

T.C.
İstanbul
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI



**RUTİN YÜKLÜ PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN
ANTİLEİSHMANİAL AKTİVİTELERİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FULYA KAHVECİOĞLU ÇETİN

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ

İSTANBUL

Temmuz 2019

T.C.
İstanbul
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02/07/2019

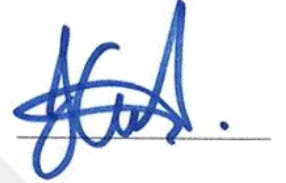
Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi



Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi



Dr. Öğr. Üyesi Sevil ÖZER
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi



Dr. Öğr. Üyesi Emrah Şefik ABAMOR
Yıldız Teknik Üniversitesi



ETİK BEYAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

18. / 06. / 2018.

Fulya KAHVECİOĞLU ÇETİN



ÖNSÖZ

Tez çalışmamda bilimsel katkılarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimiyle her daim yol gösteren, bu tez sayesinde kendisiyle çalışma fırsatı bulduğum çok değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ'e,

Laboratuvar çalışmalarının gerçekleştirilmesi sürecindeki desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e, Sayın Doç. Dr. Serap DERMAN'a, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kadriye KIZILBEY'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Emrah Şefik ABAMOR'a,

Ayrıca tez savunma jürimde katkılarını sunan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sevil ÖZER'e,

Laboratuvardaki çalışmalarım süresince pratik bilgilerini benimle paylaşan ve yardımları ile desteğini esirgemeyen Sayın Sahar DİNPARVAR'a ve Sayın Atıfcan DEMİRCİOĞLU'na,

Tez sürecinde her zaman yanımda olan, beni cesaretlendiren ve bana destek olan sevgili eşim Özcan ÇETİN'e,

Bu süreçte bana ışık tutan sevgili hocam ve aynı zamanda canım halam Öğr. Gör. Uz. F. Ayşenur CURABEYOĞLU'na ve sevgili hocam Doç. Dr. Sibel AKYOL'a,

Hayatım boyunca hiçbir konuda desteklerini esirgemeyen, sonsuz ve koşulsuz bir sevgi ile beni yetiştiren ve bugünkü vizyonumu kazandıran sevgili annem Figen KAHVECİOĞLU'na, sevgili babam Süleyman KAHVECİOĞLU'na ve tüm aileme sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz, 2019

Fulya KAHVECİOĞLU ÇETİN



İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
ETİK BEYAN	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. LEISHMANİA	4
2.1 <i>Leishmania</i> Parazitlerinin Tarihçesi ve Sınıflandırılması	4
2.2 Morfoloji	6
2.2.1 Amastigot Formlar	6
2.2.2 Promastigot Formlar	7
2.3 Parazitlerin Hayat Döngüsü	7
2.4 Leishmaniasis	8
2.4.1 Kutanöz Leishmaniasis (KL)	11
2.4.2 Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL)	13
2.4.3 Visseral Leishmaniasis (VL)	13
2.5 Leishmaniasisin Epidemiyolojisi	16
2.6 Leishmaniasisin Ülkemizdeki Dağılımı	18
2.7 Leishmaniasisin Teşhis, Tespit ve Gözetimi	18
2.8 Leishmaniasisin Yayılması	19
2.9 Leishmaniasisin Tedavisi	20
2.10 Leishmaniasisten Korunma ve Kontrol	28
2.11 Leishmaniasisin Tanısında Kullanılan Yöntemler	30
2.11.1 Kültür Yöntemleri	30
2.11.1.1 <i>Leishmania</i> Parazitlerinin Kültürünün Yapılması	30
2.11.1.2 Klasik Kültür	31
2.11.1.3 Mikro Kültür	32
2.11.1.4 <i>In vivo</i> Kültür	32
2.11.2 Serolojik Yöntemler	32
2.11.3 Moleküler Yöntemler	34
3. FLAVONOİDLER VE RUTİN	35
3.1 Flavonoidler	35
3.1.1 Flavonoidlerin Yapısı ve Alt Sınıfları	36
3.2 Rutin	37
3.2.1 Rutin Molekülünün Biyolojik Etkileri	42
3.2.1.1 Antioksidan Etkileri	42
3.2.1.2 Antibiyofilm Etkileri	42
3.2.1.3 Antidepresan Etkileri	43
3.2.1.4 Antikanserijen Etkileri	44
3.2.1.5 Gastrik Ülser Koruması	45
4. NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER	46
4.1 Sentetik Polimerler	47

5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	50
5.1 Gereç	50
5.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler.....	50
5.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler	50
5.1.3 Çözeltilerin Hazırlanması.....	51
5.1.3.1 RPMI 1640 Medyumun Hazırlanması	51
5.1.3.2 MTT Solüsyonunun Hazırlanması	51
5.1.3.3 Fosfat Tampon Solüsyonunun (PBS) Hazırlanması.....	51
5.2 Yöntem	52
5.2.1 Rutin Nanopartikülünün Sentezlenmesi.....	52
5.2.2 Rutin Nanopartikülünün Karakterizasyonu.....	53
5.2.3 <i>Leishmania</i> Promastigot Kültürünün Yapılması.....	55
5.2.4 Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı	55
5.2.5 RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin ve Antileishmanial Etkinliklerinin İncelenmesi.....	56
5.2.5.1 Farklı Konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi.....	58
5.2.5.2 Farklı Konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin Promastigot Kültüründe Antileishmanial Etkinliklerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi	59
6. BULGULAR.....	61
6.1 Nanopartiküllerin Konsantrasyon Hesabı.....	61
6.2 Farklı Konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin Sonucu.....	62
6.3 Farklı Konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> Promastigot Kültüründe MTT Yöntemi ile IC ₅₀ Değeri Üzerinden Antileishmanial Etkinliklerinin Belirlenmesinin Sonucu	68
7. TARTIŞMA	75
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	85
KAYNAKLAR.....	86
ÖZGEÇMİŞ.....	95

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 <i>Leishmania</i> parazitlerinin (a) amastigot formu ve (b) promastigot formu ...	6
Şekil 2.2 <i>Leishmania</i> Parazitlerinin Hayat Döngüsü	8
Şekil 2.3 <i>Leishmania</i> parazitleri taşıyan bir kum sineği vektörü insan derisinden kan emerken	9
Şekil 2.4 KL'li hastalardaki lezyonların görüntüsü	12
Şekil 2.5 Dünya Çapında KL'nin Endemik Durumu, 2016	12
Şekil 2.6 MKL'li hastalardaki lezyonların görüntüsü	13
Şekil 2.7 VL'li hastalarda karaciğer ve dalağın şişmesi	14
Şekil 2.8 Dünya Çapında VL'nin Endemik Durumu, 2016	15
Şekil 2.9 PKDL'li hastaların görüntüsü	16
Şekil 3.1 Flavonoidlerin alt sınıflarının yapısı	37
Şekil 3.2 Rutinin Kimyasal Yapısı	38
Şekil 4.1 PLGA polimerinin kimyasal yapısı	48
Şekil 5.1 <i>L. infantum</i> kültürü (20x)	55
Şekil 5.3 (a) ELISA reader cihazı (b) MTT solüsyonu eklenen mikropalak görüntüsü	59
Şekil 6.1 Farklı konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri (24. saat)	63
Şekil 6.2 24. saatte (a) Kontrol, 25 µg/ml'lik konsantrasyonda (b) RTN'ye (c) RTN-PLGA NP'lerine maruz kalan <i>L. infantum</i> promastigot kümelerinin mikroskopik görüntüsü (10x)	63
Şekil 6.3 Farklı konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri (48. saat)	64
Şekil 6.4 48. saatte (a) 250 µg/ml'lik, (b) 500 µg/ml'lik, (c) 1000 µg/ml'lik konsantrasyonda RTN'ye maruz kalan <i>L. infantum</i> promastigot kümelerinin mikroskopik görüntüleri (10x)	64
Şekil 6.5 48. saatte (a) 10 µg/ml'lik, (b) 1000 µg/ml'lik konsantrasyonda RTN-PLGA'ya maruz kalan <i>L. infantum</i> promastigot kümelerinin mikroskopik görüntüleri (10x)	64
Şekil 6.6 Farklı konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri (72. saat)	65
Şekil 6.7 72. saatte 100 µg/ml'lik (a) RTN'ye ve (b) RTN-PLGA konsantrasyonlarına maruz kalan <i>L. infantum</i> promastigot kümelerinin mikroskopik görüntüleri (10x)	65
Şekil 6.8 Farklı konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri (96. saat)	66
Şekil 6.9 96. saatte 1000 µg/ml'lik (a) RTN'ye ve (b) RTN-PLGA konsantrasyonlarına maruz kalan <i>L. infantum</i> promastigot kümelerinin mikroskopik görüntüleri (10x)	66
Şekil 6.10 Farklı konsantrasyonlardaki RTN'nin <i>L. infantum</i> promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri (24, 48, 72 ve 96. saat)	67
Şekil 6.11 Farklı konsantrasyonlardaki RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri (24, 48, 72 ve 96. saat)	68
Şekil 6.12 Farklı konsantrasyonlarda RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> promastigotları üzerinde antileishmanial etkinliğinin % canlılık değerleri (24. saat)	69

