bulunan tüm farelerde şekil 4.22’de gösterildiği gibi yara oluşumu öncesi belirli bölgelerde tüy dökülmeleri gözlemlendi. Bunun üzerine farelerin periferik kanındaki parazit varlığının tayini için kontrol grubundaki tüm farelerden kan örnekleri alındı. Elde edilen kan örneklerinden hem mikrokültür hem de Giemsa boyamada kullanılmak üzere smearlar hazırlandı.



Şekil 4.22 Kontrol grubunda bulunan farelerde yara oluşumu öncesi tüy dökülmeleri

#### 4.2.3 Giemsa Boyama ve Mikro Kültür Yöntemi (MKY) ile Kandan Parazit Varlığının İncelenmesi

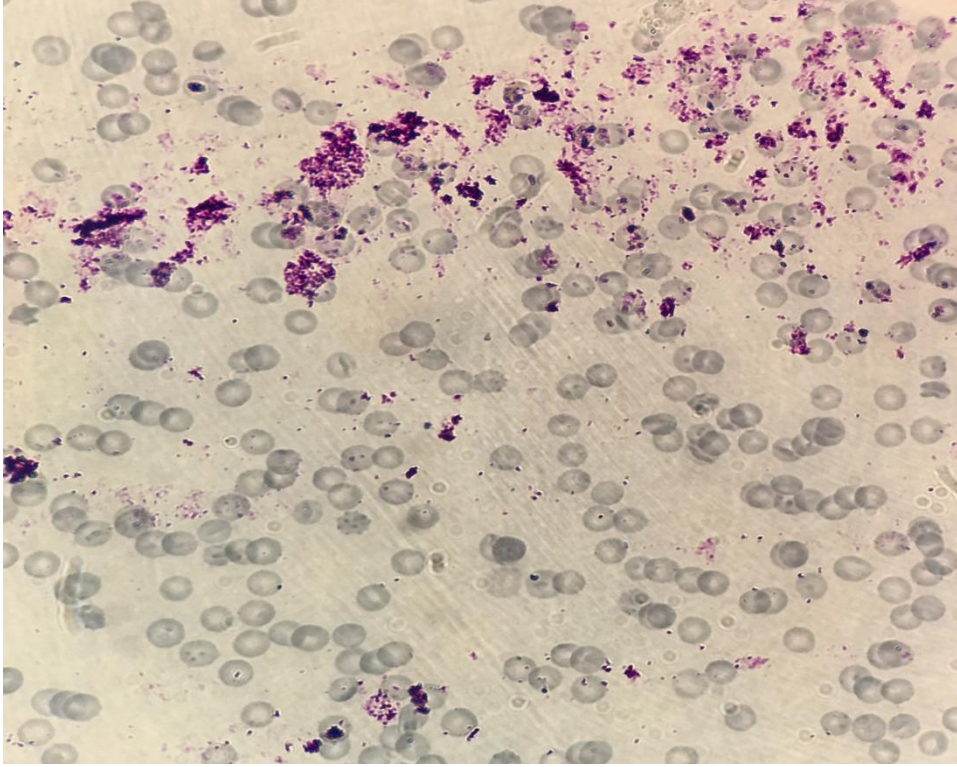
Kontrol gruplarındaki farelerden elde edilen kan örneklerinde parazit varlığı ve farelerde Leishmaniasis'e özgü lezyonların oluşmaya başlaması hastalığın gelişmekte olduğunu bir göstermektedir. Kontrol grubunda lezyonların tam olarak oluşmaya başlamasının ardından tüm gruplardaki farelerden örnekler alınarak hastalık gelişimindeki farklılıklar kıyaslı olarak incelendi (Şekil 4.23).

Hazırlanan mikrokültürler mikroskop altında incelendi. Alanda gözlenen hareketli promastigot sayısına bağlı olarak, örnekteki parazit yoğunluğu kantitatif olarak değerlendirildi. Buna göre; incelenen alanda 50'nin üzerinde promastigot bulunduğu parazit yoğunluğu "6+", 40-50 arasında promastigot bulunduğu parazit yoğunluğu "5+", 30-40 arasında promastigot bulunduğu parazit yoğunluğu "4+", 20-30 arasında promastigot bulunduğu parazit yoğunluğu "3+", 10-20 arasında promastigot bulunduğu parazit yoğunluğu "2+" ve 10'dan az sayıda

promastigot bulunduğunda parazit yoğunluğu “+” olarak değerlendirildi. Sonuçlar Çizelge 4.4’de sunulmaktadır. Sonuçlara göre, mikrokültürlerde en yüksek düzeyde parazit yoğunluğu PBS ve PLGA NP grubunda görüldü. Kontrol gruplarına kıyasla enkapsüle edilmemiş ÇLA-LPG ve OLA-LPG antijenleri ile immünize edilen farelerin kan örneklerindeki parazit yoğunluğu 1,2-1,5 kat arasında azaldığı tespit edildi. Parazit yoğunluğundaki düşüş en fazla F3, F4 ve F5 nanoformülasyonlarda gözlemlendi. Bu formülasyonlar içerisinde en yüksek etkinliği kontrol grubuna göre 3 katlık azalış ile F5 grubunun gösterdiği saptandı.

Çizelge 4.4 Mikrokültür yönteminde alandaki parazit yoğunluğu

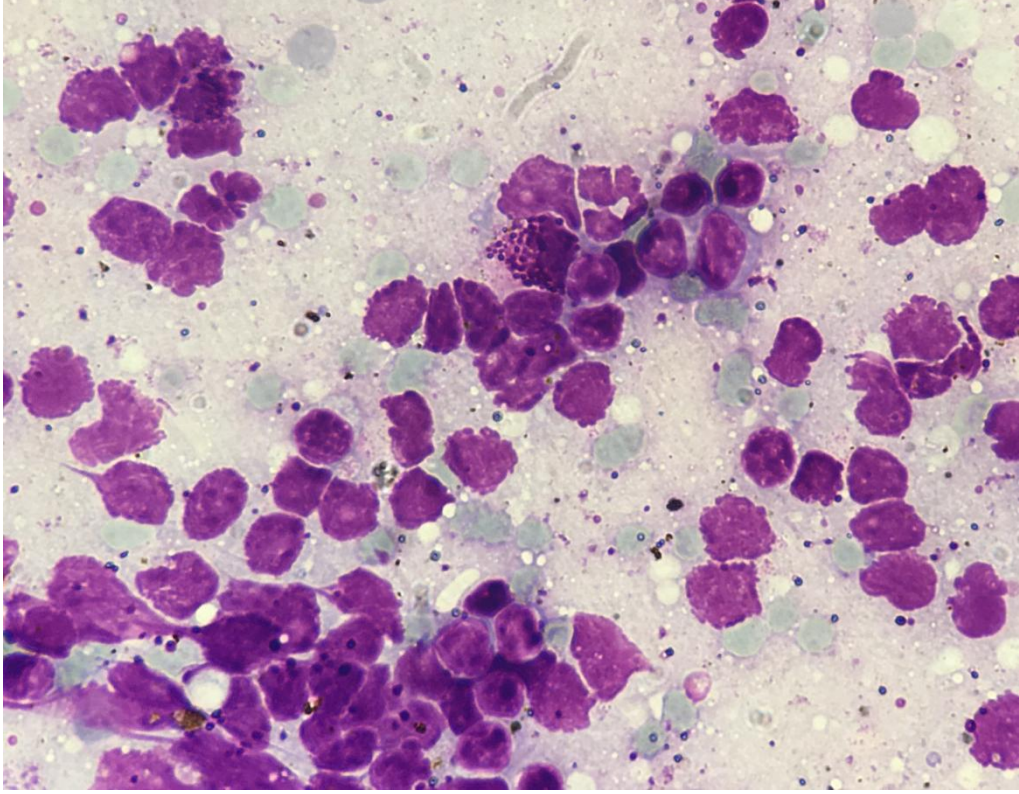
<b>Nanoformülasyon No</b>	<b>Gruplar</b>	<b>Alandaki Parazit Yoğunluğu</b>
-	<b>PBS</b>	<b>+6</b>
-	<b>PLGA NP</b>	<b>+6</b>
-	<b>OLA-LPG</b>	<b>+4</b>
-	<b>ÇLA-LPG</b>	<b>+4</b>
<b>F1</b>	<b>(LPG)PLGA</b>	<b>+5</b>
<b>F2</b>	<b>(ÇLA)PLGA</b>	<b>+4</b>
<b>F3</b>	<b>(OLA)PLGA</b>	<b>+3</b>
<b>F4</b>	<b>(ÇLA-LPG)PLGA</b>	<b>+3</b>
<b>F5</b>	<b>(OLA-LPG)PLGA</b>	<b>+2</b>



Şekil 4.23 Kontrol grubu farelerin kan smear örneklerinde amastigot görüntüsü

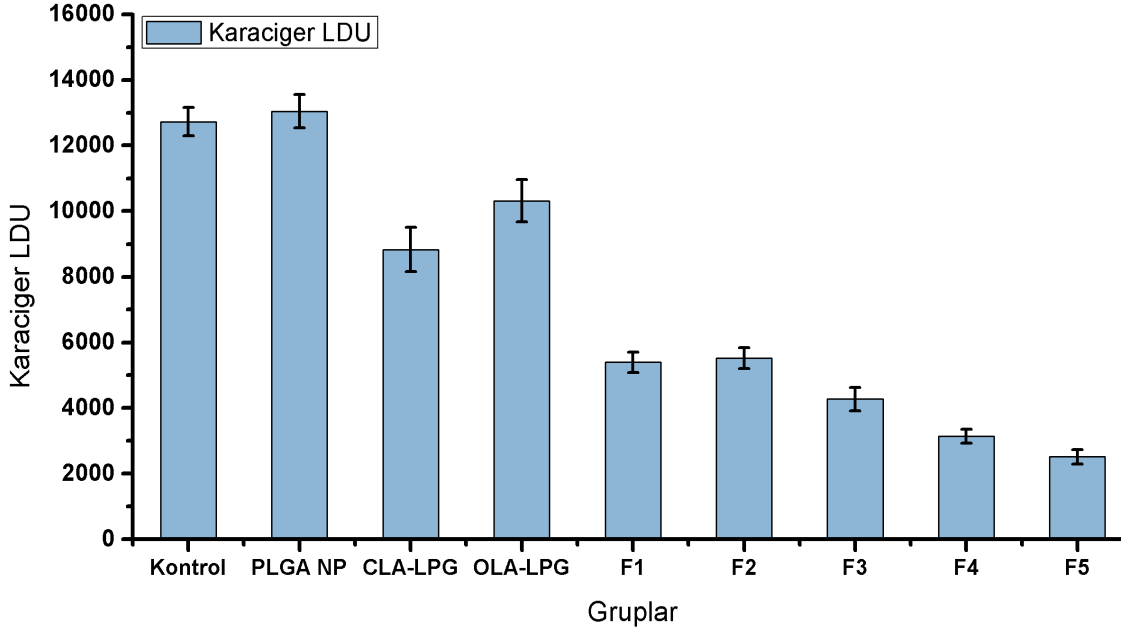
#### **4.2.4 Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonu ve Karaciğer ve Dalaktan Leishman Donovan Unit (LDU) Değerlerinin Hesaplanması**

Visseral Leishmaniasis'in değerlendirilmesinde en önemli özelliklerden biri karaciğer ve dalaktaki parazit yüküdür. Kontrol grubu farelerde kan örneklerinde yüksek düzeyde parazit varlığının tespiti, buna karşılık deney gruplarında herhangi bir lezyon oluşumunun görülmemesi ve kan örneklerindeki parazit varlığının oldukça az olduğunun gözlemlenmesi sonucu tüm hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen tüm hayvanların karaciğer ve dalakları çıkarıldı, tartıldı ve alandaki hücre sayısı ve ortamdaki serbest haldeki parazit sayılarak LDU değerleri hesaplandı.



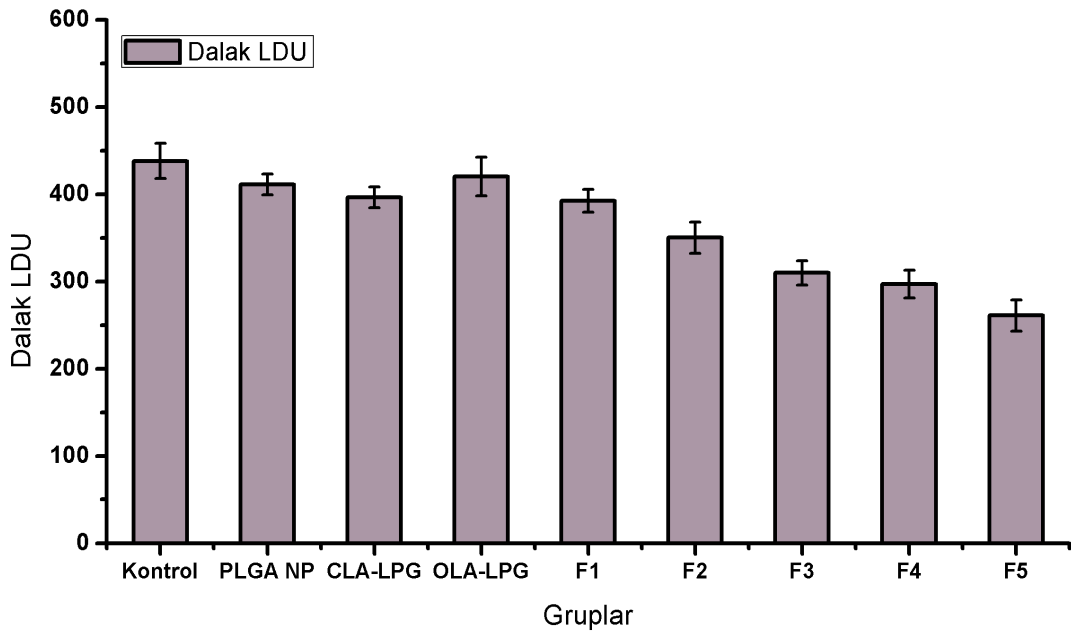
Şekil 4.24 Kontrol grubu farelerin karaciğer smear örneğinde amastigot görüntüsü

Şekil 4.25’de immünize farelerin karaciğer ve dalaklarındaki parazit yükünü gösteren LDU değerleri gösterilmektedir. En yüksek LDU değeri kontrol gruplarında gözlemlendi. Bu gruptaki farelerin karaciğerlerindeki LDU değeri ortalama 12000 olarak hesaplandı. Buna karşılık nanopartiküler formülasyonların uygulandığı gruplardaki farelerin karaciğer örneklerinde LDU miktarlarının kontrol gruplarına ve tek başına antijen uygulanan gruplara göre önemli oranda düştüğü gözlemlendi. LDU değerlerinin en düşük olduğu grupların (ÇLA-LPG)PLGA ve (OLA-LPG)PLGA grupları olduğu ortaya çıktı. Bu gruplardaki deney hayvanlarının karaciğer örneklerinde LDU değerlerinin kontrol grubuna göre yaklaşık 3-4 kat az olduğu belirlendi (Şekil 4.25).



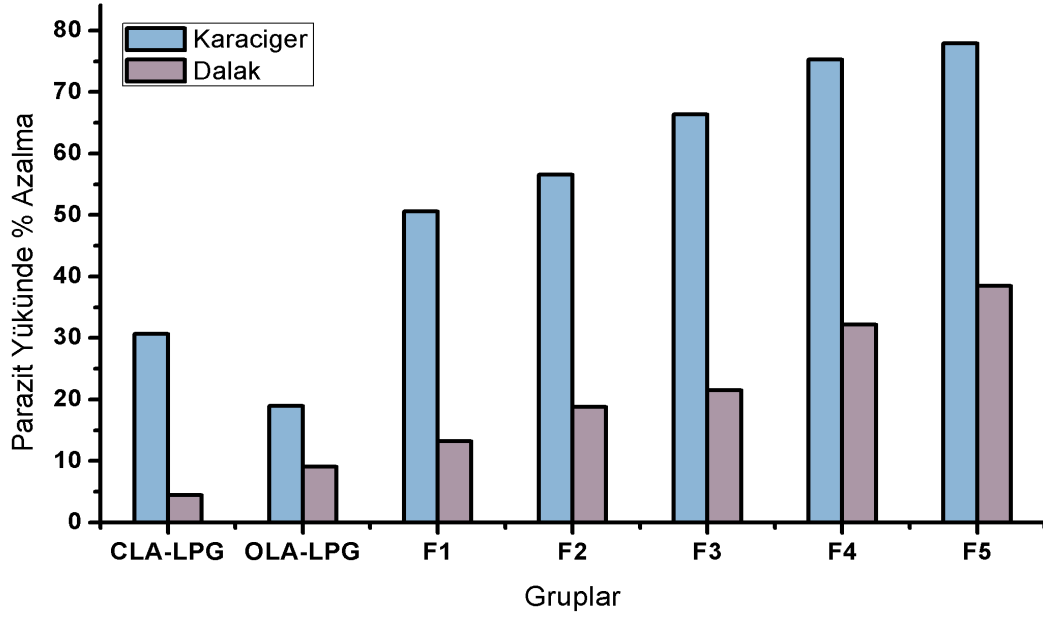
Şekil 4.25 Farklı formülasyonlarda immünize edilip enfekte edilen farelerin karaciğer LDU değerleri

Benzer şekilde dalak LDU değerleri de incelendi ve en yüksek kontrol gruplarında ve tek başına antijen gruplarında gözlemlendiği ortaya çıktı. Bu değerler kontrol ve tek başına antijenler için yaklaşık 400 civarı olarak ölçülürken, (CLA-LPG)PLGA ve (OLA-LPG)PLGA gruplarında ise 250 civarı ölçüldü (Şekil 4.25).