Şekil 6.13 Farklı konsantrasyonlarda RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> promastigotları üzerinde antileishmanial etkinliğinin % canlılık değerleri (48. saat)	70
Şekil 6.14 Farklı konsantrasyonlarda RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> promastigotları üzerinde antileishmanial etkinliğinin % canlılık değerleri (72. saat)	71
Şekil 6.15 Farklı konsantrasyonlarda RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> promastigotları üzerinde antileishmanial etkinliğinin % canlılık değerleri (96. saat)	71
Şekil 6.16 Farklı konsantrasyonlarda RTN'nin <i>L. infantum</i> promastigotları üzerinde antileishmanial etkinliğinin 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki % canlılık değerleri	72
Şekil 6.17 Farklı konsantrasyonlarda RTN-PLGA NP'lerinin <i>L. infantum</i> promastigotları üzerinde antileishmanial etkinliğinin 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki % canlılık değerleri.....	73
Şekil 6.18 (a) RTN ve RTN-PLGA'ya maruz kalan <i>L. infantum</i> promastigot kültürünün MTT solüsyonu eklenmeden önceki ve (b) sonraki mikropalak görüntüleri	73



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 <i>Leishmania</i> parazitlerinin sınıflandırılması	5
Tablo 2.2 <i>Leishmania</i> Parazitlerinin Sınıflandırması	6
Tablo 2.3 İnsanları Etkileyen <i>Leishmania</i> Türleri ve Ortaya Çıkan Klinik Belirtileri	11
Tablo 3.1 Farklı Bitki Kaynaklarındaki Rutin İçeriği	38
Tablo 5.1 RTN ve RTN-PLGA NP konsantrasyon örnekleri ve kontrol grupları	57



SEMBOL LİSTESİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
atm	Atmosfer
cm ²	Santimetre kare
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı



KISALTMA LİSTESİ

AIDS	Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu (Acquired Immunodeficiency Syndrome)
AmB	Amfoterisin B
ATP	Adenozin Trifosfat
C-ELISA	Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay
DAT	Direkt Antiglobulin Testi (Direct Antiglobulin Test)
DDT	Dikloro Difenil Trikloroetan
DEET	N,N-Diethyl-m-toluamide
DKL	Yaygın Kutanöz Leishmaniasis
DL	Etken Yükleme Kapasitesi
DMSO	Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
Dot-ELISA	Dot Enzyme Linked Immunosorbent Assay
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
ELISA	Enzim Bağlanan İmmünosorbent Testi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
FBS	Fetal Sığır Serumumu (Fetal Bovine Serum)
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü (Human Immunodeficiency Virus)
ICT	İmmünokromatografik Test (Immunochromatographic Test)
IFAT	Dolaylı Floresan Antikor Testi (Indirect Fluorescent Antibody Test)
IHA	İndirekt Hemaglutinasyon Testi (Indirect Hemagglutination Test)
KATEX	Lateks Aglutinasyon Testi
KCl	Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum Fosfat
KL	Kutanöz Leishmaniasis
L.	<i>Leishmania</i>
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
LDT	Leishmanin Deri Testi
LKL	Lokalize Kutanöz Leishmaniasis
MA	Meglumin Antimonat
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid
Na ₂ HPO ₄	Disodyum Fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)
NNN	Novy-MacNeal ve Nicolle medyum
NO	Nitrik Oksit
NP	Nanopartikül
NSO	Çörek Otu Yağı
OA	Oleanolik Asit
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate Buffered Saline)

PCL	Poli-ε -Kaprolakton
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
pH	Hidrojen Üretim Potansiyeli (Power of Hydrogen)
PKADL	Post-Kala Azar Dermal Leishmaniasis
PLGA	Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit)
PVA	Polivinil Alkol
RCL	Recidivans Kutanöz Leishmaniasis
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
RTN	Rutin
RTN-PLGA	Rutin Yüklü PLGA
Rutin	3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rutinoside
RY	Reaksiyon Verimi
Sb	Antimon
Sb(III)	Üç Değerlikli Antimonlar (Trivalent Antimony)
Sb(V)	Beş Değerlikli Antimonlar (Pentavalent Antimony)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu (Scanning Electron Microscope)
SSG	Sodyum Stibogluconate
THP-1	İnsan Lösemi Monosit Hücre Dizisi
TiAg-NP	TiO ₂ @Ag nanopartikülleri
TPGS	D-α-Tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate
TPP	Tripolifosfat
UV	Ultraviyole
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge (Ultraviolet-Visible)
WB	İmmunoblotting (Western Blotting)

ÖZET

RUTİN YÜKLÜ PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN ANTİLEISHMANIAL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Fulya KAHVECİOĞLU ÇETİN
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi. Sezen CANIM ATEŞ
Temmuz 2019, 95 sayfa

Leishmaniasis dünya çapında özellikle gelişmekte olan ülkelerde görülmekte olup yaklaşık 102 ülkede endemiktir. Leishmaniasisin tedavisinde; aşı olmaması, ilaçların yetersizliği ve yüksek toksisiteye neden olması, ilaçlara karşı direnç gelişimi ve tedavi süresinin uzun olması sebepleriyle yeni ve etkili tedavi yöntemlerine gereksinimi arttırmıştır.

Yapılan araştırmalar, flavonoidlerin birçok hastalığı önlediğini göstermektedir. Nano boyuttaki partiküller, geniş yüzey alanına ve mikro boyuta sahip olması gibi birçok özelliğe sahip olduğundan tıp alanında kullanılmaktadır.

Bu çalışmada bir flavonoid olan rutin bir polimer nanopartikül sistemi içerisine enkapsüle edilerek oluşturulan nanopartiküllerin ve serbest rutin *Leishmania infantum* promastigotları üzerindeki antileishmanial etkinliğinin karşılaştırılarak araştırılmasıdır. Bu tez çalışmasında, ilk kez olarak rutin yüklü PLGA nanopartiküllerinin (RTN-PLGA NP) *L. infantum* promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin thoma lamında sayım yapılmasıyla ve RTN-PLGA NP'lerinin *in vitro* antileishmanial etkinliklerinin MTT yöntemiyle incelenmiştir. Tekli emülsiyon çözücü evaporasyon yöntemi kullanılarak sentezlenen RTN-PLGA NP'lerinin karakterizasyonu; zeta-sizer, UV-vis spektroskopi, FTIR ve SEM cihazları kullanılarak yapılmıştır.

RTN-PLGA NP'lerinin özellikle 72. ve 96. saatte 500, 750 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarında parazitlerin proliferasyonuna önemli ölçüde etki ettiği görülmüştür. RTN-PLGA NP'lerinin 1000 µg/ml'lik konsantrasyonda % canlılık değerini 10 kat azalttığı görülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda RTN ve RTN-PLGA NP'leri uygulanan örneklerde, *L. infantum* promastigotlarının IC₅₀ değerlerinin sırasıyla; 29,2 ± 4,5 µg/ml ve 23,0 ± 2,7 µg/ml olduğu belirlenmiştir. RTN-PLGA NP'lerinin, RTN'ye kıyasla 48. saatte, 500, 750 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarda absorbans değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür.

Literatürde ilk kez olarak RTN-PLGA NP'lerinin antileishmanial özelliği tespit edilmiştir. Antileishmanial etkinliği belirlenen konsantrasyonların gelecekte pre-klinik çalışmalarda kullanılmasının ve visseral leishmaniasisin tedavisinde nanoteknolojiye dayalı yeni yaklaşımların geliştirilmesinde büyük önem taşıyacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Leishmaniasis, antileishmanial etkinlik, flavonoid, rutin, PLGA

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTILEISHMANIAL ACTIVITIES OF RUTIN-LOADED PLGA NANOPARTICLES

Fulya KAHVECIOĞLU ÇETİN
Istanbul Yeni Yuzyıl University, Science and Engineering Institute
Master Thesis, Biomedical Engineering Department
Supervisor: Dr. Sezen CANIM ATEŞ
July 2019, 95 pages

Leishmaniasis occurs especially in developing countries worldwide and is endemic approximately in 102 countries. In the treatment of leishmaniasis; lack of vaccines, insufficiency of drugs, and high toxicity, development of resistance to drugs and prolonged treatment periods increases the need for new and effective treatment methods.

Structured research shows that flavonoids prevent many diseases. Since the nanoscale particles have a wide surface area and micro size, they have many different properties are used in medicine.

In this study, the antileishmanial activity on *Leishmania infantum* promastigotes of free flavonoid rutin and flavonoid rutin encapsulated into a polymer nanoparticle system was compared. In this thesis, the effect of rutin loaded PLGA nanoparticles (RTN-PLGA NPs) on the proliferation of *L. infantum* promastigotes was first investigated by counting in thoma and *in vitro* antileishmanial activity of RTN-PLGA NPs by MTT method. Characterization of RTN-PLGA NPs synthesized using single emulsion (W/O) solvent evaporation method; zeta-sizer, UV-vis spectroscopy, FTIR and SEM instruments.

The concentrations of RTN-PLGA NPs significantly affected the proliferation of parasites at concentrations of 500, 750 and 1000 µg/mL at 72 and 96 hours. RTN-PLGA NPs were found to decrease % viability at a concentration of 1000 µg/mL by 10 times. In the samples where RTN and RTN-PLGA NPs were applied at different concentrations, IC₅₀ values of *L. infantum* promastigotes were; 29.2 ± 4.5 µg/mL and 23.0 ± 2.7 µg/mL. RTN-PLGA NPs were found to have lower absorbance values at concentrations of 500, 750 and 1000 µg/mL at 48 hours compared to RTN.

For the first time in the literature, antileishmanial activities of RTN-PLGA NPs were determined. The use of the concentration determined with antileishmanial activity in future pre-clinical studies is considered and will be of great importance in the development of new approaches based on nanotechnology for the treatment of visceral leishmaniasis.