Şekil 4.26 Farklı formülasyonlarda immünize edilip enfekte edilen farelerin dalak LDU değerleri





Şekil 4.27 Farklı formülasyonlarda immünize edilip enfekte edilen farelerin karaciğer ve dalak örneğinde parazit yükünün yüzde azalma değeri

Hem karaciğer hem de dalak için yapılan LDU incelemesinde parazit yükündeki % azalma grafik olarak Şekil 4.27’de sunuldu. Buna göre karaciğerdeki LDU değerleri için yüksek etkinlik gösteren (CLA-LPG)PLGA grubu ve (OLA-LPG)PLGA grubu farelerde sırasıyla yaklaşık %75 ve % 78 oranında koruma sağladığı ortaya çıkarken dalak LDU değerleri için yüksek etkinliği yine aynı grup farelerde yaklaşık %33 ve % 40 oranında olduğu ortaya çıktı.

#### 4.2.5 İmmünize Farelerin Dalaklarındaki Sitokin Seviyelerinin Tayin Edilmesi

Tüm farelerin sakrifikasyonu sonrası farelerden elde edilen dalak hücrelerinin (antijen ile uyarılmış ve kontrol olarak antijen ile uyarılmamış) süpernatantında sitokin yanıtları ticari ELISA kiti (IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4 ve IL-10) yardımıyla incelendi. IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4 ve IL-10 sitokinlerin ölçümlerine ait Şekil 4.28-4.31 arasında gösterildi.

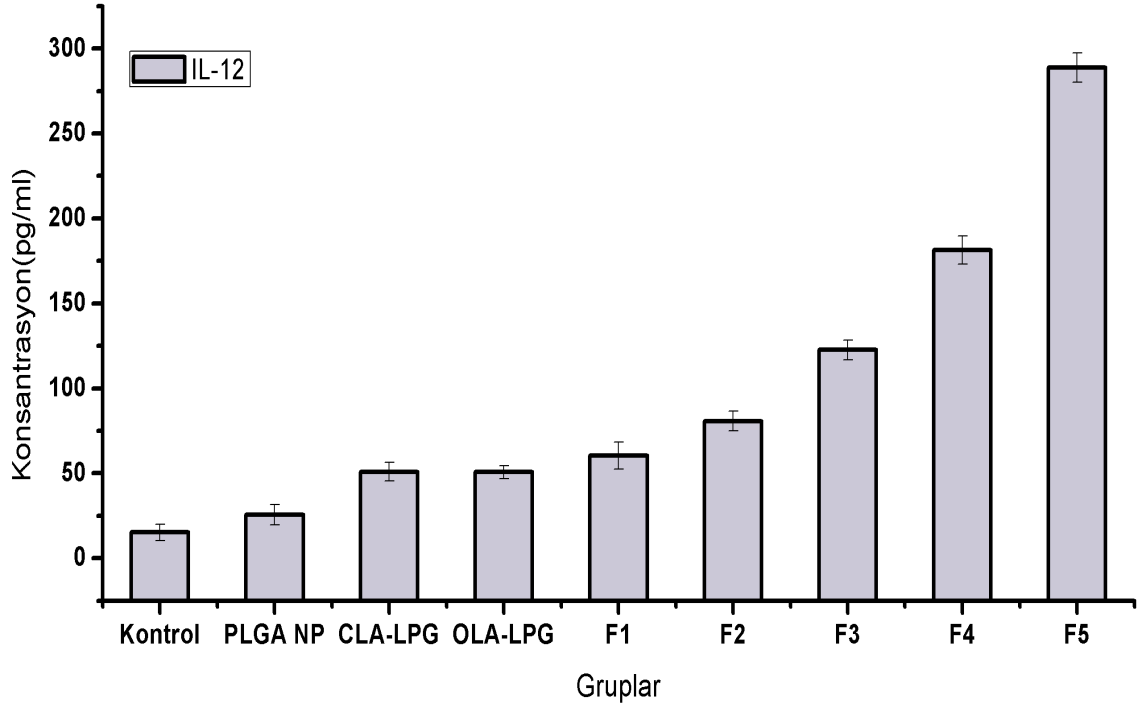
Grafikler incelendiğinde, enfeksiyon sonrası farelerde oluşan IL-4 seviyelerinde anlamlı bir değişime neden olmadığı gözlenmezken IL-10 düzeyinde kontrole nazaran düşüş gözlemlendi. Buna karşılık, immünize farelerin dalak hücrelerinden ekspres edilen IL-12 ve IFN- $\gamma$  seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı tespit edildi.

Tüm nanoformülasyonların IL-12 ve IFN- $\gamma$  üretimini tek başına antijen uygulamasına kıyasla daha fazla oranda arttırdıkları belirlendi. Nanoformülasyonlarla immünize farelerde dalak hücreleri tarafından üretilen IL-12 seviyelerinin 4-15 kat arasında arttırdığı tespit edildi. OLA-LPG antijenlerini içeren F5 nanoformülasyon grubu ile immünize edilen farelerde en yüksek etkinlik oranına ulaşıldı. Bu gruptaki IL-12 miktarı  $288,38 \pm 8,61$  pg/ml değeri ile kontrole kıyasla 15 kat arttığı tespit edildi. Tek başına OLA antijenini içeren F3 nanoformülasyonu ile kıyaslandığında 2,5 kat, LPG antijenini içeren F1 ile kıyaslandığında ise 4,5 kat daha fazla yanıt oluşturduğu gözlemlendi. Bir diğer ikili antijen kombinasyonunu içeren F4 nanoformülasyonun uygulandığı grupta IL-12 miktarı  $181,38 \pm 8,42$  pg/ml ölçüldü ve kontrole kıyasla yaklaşık 9 kat artış saptandı. F4 nanoformülasyonu tek başına antijenleri içeren F1 ve F2 nanoformülasyonuna göre sırasıyla 3 ve 2,5 kat daha fazla IL-12 sitokini ürettiği tespit edildi.

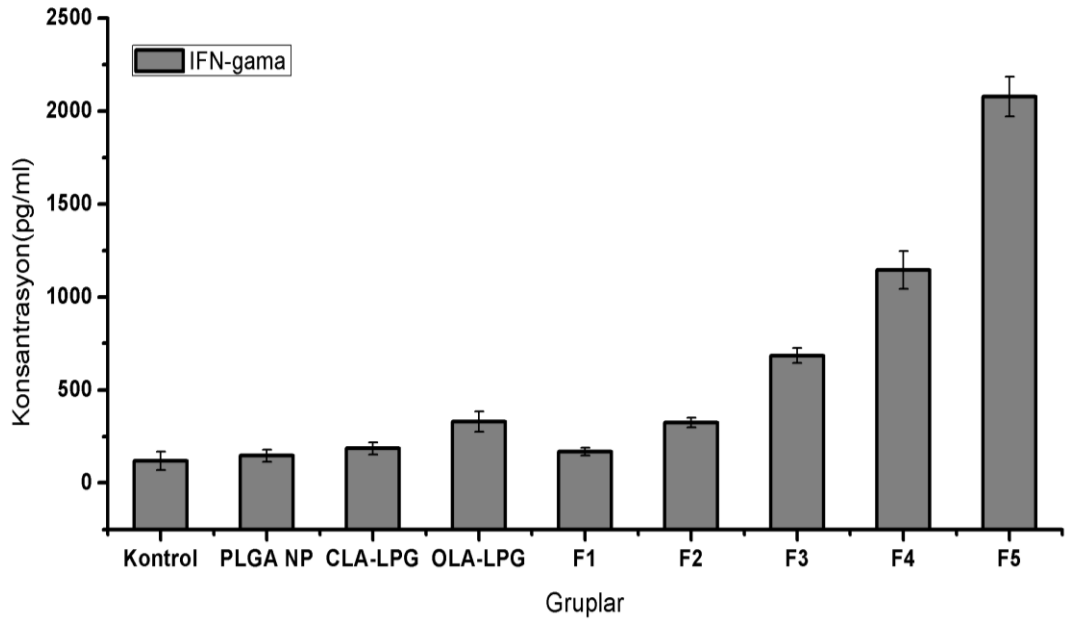
Benzer şekilde, dalak hücreleri tarafından üretilen IFN- $\gamma$  seviyelerinin de ÇLA-LPG ve OLA-LPG antijenlerini içeren F4 ve F5 nanoformülasyonları ile immünize edilen gruplarda anlamlı şekilde artış gösterdiği belirlendi. IL-12 sonuçlarına benzer şekilde, en yüksek etkinlik F5 nanoformülasyonu ile enfekte edilen farelerde görüldü. Benzer şekilde IFN- $\gamma$  için ölçülen değerler, F4 ile immünize edilen fare grubunda  $1145 \pm 102,4$  pg/ml iken F5 için  $2077 \pm 107,1$  pg/ml'dir. F5 nanoformülasyonu tek başına antijen içeren F1 nanoformülasyonlara göre 8, F3 nanoformülasyonlara göre 16 kat daha fazla IFN- $\gamma$  üretimi gözlemlendi ( $p < 0.01$ ). Bu sonuçlar farklı aşı formülasyonlarıyla immünize edilen farelerde immün yanıtın Th1 yönünde geliştiğini göstermektedir.

IL-4 sitokin miktarının ise tüm gruplarda yaklaşık 1200 pg/ml civarı olduğu, ve yine benzer etkiye sahip IL-10 sitokin miktarı F4 nanoformülasyonu için  $916 \pm 61,3$  pg/ml iken F5 nanoformülasyonu için  $732 \pm 41,9$  pg/ml olduğu gözlemlendi. IL-10 sitokin düzeyi ise F4 ve F5 nanoformülasyonları kontrole göre sırasıyla 1,5 ve 2 kat azalma gösterdi ( $p < 0.01$ ).

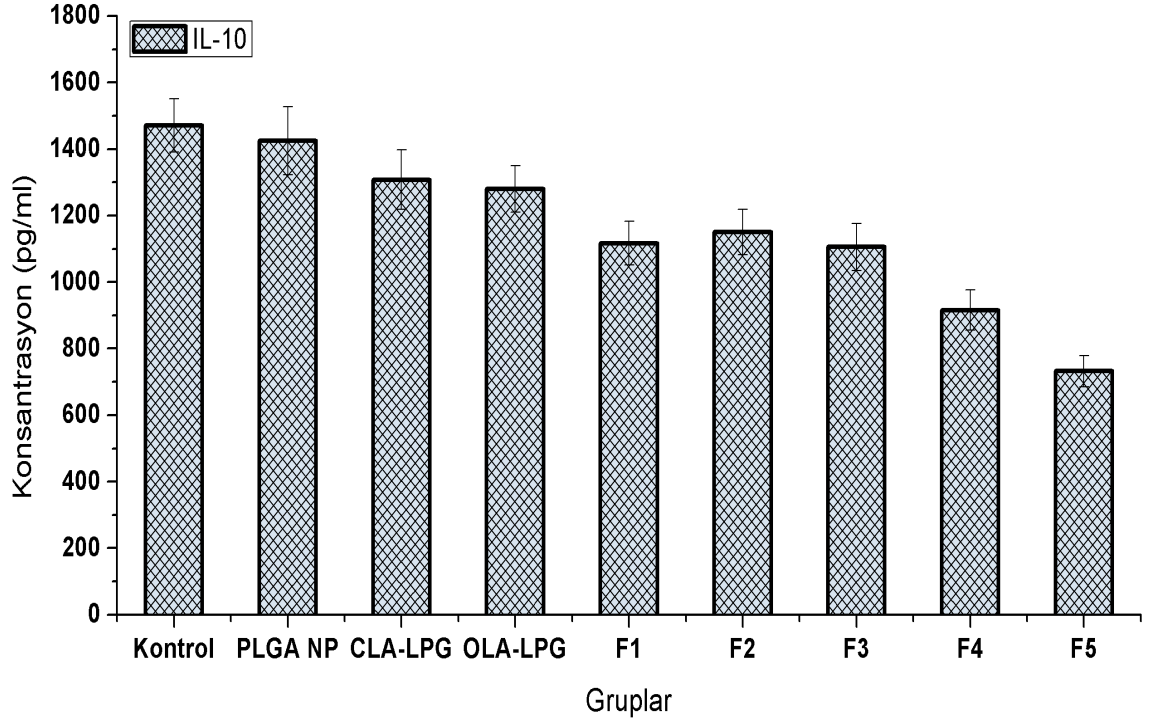
İncelenen tüm formülasyonlar içerisinde *in vivo* koruyucu etkinlik gösterilmesi konusunda en yüksek etkinliği ÇLA-LPG antijenlerini içeren F4 ve OLA-LPG antijenlerini içeren F5 nanoformülasyonun gösterdiği anlaşıldı.



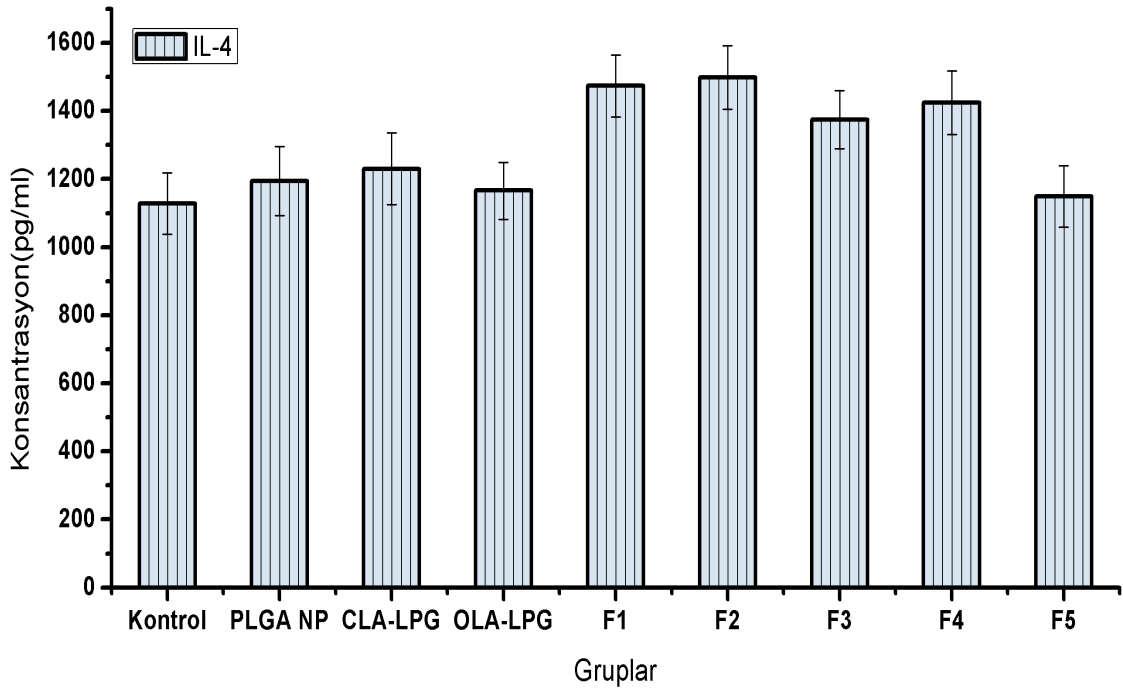
Şekil 4.28 Aşı formülasyonları ile immunize fare gruplarında ve kontrol grubunda IL-12 sitokin yanıtları



Şekil 4.29 Aşı formülasyonları ile immunize fare gruplarında ve kontrol grubunda IFN- $\gamma$  sitokin yanıtları



Şekil 4.30 Aşı formülasyonları ile immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-10 sitokin yanıtları



Şekil 4.31 Aşı formülasyonları ile immunize fare grupları ve kontrol grubunun IL-4 sitokin yanıtları

### SONUÇ VE ÖNERİLER

18. yüzyılın sonlarından bu yana mikroskopun icadıyla başlayan teknolojik gelişmelerle doğru orantılı olarak aşı çalışmaları da ilerlemiştir. Dünya'nın ve Türkiye'nin ciddi halk sağlığı problemlerinden biri olan Leishmaniasis'e karşı da yaklaşık 80 yıldır aşı geliştirilmesi yönünde çalışmalar sürmektedir. Çalışmalar birinci, ikinci ve üçüncü nesil aşılardan olmak üzere üç sınıfta incelenmiştir. Ancak henüz hastalığa karşı halen etkin bir aşı geliştirilmesi mümkün olmamıştır. Son zamanlarda nanoteknolojide meydana gelen gelişmeler ümit verici sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu tez çalışması kapsamında ilk kez olarak ikili *leishmania* antijenini içeren nanoformülasyon oluşturuldu ve etkinliği *in vitro* ve *in vivo* olarak VL'ye karşı incelendi.

Leishmaniasis'e karşı aşı çalışmalarında öldürülmüş *leishmania* antijenleri, attenüe edilmiş parazitler, parazitlerin farklı formlarından izole edilen subunit makromoleküller, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen immünojenik moleküller aşı adayları olarak kullanılmıştır [11].