Keywords: *Leishmaniasis, antileishmanial activities, flavonoid, rutin, PLGA*

1. GİRİŞ

Leishmaniasis, enfekte dişi *Phlebotominae* sınıfı kum sineklerinin ısırmasıyla insanlara bulaşan *protozoa* grubunda yer alan 20'den fazla *Leishmania (L.)* parazitlerinin neden olduğu bir hastalık grubudur. Dünya Sağlık Örgütü, 2012 yılında dünyadaki 102 ülkede leishmaniasis yükünü ve dağılımını bildirmiştir [1]. Leishmaniasis dünyanın ve ülkemizin önemli halk sağlığı problemlerinden biridir [2, 3]. Bu hastalık; yoksulluk, yetersiz beslenme ve bağışıklık sistemi bozukluğu ile ilgili ihmal edilmiş bir tropikal hastalıktır. Bu hastalığı tedavi etmek için az sayıda ilaç vardır ve yüksek toksik etkiye sebep olurlar [4]. Yeni antileishmanial bileşiklerin geliştirilmesi önemlidir [5]. Bu nedenle bitkisel bileşikler leishmaniasise karşı yeni tedaviler geliştirmek için kullanılacak alternatif yeni ilaç kaynakları olarak araştırılmaktadır [4].

Antileishmanial bileşiklerin araştırılması son yıllarda önemli ilerleme kaydetmiş olmasına rağmen, hala güvenli, etkili, ucuz ve doğru bir antileishmanial ilaç bulunamamıştır. Alternatif tedavilerin olmaması sebebiyle, dünya çapında kimyagerler, biyokimyacılar ve doktorlar için yeni ilaçların, bileşiklerin ve hedeflerin tanımlanması üzerinde çalışılması gereken bir konudur. Doğal ürünler, ihmal edilmiş tropikal hastalıkların özellikle *protozoa* türü parazitlerin tedavisi için yeni, potansiyel ve seçici ajanların kaynağıdır. İnsanlar yüzyıllardır bitki kaynaklı materyalleri kullanmayı sürdürdüğünden, bitkisel ürünlerin ilaç keşfinde ve geliştirilmesinde kullanılması şaşırtıcı değildir [6].

Bugüne kadar bitki kaynaklarından elde edilen birçok bileşik, antileishmanial aktivite potansiyeli göstermiştir. Ancak bu hastalığa gereken ilginin gösterilmemesi nedeniyle hiçbiri klinik olarak değerlendirilmemiştir. DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü), dünya nüfusunun yaklaşık %80'inin sağlıkları için geleneksel ilaçlara güvendiğini tahmin etmektedir. Geleneksel ve modern tıbbın uyum içinde olması, farmakologların bağlı olması gereken bir ilke olmalıdır [5].

Flavonoidler, tıbbi özellikleri bakımından geniş çapta araştırılan polifenollerin üst ailesine ait olan bitki türlerinden elde edilen ve ayrıca nutrasötikler olarak da adlandırılan çeşitli bileşik gruplarından biridir [7]. Güçlü antileishmanial aktivite gösterebilirler ve bu nedenle leishmaniasisin tüm formlarının tedavisi için umut vadeden ilaç adaylarıdır [6]. Bir flavonoid olan rutin (RTN); antioksidan,

antibiyofilm, antidepresan ve antikanserojen gibi birçok biyolojik etkisi olduğu tespit edilmiştir [8].

PLGA NP'leri (nanopartikül), nanoteknolojide en sık kullanılan bileşiklerden biridir ve ilaç taşıyıcı sistemler arasında bilinen en iyi taşıyıcı olarak görülmektedir. Bu makromolekül; Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayına sahip olması, biyobozunur, biyoyumlu ve toksik olmaması vb. gibi özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir [9-11].

PLGA NP'leri, ilaçların çözünürlüğünü artırır ve stabilitesini sağlar. Literatürde, RTN yüklü polimerik NP'lerin hedefe yönelik ilaç potansiyeli ve biyoyararlanımı arttırdığı bildirilmiştir [12].

Literatürde RTN-PLGA (rutin yüklü PLGA) NP'lerinin *L. infantum* promastigotlarının proliferasyonu ve antileishmanial etkinliğiyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Nanokapsülasyon işlemiyle flavonoidlerin etkinliğine yönelik yapılan çalışmalar olsa da henüz konvansiyonel ilaç uygulamalarının yerine geçememektedir.

RTN-PLGA NP'lerinin RTN'ye kıyasla, hem proliferasyon hemde antileishmanial etkinlik açısından *L. infantum* promastigotları üzerinde daha etkin olabileceği düşünülmüştür. Bu düşünce doğrultusunda, yaptığımız laboratuvar çalışmalarında ilk kez olarak RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotları üzerinde proliferasyona etkisi ve antileishmanial etkinlikleri araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı; *L. infantum* parazitlerinin *in vitro* promastigot kültürlerinde ilk kez olarak RTN ve RTN-PLGA uygulamaları yapılarak proliferasyona etkisinin ve antileishmanial etkinliklerinin incelenmesi ve leishmaniasis tedavisinde nanoteknolojiye dayalı yeni yaklaşımların araştırılmasıdır.

Amaca ulaşmak için, aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir:

- RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin çalışılacak konsantrasyonlarının belirlenmesi
- Belirlenen optimum konsantrasyonlar kullanılarak, RTN-PLGA NP'lerinin hazırlanması
- Hazırlanan RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin, *L. infantum* promastigot kültüründeki proliferasyonlarının *in vitro* incelenmesi

- Hazırlanan RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin, *L. infantum* promastigot kültüründe *in vitro* antileishmanial etkinliklerinin MTT yöntemiyle incelenmesi



2. LEISHMANIA

2.1 Leishmania Parazitlerinin Tarihçesi ve Sınıflandırılması

Batı ülkelerinde yaşayan birçok insan, bakteri ve virüslerin neden olduğu çeşitli hastalıklara aşına olsa da çok az sayıda insan paraziter enfeksiyonların gelişmekte olan ülkelerde arttığının farkındadır. Parazitler, simbiyotik olmayan bir ilişkide hayatta kalmak için konak üzerindeki organizmalar olarak tanımlanır. Bu, parazitin konağa zarar vermek pahasına beslenmesi anlamına gelir. Paraziter enfeksiyonlar tropik, alt tropik ve ılıman iklim bölgelerinde endemiktir ancak bu bölgelerle sınırlı değildir. İnsanlarda hastalığa neden olabilen üç ana parazit sınıfı vardır [13].

1. *Protozoa*: Doğada serbest yaşayan veya parazitik olabilen tek hücreli, mikroskopik organizmalardır. Sindirim sisteminde (fekal-oral yolla bulaşma) veya kanda ve insan dokusunda (eklem bacaklılar vektörü) bulunabilirler. Protozoonların neden olduğu bazı hastalık örnekleri arasında sıtma (*Plasmodium*), Afrika uyku hastalığı (*Trypanosoma*) ve leishmaniasis (*Leishmania*) vardır [13].

2. *Helmintler*: Doğada serbest yaşayan veya paraziter olabilen büyük ve çok hücreli organizmalardır. Olgun yetişkin formu insan konaklarında çoğalamaz. Bunların bazı örnekleri arasında, yassı solucanlar (*platyhelminths*), dikenli başlı solucanlar (*acanthocephalins*) ve yuvarlak solucanlar (*nematods*) vardır [13].

3. *Ektoparazitler*: Sivrisinekler, keneler, pireler, bitler ve akarlar gibi kan emen eklem bacaklılar dahil olmak üzere geniş bir kategoridir. Bu parazitlerin, yukarıda belirtilen parazit sınıfları içinde vektörler olarak da kullanılabilmesi bilinmektedir [13].

İnsanlar için bulaşıcı olan protozoonlar, hareketlilik şekillerine göre sınıflandırılır. Bunlar; *sarkodin* (amip), *mastigophora* (kamçılılar), *ciliophora* (siliatlar) ve *sporozoadır* (sporlular, yetişkin dönemi hareketli olmayan organizmalar) [13].

Leishmania parazitleri, *Kinetoplastida* sınıfının *Trypanosomatina* alt grubunun *Trypanosomatidae* ailesinde yer alır. *Kinetoplastida*, kamçı ve temel gövdeye bitişik, bir mitokondriyal DNA kütleli olan bir kinetoplasta sahip organizmaları ifade eder [13, 14].

Tablo 2.1 *Leishmania* parazitlerinin sınıflandırılması [3, 6]

Kingdom (Alem)	<i>Protista</i>
Subkingdom (Alt Alem)	<i>Protozoa</i>
Phylum (Şube)	<i>Sarcomastigophora</i>
Subphylum (Alt Şube)	<i>Mastigophora</i>
Class (Sınıf)	<i>Zoomastigophora</i>
Order (Takım)	<i>Kinetoplastida</i>
Suborder (Alt Takım)	<i>Trypanosamatina</i>
Family (Aile)	<i>Trypanosamatidea</i>
Genus (Cins)	<i>Leishmania</i>

Tanımlanan 53 adet *Leishmania* türü vardır. *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, *L. enriettii* kompleksi ve *Paraleishmania* eş anlamlı olanları dikkate alınmadan belirlenen beş alt türüdür [15].

Trypanosoma cinsi *Leishmania* paraziti, genel olarak leishmaniasis olarak bilinen çeşitli hastalık belirtilerinin etiyolojik ajanıdır. İnsan konağın enfeksiyonuna memelileri enfekte eden 30 *Leishmania* türünden 21'i neden olur. Bunlar arasında 3 tür içeren *L. donovani* kompleksi (*L. donovani*, *L. infantum* ve *L. chagasi*); 3 ana türden oluşan *L. mexicana* kompleksi (*L. mexicana*, *L. amazonensis* ve *L. venezuelensis*), *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* ve 4 ana türden oluşan *Viannia* alt türü (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* ve *L. (V.) peruviana*) bulunur [15].