Bunlar içerisinde çözünebilir *Leishmania* antijenleri (ÇLA) ve otoklavlanmış *leishmania* antijenleri (OLA) farklı antijenik yapıları bir arada barındırdığından kullanımları avantajlıdır. Çünkü bu sayede parazite ait epitop çeşitliliği konak hücrelerinde farklı MHC molekülleri ile etkileşebilmektedir. Ayrıca parazit biyolojisinde ortaya çıkan yenilikler sayesinde parazitin yüzey antijenlerinin en iyi aşı adaylarından biri olduğu gösterilmiştir [169]. Özellikle tüm *Leishmania* parazitlerinin yüzeyinde yoğun olarak bulunan LPG moleküllerinin immünojenik potansiyeli birçok çalışmada ispatlanmıştır [313], [23].

Ancak, aşı geliştirilmesinde tek başına bu antijenler yeterli immün yanıt oluşturamamaktadır. Adjuvan denilen yardımcı maddelerle aşılarda etkinlikleri arttırılabilmektedir. Günümüze kadar hem ÇLA hem OLA hem de LPG antijenleri tek başlarına çeşitli adjuvan türleriyle çalışılmış ve Leishmaniasis'e karşı etkinlikleri incelenmiştir. Ancak henüz etkin ve güvenli bir aşı adayının oluşturulamamış olması yeni adjuvan sistemlerinin de geliştirilmesi gerektiğini açıkça vurgulamaktadır.

Son yıllarda geliştirilmeye başlanan nanopartikül temelli taşıyıcı sistemler antijenik moleküllerin uzun süreli salımına imkan tanıyabilmesi, hem humoral hem de hücrel immün yanıt oluşturarak uzun süreli koruma sağlayabilmesi yönünde çalışmalar ortaya konulmuştur. Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesinde polimerik nanopartiküller, lipozomlar, katı lipit nanopartikülleri kullanılmıştır. Lipozom ve katı lipit nanopartikülleri düşük yükleme kapasiteleri, lipitin fiziksel durumunun karmaşıklığı, hazırlama yöntemleri ve uygulama sırasında stabilite problemleri gibi bazı dezavantajlar vardır [26], [27]. Polimerik nanopartikül taşıyıcı sistem olarak FDA onaylı polilaktik ko-glikolik asit (PLGA) sıklıkla kullanılmaktadır. PLGA vücut dokularında hidrolize olarak zararsız laktik asit ve glikolik asite dönüşür. Bu polimerin biyobozunur, biyouyumlu non-toksik ve adjuvan özellik de gösterebilmesi bu polimerin önemini ortaya koymaktadır [314]. Çeşitli enfeksiyonlara ve kansere karşı farklı antijenik epitoplara içeren PLGA nanopartikülleri aşı adayı olarak incelenmiş ve bu çalışmalarda ümit verici sonuçlar elde edilmiştir [315], [316], [317], [318].

Özellikle Leishmaniasis'e karşı PLGA bazlı nanopartikül sistemlerin kullanıldığı çalışmalarda otoklavlanmış *Leishmania majör*, çözünür *leishmania* antijeni ve KMP-11 antijenleri farklı adjuvanlarla bir arada PLGA nanopartiküllerinin içerisine yüklenmiş ve yapılan *in vivo* çalışmalar sonucunda geliştirilen formülasyonların yüksek koruyucu etkinlik gösterdikleri tespit edilmiştir [31], [319], [32], [320], [321]. Ancak günümüze kadar ÇLA-LPG ve OLA-LPG antijenlerini bir arada içeren PLGA nanoformülasyonlarının oluşturulması ve bu formülasyonların koruyucu etkinliklerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Buna göre de tez çalışması kapsamında ilk kez olarak ÇLA-LPG ve OLA-LPG moleküllerini içeren PLGA nanoformülasyonların sentezi, karakterizasyonu ve *in vitro/in vivo* immünojenik etkinliklerinin incelenmesi gerçekleştirildi. Öncelikle tüm antijenlerin

eldesi için yoğun miktarda parazit biyomasına ihtiyaç duyulduğundan *Leishmania* parazitlerinden ölçek büyütme yöntemi ile hem manuel olarak hem biyoreaktör yardımıyla parazit biyoması elde edildi. Elde edilen parazit pelletleri, sonikasyon, propanol ekstraksiyonu, kolon kromatografisi gibi ayırma işlemleri kullanılarak parçalanmış ve LPG molekülü saflaştırılmıştır. Saflaştırılan LPG moleküllerinin karakterizasyonu için İnce Tabaka Kromatografisi, spektrofotometre ve GPC (jel geçirgenlik kromatografisi) kullanılmış ve böylece elde edilen izolatlardaki LPG varlığı kantitatif ve kalitatif olarak tespit edildi. Laboratuvarımızda Prof. Dr. Adil M. Allahverdiyev yürütücülüğünde daha önce yaptığımız çalışmamızda (TUBITAK, 1085170SBAG-4007) iki farklı LPG konsantrasyonunda (35 ve 70 ug) LPG-PAA konjugatı başarılı bir şekilde oluşturulmuştur. Hazırlanan bu konjugatın deney hayvanları üzerindeki etkinliği, LPG/PAA ve LPG/Freund fiziksel karışımları ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. LPG-PAA konjugatının %70-80 aralığında koruma sağladığı gözlenirken, tek başına LPG molekülünün %50 koruma sağladığı gösterilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada en etkili yanıtın LPG-PAA konjugatında olduğu görüldü. Bu sonuç, LPG'nin yüksek immünojen özelliğe sahip olduğunu ve diğer adjuvanlarla bir arada kullanıldığında aşı adayı olarak etkinliğinin daha da artabileceğini göstermektedir [22], [23].

ÇLA ve OLA ise bu tez çalışmasında kullanılan diğer antijenlerdir. Bu antijenlerin eldesinde sırasıyla Saremi, Khalil ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadaki yöntemler kullanılmıştır [322], [323], [324]. ÇLA ve OLA antijenleri sırasıyla sıvı azotta dondurup çözme yöntemiyle ve otoklavlama yöntemiyle elde edildi. Antijenlerin nanopartiküllere enkapsülasyonu ve karakterizasyonu proje kapsamında projede yer alan değerli hocalarımız Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Akdeste ve Doç. Dr. Serap Derman'ın koordinatörlüğündeki Biyopolimer ve Sentetik Aşılar grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle LPG, ÇLA, OLA antijenleri tek başına PLGA nanopartiküllerine enkapsülasyonu gerçekleştirilerek sırasıyla F1, F2 ve F3 nanoformülasyonu ve ÇLA-LPG ve OLA-LPG ikili antijen kombinasyon halinde enkapsülasyonu gerçekleştirilerek sırasıyla F4 ve F5 nanoformülasyonları elde edildi. Nanopartiküllerin hazırlanmasında ikili solvent emülsiyon yöntemi kullanıldı. Hazırlanan partiküllerin karakterizasyonunda öncelikle tek başına antijenlerin, PLGA

polimerinin ve sentezlenen nanoformülasyonların FTIR pikleri üst üste karşılaştırılarak antijenlerin nanopartiküllerin içerisine kapsüllenip kapsüllenmediği FTIR cihazı yardımıyla incelendi. Antijen yüklü nanoformülasyonların nano boyutlarda olup olmadıkları ise Zeta-Sizer cihazında gerçekleştirilen boyut analizi sonuçlarına göre tespit edildi. Buna göre, elde edilen nanoformülasyonların boyutlarının  $159,3 \pm 2,07$  ve  $316,3 \pm 76,39$  nm boyutları aralığında olduğu belirlendi. Aynı zamanda nanopartiküllerin SEM analizleri ile morfolojilerinin pürüzsüz olduğu ve homojen dağılımlı olduğu gözlemlendi. Nanoformülasyonlar için bir diğer önemli parametre partiküllerin salım profillerinin çıkarılmasıdır. Salınan antijen miktarını belirlemek için BCA yöntemi ile UV-Spektrofotometre cihazından yararlanıldı. Sonuç olarak nanopartiküllerin 30 gün içerisinde yaklaşık % 59,4 ile % 75,7 aralığında salım yaptıkları tespit edildi. Benzer şekilde nanopartiküllerin enkapsülasyon verimlerinin % 8,4 ve % 32,4 arasında olduğu da belirlendi.

Tüm nanoformülasyonların 50 - 1000 µg/ml konsantrasyon aralığında J774 ve L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksiteleri incelendi. Buna göre, 500 µg/ml konsantrasyona kadar olan konsantrasyonların hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkiye neden olmadıkları 1000 µg/ml konsantrasyonunda ise nanopartiküllerin hücrelerde belirgin toksik etkiler gösterdikleri belirlendi. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda en yüksek non-toksik konsantrasyon olarak belirlenen 500 µg/ml konsantrasyonu kullanıldı. Sentezlenen formülasyonların 500 µg/ml'lik konsantrasyonu makrofajlar üzerine uygulanarak, makrofajların nitrik oksit ve sitokin üretme potansiyelleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda tüm nanoformülasyonların nitrik oksit ve sitokin seviyelerini anlamlı ölçüde arttırdıkları saptandı. Tek başına LPG ve OLA antijenini içeren nanoformülasyonları hemen hemen aynı oranda nitrik oksit üretimi sağladığı ve kontrol grubu ile kıyaslandığında nitrik oksit miktarını sırasıyla 6 kat arttırdığı, ÇLA antijenini içeren nanoformülasyon ise kontrol grubu ile kıyaslandığında 8 kat arttırdığı sonucuna varıldı. Buna karşılık İkili antijen kombinasyonu içeren nanoformülasyonlar sırasıyla F4 ve F5 için nitrik oksit miktarları  $56 \pm 3,21$  ve  $71 \pm 3,84$  olarak ölçüldü. Bu sonuçlar kontrol grubuyla kıyaslandığında nitrik oksit seviyesini sırasıyla yaklaşık 12 ve 20 kat arttırdıkları tespit edildi. Bu konuda yapılan çalışmalardan birinde rekombinant KMP-11 antijeninin PLGA nanopartiküllerine enkapsülasyonu ile oluşturulan



formülasyonların periton makrofajlarının NO üretimi üzerindeki etkinlikleri incelenmiş. Buna göre antijen yüklü nanopartiküllerin uygulandığı makrofajlarda NO seviyesinin boş nanopartikül ve tek başına antijen içeren formülasyonlara kıyasla yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar antijen yüklü polimerik nanopartiküllerin *in vitro* ortamda makrofajların NO üretme potansiyellerini arttırabildiklerinin ortaya koymaktadır [32]. Bir başka çalışmada çalışmada PLGA nanopartiküllerine kinetoplastid membran proteini 11 (KMP-11) yükleyerek oluşturdukları formülasyonun etkinliği *in vivo* olarak incelemişler ve parazit yükünü önemli ölçüde azalttığı sonucuna varmışlardır. KMP-11 yüklü PLGA nanoparçacıkları ile makrofajların inkübasyonu, parazit yükünü önemli ölçüde azalttığı ve buna paralel olarak, artmış nitrik oksit, süperoksit, TNF- $\alpha$  ve IL-6 üretimini gözlemlemişler. Sonuç olarak KMP-11 yüklü PLGA nanoparçacıklarının, doğuştan gelen güçlü yanıtların indüksiyonu yoluyla hücre içi *Leishmania* parazitlerinin öldürülmesini sağladığını rapor etmişler [319].

Aşı formülasyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer parametre ise makrofaj hücrelerinde sitokin üretme potansiyelleridir. Tez kapsamında IL-4, IL-10, IL-12 ve IFN- $\gamma$  sitokinleri ticari ELISA kitleri kullanılarak incelendi. Antijen yüklü nanoformülasyonların ve serbest haldeki antijenlerin özellikle IL-12 ve IFN- $\gamma$  seviyelerini önemli oranda arttırdıkları belirlendi. Nanoformülasyonlar arasında IL-12 ve IFN-gama sitokinleri üretimi açısından önemli bir farklılık gözlenmezken kontrol grubu ile kıyaslandığında bu sitokinlerin 4-6 kat arasında arttığı saptandı. Bu sitokinler için en yüksek değerler ise OLA-LPG ve ÇLA-LPG antijenlerinde gözlemlendi. OLA-LPG ve ÇLA-LPG antijenlerine maruz kalan makrofajlarda IL-12 değerleri sırasıyla  $58 \pm 3,53$  pg/ml ve  $55 \pm 3,80$  pg/ml olarak belirlenirken IFN- $\gamma$  sırasıyla  $25 \pm 1,62$  pg/ml ve  $23 \pm 1,47$  pg/ml olarak ölçüldü. Buna karşılık, serbest haldeki antijen kombinasyonlarına ve antijen yüklü nanoformülasyonlara maruz kalan makrofajlardaki IL-4 ve IL-10 seviyelerinde anlamlı bir değişikliğin meydana gelmediği belirlendi. IL-4 değeri hem serbest antijenler hem de nanoformülasyonlar için yaklaşık 17 pg/ml, IL-10 değeri ise yaklaşık 25 pg/ml olarak ölçüldü.

IL-12 ve IFN- $\gamma$  gibi Th1 immün yanıtı tetikleyen sitokinlerin seviyelerinin kontrol grubuna göre nanoformülasyonlarla muamele sonucunda artmış olması, bu

formülasyonların Th1 immün yanıtı tetikleyebileceğinin bir kanıtı olarak değerlendirilebilir [111].

*In vitro* sitokin deneyleriyle ilgili elde ettiğimiz diğer önemli sonuç tek başına antijen uygulamalarının nanoformülasyonlarla aynı seviyede IL-12 ve IFN- $\gamma$  seviyesini arttırmasıdır. Bunun nedeninin, PLGA nanopartiküllerinin içerisindeki antijenlerin zamanla salındıkları için, 72 saatlik kısa süre sonunda yalnızca az miktarda antijenin ortama salınması ve makrofajların indüklenmesine neden olması olabilir. Ayrıca, nanopartiküler sistemlerin serbest antijenlerle hemen hemen eşit düzeyde sitokin üretimini tetiklemesi bu taşıyıcı sistemlerin bir adjuvan olarak da başarısını göstermektedir. Tafagodi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada PLGA nanoküreleri içerisine CpG-ODN immunoadjuvanı ve otoklavlanmış *leishmania antijenini* (OLA) enkapsüle ederek PLGA nanokürelerinin aşı taşıyıcı sistemi olarak koruyucu bağışıklık tepkilerini artırabileceği ve böylece antijen yüklü PLGA nanopartiküler sistemlerin immün yanıtı Th1 yönünde regüle ettiği gösterilmiştir [31].

Yapılan *in vitro* çalışmaların ardından tüm gruplar için belirlenen konsantrasyonlar kullanılarak deney hayvanlarının üzerinde gerçekleştirilecek *in vivo* çalışmalara geçildi.

Deney hayvanları öncelikle ÇLA-LPG, OLA-LPG antijen kombinasyonu ve nanoformülasyonlarla 8 kez immünize edildi. 8. immünizasyon sonucunda farelerden alınan kan örneklerindeki antikor miktarları incelendiğinde, tüm nanopartiküler formülasyonların antikor seviyelerini anlamlı oranda arttırdığı sonucuna varıldı. Formülasyonlar içerisinde antikor yanıtını arttırma konusunda en yüksek etkinliğe sahip grubun (OLA-LPG) PLGA formülasyonu olduğu anlaşıldı. (OLA-LPG) PLGA ile immünize edilen fare grupları OLA-LPG grubu farelere kıyasla 2 kat yüksek antikor yanıtı oluşturmuştur. (OLA-LPG) PLGA formülasyonu tek başına OLA ve tek başına LPG antijenlerini içeren PLGA nanoformülasyonları ile kıyaslandığında sırasıyla 2 ve 3,5 katlık artış göstermiştir.

Böylece yeterli düzeyde antikor yanıtının elde edilmesinin ardından, deney hayvanları enfektif *L.infantum* promastigotlarıyla enfekte edildi ve bir aylık süre boyunca düzenli olarak takip edildi. Bir aylık bir inkübasyon döneminin ardından, kontrol grubu farelerin belirli bölgelerinde tüylerinde dökülmeler gözlemlendi. Bunun üzerine tüm gruplardan kan

örneği alınıp giemsa ve mikrokültür yöntemi ile kandan parazit varlığı tespit edildi. Giemsa ve MKY incelemeleri sonucu kontrol grubu farelerde yoğun miktarda parazit enfeksiyonu gözlemlendi. Bu gözlemlerin ardından deney hayvanlarının sakrifikasyonu gerçekleştirildi ve parazit yükünün belirlenmesi (LDU) ve sitokin ölçümleri için karaciğer ve dalakları alındı. Hesaplanan LDU değerlerine göre (ÇLA-LPG)PLGA ve (OLA-LPG)PLGA nanoformülasyonlarıyla immünize edilen farelerin karaciğerleri için LDU değerlerinin kontrole göre ciddi anlamda düştüğü tespit edilmiştir. Karaciğer LDU değerinde meydana gelen azalma sırasıyla (ÇLA-LPG)PLGA ve (OLA-LPG)PLGA için yaklaşık %75 ve %78 olarak belirlendi. Tek başına antijen içeren nanoformülasyonlar ise %50-65 arasında koruma sağladığı tespit edildi. Dalak LDU değeri ise (ÇLA-LPG)PLGA ve (OLA-LPG)PLGA için sırasıyla yaklaşık % 33 ve % 40 olarak belirlendi. LDU değerlerinde meydana gelen azalma, deney hayvanlarının karaciğer ve dalaklarındaki parazit yükünün azaldığını göstermektedir. Bu sonuç uygulanan aşı formülasyonlarının hücresel ve humoral yanıtı tetikleyerek organlardaki parazit enfeksiyonunu büyük ölçekte engellediğini düşündürmektedir.