Farklı türler morfolojik olarak ayırt edilemez ancak izoenzim analizi, moleküler yöntemler veya monoklonal antikorlar ile ayırt edilebilirler [15].

İnsanlar için patojen türler moleküler biyolojilerine göre sınıflandırılır. Amerika'da baskın olan kompleksler *L. mexicana* ve *L. braziliensis*'dir. Eski Dünya'da hastalığa *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. donovani* ve *L. infantum* neden olur [14].

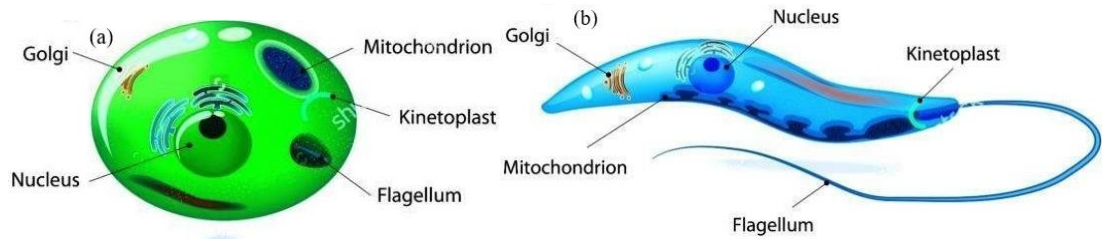
Tablo 2.2 *Leishmania* Parazitlerinin Sınıflandırması [16]

LEISHMANIA			
Ross 1903			
<i>L. tropica</i> Wright 1903	<i>L. majör</i> Yakhnoff&Schokhor 1914	<i>L. donovani</i> Laveran&Mesrul 1903	<i>L. mexicana</i> Biagi 1953
<i>L. killicki</i> Rioux ve arkadaşları 1986	<i>L. gerbili</i> Wang ve arkadaşları 1964	<i>L. archibaldi</i> Casteliani&Chalmers 1919	<i>L. pifanoi</i> Medina&Romero 1959
<i>L. aethiopica</i> Bray ve arkadaşları 1973	<i>L. turanica</i> Strelkova ve arkadaşları 1990	<i>L. infantum</i> Nicolle 1908	<i>L. amazonensis</i> Lainson&Shaw 1972
	<i>L. arabica</i> Peters ve arkadaşları 1987	<i>L. chagasi</i> Cunha&Chagas 1937	<i>L. garnhami</i> Scorza ve arkadaşları 1979
			<i>L. venezuelensis</i> Bonfante-Garrido 1980
			<i>L. aristidesi</i> Lainson&Shaw 1979
			<i>L. forattinii</i> Yoshida ve ark. 1993

	Eski Dünya Parazitleri
	Yeni Dünya Parazitleri

2.2 Morfoloji

Leishmania parazitleri iki morfolojik forma sahiptir [15]. *Leishmania*'nın hayat döngüsünde, promastigot formu vektör bağırsağında hücre dışı olarak çoğalırken, amastigot formu konakçı hücrelerde (örn. makrofajlar) hücre içinde çoğalır. Uygun *in vitro* kültür koşulları ile bu iki aşama laboratuvarlarda çalışılabilmektedir [17].



Şekil 2.1 *Leishmania* parazitlerinin (a) amastigot formu ve (b) promastigot formu [18]

2.2.1 Amastigot Formlar

Amastigot formlar, memeli konakçının makrofaj hücrelerinde çok kısa bir “duyusal” kamçısı olan hücre içi organizmalardır ve çapları 2 ila 5 µm arasındadır [15, 19].

2.2.2 Promastigot Formlar

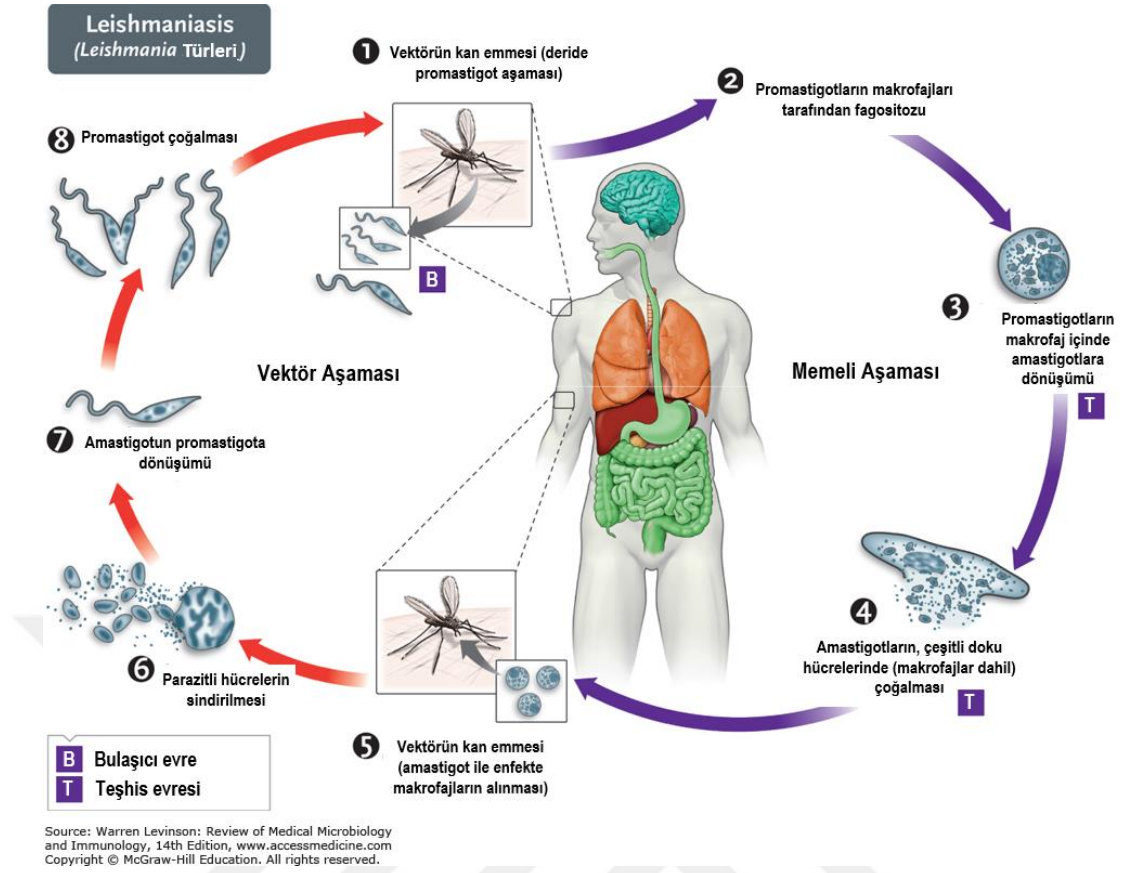
Promastigot formlar (uzun hareketli kamçısı olan [19]), ön kısmında bulunan kamçısı ile kum sineği konakçıda hücre dışındadır ve yaklaşık 10 ila 20 µm uzunluğundadır [13-15]. Kum sineğinin orta bağırsağında ve tükürük bezleri içinde yaşarlar [13, 15]. Bağırsak içindeki promastigotlar, prosiklik aşaması olarak adlandırılan hareketsiz, enfektif olmayan, logaritmik bir büyüme döngüsünden sonra enfektif metasiklik aşamasına kadar gelişir [13].

2.3 Parazitlerin Hayat Döngüsü

Leishmania parazitlerinin, hayat döngülerinin bir parçası olarak, her bir konakçıya daha iyi adapte olmasını sağlayan iki farklı form arasında geçiş yapması gerekir [20]. Bu hayat döngüsü, iki parazit formunun, bir memeli konakçı ve bir kum sineği-konakçı arasındaki değişimini içerir [21, 22]. Memeli konakçıda parazitin gelişimsel biyolojisi basit ve türler arasında tutarlıdır. Buna karşın, kum sineği konakçıda parazitin gelişimsel biyolojisi daha karmaşıktır [22].

Tanımlanan bu aşamalar promastigot ve amastigot aşamalarıdır. Promastigotlar; omurgalı konağın kanını emerken enfekte olmuş vektör kum sineği içinde, 12 ila 20 µm uzunluğunda ve kamçılı olan aşamasıdır [14]. Promastigotlar ilk olarak makrofajlar tarafından alınır [22]. Kum sineğinin bağırsağında bulunan promastigotlar, 4 ila 25 gün içinde amastigot forma geçer. Amastigotlar, 2,5 ila 3,5 µm arasında değişen uzunlukta ve konağın fagositik hücrelerinde lokalize olan zorunlu bir hücre içi parazittir. Enfekte hayvanı ısırırken, enfekte dişi kum sineği, amastigot formlarını rezervuarın kanından emer. Böceğin bağırsağındaki parazit, bir dönüşüm sürecine başlar ve amastigotlar, prosiklik promastigotlara ve daha sonra metasiklik promastigotlara dönüşür ve çoğalırlar. Metasiklik promastigotlar bulaşıcıdır ve sağlıklı bir hayvanın vektör tarafından ısırılmasıyla, bu tür promastigotları aşılar [14].

İki konak arasında gidip gelen parazitler; pH, sıcaklık, reaktif oksijen türleri, besin ve oksijen uygunluğu gibi çevresel değişikliklere maruz kalmaktadır [20]. Vektördeki hayat döngüsünün süresi, *Leishmania* türüne bağlı olarak 4 ila 25 gün arasında değişir. Bu süre düşük sıcaklıklarda uzayabilir veya yüksek sıcaklıklarda kısalabilir [14].