İncelenen bir diğer önemli *in vivo* parametre dalak hücrelerindeki sitokin seviyeleridir. Bunun nedeni sitokinlerin hücresel büyüme, inflamasyon, immünite ve doku onarımı gibi çeşitli önemli biyolojik olaylarda rol oynamasıdır. Sitokinler, birbirinden farklı çok çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanırlar ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler [325]. Bu sayede Th1 ve Th2 immün yanıtları arasındaki dengede önemli görevleri vardır. Hastalığa karşı direnç genel olarak CD4<sup>+</sup> T lenfositlerin alt tipi olan Th1 hücrelerinin çoğalarak IL-12 ve IFN- $\gamma$  üretimiyle ilişkilidir. Böylece makrofajların aktivasyonu sağlanır ve aktiflenmiş makrofajlar serbest radikalleri ve NO üreterek parazitin hücre içinde öldürülmesini sağlamaktadır. Leishmaniasis'e duyarlı kişilerde ise genel olarak Th2 hücrelerine bağlı olarak IL-4 ve IL-10 sitokinleri üretilir. Bu sitokinlerden IL-4, Th1 lenfositlerin çoğalmasını inhibe eder [326], [327], [328]. Bu yüzden Leishmaniasis'e karşı aşı çalışmalarında sitokin ölçümleri hastalığın kontrolünde oldukça önemli role sahiptir. Bu nedenle tez kapsamında tüm gruplar için IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4 ve IL-10 sitokinleri değerlendirildi. Değerlendirme sonuçlarına göre (ÇLA-LPG)PLGA ve (OLA-LPG)PLGA nanoformülasyonlarının IL-12 ve IFN- $\gamma$  seviyelerini anlamlı ölçüde arttırdıkları, IL-4 seviyesinin anlamlı düzeyde değişmediği ve IL-10 seviyelerinin ise

nanofarmülasyon gruplarında yaklaşık 2 katlık bir düşüş gösterdiği saptandı. (ÇLA-LPG)PLGA formülasyonu uygulanmış farelerde dalak hücrelerinin ürettiği IL-12 sitokin miktarı  $181,38 \pm 8,42$  pg/ml iken (OLA-LPG)PLGA için üretilen sitokin miktarı  $288,38 \pm 8,61$  pg/ml hesaplandı. Benzer şekilde IFN- $\gamma$  için ölçülen değerler, (ÇLA-LPG)PLGA ile immünize edilen fare grubunda  $1145 \pm 102,4$  pg/ml iken (OLA-LPG)PLGA için  $2077 \pm 107,1$  pg/ml'dir. IL-4 sitokin miktarının ise tüm gruplarda yaklaşık 1200 pg/ml civarı olduğu, ve yine benzer etkiye sahip IL-10 sitokin miktarı (ÇLA-LPG)PLGA için  $916 \pm 61,3$  pg/ml iken (OLA-LPG)PLGA için  $732 \pm 41,9$  pg/ml olduğu gözlemlendi. İncelenen tüm formülasyonlar içerisinde *in vivo* koruyucu etkinlik gösterilmesi konusunda en yüksek etkinliği (ÇLA-LPG)PLGA ve (OLA-LPG)PLGA nanofarmülasyonun gösterdiği anlaşıldı.

Geçmişte konuyla ilgili yapılan çalışmalarda antijenlerin kombinasyon halinde uygulanmasının, tek başına uygulanmalarına kıyasla daha yüksek etkinlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Kaur ve arkadaşları yaptıkları çalışmada visceral leishmaniasise karşı gp63 ve Hsp70 antijenleri ile MPL-A (monofosfolipit-A) ve ALD (autoclaved *leishmania donovani*) adjuvanlarının kombinasyonlarını oluşturarak bunların koruyucu etkinliğini incelemiştir. Enfekte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında antijen kombinasyonları ile aşılansın Balb/c farelerin hepatik ve dalak parazit yükünde belirgin bir azalma olduğu ortaya konulmuştur [329]. Benzer bir çalışmada Nagill ve arkadaşları *Leishmania donovani* promastigotlarından elde ettikleri otoklavlanmış ve ısıyla öldürülmüş antijenleri kullanarak deney hayvanlarında hücre aracılı ve humoral tepkiyi indüklemek potansiyelleri değerlendirilmiştir. Aşılama ile öncelikle splenositlerde IFN- $\gamma$  ve IL-2 üretiminin uyarıldığı ve bununla birlikte IL-10 ve IL-4'ün aşağı regülasyonun eşlik ettiği gösterilmiş ve böylece arelerde Th1 tipi yanıt geliştiği rapor edilmiştir. Sonuç olarak ısıyla öldürülmüş ve otoklava tabii tutulmuş antijenlerin, hücre aracılı immün tepkiyi tetikleyebilecek bir aşı olma potansiyeli olduğunu işaret etmektedir [330]. Bir başka çalışmada Bhowmick ve arkadaşları *Leishmania donovani* promastigotlarından elde ettikleri çözünür *leishmania* antijenlerini (ÇLA) negatif, nötr veya pozitif yüklü lipozomlar içinde hapsederek VL'ye karşı aşı etkinliğini çalışmalarında incelemişlerdir. BALB/c farelerinde *L. donovani* enfeksiyonuna karşı en iyi yanıtı ÇLA yüklü pozitif lipozom aşı formülasyonu göstermiştir. Bu aşı formülasyonunun parazitlerin hem

karaciğerden hem de dalaktan % 90'dan daha fazla oranda eliminasyona neden olduğunu saptamışlar [331].

Böylece bu tez çalışmasında;

*L.infantum* parazitlerinden immünojen özellikli LPG molekülünün izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirildi. Ayrıca ÇLA ve OLA antijenleri hazırlandı.

Hem tek başına LPG, ÇLA, OLA hem de ÇLA-LPG ve OLA-LPG antijen kombinasyonları halinde nanopartiküller içerisine enkapsüle edilerek sırasıyla F1, F2, F3, F4 ve F5 nanoformülasyonları elde edildi ve karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Elde edilen nanoformülasyonların fare fibroblast (L929) ve fare makrofaj hücrelerinde (J774) 500 µl konsantrasyonuna kadar toksik etki göstermediği MTT yöntemi ile belirlendi.

Tek başına antijen kombinasyonlarının ve nanoformülasyonların *in vitro* etkinlikleri *Leishmania* parazitin konak hücresi olan makrofaj hücrelerinde çalışıldı. Bu çalışmalar arasında nanoformülasyonların uygulandığı makrofaj hücrelerinin NO ve sitokin üretme potansiyeli incelendi. Bunun sonucunda ikili antijen kombinasyonlarını içeren F4 ve F5 nanoformülasyonlarının kontrol grubuyla kıyaslandığında nitrik oksit seviyesini sırasıyla yaklaşık 15 ve 20 kat arttırdıkları tespit edildi. Sitokin incelemelerinde ise tüm nanoformülasyonlar arasında F5 nanoformülasyonu IL-12 ve IFN-γ miktarlarının en fazla üretildiği grup olarak belirlendi. Ancak tek başına antijen kombinasyonlarının nanoformülasyonlarla yaklaşık aynı düzeyde sitokin üretimini uyardıkları gözlemlendi. Bunun nedeninin nanopartiküler sistemlerin zamanla salım yapmaları sonucu 72 saatlik kısa süre sonunda az miktarda antijenin ortama salınması ve makrofajların yeterince indüklenmemiş olması olabilir. İncelenen diğer sitokiner IL-4 ve IL-10 seviyelerinde ise tüm gruplara arasında anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi.

Nanoformülasyonların *in vivo* etkinlerini incelemek için öncelikle deney hayvanlarının immünizasyonu gerçekleştirildi ve 8. İmmünizasyondan sonra en yüksek antikor yanıtı F5 deney grubu farelerde gözlemlendi.

Daha sonra farelerin enfeksiyonu gerçekleştirildi ve enfeksiyonun kontrolü Giemsa boyama ve MKY ile yapılan incelemelere göre değerlendirildi.

*In vivo* aşı etkinliğinin incelenmesinde Leishman-Donovan unite hesaplanmasının önemli bir yeri vardır. Buna göre parazit yükünde en belirgin azalma % 78 değeriyle OLA-LPG antijenlerinin içeren PLGA (F5) ve yaklaşık %75 ile (ÇLA-LPG)PLGA (F4) grubunda gözlemlendi.

Böylece bu tez çalışması kapsamında Dünyada ve Ülkemizde ilk kez olarak, Visseral Leishmaniasis'e karşı etkinliği *in vitro* ve *in vivo* incelenen ÇLA-LPG ve OLA-LPG ikili antijen kombinasyonu içeren PLGA temelli yeni nesil aşı nanoformülasyonları geliştirilmiş oldu.

### **Öneriler**

Elde edilen sonuçlara dayanarak;

- 1- Ülkemizde Visseral Leishmaniasis'e karşı milli aşılardan üretilmesi için OLA-LPG ve ÇLA-LPG içeren PLGA nanoformülasyonlarının büyük ölçekte üretimine yönelik çalışmalar başlatılabilir.
- 2- Üretilen aşı nanoformülasyonlarının hastalığın rezervuarı olduğu bilinen köpekler üzerinde uygulanmasına yönelik çalışmalara başlatılabilir.
- 3- Daha sonraki aşamalarda ise insanlarda klinik faz aşamaları başlatılabilir.

## KAYNAKLAR

- [1] Pujar, H. ve Lundgren, M., (2018). "Modern Production Strategies in the Vaccine Industry", Elsevier, First edition, İsveç.
- [2] Moyle, P.M., (2017). "Biotechnology approaches to produce potent, self-adjuvanting antigen-adjuvant fusion protein subunit vaccines", *Biotechnol Adv*, 35: 375-389.
- [3] Reithinger, R. Dujardin, J.C. Louzir, H. Pirmez, C. Alexander, B. ve Brooker, S., (2007). "Cutaneous leishmaniasis", *Lancet Infect Dis*, 7: 581-596.
- [4] Alvar, J. Croft, S.L. Kaye, P. Khamesipour, A. Sundar, S. ve Reed, S.G., (2013). "Case study for a vaccine against leishmaniasis", *Vaccine*, 31: B244-B249.
- [5] Uzun, S. Gurel, M.S. Durdu, M. Akyol, M. Fettahlioglu Karaman, B. Aksoy, M. Aytakin, S. Borlu, M. Inan Dogan, E. Dogramaci, C.A. Kapicioglu, Y. Akman-Karakas, A. Kaya, T.I. Mulayim, M.K. Ozbel, Y. Ozensoy Toz, S. Ozgoztasi, O. Yesilova, Y. ve Harman, M., (2018). "Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey", *Int J Dermatol*, 57: 973-982.
- [6] Ozbilgin, A. Toz, S. Harman, M. Gunasti Topal, S. Uzun, S. Okudan, F. Gungor, D. Erat, A. Ertabaklar, H. Ertug, S. Gunduz, C. Cavus, I. Karakus, M. Ostan Ural, I. Olgen, M.K. Kayabasi, C. Kurt, O. ve Ozbel, Y., (2018). "The current clinical and geographical situation of cutaneous leishmaniasis based on species identification in Turkey", *Acta Trop*.
- [7] Özkeklikçi, A. Karakuş, M. Özbel, Y. ve Töz, S., (2017). "The new situation of cutaneous leishmaniasis after Syrian civil war in Gaziantep city, Southeastern region of Turkey", *Acta Tropica*, 166: 35-38.
- [8] Oryan, A. ve Akbari, M., (2016). "Worldwide risk factors in leishmaniasis", *Asian Pac J Trop Med*, 9: 925-932.
- [9] Torres-Guerrero, E. Quintanilla-Cedillo, M.R. Ruiz-Esmenjaud, J. ve Arenas, R., (2017). "Leishmaniasis: a review", *F1000Res*, 6: 750.
- [10] Palatnik-de-Sousa, C.B., (2008). "Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years", *Vaccine*, 26: 1709-1724.
- [11] Modabber, F., (1995). "Vaccines against leishmaniasis", *Ann Trop Med Parasitol*, 89 Suppl 1: 83-88.

- [12] Rezvan, H. ve Moafi, M., (2015). "An overview on Leishmania vaccines: A narrative review article", *Vet Res Forum*, 6: 1-7.
- [13] Allahverdiyev, A. Bagirova, M. Cakir Koc, R. Oztel, O.N. Elcicek, S. Ates, S.C. ve Karaca, T.D., (2010). "[Approaches and problems in vaccine development against leishmaniasis]", *Turkiye Parazitolojisi Dergisi*, 34: 122-130.
- [14] Firouzmand, H. Badiie, A. Khamesipour, A. Shargh, V.H. Alavizadeh, S.H. Abbasi, A. ve Jaafari, M.R., (2013). "Induction of protection against leishmaniasis in susceptible BALB/c mice using simple DOTAP cationic nanoliposomes containing soluble Leishmania antigen (SLA)", *Acta Tropica*, 128: 528-535.
- [15] Nagill, R. Mahajan, R. Sharma, M. ve Kaur, S., (2009). "Induction of cellular and humoral responses by autoclaved and heat-killed antigen of Leishmania donovani in experimental visceral leishmaniasis", *Parasitol Int*, 58: 359-366.
- [16] Coler, R.N. ve Reed, S.G., (2005). "Second-generation vaccines against leishmaniasis", *Trends Parasitol*, 21: 244-249.
- [17] Yao, C. Donelson, J.E. ve Wilson, M.E., (2003). "The major surface protease (MSP or GP63) of Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function", *Mol Biochem Parasitol*, 132: 1-16.
- [18] Handman, E. ve Mitchell, G.F., (1985). "Immunization with Leishmania receptor for macrophages protects mice against cutaneous leishmaniasis", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 5910-5914.
- [19] Moll, H. Mitchell, G.F. McConville, M.J. ve Handman, E., (1989). "Evidence of T-cell recognition in mice of a purified lipophosphoglycan from Leishmania major", *Infect Immun*, 57: 3349-3356.
- [20] Moll, H. ve Rollinghoff, M., (1991). "T-cell reactivity to purified lipophosphoglycan from Leishmania major: a model for analysis of the cellular immune response to microbial carbohydrates", *Behring Inst Mitt*: 161-169.
- [21] Amprey, J.L. Im, J.S. Turco, S.J. Murray, H.W. Illarionov, P.A. Besra, G.S. Porcelli, S.A. ve Spath, G.F., (2004). "A subset of liver NK T cells is activated during Leishmania donovani infection by CD1d-bound lipophosphoglycan", *J Exp Med*, 200: 895-904.
- [22] Topuzogullari, M. Cakir Koc, R. Dincer Isoglu, S. Bagirova, M. Akdeste, Z. Elcicek, S. Oztel, O.N. Yesilkir Baydar, S. Canim Ates, S. ve Allahverdiyev, A.M., (2013). "Conjugation, characterization and toxicity of lipophosphoglycan-polyacrylic acid conjugate for vaccination against leishmaniasis", *J Biomed Sci*, 20: 35.
- [23] Allahverdiyev, A.M. Cakir Koc, R. Bagirova, M. Elcicek, S. Baydar, S.Y. Oztel, O.N. Abamor, E.S. Ates, S.C. Topuzogullari, M. Isoglu Dincer, S. ve Akdeste, Z., (2017). "A new approach for development of vaccine against visceral leishmaniasis: Lipophosphoglycan and polyacrylic acid conjugates", *Asian Pac J Trop Med*, 10: 877-886.



- [24] Yadav, H.K.S. Dibi, M. Mohammad, A. ve Srouji, A.E., (2018). "Nanovaccines formulation and applications-a review", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 44: 380-387.
- [25] Vicente, S. Prego, C. Csaba, N. ve Alonso, M.J., (2010). "From single-dose vaccine delivery systems to nanovaccines", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 20: 267-276.
- [26] Pardeshi, C. Rajput, P. Belgamwar, V. Tekade, A. Patil, G. Chaudhary, K. ve Sonje, A., (2012). "Solid lipid based nanocarriers: an overview", *Acta Pharm*, 62: 433-472.
- [27] Nordly, P. Madsen, H.B. Nielsen, H.M. ve Foged, C., (2009). "Status and future prospects of lipid-based particulate delivery systems as vaccine adjuvants and their combination with immunostimulators", *Expert Opin Drug Deliv*, 6: 657-672.
- [28] Mahapatro, A. ve Singh, D.K., (2011). "Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines", *J Nanobiotechnology*, 9: 55.
- [29] Kumari, A. Yadav, S.K. ve Yadav, S.C., (2010). "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75: 1-18.
- [30] Tafaghodi, M. Eskandari, M. Kharazizadeh, M. Khamesipour, A. ve Jaafari, M.R., (2010). "Immunization against leishmaniasis by PLGA nanospheres loaded with an experimental autoclaved *Leishmania major* (ALM) and Quillaja saponins", *Trop Biomed*, 27: 639-650.
- [31] Tafaghodi, M. Khamesipour, A. ve Jaafari, M.R., (2011). "Immunization against leishmaniasis by PLGA nanospheres encapsulated with autoclaved *Leishmania major* (ALM) and CpG-ODN", *Parasitol Res*, 108: 1265-1273.
- [32] Santos, D.M. Carneiro, M.W. de Moura, T.R. Soto, M. Luz, N.F. Prates, D.B. Irache, J.M. Brodskyn, C. Barral, A. Barral-Netto, M. Espuelas, S. Borges, V.M. ve de Oliveira, C.I., (2013). "PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of *Leishmania*", *Nanomedicine*, 9: 985-995.
- [33] Wang, Q. Barry, M.A. Seid, C.A. Hudspeth, E.M. McAtee, C.P. ve Heffernan, M.J., (2018). "3M-052 as an adjuvant for a PLGA microparticle-based *Leishmania donovani* recombinant protein vaccine", *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 106: 1587-1594.
- [34] Bobbala, S. ve Hook, S., (2016). "Is There an Optimal Formulation and Delivery Strategy for Subunit Vaccines?", *Pharm Res*, 33: 2078-2097.
- [35] Moyle, P.M. ve Toth, I., (2013). "Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities", *ChemMedChem*, 8: 360-376.
- [36] Hilleman, M.R., (2000). "Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries", *Vaccine*, 18: 1436-1447.