Şekil 2.2 *Leishmania* Parazitlerinin Hayat Döngüsü [23]

Leishmania'da, tembel hayvanlar (*Bradypus pygmaeus*), keseli sıçanlar, kemirgenler, köpekler, kestaneler ve yaban fareleri dahil olmak üzere birçok zoonotik rezervuar vardır [13, 16].

Epidemiyolojik olarak, transmisyon döngüsü zoonotik veya antroponotiktir. Taşıyıcı hayvan konakçılardan bulaşmış ise zoonotik olması, insanın vektör kum sineği için tek enfeksiyon kaynağı olması ise antroponotik olması anlamına gelir [21].

2.4 Leishmaniasis

Leishmaniasis, en önemli altı tropikal hastalıktan biridir [24]. Aynı zamanda en önemli paraziter hastalıklardan biridir [25]. Leishmaniasisin, eski yazılarda ve antik arkeolojik bulgularda bulunan ilkel tanımlarla, M.Ö. 2500'e dayanan uzun bir geçmişe sahip olduğu anlaşılmıştır [16]. Leishmaniasis adını, 1901'de hastalığı keşfeden ve 1903'te bulgularını yayınlayan bir İngiliz ordusu sağlık memuru olan Sir William Leishman'dan alır [26].

Leishmaniasis, *protozoa* grubunda yer alan *Leishmania* cinsine ait parazitlerden kaynaklanır. Parazitler, küçük (sadece 2-3 mm uzunluğunda) bir vektör olan kum sineği ısırığı ile bulaşır [27]. Kum sinekleri, enfekte olmuş bir insanın veya vahşi bir memelinin kanını emmesi durumunda enfekte olurlar [15]. Kum sineği türleri arasında; *Phlebotomus*, *Lutzomyia* ya da *Psychodopygus* bulunur. 600'den fazla türün herhangi biri potansiyel olarak vektör olabilir [13]. Ancak yalnızca 30 kadarının leishmaniasise sebep olduğu bulunmuştur. Sadece dişi kum sinekleri parazitleri bulaştırır. Dişi kum sinekleri, yumurtalarının gelişmesi için kana ihtiyaç duyarlar ve enfekte bir kişi veya hayvandan kan emdiklerinde, *Leishmania* parazitleriyle enfekte olurlar. 4-25 günlük bir süre zarfında, kum sineklerinde parazitler gelişir. Enfekte olmuş dişi kum sinekleri daha sonra enfekte olmamış insan veya hayvan kanını emerken paraziti bulaştırır ve bulaşma döngüsü tamamlanır. Kum sinekleri, dünyanın dönenceler arası ve ılıman bölgelerinde bulunur. Dişi kum sineği larvasını organik maddeyi ve geliştirmek için ihtiyacı olan ısıyı ve nemi bulabileceği; belirli kemirgenlerin yuvalarına, yaşlı ağaçların kabuklarına, yıkık binalara, evlerin duvarlarındaki çatlaklara, hayvan barınaklarına ve ev çöplerine bırakır. Bu sinekler, kan emme arayışı içinde (genellikle akşam ve gece), yaşam alanlarının etrafında birkaç yüz metreye ulaşabilir [27].



Şekil 2.3 *Leishmania* parazitleri taşıyan bir kum sineği vektörü insan derisinden kan emerken [27]

Leishmaniasis, parazit ile enfekte olmuş dişi kum sineklerinin ısırığı yoluyla insanlara bulaşır [28]. Bu hastalık, *Leishmania* cinsine ait makrofaj içi protozoonların sebep olduğu zoonotik hastalıktır. Leishmaniasisin üç farklı klinik formu; parazitin türüne ve konağın immün yanıtına bağlıdır [29].

Parazitin farklı türleri nedeniyle leishmaniasis geniş bir klinik görünüm yelpazesine sahiptir. Parazitin farklı türleri, hastalığın çeşitli formlarına neden olur [19]. Leishmaniasis; en sık görülen form olan kutanöz leishmaniasis (KL), mukokutanöz leishmaniasis (MKL) ve visseral leishmaniasis (VL) olarak üç şekilde kendini gösterir [28]. KL, halk arasında şark çıbanı ve VL'de kala-azar olarak da bilinmektedir [29]. KL, insan vücudunun hastalığa maruz kalan bölgelerinde, iyileştiği zaman kalıcı izler bırakan yaralara neden olurken; MKL, burun, ağız ve boğaz boşluklarının ve çevresindeki dokuların, mukoza zarlarının tahrip olmasına neden olur. Bu iki form hastanın ölümüne yol açmasa da, sakat kalmış hastaya karşı toplumun önyargılı olması hatta hastanın toplumdan dışlanması gibi ciddi bir sosyal problem oluşturur [28].

Leishmaniasise neden olan parazitler, coğrafi dağılıma ve vektör cinsine göre “Eski Dünya” veya “Yeni Dünya” parazitleri olarak sınıflandırılırlar. Eski Dünya parazitleri Avrupa, Asya ve Afrika'da bulunur ve *Phlebotomus* cinsine ait kum sinekleri tarafından taşınır. Yeni Dünya parazitleri öncelikle Orta ve Güney Amerika'nın batı bölgelerinde bulunur ve *Lutzomyia* cinsine ait kum sinekleri tarafından taşınırlar [13]. Her bir sineğin türünün biyolojisi benzersiz ve karmaşıktır. Bu türler, leishmaniasis ve vektör kontrolünün epidemiyolojisi üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Kum sineklerinin zamansal ve mekansal dağılımı yerel coğrafi ve iklimsel faktörlere bağlıdır [30].

Leishmania'nın birçok alt türü mevcuttur. *L. amazonensis*; anerjik dağınık kutanöz form ve yaygın lezyonlu kutanöz formlara sebep olur. *L. chagasi*; visseral Amerikan leishmaniasise neden olan ve Latin Amerika'da Meksika'dan Arjantin'e uzanan geniş bir dağılıma sahip olan türüdür. *L. mexicana*; Meksika, Kolombiya, Karayip Denizi bölgesi ve Ekvador'da gözlemlenen ve MKL olarak bilinen klasik kutanöz türüdür. *L. venezuelensis*; Venezuela'daki MKL'nin nedensel ajanıdır. *L. pifanoi*; Venezüella And Dağları'nda gözlenmektedir. *L. donovani*; Eski Dünya'da VL'den sorumlu olan türdür. *L. infantum*, bebeklerde VL ve KL'ye neden olan türdür. *L. tropica*; KL'nin nedensel ajanı olan türüdür. *L. aethiopica*; KL ve MKL'nin nedensel ajanı olan türüdür [14].

Tablo 2.3 İnsanları Etkileyen *Leishmania* Türleri ve Ortaya Çıkan Klinik Belirtileri [13]

Klinik Bulgular	Eski Dünya Parazitleri	Yeni Dünya Parazitleri
Kutanöz Leishmaniasis (KL)	<i>L. majör</i> (LKL) <i>L. tropica</i> (LKL/RCL) <i>L. aethiopica</i> (LKL/DKL) <i>L. infantum</i> (LKL/PKADL) <i>L. donovani</i> (PKADL)	<i>L. mexicana</i> (LKL) <i>L. venezuelensis</i> (LKL/DKL) <i>L. amazonensis</i> (LKL/DKL) <i>L. braziliensis</i> (LKL/RCL) <i>L. panamensis</i> (LKL) <i>L. guyanensis</i> (LKL) <i>L. peruviana</i> (LKL) <i>L. chagasi</i> (LKL/PKADL)
Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL)	<i>L. aethiopica</i> (nadir) <i>L. majör</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i>
Visseral Leishmaniasis (VL)	<i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i> <i>L. tropica</i> (nadir)	<i>L. chagasi</i>

(Yaygın Kutanöz Leishmaniasis (DKL), Lokalize Kutanöz Leishmaniasis (LKL), PKADL: Post-Kala Azar Yaygın Leishmaniasis, RCL: Recidivans Kutanöz Leishmaniasis)

2.4.1 Kutanöz Leishmaniasis (KL)

Saf KL ilk olarak Eski Dünya'da Lewis ve Cunningham tarafından 1876'da tanımlanmıştır. Bu hastalığa *L. tropica* neden olmaktadır. Meksika'nın güneybatısındaki ve Guatemala sınırındaki nedensel ajan ise *L. mexicana*'dir [14].