- [37] Clem, A.S., (2011). "Fundamentals of vaccine immunology", J Glob Infect Dis, 3: 73-78.
- [38] Delany, I. Rappuoli, R. ve De Gregorio, E., (2014). "Vaccines for the 21st century", EMBO Mol Med, 6: 708-720.
- [39] Xie, J. ve He, Y., (2017). "Ontology-Based Vaccine Adverse Event Representation and Analysis", Adv Exp Med Biol, 1028: 89-103.
- [40] Plotkin, S.A. ve Plotkin, S.L., (2011). "The development of vaccines: how the past led to the future", Nat Rev Microbiol, 9: 889-893.
- [41] Tuells, J., (2012). "Vaccinology: the name, the concept, the adjectives", Vaccine, 30: 5491-5495.
- [42] Hajj Hussein, I. Chams, N. Chams, S. El Sayegh, S. Badran, R. Raad, M. Gerges-Geagea, A. Leone, A. ve Jurjus, A., (2015). "Vaccines Through Centuries: Major Cornerstones of Global Health", Front Public Health, 3: 269.
- [43] Kevric, I. Cappel, M.A. ve Keeling, J.H., (2015). "New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review", Dermatol Clin, 33: 579-593.
- [44] Ozkeklikci, A. Karakus, M. Ozbel, Y. ve Toz, S., (2017). "The new situation of cutaneous leishmaniasis after Syrian civil war in Gaziantep city, Southeastern region of Turkey", Acta Trop, 166: 35-38.
- [45] Gurel, M.S. Yesilova, Y. Olgen, M.K. ve Ozbel, Y., (2012). "[Cutaneous leishmaniasis in Turkey]", Turkiye Parazitoloj Derg, 36: 121-129.
- [46] Kursun, E. Turunc, T. Demiroglu, Y.Z. Solmaz, S. ve Arslan, H., (2013). "[Evaluation of fourteen adult cases with visceral leishmaniasis]", Mikrobiyol Bul, 47: 500-506.
- [47] Ozbilgin, A. Harman, M. Karakus, M. Bart, A. Toz, S. Kurt, O. Cavus, I. Polat, E. Gunduz, C. Van Gool, T. ve Ozbel, Y., (2017). "Leishmaniasis in Turkey: Visceral and cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* in Turkey", Acta Trop, 173: 90-96.
- [48] Kocarslan, S. Turan, E. Ekinci, T. Yesilova, Y. ve Apari, R., (2013). "Clinical and histopathological characteristics of cutaneous Leishmaniasis in Sanliurfa City of Turkey including Syrian refugees", Indian J Pathol Microbiol, 56: 211-215.
- [49] Burza, S. Croft, S.L. ve Boelaert, M., (2018). "Leishmaniasis", Lancet, 392: 951-970.
- [50] Monge-Maillo, B. ve Lopez-Velez, R., (2013). "Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis", Drugs, 73: 1889-1920.
- [51] Culha, G. Dogramaci, A.C. Kaya, T. Cavus, I. Gulkan, B. ve Ozbilgin, A., (2018). "[Imported cutaneous leishmaniasis cases detected in truck drivers in Hatay]", Mikrobiyol Bul, 52: 316-323.
- [52] Asilian, A. Jalayer, T. Whitworth, J.A. Ghasemi, R.L. Nilforooshzadeh, M. ve Olliaro, P., (1995). "A randomized, placebo-controlled trial of a two-week

regimen of aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran", *Am J Trop Med Hyg*, 53: 648-651.

- [53] Zakraoui, H. Ben Salah, A. Ftaiti, A. Marrakchi, H. Zaatour, A. Zaafour, B. Ahmadi, Z. Garraoui, A. Ben Osman, A. Dellagi, K. ve et al., (1995). "[Spontaneous course of lesions of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis in Tunisia]", *Ann Dermatol Venereol*, 122: 405-407.
- [54] Layegh, P. Moghiman, T. ve Ahmadian Hoseini, S.A., (2013). "Children and cutaneous leishmaniasis: a clinical report and review", *J Infect Dev Ctries*, 7: 614-617.
- [55] Minodier, P. Zambelli, L. Mary, C. Faraut, F. Garnier, J.M. ve Berbis, P., (2008). "Cutaneous leishmaniasis treated with azithromycin in a child", *Pediatr Infect Dis J*, 27: 80-81.
- [56] 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.
- [57] Handler, M.Z. Patel, P.A. Kapila, R. Al-Qubati, Y. ve Schwartz, R.A., (2015). "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives", *J Am Acad Dermatol*, 73: 897-908; quiz 909-810.
- [58] Pedras, M.J. Carvalho, J.P. Silva, R.E.D. Ramalho, D.B. Senna, M.C.R. Moreira, H.S.A. Martinho, L.Z.M. Rabello, A. ve Cota, G., (2018). "Mucosal leishmaniasis: the experience of a Brazilian referral center", *Rev Soc Bras Med Trop*, 51: 318-323.
- [59] Amato, V.S. Tuon, F.F. Siqueira, A.M. Nicodemo, A.C. ve Neto, V.A., (2007). "Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review", *Am J Trop Med Hyg*, 77: 266-274.
- [60] Blum, J. Desjeux, P. Schwartz, E. Beck, B. ve Hatz, C., (2004). "Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53: 158-166.
- [61] Machado-Coelho, G.L. Caiaffa, W.T. Genaro, O. Magalhaes, P.A. ve Mayrink, W., (2005). "Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99: 55-61.
- [62] Konecny, P. ve Stark, D.J., (2007). "An Australian case of New World cutaneous leishmaniasis", *Med J Aust*, 186: 315-317.
- [63] Carvalho, E.M. Llanos-Cuentas, A. ve Romero, G.A.S., (2018). "Mucosal leishmaniasis: urgent need for more research", *Rev Soc Bras Med Trop*, 51: 120-121.
- [64] Maxfield, L. ve Crane, J.S., (2018). *Leishmaniasis*, ed. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC.
- [65] Zacarias, D.A. Rolao, N. de Pinho, F.A. Sene, I. Silva, J.C. Pereira, T.C. Costa, D.L. ve Costa, C.H.N., (2017). "Causes and consequences of higher *Leishmania*

infantum burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients", *Trop Med Int Health*, 22: 679-687.

- [66] Malafaia, G., (2009). "Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review", *Parasite Immunol*, 31: 587-596.
- [67] Lindoso, J.A.L. Moreira, C.H.V. Cunha, M.A. ve Queiroz, I.T., (2018). "Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives", *HIV AIDS (Auckl)*, 10: 193-201.
- [68] Lindoso, J.A. Cunha, M.A. Queiroz, I.T. ve Moreira, C.H., (2016). "Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges", *HIV AIDS (Auckl)*, 8: 147-156.
- [69] Alvar, J. Aparicio, P. Aseffa, A. Den Boer, M. Canavate, C. Dedet, J.P. Gradoni, L. Ter Horst, R. Lopez-Velez, R. ve Moreno, J., (2008). "The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years", *Clinical Microbiology Reviews*, 21: 334.
- [70] Harhay, M.O. Oliaro, P.L. Vaillant, M. Chappuis, F. Lima, M.A. Ritmeijer, K. Costa, C.H. Costa, D.L. Rijal, S. Sundar, S. ve Balasegaram, M., (2011). "Who is a typical patient with visceral leishmaniasis? Characterizing the demographic and nutritional profile of patients in Brazil, East Africa, and South Asia", *Am J Trop Med Hyg*, 84: 543-550.
- [71] van Griensven, J. ve Diro, E., (2012). "Visceral leishmaniasis", *Infect Dis Clin North Am*, 26: 309-322.
- [72] Ready, P.D., (2014). "Epidemiology of visceral leishmaniasis", *Clin Epidemiol*, 6: 147-154.
- [73] Chappuis, F. Sundar, S. Hailu, A. Ghalib, H. Rijal, S. Peeling, R.W. Alvar, J. ve Boelaert, M., (2007). "Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control?", *Nature Reviews Microbiology*, 5: 873-882.
- [74] Murray, H.W. Berman, J.D. Davies, C.R. ve Saravia, N.G., (2005). "Advances in leishmaniasis", *Lancet*, 366: 1561-1577.
- [75] Matthews, K.R., (2011). "Controlling and coordinating development in vector-transmitted parasites", *Science*, 331: 1149-1153.
- [76] Forestier, C.L., (2013). "Imaging host-Leishmania interactions: significance in visceral leishmaniasis", *Parasite Immunol*, 35: 256-266.
- [77] Leishman, W.B., (1903). "On the possibility of the occurrence of trypanomiasis in India.", *The British Medical Journal*.
- [78] Donovan, C., (1903). "Memoranda: On the possibility of the occurrence of trypanomiasis in India", *The British Medical Journal*.
- [79] Steverding, D., (2017). "The history of leishmaniasis", *Parasit Vectors*, 10: 82.
- [80] Ross, R., (1903). "Further notes on Leishman's bodies", *Ibid*.

- [81] (2016). "Correction: A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies", *PLoS Negl Trop Dis*, 10: e0004770.
- [82] Banuls, A.L. Hide, M. ve Prugnolle, F., (2007). "Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans", *Adv Parasitol*, 64: 1-109.
- [83] Singh, N. Mishra, B.B. Bajpai, S. Singh, R.K. ve Tiwari, V.K., (2014). "Natural product based leads to fight against leishmaniasis", *Bioorg Med Chem*, 22: 18-45.
- [84] Aleman, C., (1969). "Finestructure of cultured *Leishmania brasiliensis*", *Exp Parasitol*, 24: 259-264.
- [85] Sunter, J. ve Gull, K., (2017). "Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding", *Open Biol*, 7.
- [86] Wheeler, R.J. Sunter, J.D. ve Gull, K., (2016). "Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* life cycle involves a discrete flagellum attachment zone", *J Cell Sci*, 129: 854-867.
- [87] Rudzinska, M.A. D, A.P. ve Trager, W., (1964). "THE FINE STRUCTURE OF *LEISHMANIA DONOVANI* AND THE ROLE OF THE KINETOPLAST IN THE *LEISHMANI-LEPTOMONAD* TRANSFORMATION", *J Protozool*, 11: 166-191.
- [88] Waller, R.F. ve McConville, M.J., (2002). "Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites", *Int J Parasitol*, 32: 1435-1445.
- [89] Mullin, K.A. Foth, B.J. Ilgoutz, S.C. Callaghan, J.M. Zawadzki, J.L. McFadden, G.I. ve McConville, M.J., (2001). "Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*", *Mol Biol Cell*, 12: 2364-2377.
- [90] Wheeler, R.J. Gluenz, E. ve Gull, K., (2015). "Basal body multipotency and axonemal remodelling are two pathways to a 9+0 flagellum", *Nat Commun*, 6: 8964.
- [91] Zulfiqar, B. Shelper, T.B. ve Avery, V.M., (2017). "Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development", *Drug Discov Today*, 22: 1516-1531.
- [92] Shapiro, S.Z. Naessens, J. Liesegang, B. Moloo, S.K. ve Magondu, J., (1984). "Analysis by flow cytometry of DNA synthesis during the life cycle of African trypanosomes", *Acta Trop*, 41: 313-323.
- [93] Petropolis, D.B. Rodrigues, J.C. Viana, N.B. Pontes, B. Pereira, C.F. ve Silva-Filho, F.C., (2014). "*Leishmania amazonensis* promastigotes in 3D Collagen I culture: an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions", *PeerJ*, 2: e317.

- [94] Ribeiro-Gomes, F.L. ve Sacks, D., (2012). "The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection", *Front Cell Infect Microbiol*, 2: 59.
- [95] de Menezes, J.P. Saraiva, E.M. ve da Rocha-Azevedo, B., (2016). "The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis", *Parasit Vectors*, 9: 264.
- [96] Wetzel, D.M. Rhodes, E.L. Li, S. McMahon-Pratt, D. ve Koleske, A.J., (2016). "The Src kinases Hck, Fgr and Lyn activate Arg to facilitate IgG-mediated phagocytosis and Leishmania infection", *J Cell Sci*, 129: 3130-3143.
- [97] Antoine, J.C. Prina, E. Jouanne, C. ve Bongrand, P., (1990). "Parasitophorous vacuoles of Leishmania amazonensis-infected macrophages maintain an acidic pH", *Infect Immun*, 58: 779-787.
- [98] Antoine, J.C. Prina, E. Lang, T. ve Courret, N., (1998). "The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages", *Trends Microbiol*, 6: 392-401.
- [99] Loset, J.R., (2008). "Natural products for neglected diseases: a review", *Current Organic Chemistry*, 12: 643-666.
- [100] Wheeler, R.J. Gluenz, E. ve Gull, K., (2011). "The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology", *Mol Microbiol*, 79: 647-662.
- [101] Gossage, S.M. Rogers, M.E. ve Bates, P.A., (2003). "Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle", *Int J Parasitol*, 33: 1027-1034.
- [102] Bee, A. Culley, F.J. Alkhalife, I.S. Bodman-Smith, K.B. Raynes, J.G. ve Bates, P.A., (2001). "Transformation of Leishmania mexicana metacyclic promastigotes to amastigote-like forms mediated by binding of human C-reactive protein", *Parasitology*, 122: 521-529.
- [103] Killick-Kendrick, R., (1990). "The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host", *Ann Parasitol Hum Comp*, 65 Suppl 1: 37-42.
- [104] Handman, E. ve Bullen, D.V., (2002). "Interaction of Leishmania with the host macrophage", *Trends Parasitol*, 18: 332-334.
- [105] Selvapandiyan, A. Dey, R. Gannavaram, S. Solanki, S. Salotra, P. ve Nakhasi, H.L., (2014). "Generation of growth arrested Leishmania amastigotes: A tool to develop live attenuated vaccine candidates against visceral leishmaniasis", *Vaccine*, 32: 3895-3901.
- [106] Kumar, R. ve Engwerda, C., (2014). "Vaccines to prevent leishmaniasis", *Clin Transl Immunology*, 3: e13.
- [107] Andrade-Narvaez, F.J. Simmonds-Diaz, E. Rico-Aguilar, S. Andrade-Narveez, M. Palomo-Cetina, A. Canto-Lara, S.B. Garcia-Miss, M.R. Madera-Sevilla, M. ve Albertos-Alpuche, N., (1990). "Incidence of localized cutaneous

- leishmaniasis (chiclero's ulcer) in Mexico", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84: 219-220.
- [108] Telleria, E.L. Martins-da-Silva, A. Tempone, A.J. ve Traub-Cseko, Y.M., (2018). "Leishmania, microbiota and sand fly immunity", *Parasitology*, 145: 1336-1353.
- [109] Alexander, J. ve Bryson, K., (2005). "T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm", *Immunol Lett*, 99: 17-23.
- [110] Bogdan, C. ve Rollinghoff, M., (1999). "How do protozoan parasites survive inside macrophages? (vol 15, pg 22, 1999)", *Parasitology Today*, 15: 124-124.
- [111] Kumar, R. Bhatia, M. ve Pai, K., (2017). "Role of Cytokines in the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis", *Clin Lab*, 63: 1549-1559.
- [112] Pagliano, P. ve Esposito, S., (2017). "Visceral leishmaniosis in immunocompromised host: an update and literature review", *J Chemother*, 29: 261-266.
- [113] Tacchini-Cottier, F. Zweifel, C. Belkaid, Y. Mukankundiye, C. Vasei, M. Launois, P. Milon, G. ve Louis, J.A., (2000). "An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*", *J Immunol*, 165: 2628-2636.
- [114] McFarlane, E. Perez, C. Charmoy, M. Allenbach, C. Carter, K.C. Alexander, J. ve Tacchini-Cottier, F., (2008). "Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*", *Infect Immun*, 76: 532-541.
- [115] Rousseau, D. Demartino, S. Ferrua, B. Michiels, J.F. Anjuere, F. Fragaki, K. Le Fichoux, Y. ve Kubar, J., (2001). "In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection", *BMC Microbiol*, 1: 17.
- [116] Ritter, U. Frischknecht, F. ve van Zandbergen, G., (2009). "Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites?", *Trends Parasitol*, 25: 505-510.
- [117] Wiethe, C. Debus, A. Mohrs, M. Steinkasserer, A. Lutz, M. ve Gessner, A., (2008). "Dendritic cell differentiation state and their interaction with NKT cells determine Th1/Th2 differentiation in the murine model of *Leishmania major* infection", *J Immunol*, 180: 4371-4381.
- [118] Soong, L., (2008). "Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites", *J Immunol*, 180: 4355-4360.
- [119] Lutz, M.B. ve Schuler, G., (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?", *Trends Immunol*, 23: 445-449.
- [120] Moll, H. Fuchs, H. Blank, C. ve Rollinghoff, M., (1993). "Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells", *Eur J Immunol*, 23: 1595-1601.
- [121] Ng, L.G. Hsu, A. Mandell, M.A. Roediger, B. Hoeller, C. Mrass, P. Iparraguirre, A. Cavanagh, L.L. Triccas, J.A. Beverley, S.M. Scott, P. ve

- Weninger, W., (2008). "Migratory Dermal Dendritic Cells Act as Rapid Sensors of Protozoan Parasites", *Plos Pathogens*, 4.
- [122] Iezzi, G. Frohlich, A. Ernst, B. Ampenberger, F. Saeland, S. Glaichenhaus, N. ve Kopf, M., (2006). "Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after *Leishmania major* infection", *Journal of Immunology*, 177: 1250-1256.
- [123] Kapsenberg, M.L., (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization", *Nat Rev Immunol*, 3: 984-993.
- [124] Reiner, S.L. ve Locksley, R.M., (1995). "The regulation of immunity to *Leishmania major*", *Annu Rev Immunol*, 13: 151-177.
- [125] Brodskyn, C. de Oliveira, C.I. Barral, A. ve Barral-Netto, M., (2003). "Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years", *Expert Rev Vaccines*, 2: 705-717.
- [126] Scott, P., (1991). "IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis", *J Immunol*, 147: 3149-3155.
- [127] Trinchieri, G., (1993). "Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells", *Immunol Today*, 14: 335-338.
- [128] Ramirez-Pineda, J.R. Frohlich, A. Berberich, C. ve Moll, H., (2004). "Dendritic cells (DC) activated by CpG DNA ex vivo are potent inducers of host resistance to an intracellular pathogen that is independent of IL-12 derived from the immunizing DC", *J Immunol*, 172: 6281-6289.
- [129] Heinzl, F.P. Schoenhaut, D.S. Rerko, R.M. Rosser, L.E. ve Gately, M.K., (1993). "Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*", *J Exp Med*, 177: 1505-1509.
- [130] Kemp, M., (1997). "Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections", *APMIS Suppl*, 68: 1-33.
- [131] Macatonia, S.E. Hsieh, C.S. Murphy, K.M. ve O'Garra, A., (1993). "Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent", *Int Immunol*, 5: 1119-1128.
- [132] Tanaka, T. Hu-Li, J. Seder, R.A. Fazekas de St Groth, B. ve Paul, W.E., (1993). "Interleukin 4 suppresses interleukin 2 and interferon gamma production by naive T cells stimulated by accessory cell-dependent receptor engagement", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 5914-5918.
- [133] Park, A.Y. Hondowicz, B. Kopf, M. ve Scott, P., (2002). "The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*", *J Immunol*, 168: 5771-5777.
- [134] Carrera, L. Gazzinelli, R.T. Badolato, R. Hieny, S. Muller, W. Kuhn, R. ve Sacks, D.L., (1996). "*Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12



induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice", *J Exp Med*, 183: 515-526.

- [135] Tejle, K. Lindroth, M. Magnusson, K.E. ve Rasmusson, B., (2008). "Wild-type *Leishmania donovani* promastigotes block maturation, increase integrin expression and inhibit detachment of human monocyte-derived dendritic cells--the influence of phosphoglycans", *FEMS Microbiol Lett*, 279: 92-102.
- [136] McDowell, M.A. Marovich, M. Lira, R. Braun, M. ve Sacks, D., (2002). "Leishmania priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent", *Infect Immun*, 70: 3994-4001.
- [137] Sporri, R. ve Reis e Sousa, C., (2005). "Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function", *Nat Immunol*, 6: 163-170.
- [138] Reiner, N.E. Ng, W. ve McMaster, W.R., (1987). "Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products", *J Immunol*, 138: 1926-1932.
- [139] De Almeida, M.C. Cardoso, S.A. ve Barral-Netto, M., (2003). "Leishmania (*Leishmania*) chagasi infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage", *Int J Parasitol*, 33: 153-162.
- [140] Prina, E. Jouanne, C. de Souza Lao, S. Szabo, A. Guillet, J.G. ve Antoine, J.C., (1993). "Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes", *J Immunol*, 151: 2050-2061.
- [141] Bogdan, C. Gessner, A. Solbach, W. ve Rollinghoff, M., (1996). "Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites", *Curr Opin Immunol*, 8: 517-525.
- [142] Heinzl, F.P. Rerko, R.M. ve Hujer, A.M., (1998). "Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity", *Cell Immunol*, 184: 129-142.
- [143] Snijders, A. Kalinski, P. Hilkens, C.M. ve Kapsenberg, M.L., (1998). "High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals", *Int Immunol*, 10: 1593-1598.
- [144] Wei, X.Q. Charles, I.G. Smith, A. Ure, J. Feng, G.J. Huang, F.P. Xu, D. Muller, W. Moncada, S. ve Liew, F.Y., (1995). "Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase", *Nature*, 375: 408-411.
- [145] Wang, Z.E. Reiner, S.L. Zheng, S. Dalton, D.K. ve Locksley, R.M., (1994). "CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*", *J Exp Med*, 179: 1367-1371.
- [146] Swihart, K. Fruth, U. Messmer, N. Hug, K. Behin, R. Huang, S. Del Giudice, G. Aguet, M. ve Louis, J.A., (1995). "Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with

- Leishmania major but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response", *J Exp Med*, 181: 961-971.
- [147] Harms, G. Zwingenberger, K. Chehade, A.K. Talhari, S. Racz, P. Mouakeh, A. Douba, M. Nakel, L. Naiff, R.D. Kremsner, P.G. ve et al., (1989). "Effects of intradermal gamma-interferon in cutaneous leishmaniasis", *Lancet*, 1: 1287-1292.
- [148] Nylen, S. Khamesipour, A. Mohammadi, A. Jafari-Shakib, R. Eidsmo, L. Noazin, S. Modabber, F. ve Akuffo, H., (2006). "Surrogate markers of immunity to Leishmania major in leishmanin skin test negative individuals from an endemic area re-visited", *Vaccine*, 24: 6944-6954.
- [149] Tumang, M.C. Keogh, C. Moldawer, L.L. Helfgott, D.C. Teitelbaum, R. Hariprasad, J. ve Murray, H.W., (1994). "Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis", *J Immunol*, 153: 768-775.
- [150] Theodos, C.M. Povinelli, L. Molina, R. Sherry, B. ve Titus, R.G., (1991). "Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo", *Infect Immun*, 59: 2839-2842.
- [151] Murphy, M.L. Wille, U. Villegas, E.N. Hunter, C.A. ve Farrell, J.P., (2001). "IL-10 mediates susceptibility to Leishmania donovani infection", *Eur J Immunol*, 31: 2848-2856.
- [152] Kane, M.M. ve Mosser, D.M., (2001). "The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis", *J Immunol*, 166: 1141-1147.
- [153] de Waal Malefyt, R. Abrams, J. Bennett, B. Figdor, C.G. ve de Vries, J.E., (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes", *J Exp Med*, 174: 1209-1220.
- [154] Ribeiro, J.M. Rossignol, P.A. ve Spielman, A., (1986). "Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*", *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 83: 683-686.
- [155] Ghalib, H.W. Piuvezam, M.R. Skeiky, Y.A. Siddig, M. Hashim, F.A. el-Hassan, A.M. Russo, D.M. ve Reed, S.G., (1993). "Interleukin 10 production correlates with pathology in human Leishmania donovani infections", *J Clin Invest*, 92: 324-329.
- [156] Carvalho, E.M. Bacellar, O. Brownell, C. Regis, T. Coffman, R.L. ve Reed, S.G., (1994). "Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis", *J Immunol*, 152: 5949-5956.
- [157] Ding, L. Linsley, P.S. Huang, L.Y. Germain, R.N. ve Shevach, E.M., (1993). "IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression", *J Immunol*, 151: 1224-1234.
- [158] Kubin, M. Kamoun, M. ve Trinchieri, G., (1994). "Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells", *J Exp Med*, 180: 211-222.

- [159] Khamesipour, A. Rafati, S. Davoudi, N. Maboudi, F. ve Modabber, F., (2006). "Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview", *Indian J Med Res*, 123: 423-438.
- [160] Wilson, M.E. Jeronimo, S.M. ve Pearson, R.D., (2005). "Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species", *Microb Pathog*, 38: 147-160.
- [161] Scott, P. ve Novais, F.O., (2016). "Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis", *Nat Rev Immunol*, 16: 581-592.
- [162] Kaye, P.M. Svensson, M. Ato, M. Maroof, A. Polley, R. Stager, S. Zubairi, S. ve Engwerda, C.R., (2004). "The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis", *Immunol Rev*, 201: 239-253.
- [163] Ali, N. Mekuria, A.H. Requena, J.M. ve Engwerda, C., (2012). "Immunity to visceral leishmaniasis", *J Trop Med*, 2012: 780809.
- [164] Murray, H.W. ve Delph-Etienne, S., (2000). "Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis", *Infect Immun*, 68: 288-293.
- [165] Costa-Pereira, C. Moreira, M.L. Soares, R.P. Marteleto, B.H. Ribeiro, V.M. Franca-Dias, M.H. Cardoso, L.M. Viana, K.F. Giunchetti, R.C. Martins-Filho, O.A. ve Araujo, M.S., (2015). "One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis", *BMC Vet Res*, 11: 92.
- [166] Goto, H. ve Lindoso, J.A., (2004). "Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis", *Braz J Med Biol Res*, 37: 615-623.
- [167] Del Vecchio, M. Bajetta, E. Canova, S. Lotze, M.T. Wesa, A. Parmiani, G. ve Anichini, A., (2007). "Interleukin-12: biological properties and clinical application", *Clin Cancer Res*, 13: 4677-4685.
- [168] Reiner, S.L. Zheng, S. Wang, Z.E. Stowring, L. ve Locksley, R.M., (1994). "*Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection", *J Exp Med*, 179: 447-456.
- [169] Chang, K.P. Chaudhuri, G. ve Fong, D., (1990). "Molecular determinants of *Leishmania* virulence", *Annu Rev Microbiol*, 44: 499-529.
- [170] Khadem, F. ve Uzonna, J.E., (2014). "Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy", *Future Microbiol*, 9: 901-915.
- [171] Meier, C.L. Svensson, M. ve Kaye, P.M., (2003). "Leishmania-induced inhibition of macrophage antigen presentation analyzed at the single-cell level", *J Immunol*, 171: 6706-6713.
- [172] Sibley, L.D., (2011). "Invasion and intracellular survival by protozoan parasites", *Immunol Rev*, 240: 72-91.

- [173] Liew, F.Y. Millott, S. Parkinson, C. Palmer, R.M. ve Moncada, S., (1990). "Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine", *J Immunol*, 144: 4794-4797.
- [174] Leifso, K. Cohen-Freue, G. Dogra, N. Murray, A. ve McMaster, W.R., (2007). "Genomic and proteomic expression analysis of Leishmania promastigote and amastigote life stages: The Leishmania genome is constitutively expressed", *Molecular and Biochemical Parasitology*, 152: 35-46.
- [175] Seger, R. ve Krebs, E.G., (1995). "The MAPK signaling cascade", *FASEB J*, 9: 726-735.
- [176] Cunningham, A.C., (2002). "Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania", *Exp Mol Pathol*, 72: 132-141.
- [177] Podinovskaia, M. ve Descoteaux, A., (2015). "Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction", *Future Microbiol*, 10: 111-129.
- [178] Kima, P.E., (2007). "The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist", *International Journal for Parasitology*, 37: 1087-1096.
- [179] Lodge, R. ve Descoteaux, A., (2005). "Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania", *Clin Immunol*, 114: 256-265.
- [180] Lodge, R. ve Descoteaux, A., (2008). "Leishmania invasion and phagosome biogenesis", *Subcell Biochem*, 47: 174-181.
- [181] Rodriguez, N.E. Gaur, U. ve Wilson, M.E., (2006). "Role of caveolae in Leishmania chagasi phagocytosis and intracellular survival in macrophages", *Cell Microbiol*, 8: 1106-1120.
- [182] Ueno, N. Bratt, C.L. Rodriguez, N.E. ve Wilson, M.E., (2009). "Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic Leishmania infantum chagasi promastigotes", *Cell Microbiol*, 11: 1827-1841.
- [183] Flannagan, R.S. Cosio, G. ve Grinstein, S., (2009). "Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies", *Nat Rev Microbiol*, 7: 355-366.
- [184] Sacks, D.L., (2001). "Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence", *Cell Microbiol*, 3: 189-196.
- [185] Alexander, J. Satoskar, A.R. ve Russell, D.G., (1999). "Leishmania species: models of intracellular parasitism", *J Cell Sci*, 112 Pt 18: 2993-3002.
- [186] Severn, A. Wakelam, M.J. ve Liew, F.Y., (1992). "The role of protein kinase C in the induction of nitric oxide synthesis by murine macrophages", *Biochem Biophys Res Commun*, 188: 997-1002.
- [187] Sorensen, A.L. Hey, A.S. ve Kharazmi, A., (1994). "Leishmania major surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro", *APMIS*, 102: 265-271.

- [188] Mcconville, M.J., (1991). "Glycosylated-Phosphatidylinositols as Virulence Factors in Leishmania", *Cell Biology International Reports*, 15: 779-798.
- [189] Pimenta, P.F. Saraiva, E.M. ve Sacks, D.L., (1991). "The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*", *Exp Parasitol*, 72: 191-204.
- [190] Descoteaux, A. ve Turco, S.J., (1999). "Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity", *Biochim Biophys Acta*, 1455: 341-352.
- [191] Miao, L. Stafford, A. Nir, S. Turco, S.J. Flanagan, T.D. ve Epanand, R.M., (1995). "Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*", *Biochemistry*, 34: 4676-4683.
- [192] Descoteaux, A. Turco, S.J. Sacks, D.L. ve Matlashewski, G., (1991). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages", *J Immunol*, 146: 2747-2753.
- [193] Descoteaux, A. ve Turco, S.J., (1993). "The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C", *Parasitology Today*, 9: 468-471.
- [194] Sorensen, A.L. Hey, A.S. ve Kharazmi, A., (1994). "*Leishmania*-Major Surface Protease Gp63 Interferes with the Function of Human Monocytes and Neutrophils in-Vitro", *APMIS*, 102: 265-271.
- [195] Kavooosi, G. Ardestani, S.K. Kariminia, A. ve Tavakoli, Z., (2006). "Production of nitric oxide by murine macrophages induced by lipophosphoglycan of *Leishmania major*", *Korean J Parasitol*, 44: 35-41.
- [196] Ueno, N. Bratt, C.L. Rodriguez, N.E. ve Wilson, M.E., (2009). "Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum* chagasi promastigotes", *Cellular Microbiology*, 11: 1827-1841.
- [197] Sundar, S. ve Singh, O.P., (2018). "Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis", *Mol Diagn Ther*.
- [198] Reithinger, R. ve Dujardin, J.C., (2007). "Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications", *J Clin Microbiol*, 45: 21-25.
- [199] Savoia, D., (2015). "Recent updates and perspectives on leishmaniasis", *J Infect Dev Ctries*, 9: 588-596.
- [200] Srivastava, P. Dayama, A. Mehrotra, S. ve Sundar, S., (2011). "Diagnosis of visceral leishmaniasis", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 105: 1-6.
- [201] Reis, L.E. Coura-Vital, W. Roatt, B.M. Bouillet, L.E. Ker, H.G. Fortes de Brito, R.C. Resende Dde, M. Carneiro, M. Giunchetti, R.C. Marques, M.J. Carneiro, C.M. ve Reis, A.B., (2013). "Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection", *Vet Parasitol*, 197: 498-503.