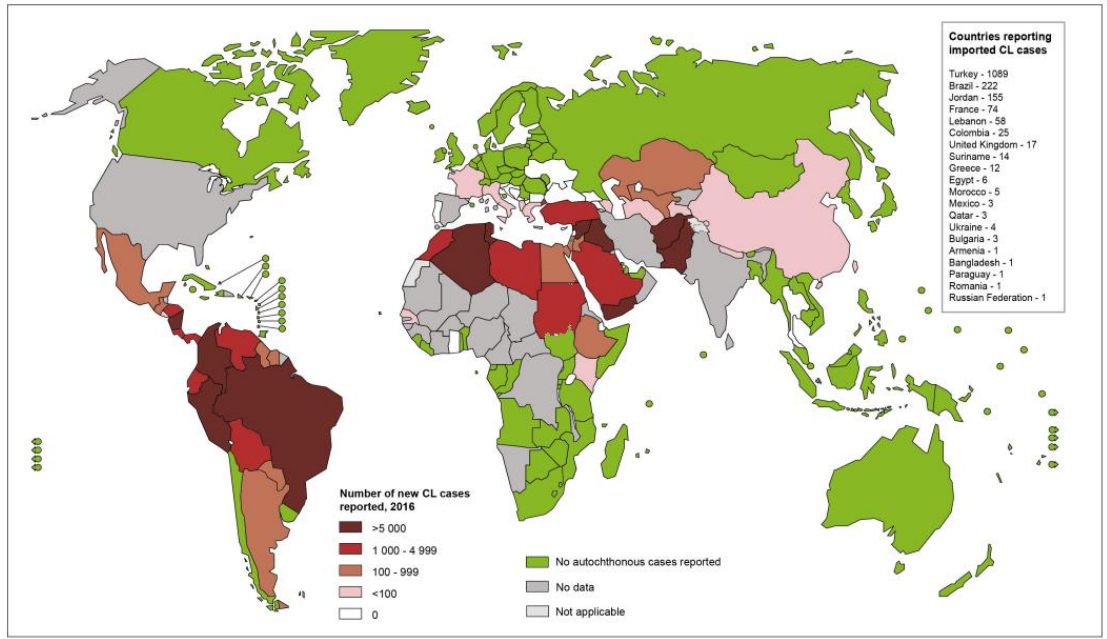
Leishmania parazitleri ilk olarak, bir KL lezyonu olan şark çıbanından bir örnekte 1885 yılında Hindistan'da Cunningham tarafından tanımlanmıştır. Kısa süre sonra, Rus ordusunun cerrahı Borovsky, 1889'da Özbekistan'ın Taşkent kentinde gözlemlenen şark çıbanı lezyonlarındaki organizmaların mükemmel bir tanımını yapmıştır. Amerikan Doktor Wright, 1903 yılında genç bir Ermeni göçmenin deri lezyonunda hücre içi protozoal organizmaları keşfetmiştir. Wright, organizmalara "*helcosoma tropicum*" adını vermiştir. "Kala-azar" hastalarının dalaklarında bulunan benzer organizmalar, 1903'te Leishman ve Donovan tarafından bağımsız olarak incelenmiştir ve 1903'te Ross tarafından *L. donovani* olarak adlandırılmıştır [21].

KL, hastalığın yaygın ve mukozal formlarını ilerleten kronik cilt lezyonları ile tanımlanan ölümcül bir hastalıktır [31]. En sık görülen form olan KL, birkaç ay içinde kendi kendine iyileşen 1-200 arası basit cilt lezyonuna neden olur, ancak çoğu zaman kum sineğinin ısırıldığı bölgede belirgin izler bırakır [13, 21].



Şekil 2.4 KL'li hastalardaki lezyonların görüntüsü [32]

L. major, *L. mexicana*, *L. braziliensis* ve *L. panamensis*'in neden olduğu KL, genellikle 3-18 ay içinde kendi kendine iyileşir ancak kalıcı yara izleri bırakır [33]. KL, tedavi edilmezse altı aydan birkaç yıla kadar sürebilen iyileşmeyen yaralar oluşturur [15]. KL, hastalığın en sık görülen şeklidir. Genellikle yara; yüz, kollar ve bacaklar gibi vücudun açık kısımlarında gelişir. Ciddi sakatlığa neden olabilecek çok sayıda lezyon olabilir. Yaralar iyileştiğinde, genellikle ciddi sosyal önyargıların nedeni olan kalıcı izler bırakır [32].



Şekil 2.5 Dünya Çapında KL'nin Endemik Durumu, 2016 [34]

Her yıl 2 milyon yeni leishmaniasis vakasının eklendiği ve yaklaşık 1,5 milyonunun KL olduğu tahmin edilmektedir [35].

2.4.2 Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL)

MKL, genellikle kum sineğinin ısırıldığı bölgede tek bir lezyon olarak ortaya çıkar ve enfeksiyon devam ederse, bu lezyonlar ciltte iz bırakan eritemli kabarcık yaralar gelişir [36].

MKL, burun ve ağzın mukoza dokularındaki lezyonlar olarak tanımlanır. Hastalık, sıklıkla ağır doku yıkımı ve şekil bozukluğu ile ilerler [21]. Bu form genellikle KL'den sonra veya eşzamanlı olarak ortaya çıkar [15]. Sıklıkla morbidite ile sonuçlanan Yeni Dünya hastalığıdır. MKL'nin klinik olarak oluşması yıllar alır ve üst solunum yoluna yerleşen *Leishmania* parazitlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ağız ve üst yutak zarlarının parçalanması sonucunda yüzde geniş morbiditeye neden olur ve ölümcül olabilir [13].

MKL'de lezyonlar; burun, ağız ve boğaz boşluklarının ve çevresindeki dokuların mukozalarının kısmen veya tamamen tahrip olmasına neden olabilir. Leishmaniasisin bu sakatlayıcı şekli, acı çeken kişinin toplum tarafından reddedilmesine yol açabilir [37].



Şekil 2.6 MKL'li hastalardaki lezyonların görüntüsü [37]

Lezyonlar kendiliğinden iyileşebilir veya iyileşmesi birkaç yıl sürebilir. Parazitler, konakçılarda bağışıklık sistemini düşürerek ve fırsatçı enfeksiyonlara karşı duyarlılığı artırarak daha fazla hasara neden olur. Az sayıda bir hasta grubunda, hızlı bir inflamatuvar tepkinin ardından, parazit kolonileri oluştuğundan sonra, konakçılarda septumlarına, dudaklarına, yanaklarına ve yumuşak damaklarına zarar vererek MKL gelişebilir [36].

2.4.3 Visseral Leishmaniasis (VL)

VL ya da kala-azar dişi kum sineği vektörü tarafından yayılan bir parazit tehditidir [38]. Bu formda parazitler, deriden ziyade retikuloendotelial sisteme yerleşir [13].

VL, iç organlara saldırır [39] ve dalak, karaciğer ve kemik iliği gibi çok sayıda makrofajı olan iç organlarda kronik enfeksiyona neden olan ölüm riski olan bir hastalıktır [15, 31]. Tedavi edilmediği takdirde kaçınılmaz olarak ölüme yol açan leishmaniasis hastalığının en ciddi şeklidir [28]. Tedavi edilmeyen VL'de, mortalite oranı %95'tir [15]. VL, *L. donovani*'nin ve *L. infantum*'un neden olduğu leishmaniasisin en şiddetli formudur [19, 40].

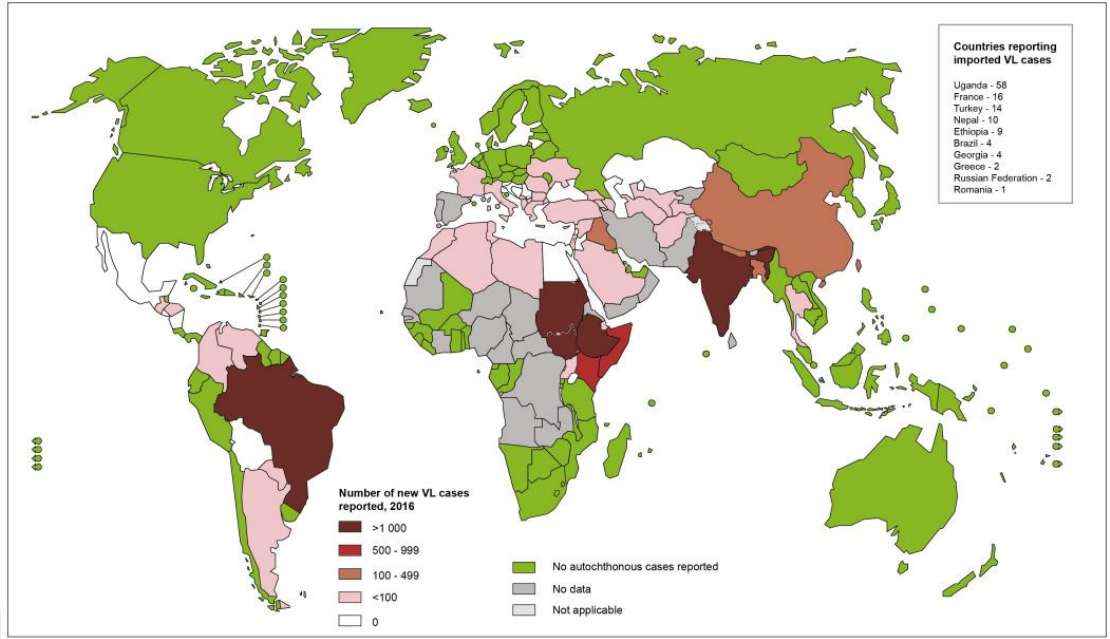
VL; yüksek ateş, halsizlik, kilo kaybı, dalak, karaciğer ve lenf bezlerinin şişmesi, pansitopeni ve anemiye neden olan sistemik bir rahatsızlıktır [38].



Şekil 2.7 VL'li hastalarda karaciğer ve dalağın şişmesi [41]

VL, ölümcül vaka oranı yüksek olan engellenemeyen ve uzun süreli salgınlara neden olabilir. Salgınlar, özellikle doğu Afrika'da ve bazen de Güney Amerika'da erişilmesi zor bölgelerde sık görülür. Son zamanlarda büyük salgınlardan etkilenen bölgeler arasında Libo Kemkem, Etiyopya (2005-2006), Wajir, Kenya (2008) ve Jonglei ve Yukarı Nil, Güney Sudan (2009-2012) bulunmaktadır [42].

VL sırasında zarar gören bağışıklık hücreleri, hastaları çoklu ikincil enfeksiyon riskini artırır. Bu durum enfekte kişinin ölümüne yol açar [38]. Bağışıklık sistemi baskılanmış HIV hastalarının özellikle VL enfeksiyonuna karşı savunmasız olması nedeniyle HIV ile birlikte enfeksiyonun ortaya çıkması risk oluşturur. Aslında, Güney Avrupa'da bildirilen VL vakalarının çoğu HIV taşıyan hastaları içermektedir [28]. *Leishmania*-HIV koinfeksiyonu, 35 endemik ülkeden rapor edilmiştir. HIV ile koinfeksiyon, yönetilmesi daha zor olan ciddi formlara neden olarak VL ve KL vakalarını artırır [42].



Şekil 2.8 Dünya Çapında VL'nin Endemik Durumu, 2016 [43]

Post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL); genellikle yüz, üst kollar, gövdeler ve vücudun diğer kısımlarında maküler, papüler veya nodüler döküntü gibi görünen VL'nin ciltteki kalıntıları şeklindedir [42]. Genellikle VL'den iyileşen hastalarda hipopigmente maküler, makülopapüler ve nodüler döküntü ile tanımlanır [41].

Daha çok Doğu Afrika'da ve Hindistan Yarımadası'nda görülür. Kala-azar hastalarının Doğu Afrika'da %50'sinde ve Hindistan Yarımadası'nda %5-10'unda PKDL'nin geliştiği gözlenmiştir. Genellikle kala-azar görünüşte iyileştirildikten 6 ay ila 1 yıl veya daha uzun bir süre sonra ortaya çıkar. Ancak daha erken de ortaya çıkabilir. PKDL'li insanlar potansiyel bir kala-azar enfeksiyonu kaynağı olarak kabul edilir [42].

PKDL, Afrika'daki vakaların çoğunda kendiliğinden iyileşirken Hindistan'daki hastalarda kendiliğinden nadiren iyileşir. Özellikle VL'nin epidemik dönemlerinde, parazitler için rezervuar görevi gören hastalıkların bulaşmasında ve korunmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [41].

Özellikle salgın hastalıklar dönemlerinde kala-azarın bulaşması potansiyeli artmaktadır. Ancak, PKDL hem klinik hem de epidemiyolojik olarak ihmal edilmiştir [44].

KL'den farklı olarak PKDL lezyonları ateşli değildir. Bununla birlikte, her zaman peri-oral dağılım göstermezler cilt hastalıkları ile benzerlik gösterebilirler [44].

Klinik spektrum değişkendir ve ayırıcı tanılarının listesi uzundur. Bununla birlikte, PKDL'nin makul bir teşhisi, sadece diğer ayırıcı tanılarının dışlanabileceği iyi bir klinik değerlendirme temelinde klinik gerekçelerle yapılabilir [44].



Şekil 2.9 PKDL'li hastaların görüntüsü [41]

Ayrıca *L. infantum*'un neden olduğu paraziter bir hastalık olan Canine Visseral Leishmaniasis (CVL), kronik bir duruma dönüşebilir ve ölüme yol açabilir. Enfekte köpeklerin değerlendirilmesi, hastalığın evrimi ile ilgili klinik ve laboratuvar parametrelerini oluşturulması için önemlidir [45].

VL tedavisi için çok çeşitli platformlar kullanılmakta iken, şu anda VL tedavisi için standart bir protokol bulunmamaktadır. Bu nedenle tedavi stratejilerini geliştirmek için etkili bir ilaca ihtiyaç vardır [19].

VL için mevcut tedavi seçenekleri; yüksek maliyet, toksisite, sınırlı erişim, direnç gelişimi ve tedavinin başarısızlığı sebepleriyle sınırlıdır [38].

2.5 Leishmaniasisin Epidemiyolojisi

Leishmaniasis dünya çapında yaklaşık 100 ülkede endemiktir ve gelişmekte olan ülkelerin çoğunda bir sağlık sorunudur. Dünya çapında yıllık leishmaniasis prevalansı yaklaşık 12 milyondur ve 350 milyon insan risk altındadır. Her yıl yaklaşık 2 milyon KL ve 500.000 VL vakası kaydedilmektedir ve dünya çapında 60.000 kişinin hastalıktan hayatını kaybettiği rapor edilmektedir [24, 25].

KL'nin başlıca salgınları Afganistan ve Suriye Arap Cumhuriyeti'nin farklı bölgelerini etkilemiştir. 2017'de, DSÖ'ye bildirilen 22.145 yeni vakanın 20.792'si (%94'ü) yedi ülkede meydana gelmiştir. Bunlar; Brezilya, Etiyopya, Hindistan, Kenya, Somali, Güney Sudan ve Sudan'dır [46].

DSÖ, Güneydoğu Asya Bölgesi'nde kala-azar önleme programı etkili bir şekilde ilerlemekte ve 2006'da 9000'den fazla vaka bildiren Bangladeş gibi ülkeler, 2016'da 255 ve 2017'de 192 yeni vaka bildirmiştir. KL vakalarının çoğunluğu Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, İran İslam Cumhuriyeti, Pakistan, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye Arap Cumhuriyeti'nde görülmektedir. Antroponotik KL ağırlıklı olarak kentsel ve çevreseldir. Ayrıca Güney-Doğu Asya'daki antroponotik VL'ye benzer bölgesel kümelenme modelleri oluşturur. Hastalık genellikle nüfus yoğunluğu fazla olan şehirlerde, özellikle savaş ve çatışma bölgelerinde, mülteci kamplarında ve geniş çapta göçün yaşandığı bölgelerde büyük salgınlarla ortaya çıkar. Amerika Bölgesi'ndeki KL'nin epidemiyolojisi; bulaşma döngülerindeki çeşitlilikleri, rezervuar konakları, kum sineği vektörleri, klinik belirtileri ve tedaviye cevapları ve aynı coğrafi bölgede çok sayıda dolaşan *Leishmania* türünden dolayı karmaşıktır. MKL vakalarının yaklaşık %90'ı; Bolivya Çokuluslu Devleti, Brezilya ve Peru'da görülür [46].

En yaygın form olan KL, yüz yaralarına, yara izlerinin belirginleşmesine ve sakatlıklara neden olur. Kenya'da endemiktir [39]. Afganistan, Cezayir, Kolombiya, Brezilya, İran, Suriye, Etiyopya, Kuzey Sudan, Kosta Rika ve Peru ülkeleri tahmini küresel KL insidansının %70 ila %75'ini oluşturmaktadır [16].

Hastalığın en ciddi şekli olan VL, 80'den fazla ülkede özellikle yoksulluktan etkilenen birçok tropik ve subtropikal bölgelerde ve savaş bölgelerinde endemiktir [26, 38]. Düzensiz ateş nöbetleri, kilo kaybı, dalak ve karaciğerin büyümesi ve anemi ile tanımlanır [26]. Doğu Afrika'da tekrarlayan VL, salgınlardan etkilenen topluluklarda yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmuştur [46]. Hastalık, Hindistan Yarımadası'nda ve her yıl tahminen 200.000 ila 400.000 yeni vakanın görüldüğü Doğu Afrika'da oldukça endemiktir. Tüm yeni vakaların %90'ı altı ülkeden bildirilmektedir. Bunlar; Brezilya, Etiyopya, Hindistan, Somali, Güney Sudan ve Sudan'dır [26].

Toplam VL vakalarının yaklaşık %50'si Hindistan'da görülür ve Hindistan'da görülen vakaların %90'ı Bihar eyaletinde görülmektedir. *Leishmania*, Sudan ve Hindistan gibi ülkelerin bölgelerinin çoğunda zoonotik döngüden farklı olarak, antroponotik döngüyü takip eder [38]. VL tedavi edilmezse, gelişmekte olan ülkelerde ölüm oranı 2 yıl içinde %100'e kadar yükselebilir [41].

2.6 Leishmaniasisin Ülkemizdeki Dağılımı

Türkiye, Suriye'deki iç savaş nedeniyle yaklaşık 3 milyon mültecinin ülkeye girmesine izin vermiştir. Mülteciler çoğunlukla Türkiye'nin güneyindeki kamplarda veya evlerde yaşamaktadır. 2009-2015 yılları arasında, Türkiye'de yapılan bir epidemiyolojik çalışma, gerçek zamanlı ve Heminested (semi-nested) PCR ile leishmaniasis tanısı konulan 263 hastanın %66,15'inin Türk, %33,46'sının Suriye ve %0,38'inin Afgan olduğunu tespit etmiştir. *L. tropica* ve *L. infantum* (Türk ve Suriye'li hastalardan) türlerinin hastalığa sebep olduğu bulunmuştur. Bu durum savaşın o bölgedeki etkilerini açıkça göstermektedir [14].

Leishmaniasis yükünü incelemek için seçilen 25 ülkenin 13'ünde yüksek bir VL yükü (Bangladeş, Çin, Etiyopya, Gürcistan, Hindistan, Kenya, Nepal, Paraguay, Somali, Güney Sudan, İspanya, Sudan ve Uganda), 11'inde yüksek bir KL yükü (Afganistan, Cezayir, Kolombiya, İran, Fas, Pakistan, Peru, Suudi Arabistan, Suriye Arap Cumhuriyeti, Tunus ve Türkiye) ve bir tanesinde (Brezilya) her ikisinin de yükü yüksek olan klinik formlar raporlanmıştır. Türkiye'de her yıl yaklaşık 2000 lokal KL vakası bildirilmiştir [14].

Ülkemizde en çok Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde endemik olarak KL görülmektedir. Son on yılda bu hastalık, Ege Bölgesi de dahil pek çok bölgeye yayılmıştır [47].