- [202] Allahverdiyev, A.M. Uzun, S. Bagirova, M. Durdu, M. ve Memisoglu, H.R., (2004). "A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis", *Am J Trop Med Hyg*, 70: 294-297.
- [203] Boggild, A.K. Miranda-Verastegui, C. Espinosa, D. Arevalo, J. Martinez-Medina, D. Llanos-Cuentas, A. ve Low, D.E., (2008). "Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru", *Am J Trop Med Hyg*, 79: 847-852.
- [204] Hide, M. Singh, R. Kumar, B. Banuls, A.L. ve Sundar, S., (2007). "A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients", *Acta Trop*, 102: 197-200.
- [205] Maltezou, H.C., (2010). "Drug resistance in visceral leishmaniasis", *J Biomed Biotechnol*, 2010: 617521.
- [206] Sundar, S. ve Singh, A., (2016). "Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis", *Ther Adv Infect Dis*, 3: 98-109.
- [207] Nagle, A.S. Khare, S. Kumar, A.B. Supek, F. Buchynskyy, A. Mathison, C.J. Chennamaneni, N.K. Pendem, N. Buckner, F.S. Gelb, M.H. ve Molteni, V., (2014). "Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis", *Chem Rev*, 114: 11305-11347.
- [208] Brahmachari, U.N.R.B. ve Banerjee, S.C., (1928). "A Rare Case of Dermal Leishmanoid", *Ind Med Gaz*, 63: 389-390.
- [209] Sundar, S. ve Chakravarty, J., (2015). "An update on pharmacotherapy for leishmaniasis", *Expert Opin Pharmacother*, 16: 237-252.
- [210] Shaked-Mishan, P. Ulrich, N. Ephros, M. ve Zilberstein, D., (2001). "Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*", *J Biol Chem*, 276: 3971-3976.
- [211] Ferreira Cdos, S. Martins, P.S. Demicheli, C. Brochu, C. Ouellette, M. ve Frezard, F., (2003). "Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione", *Biometals*, 16: 441-446.
- [212] Zhou, Y. Messier, N. Ouellette, M. Rosen, B.P. ve Mukhopadhyay, R., (2004). "*Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam", *J Biol Chem*, 279: 37445-37451.
- [213] Denton, H. McGregor, J.C. ve Coombs, G.H., (2004). "Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1", *Biochem J*, 381: 405-412.
- [214] Mukhopadhyay, R. Dey, S. Xu, N. Gage, D. Lightbody, J. Ouellette, M. ve Rosen, B.P., (1996). "Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 10383-10387.

- [215] Krauth-Siegel, R.L. ve Comini, M.A., (2008). "Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism", *Biochim Biophys Acta*, 1780: 1236-1248.
- [216] Demicheli, C. Frezard, F. Mangrum, J.B. ve Farrell, N.P., (2008). "Interaction of trivalent antimony with a CCHC zinc finger domain: potential relevance to the mechanism of action of antimonial drugs", *Chem Commun (Camb)*: 4828-4830.
- [217] Sundar, S. ve Chakravarty, J., (2015). "Investigational drugs for visceral leishmaniasis", *Expert Opin Investig Drugs*, 24: 43-59.
- [218] Fanos, V. ve Cataldi, L., (2001). "Renal transport of antibiotics and nephrotoxicity: a review", *J Chemother*, 13: 461-472.
- [219] Thakur, C.P. Pandey, A.K. Sinha, G.P. Roy, S. Behbehani, K. ve Olliaro, P., (1996). "Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90: 319-322.
- [220] Sundar, S. Jha, T.K. Thakur, C.P. Mishra, M. Singh, V.R. ve Buffels, R., (2002). "Low-dose liposomal amphotericin B in refractory Indian visceral leishmaniasis: a multicenter study", *Am J Trop Med Hyg*, 66: 143-146.
- [221] Meheus, F. Balasegaram, M. Olliaro, P. Sundar, S. Rijal, S. Faiz, M.A. ve Boelaert, M., (2010). "Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent", *PLoS Negl Trop Dis*, 4.
- [222] Aszalos, A. Bax, A. Burlinson, N. Roller, P. ve McNeal, C., (1985). "Physico-chemical and microbiological comparison of nystatin, amphotericin A and amphotericin B, and structure of amphotericin A", *J Antibiot (Tokyo)*, 38: 1699-1713.
- [223] Kaminski, D.M., (2014). "Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments", *Eur Biophys J*, 43: 453-467.
- [224] Verweij, J. Planting, A. van der Burg, M. ve Stoter, G., (1992). "A dose-finding study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with metastatic solid tumours", *J Cancer Res Clin Oncol*, 118: 606-608.
- [225] Bhattacharya, S.K. Sinha, P.K. Sundar, S. Thakur, C.P. Jha, T.K. Pandey, K. Das, V.R. Kumar, N. Lal, C. Verma, N. Singh, V.P. Ranjan, A. Verma, R.B. Anders, G. Sindermann, H. ve Ganguly, N.K., (2007). "Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis", *J Infect Dis*, 196: 591-598.
- [226] Rakotomanga, M. Blanc, S. Gaudin, K. Chaminade, P. ve Loiseau, P.M., (2007). "Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes", *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 1425-1430.
- [227] Zuo, X. Djordjevic, J.T. Bijosono Oei, J. Desmarini, D. Schibeci, S.D. Jolliffe, K.A. ve Sorrell, T.C., (2011). "Miltefosine induces apoptosis-like cell death in yeast via Cox9p in cytochrome c oxidase", *Mol Pharmacol*, 80: 476-485.

- [228] Jhingran, A. Chawla, B. Saxena, S. Barrett, M.P. ve Madhubala, R., (2009). "Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*", *Mol Biochem Parasitol*, 164: 111-117.
- [229] Moskalenko, N. ve Pershin, G.N., (1966). "[Comparative study of the chemotherapeutic effect of paromomycin and monomycin in experimental cutaneous leishmaniasis in albino mice]", *Farmakol Toksikol*, 29: 90-94.
- [230] Chawla, B. Jhingran, A. Panigrahi, A. Stuart, K.D. ve Madhubala, R., (2011). "Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant *Leishmania donovani*", *PLoS One*, 6: e26660.
- [231] Reguera, R. Balana Fouce, R. Cubria, J.C. Alvarez Bujidos, M.L. ve Ordonez, D., (1994). "Putrescine uptake inhibition by aromatic diamidines in *Leishmania infantum* promastigotes", *Biochem Pharmacol*, 47: 1859-1866.
- [232] Mehta, A. ve Shaha, C., (2004). "Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity", *J Biol Chem*, 279: 11798-11813.
- [233] Singh, G. ve Dey, C.S., (2007). "Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant *L. donovani*", *Acta Trop*, 103: 172-185.
- [234] Sundar, S. ve Singh, B., (2014). "Identifying vaccine targets for anti-leishmanial vaccine development", *Expert Rev Vaccines*, 13: 489-505.
- [235] Gradoni, L., (2015). "Canine *Leishmania* vaccines: still a long way to go", *Vet Parasitol*, 208: 94-100.
- [236] Moreno, J. Vouldoukis, I. Schreiber, P. Martin, V. McGahie, D. Gueguen, S. ve Cuisinier, A.M., (2014). "Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later", *Vet Immunol Immunopathol*, 158: 199-207.
- [237] Chhajer, R. ve Ali, N., (2014). "Genetically modified organisms and visceral leishmaniasis", *Front Immunol*, 5: 213.
- [238] Modabber, F., (1990). "Development of vaccines against leishmaniasis", *Scand J Infect Dis Suppl*, 76: 72-78.
- [239] Convit, J. Castellanos, P.L. Rondon, A. Pinardi, M.E. Ulrich, M. Castes, M. Bloom, B. ve Garcia, L., (1987). "Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis", *Lancet*, 1: 401-405.
- [240] Machado-Pinto, J. Pinto, J. da Costa, C.A. Genaro, O. Marques, M.J. Modabber, F. ve Mayrink, W., (2002). "Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial", *Int J Dermatol*, 41: 73-78.
- [241] Roberts, M.T., (2005). "Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment", *Br Med Bull*, 75-76: 115-130.



- [242] Breton, M. Tremblay, M.J. Ouellette, M. ve Papadopoulou, B., (2005). "Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis", *Infect Immun*, 73: 6372-6382.
- [243] Momeni, A.Z. Jalayer, T. Emamjomeh, M. Khamesipour, A. Zicker, F. Ghassemi, R.L. Dowlati, Y. Sharifi, I. Aminjavaheri, M. Shafiei, A. Alimohammadian, M.H. Hashemi-Fesharki, R. Nasser, K. Godal, T. Smith, P.G. ve Modabber, F., (1999). "A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran", *Vaccine*, 17: 466-472.
- [244] Velez, I.D. del Pilar Agudelo, S. Arbelaez, 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", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94: 698-703.
- [245] Sharifi, I. FeKri, A.R. Aflatonian, M.R. Khamesipour, A. Nadim, A. Mousavi, M.R. Momeni, A.Z. Dowlati, Y. Godal, T. Zicker, F. Smith, P.G. ve Modabber, F., (1998). "Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran", *Lancet*, 351: 1540-1543.
- [246] Jamshidi, S. Avizeh, R. Mohebbali, M. ve Bokaie, S., (2011). "Immunotherapy Using Autoclaved *L. major* Antigens and *M. vaccae* with Meglumine Antimoniate, for the Treatment of Experimental Canine Visceral Leishmaniasis", *Iran J Parasitol*, 6: 26-34.
- [247] Gicheru, M.M. Olobo, J.O. Anjili, C.O. Orago, A.S. Modabber, F. ve Scott, P., (2001). "Vervet monkeys vaccinated with killed *Leishmania major* parasites and interleukin-12 develop a type 1 immune response but are not protected against challenge infection", *Infection and Immunity*, 69: 245-251.
- [248] Garg, R. ve Dube, A., (2006). "Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis", *Indian J Med Res*, 123: 439-454.
- [249] Giunchetti, R.C. Correa-Oliveira, R. Martins-Filho, O.A. Teixeira-Carvalho, A. Roatt, B.M. de Oliveira Aguiar-Soares, R.D. de Souza, J.V. das Dores Moreira, N. Malaquias, L.C. Mota e Castro, L.L. de Lana, M. ve Reis, A.B., (2007). "Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs", *Vaccine*, 25: 7674-7686.
- [250] Gillespie, P.M. Beaumier, C.M. Strych, U. Hayward, T. Hotez, P.J. ve Bottazzi, M.E., (2016). "Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis", *Vaccine*, 34: 2992-2995.
- [251] McCall, L.I. Zhang, W.W. Ranasinghe, S. ve Matlashewski, G., (2013). "Leishmanization revisited: immunization with a naturally attenuated cutaneous *Leishmania donovani* isolate from Sri Lanka protects against visceral leishmaniasis", *Vaccine*, 31: 1420-1425.

- [252] Rivier, D. Bovay, P. Shah, R. Didisheim, S. ve Mauel, J., (1999). "Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection", *Parasite Immunol*, 21: 461-473.
- [253] Amaral, V.F. Teva, A. Oliveira-Neto, M.P. Silva, A.J. Pereira, M.S. Cupolillo, E. Porrozzi, R. Coutinho, S.G. Pirmez, C. Beverley, S.M. ve Grimaldi, G., Jr., (2002). "Study of the safety, immunogenicity and efficacy of attenuated and killed *Leishmania (Leishmania) major* vaccines in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of the human disease", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97: 1041-1048.
- [254] Ryan, K.A. Garraway, L.A. Descoteaux, A. Turco, S.J. ve Beverley, S.M., (1993). "Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 8609-8613.
- [255] Handman, E., (2001). "Leishmaniasis: current status of vaccine development", *Clin Microbiol Rev*, 14: 229-243.
- [256] Duthie, M.S. Raman, V.S. Piazza, F.M. ve Reed, S.G., (2012). "The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines", *Vaccine*, 30: 134-141.
- [257] Chang, K.P. Reed, S.G. McGwire, B.S. ve Soong, L., (2003). "Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity", *Acta Trop*, 85: 375-390.
- [258] Kurtzhals, J.A. Hey, A.S. Jardim, A. Kemp, M. Schaefer, K.U. Odera, E.O. Christensen, C.B. Githure, J.I. Olafson, R.W. Theander, T.G. ve et al., (1994). "Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. II. Absent or Th2-like response to gp63 and Th1-like response to lipophosphoglycan-associated protein in cells from cured visceral leishmaniasis patients", *Clin Exp Immunol*, 96: 416-421.
- [259] Tonui, W.K. Mbatia, P.A. Anjili, C.O. Orago, A.S. Turco, S.J. Githure, J.I. ve Koech, D.K., (2001). "Transmission blocking vaccine studies in leishmaniasis: II. Effect of immunisation using *Leishmania major* derived 63 kilodalton glycoprotein, lipophosphoglycan and whole parasite antigens on the course of *L. major* infection in BALB/c mice", *East Afr Med J*, 78: 90-92.
- [260] Lazaro-Souza, M. Matte, C. Lima, J.B. Arango Duque, G. Quintela-Carvalho, G. de Carvalho Vivarini, A. Moura-Pontes, S. Figueira, C.P. Jesus-Santos, F.H. Gazos Lopes, U. Farias, L.P. Araujo-Santos, T. Descoteaux, A. ve Borges, V.M., (2018). "*Leishmania infantum* Lipophosphoglycan-Deficient Mutants: A Tool to Study Host Cell-Parasite Interplay", *Front Microbiol*, 9: 626.
- [261] Tonui, W.K. Mpoke, S.S. Orago, A.S. Turco, S.J. Mbatia, P.A. ve Mkoji, G.M., (2003). "*Leishmania donovani*-derived lipophosphoglycan plus BCG induces a Th1 type immune response but does not protect Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) and BALB/c mice against *Leishmania donovani*", *Onderstepoort J Vet Res*, 70: 255-263.

- [262] Matos, D.C. Faccioli, L.A. Cysne-Finkelstein, L. Luca, P.M. Corte-Real, S. Armoa, G.R. Lemes, E.M. Decote-Ricardo, D. ve Mendonca, S.C., (2010). "Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105: 341-347.
- [263] de Mendonca, S.C. Cysne-Finkelstein, L. ve Matos, D.C., (2015). "Kinetoplastid Membrane Protein-11 as a Vaccine Candidate and a Virulence Factor in *Leishmania*", *Front Immunol*, 6: 524.
- [264] Basu, R. Bhaumik, S. Basu, J.M. Naskar, K. De, T. ve Roy, S., (2005). "Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis", *J Immunol*, 174: 7160-7171.
- [265] Palatnik-de-Sousa, C.B. Barbosa Ade, F. Oliveira, S.M. Nico, D. Bernardo, R.R. Santos, W.R. Rodrigues, M.M. Soares, I. ve Borja-Cabrera, G.P., (2008). "FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine", *Expert Rev Vaccines*, 7: 833-851.
- [266] Yang, D.M. Fairweather, N. Button, L.L. McMaster, W.R. Kahl, L.P. ve Liew, F.Y., (1990). "Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis", *J Immunol*, 145: 2281-2285.
- [267] Xu, D. McSorley, S.J. Chatfield, S.N. Dougan, G. ve Liew, F.Y., (1995). "Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA- AroD-)", *Immunology*, 85: 1-7.
- [268] Sinha, S. Sundaram, S. Singh, A.P. ve Tripathi, A., (2011). "A gp63 based vaccine candidate against Visceral Leishmaniasis", *Bioinformation*, 5: 320-325.
- [269] Tewary, P. Jain, M. Sahani, M.H. Saxena, S. ve Madhubala, R., (2005). "A heterologous prime-boost vaccination regimen using ORFF DNA and recombinant ORFF protein confers protective immunity against experimental visceral leishmaniasis", *J Infect Dis*, 191: 2130-2137.
- [270] Mazumder, S. Maji, M. Das, A. ve Ali, N., (2011). "Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/protein and protein/protein based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice", *PLoS One*, 6: e14644.
- [271] Das, A. ve Ali, N., (2012). "Vaccine Development Against *Leishmania donovani*", *Front Immunol*, 3: 99.
- [272] Moll, H. ve Berberich, C., (2001). "Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniasis", *Immunobiology*, 204: 659-666.

- [273] Bagirova, M. Allahverdiyev, A.M. Abamor, E.S. Ullah, I. Cosar, G. Aydogdu, M. Senturk, H. ve Ergenoglu, B., (2016). "Overview of dendritic cell-based vaccine development for leishmaniasis", *Parasite Immunol*, 38: 651-662.
- [274] 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", *J Exp Med*, 188: 1547-1552.
- [275] Tsagozis, P. Karagouni, E. ve Dotsika, E., (2004). "Dendritic cells pulsed with peptides of gp63 induce differential protection against experimental cutaneous leishmaniasis", *Int J Immunopathol Pharmacol*, 17: 343-352.
- [276] Barral, A. Honda, E. Caldas, A. Costa, J. Vinhas, V. Rowton, E.D. Valenzuela, J.G. Charlab, R. Barral-Netto, M. ve Ribeiro, J.M., (2000). "Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker?", *Am J Trop Med Hyg*, 62: 740-745.
- [277] Brodie, T.M. Smith, M.C. Morris, R.V. ve Titus, R.G., (2007). "Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages", *Infect Immun*, 75: 2359-2365.
- [278] Kumar, A. ve Samant, M., (2016). "DNA vaccine against visceral leishmaniasis: a promising approach for prevention and control", *Parasite Immunol*, 38: 273-281.
- [279] Samant, M. Gupta, R. Kumari, S. Misra, P. Khare, P. Kushawaha, P.K. Sahasrabudhe, A.A. ve Dube, A., (2009). "Immunization with the DNA-encoding N-terminal domain of proteophosphoglycan of *Leishmania donovani* generates Th1-type immunoprotective response against experimental visceral leishmaniasis", *J Immunol*, 183: 470-479.
- [280] Badiie, A. Heravi Shargh, V. Khamesipour, A. ve Jaafari, M.R., (2013). "Micro/nanoparticle adjuvants for antileishmanial vaccines: present and future trends", *Vaccine*, 31: 735-749.
- [281] Dube, A. Sharma, P. Srivastava, J.K. Misra, A. Naik, S. ve Katiyar, J.C., (1998). "Vaccination of langur monkeys (*Presbytis entellus*) against *Leishmania donovani* with autoclaved *L. major* plus BCG", *Parasitology*, 116 ( Pt 3): 219-221.
- [282] Tewary, P. Pandya, J. Mehta, J. Sukumaran, B. ve Madhubala, R., (2004). "Vaccination with *Leishmania* soluble antigen and immunostimulatory oligodeoxynucleotides induces specific immunity and protection against *Leishmania donovani* infection", *FEMS Immunol Med Microbiol*, 42: 241-248.
- [283] Ulfgren, A.K. Lindblad, S. Klareskog, L. Andersson, J. ve Andersson, U., (1995). "Detection of cytokine producing cells in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis", *Ann Rheum Dis*, 54: 654-661.
- [284] Matthys, P. Vermeire, K. ve Billiau, A., (2001). "Mac-1(+) myelopoiesis induced by CFA: a clue to the paradoxical effects of IFN-gamma in autoimmune disease models", *Trends Immunol*, 22: 367-371.

- [285] Heeger, P.S. Forsthuber, T. Shive, C. Biekert, E. Genain, C. Hofstetter, H.H. Karulin, A. ve Lehmann, P.V., (2000). "Revisiting tolerance induced by autoantigen in incomplete Freund's adjuvant", *J Immunol*, 164: 5771-5781.
- [286] Clements, C.J. ve Griffiths, E., (2002). "The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants", *Vaccine*, 20 Suppl 3: S24-33.
- [287] Misra, A. Dube, A. Srivastava, B. Sharma, P. Srivastava, J.K. Katiyar, J.C. ve Naik, S., (2001). "Successful vaccination against *Leishmania donovani* infection in Indian langur using alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* with BCG", *Vaccine*, 19: 3485-3492.
- [288] Milstien, J.B. ve Gibson, J.J., (1990). "Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety", *Bull World Health Organ*, 68: 93-108.
- [289] Bogdan, C. Streck, H. Rollinghoff, M. ve Solbach, W., (1989). "Cyclosporin A enhances elimination of intracellular *L. major* parasites by murine macrophages", *Clin Exp Immunol*, 75: 141-146.
- [290] Hill, J.O., (1987). "Modulation of the pattern of development of experimental disseminated leishmaniasis by *Corynebacterium parvum*", *J Leukoc Biol*, 41: 165-169.
- [291] Cook, J.A. ve Holbrook, T.W., (1983). "Immunogenicity of soluble and particulate antigens from *Leishmania donovani*: effect of glucan as an adjuvant", *Infect Immun*, 40: 1038-1043.
- [292] Zehra, K. Pal, R. Anuradha Rizvi, S.Y. Haq, W. Kundu, B. Katiyar, J.C. ve Mathur, K.B., (1995). "Leishmania donovani in hamsters: stimulation of non-specific resistance by novel lipopeptides and their effect in antileishmanial therapy", *Experientia*, 51: 725-730.
- [293] Melby, P.C. Chandrasekar, B. Zhao, W. ve Coe, J.E., (2001). "The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response", *J Immunol*, 166: 1912-1920.
- [294] Afonso, L.C. Scharon, T.M. Vieira, L.Q. Wysocka, M. Trinchieri, G. ve Scott, P., (1994). "The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*", *Science*, 263: 235-237.
- [295] Gicheru, M.M. Olobo, J.O. Anjili, C.O. Orago, A.S. Modabber, F. ve Scott, P., (2001). "Vervet monkeys vaccinated with killed *Leishmania major* parasites and interleukin-12 develop a type 1 immune response but are not protected against challenge infection", *Infect Immun*, 69: 245-251.
- [296] Klinman, D.M. Klaschik, S. Sato, T. ve Tross, D., (2009). "CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases", *Adv Drug Deliv Rev*, 61: 248-255.
- [297] Verthelyi, D. Kenney, R.T. Seder, R.A. Gam, A.A. Friedag, B. ve Klinman, D.M., (2002). "CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates", *J Immunol*, 168: 1659-1663.

- [298] Singh, M. Chakrapani, A. ve O'Hagan, D., (2007). "Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems", *Expert Rev Vaccines*, 6: 797-808.
- [299] Sahdev, P. Ochyl, L.J. ve Moon, J.J., (2014). "Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems", *Pharm Res*, 31: 2563-2582.
- [300] Athanasiou, E. Agallou, M. Tastsoglou, S. Kammona, O. Hatzigeorgiou, A. Kiparissides, C. ve Karagouni, E., (2017). "A Poly(Lactic-co-Glycolic) Acid Nanovaccine Based on Chimeric Peptides from Different *Leishmania infantum* Proteins Induces Dendritic Cells Maturation and Promotes Peptide-Specific IFN $\gamma$ -Producing CD8(+) T Cells Essential for the Protection against Experimental Visceral Leishmaniasis", *Front Immunol*, 8: 684.
- [301] Xiang, S.D. Scholzen, A. Minigo, G. David, C. Apostolopoulos, V. Mottram, P.L. ve Plebanski, M., (2006). "Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter?", *Methods*, 40: 1-9.
- [302] Danesh-Bahreini, M.A. Shokri, J. Samiei, A. Kamali-Sarvestani, E. Barzegar-Jalali, M. ve Mohammadi-Samani, S., (2011). "Nanovaccine for leishmaniasis: preparation of chitosan nanoparticles containing *Leishmania* superoxide dismutase and evaluation of its immunogenicity in BALB/c mice", *Int J Nanomedicine*, 6: 835-842.
- [303] Schwendener, R.A., (2014). "Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances", *Ther Adv Vaccines*, 2: 159-182.
- [304] Yan, S. Gu, W. ve Xu, Z.P., (2013). "Re-considering how particle size and other properties of antigen-adjuvant complexes impact on the immune responses", *J Colloid Interface Sci*, 395: 1-10.
- [305] Kalam, M.A. Khan, A.A. ve Alshamsan, A., (2017). "Non-invasive administration of biodegradable nano-carrier vaccines", *Am J Transl Res*, 9: 15-35.
- [306] Danhier, F. Ansorena, E. Silva, J.M. Coco, R. Le Breton, A. ve Preat, V., (2012). "PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications", *J Control Release*, 161: 505-522.
- [307] Lu, J.M. Wang, X. Marin-Muller, C. Wang, H. Lin, P.H. Yao, Q. ve Chen, C., (2009). "Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology", *Expert Rev Mol Diagn*, 9: 325-341.
- [308] Kawashima, Y. Yamamoto, H. Takeuchi, H. Fujioka, S. ve Hino, T., (1999). "Pulmonary delivery of insulin with nebulized DL-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect", *J Control Release*, 62: 279-287.
- [309] Shen, H. Ackerman, A.L. Cody, V. Giodini, A. Hinson, E.R. Cresswell, P. Edelson, R.L. Saltzman, W.M. ve Hanlon, D.J., (2006). "Enhanced and prolonged cross-presentation following endosomal escape of exogenous antigens encapsulated in biodegradable nanoparticles", *Immunology*, 117: 78-88.

- [310] Gregory, A.E. Titball, R. ve Williamson, D., (2013). "Vaccine delivery using nanoparticles", *Front Cell Infect Microbiol*, 3: 13.
- [311] Abamor, E.S., (2017). "Antileishmanial activities of caffeic acid phenethyl ester loaded PLGA nanoparticles against *Leishmania infantum* promastigotes and amastigotes in vitro", *Asian Pac J Trop Med*, 10: 25-34.
- [312] Van de Ven, H. Vermeersch, M. Vandenbroucke, R.E. Matheussen, A. Apers, S. Weyenberg, W. De Smedt, S.C. Cos, P. Maes, L. ve Ludwig, A., (2012). "Intracellular drug delivery in *Leishmania*-infected macrophages: Evaluation of saponin-loaded PLGA nanoparticles", *J Drug Target*, 20: 142-154.
- [313] McConville, M.J. Bacic, A. Mitchell, G.F. ve Handman, E., (1987). "Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 8941-8945.
- [314] Kapoor, D.N. Bhatia, A. Kaur, R. Sharma, R. Kaur, G. ve Dhawan, S., (2015). "PLGA: a unique polymer for drug delivery", *Ther Deliv*, 6: 41-58.
- [315] de Groot, A.M. Du, G. Monkare, J. Platteel, A.C.M. Broere, F. Bouwstra, J.A. ve Sijts, A., (2017). "Hollow microneedle-mediated intradermal delivery of model vaccine antigen-loaded PLGA nanoparticles elicits protective T cell-mediated immunity to an intracellular bacterium", *J Control Release*, 266: 27-35.
- [316] Yang, H.W. Ye, L. Guo, X.D. Yang, C. Compans, R.W. ve Prausnitz, M.R., (2017). "Ebola Vaccination Using a DNA Vaccine Coated on PLGA-PLL/gammaPGA Nanoparticles Administered Using a Microneedle Patch", *Adv Healthc Mater*, 6.
- [317] Tan, Z. Liu, W. Liu, H. Li, C. Zhang, Y. Meng, X. Tang, T. Xi, T. ve Xing, Y., (2017). "Oral *Helicobacter pylori* vaccine-encapsulated acid-resistant HP55/PLGA nanoparticles promote immune protection", *Eur J Pharm Biopharm*, 111: 33-43.
- [318] Jahan, S.T. Sadat, S.M.A. Yarahmadi, M. ve Haddadi, A., (2018). "Potentiating antigen specific immune response by targeted delivery of PLGA based model cancer vaccine", *Mol Pharm*.
- [319] Santos, D.M. Carneiro, M.W. de Moura, T.R. Fukutani, K. Clarencio, J. Soto, M. Espuelas, S. Brodskyn, C. Barral, A. Barral-Netto, M. ve de Oliveira, C.I., (2012). "Towards development of novel immunization strategies against leishmaniasis using PLGA nanoparticles loaded with kinetoplastid membrane protein-11", *Int J Nanomedicine*, 7: 2115-2127.
- [320] Margaroni, M. Agallou, M. Athanasiou, E. Kammona, O. Kiparissides, C. Gaitanaki, C. ve Karagouni, E., (2017). "Vaccination with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with soluble *Leishmania* antigens and modified with a TNFalpha-mimicking peptide or monophosphoryl lipid A confers protection against experimental visceral leishmaniasis", *Int J Nanomedicine*, 12: 6169-6184.

- [321] Margaroni, M. Agallou, M. Kontonikola, K. Karidi, K. Kammona, O. Kiparissides, C. Gaitanaki, C. ve Karagouni, E., (2016). "PLGA nanoparticles modified with a TNFalpha mimicking peptide, soluble Leishmania antigens and MPLA induce T cell priming in vitro via dendritic cell functional differentiation", *Eur J Pharm Biopharm*, 105: 18-31.
- [322] Saremi, S.S. Shahryari, M. Ghoorchian, R. Eshaghian, H. Jalali, S.A. Nikpoor, A.R. Jafari, M.R. ve Badiiee, A., (2018). "The role of nanoliposome bilayer composition containing soluble leishmania antigen on maturation and activation of dendritic cells", *Iran J Basic Med Sci*, 21: 536-545.
- [323] Scott, P. Pearce, E. Natovitz, P. ve Sher, A., (1987). "Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes", *J Immunol*, 139: 221-227.
- [324] Khalil, E.A. El Hassan, A.M. Zijlstra, E.E. Mukhtar, M.M. Ghalib, H.W. Musa, B. Ibrahim, M.E. Kamil, A.A. Elsheikh, M. Babiker, A. ve Modabber, F., (2000). "Autoclaved Leishmania major vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan", *Lancet*, 356: 1565-1569.
- [325] Arango Duque, G. ve Descoteaux, A., (2014). "Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases", *Front Immunol*, 5: 491.
- [326] Liu, D. ve Uzonna, J.E., (2012). "The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response", *Front Cell Infect Microbiol*, 2: 83.
- [327] Mosmann, T.R. ve Coffman, R.L., (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties", *Annu Rev Immunol*, 7: 145-173.
- [328] Wanasen, N. ve Soong, L., (2008). "L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection", *Immunol Res*, 41: 15-25.
- [329] Kaur, T. Sobti, R.C. ve Kaur, S., (2011). "Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against Leishmania donovani in BALB/c mice", *Parasite Immunol*, 33: 95-103.
- [330] 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.
- [331] Bhowmick, S. Ravindran, R. ve Ali, N., (2007). "Leishmanial antigens in liposomes promote protective immunity and provide immunotherapy against visceral leishmaniasis via polarized Th1 response", *Vaccine*, 25: 6544-6556.



ETİK KURUL TUTANAĞI



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

SAYI: 2013/128  
KONU: Sn. Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

26.07.2013

Sayın Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV,

Başlığı "*L. infantum*'un Neden Olduğu Visseral Leishmaniasise Karşı Nano Partikül Temelli Aşı Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Koruyucu Etkinliklerinin Belirlenmesi" olan projeniz 25.07.2013 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Ülkan Kılıç  
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet Belce  
Üye

Prof. Dr. Serdar Üşümez  
Üye

Prof. Dr. Erhan Ayşan  
Üye

Yrd. Doç. Dr. Mahmut Gürkan  
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer Uysal  
Üye

Uzm. Vet. Hek. Öznur İnan  
Üye

Muhsin Ceylan  
KATILIMCI  
Üye

Ahmet Sivril  
KATILIMCI  
Üye

## ÖZGEÇMİŞ

---

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Özlem Ayşe TOSYALI  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 1987, Artvin  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**E-posta** : ozlemayseozyilmaz@gmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2014
Lisans	Kimya	Ankara Üniversitesi	2012
Lise	Fen	Arhavi Yabancı Dil Ağırlıklı Lise	2005

## YAYINLARI

### Makaleler

1. Abamor E.Ş. **Tosyalı Ö.A.**, Allahverdiyev A. ve Bağırova M. (2018) "Encapsulation Of Nigella Sativa Oil Into PCL Nanoparticles: Significant Antileishmanial Activities Against *L. Infantum* Promastigotes And Amastigotes, *In Vitro* " IET Nanobiotechnology, doi: 10.1049/iet-nbt.2018.5115

2. Aydoğdu M., Bağırova M., Allahverdiyev A., Abamor E.Ş., **Özyılmaz Ö.A.**, Dinparvar S. ve Kocagöz T., (2018). "A New Approach For Large Scale Cultivation Of *L. Infantum* Promastigotes: pH and Temperature Controllable Stirred Bioreactor", Journal of Vector Borne Diseases., baskıda.

### Bildiriler

1. Abamor, E. S., **Tosyalı, Ö. A.**, (2018). "Co-encapsulation of Essential Oils and Anti-leishmanial Drugs in Polycaprolactone Nanoparticles: A Novel Treatment Approach Against Leishmaniasis", International Conference On Innovative Engineering Applications, 20-22 September 2018, Sivas.

2. Abamor, E. S., **Tosyalı, Ö. A.**, (2018). "Antileishmanial İlaç Yüklü Polikaprolakton Nanopartiküllerinin In Vitro Ve In Vivo Antiparaziter Etkinliklerinin İncelenmesi", III. Uluslararası Mesleki Ve Teknik Bilimler Kongresi, 21-22 Haziran 2018, Gaziantep.

3. **Özyılmaz, Ö. A.**, Bağırova, M., Abamor, E. S., ve Allahverdiyev, A., (2015). Çözünür *Leishmania* Antijenlerini Ve Polioksidonyum Adjuvanını İçeren Aşı Formülasyonlarının Makrofajların Nitrik Oksit Üretimi Üzerindeki Etkinliğinin *In Vitro* İncelenmesi", 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Ekim 2015, Erzurum.

4. **Özyılmaz, Ö. A.**, Bağırova, M., Abamor, E. S., ve Allahverdiyev, A. (2015). "Farklı Aşı Formülasyonlarının Makrofaj Hücre Kültür Sisteminde Etkinliğinin İncelenmesi", Ulusal Aşı Bilimi Kongresi, 28-30 Nisan 2015, İzmir.

5. Abamor, E. S., **Özyılmaz, Ö. A.**, Bağırova, M., ve Allahverdiyev, A. (2015). "Uzun Süreli Makrofaj Hücre Kültür Sisteminin Leishmaniasis'e Karşı Aşı Geliştirilmesindeki Önemi", Ulusal Aşı Bilimi Kongresi, 28-30 Nisan 2015, İzmir.

6. Yıldırım Köken G., **Özyılmaz, Ö. A.**, Zorba A.P, Yılmaz G., Karlığa S., Abamor, E. S. Ve Bağırova, M. (2015). "Leishmaniasis'e Karşı Yüzey Moleküllerine Dayalı Aşı Geliştirmek Üzere *L. tropica* Parazitlerinin Büyük Ölçekli Çoğaltılmasının Optimizasyonu" Ulusal Aşı Bilimi Kongresi, 28-30 Nisan 2015, İzmir.

### Proje

1. *Leishmania Infantum*'un Neden Olduğu Visseral Leishmaniasis'e Karşı Nanopartikül Temelli Aşı Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Koruyucu Etkilerinin Belirlenmesi-Araştırmacı/ 213S148 nolu SB0101 TÜBİTAK. Proje Başlangıç ve Bitiş Tarihi: 01/10/2014 - 01/10/2017

2. Kütanöz Leishmaniasis'e Neden Olan *L. Tropica*'dan İzole Edilen Lipofosfolikan Moleküllerin Karşı Monoklonal Antikor Teknolojisine Dayalı Tanı Kitinin Geliştirilmesi- Araştırmacı/ 0254.STZ.2013-2 SANTEZ. Proje Başlangıç ve Bitiş Tarihi: 01/08/2014 - 01/02/2017

### **ÖDÜLLERİ**

1. TÜBİTAK-2211-C Öncelikli Alanlar Bursiyeri