2.7 Leishmaniasisin Teşhis, Tespit ve Gözetimi

VL tanısının klinik bulguları parazitolojik veya serolojik testlerle beraber yapılır. KL ve MKL hastalarında, parazitolojik testler klinik görünüm tanıyı doğrular ancak serolojik testlerin sonucu sınırlıdır. Sağlam bir gözetim sistemi, kontrol veya önleme programlarının temel bir bileşenidir. Esas olarak iki gözetim şekli olan pasif ve aktif vaka tespiti veya aramaları, hastalık kontrol programlarında uygulanır. "Pasif vaka tespiti", durgun sağlık tesislerinde çalışan klinisyenler tarafından, hastalıklarına çözüm arayan hastalar vasıtasıyla bulunmasına neden olmasıdır. Bir vakayı takip eden klinisyenler, düşük yükü olan ya da endemik olmayan ülkelerde bile, dünyadaki leishmaniasis yükü hakkında daha doğru bilgi edinmek için uygun epidemiyolojik gözetim sistemine bildirmelidir [48].

DSÖ, vakaları tespit etmek için standart vaka tanımlarının kullanılmasını önermektedir. “Aktif vaka tespiti” veya arama, sağlık personelinin topluma ulaşması ve leishmaniasis vakalarını bulmak için toplumu sistematik olarak taraması anlamına gelir. Aktif vaka araştırması, Hindistan Yarımadası’ndaki VL önleme stratejisinin önemli bir bileşenidir. Hastaların bulaştırma süresini azaltarak, hastalığın bulaşmasını önlemeye yardımcı olur ve erken teşhis ve tedavi ile hastaların tedavi sonuçlarını iyileştirir [48].

Doğada kertenkelelerde ve memelilerde rastlanan leishmaniasisin insan dışında en çok görüldüğü memeli türü köpeklerdir. Köpekler, klinik olarak hastalanmalarının dışında, başta insanlar olmak üzere hastalığın diğer memelere taşınması açısından da önemlidir. Hastalık, köpeklerde ölümcül olabilmektedir [49].

2.8 Leishmaniasisin Yayılması

Leishmaniasis, dünyadaki en fakir popülasyonu etkileyen, yüksek mortalite ve morbiditeye neden olan parazitik protozoal hastalıklardan biridir [50]. Bu hastalık, üçüncü en önemli vektör kaynaklı olan bulaşıcı bir hastalıktır [19].

Leishmaniasis ihmal edilmiş bir tropikal hastalıktır, tropik ve subtropikal bölgelere özgüdür. Ancak, gelişmiş ülkelerde de yaygınlaşmaktadır [51]. Özellikle Afrika, Asya ve Latin Amerika'da morbidite ve mortaliteye neden olan önemli bir halk sağlığı problemi olarak görülmektedir [2].

Leishmaniasis dört kıtaya dağılmış ve milyonlarca insanı etkilemektedir. Özellikle de yetersiz sağlık koşulları ve kaynak eksikliğinin, yetersiz beslenmenin ve zayıf bağışıklık sisteminin enfeksiyon olasılığını arttırdığı fakir ülkelerde daha da etkilidir [28].

Ayrıca, leishmaniasisin endemik olmadığı gelişmiş ülkelerde, artan uluslararası turizm, askeri operasyonlar ve endemik ülkelere gelen göçmenlerin akışı ile bağlantılı olarak, son yıllarda enfekte olmuş nüfus vakaları artmıştır [28]. Küresel ısınma ve leishmanial vektörlerin artması da bu hastalığın her iki formunun da yüksek oranda görülmesine neden olmaktadır [52].

Hastalığın küresel ısınmanın, savaşların ve göçün etkileri nedeniyle daha hızlı bir dağılım göstermesi beklenmektedir [25].

Hastalık, temel olarak, yoksul barınak koşullarında yaşayan yiyeceklere erişimi kısıtlı olan insanları etkilemektedir [53].

Günümüzde, bilimsel ve medikal topluluklar tarafından leishmaniasis hakkında çok bilgi toplanmasına rağmen hastalığın kontrolünün hala zor olduğu bilinmektedir [35]. Hastalığın klinik belirtileri enfekte edici türlere bağlıdır [21].

Leishmaniasis, ağırlıklı olarak yoksulluk sınırının altında yaşayan gelişmekte olan ülkelerin insanlarını etkileyen, yaşamı tehdit eden bir hastalıktır. Hastalık endemik bölgelerinde zayıf hassasiyetler, yetersiz beslenme ve sağlıksız yaşam ortamı faktörleri patogenezi ve belirtilerinin temel nedenidir. Nüfusun endemik bölgelerden endemik olmayan bölgelere göçü ve endemik bölgelerdeki turizm faaliyetleri, yeni bölgelerde yayılan hastalıkların başlıca nedenidir. Endemik ülkelerde hastalığın yayılmasını kontrol altına almak için, hem vektör hem de parazitler için etkili kontrol önlemlerin alınması gerekmektedir [33].

Brezilya'da, bu enfeksiyon birçok bölgede endemiktir. Brezilya Sağlık Bakanlığı'na göre 2016 yılında Kuzeydoğu Bölgesi'nde, en fazla VL vakası olan 1523 vaka ve ardından Güneydoğu'da 592 vaka kaydedildi. 2005'ten 2016'ya kadar Brezilya'da bulunan leishmaniasis vakalarının sayısı azalmıştır. Dünyada yılda 1,5 ila 2 milyon kişi bu enfeksiyondan etkilenmekte ve 350 milyon kişi hastalığa yakalanma riski altındadır [54].

Yeni vaka sayısındaki artışın sebeplerinden biri de parazitlerin konvansiyonel kemoterapiye karşı artan direncinin yanı sıra vektörleri ve çevresel değişiklikleri kontrol etmedeki güçlüklerdir. Ek olarak, bu hastalık yetersiz beslenme ve koinfeksiyonlarla ilişkili ciddi ve ölümcül formlarda kendini gösterebilir [54].

2.9 Leishmaniasisin Tedavisi

Leishmaniasis, özellikle Afrika'da önemli morbidite ve mortaliteye sahip olan ciddi bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir [55]. Yüksek morbiditeye rağmen, terapötik alternatifler çok azdır. Yüksek dozda ve uzun süreli tedavi sebebiyle orta ila yüksek toksisiteye neden olan ciddi dezavantajları vardır. Konvansiyonel ilaca karşı şiddetli toksik reaksiyonlar sebebiyle yeni tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır [56]. Mevcut tedaviler yeterli değildir [51].

Leishmaniasis gibi paraziter hastalıkları tedavi etmek için ilaçların geliştirilmesi, ilaç endüstrisinin yüksek kar elde etmemesi ve geliştirmekte olan ülkelerde daha sık görülmesi nedeniyle yetersiz kalmıştır [24]. Hastalıktan tamamen iyileşme, bir aydan daha uzun bir süre boyunca sürekli ilaç kullanılmasını gerektirir. Bu durum, özellikle geliştirmekte olan veya gelişmemiş ülkelerde insanlar için yüksek tedavi maliyetine sebep olur [25]. Çünkü leishmaniasisin mevcut tedavisi pahalıdır [57]. Düşük sosyoekonomik duruma sahip popülasyonların erişebileceği düşük maliyetli ilaçlar geliştirilmelidir [24].

Dünyanın farklı bölgelerindeki *Leishmania* türleri, kullanılan antileishmanial ilaçlara karşı direnç geliştirmiştir. Bu nedenle leishmaniasis tedavisi için yeni ilaçların geliştirilmesi, parazitlerde ilaç direncinin ortaya çıkması ve ilaçların toksisitesi nedeniyle DSÖ raporlarına göre acil bir ihtiyaçtır. İlaç direnci, bu tip bir parazitin neden olduğu insan enfeksiyonlarının tedavisindeki başarısızlığa bağlı önemli bir sorundur. Bu nedenle yeni ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir [57].

Mevcut ilaç rejimiyle birlikte artan direnç insidansı, daha ucuz ilaçların ve yeni aşılarda geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Uzun yıllardır *Leishmania* parazitleri üzerinde yapılan araştırmalarla önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Maalesef geliştirilen yeni ilaçlar tatmin edici olmaktan uzaktır. Ek olarak, önleyici veya koruyucu aşı alternatiflerinin bulunmaması, hastalığın kontrolünü zorlaştırmaktadır [33].

Leishmania aşısının geliştirilmesine yönelik umut verici birçok sonuç alınmasına rağmen kemoterapi tedavileri hastalığın iyileştirilmesinde ilk sırada yer almaktadır. Halen leishmaniasis tedavisinde etkinliği gösteren yaklaşık 25 bileşik vardır. Ancak bu bileşiklerin hepsinde, bir veya daha fazla sınırlama ve/veya dezavantaj vardır [13].

Leishmaniasis, ilaç endüstrisinden çok az ilgi görmüştür. Klinik olarak kullanılan sınırlı sayıda ilaç vardır. Leishmaniasisin tedavisi sadece kemoterapiye dayanır [28].

Leishmaniasis tedavisi için onaylanmış olan dört adet parenteral olarak verilen ilaç sınıfı vardır. Bunlardan birincisi olan Pentostam (sodyum stiboglukonat) ve meglumin antimonat dahil olmak üzere beş değerlikli antimonlar (Sb(V)), tüm leishmaniasis formlarını tedavi etmek için tercih edilen ilaçlardır [13, 25, 58].

İkincisi olan polien makrolid antibiyotik amfoterisin (amfoterisin B, lipozomal amfoterisin B) hem KL'yi hem de VL'yi başarılı bir şekilde tedavi etmek için kullanılmaktadır. Üçüncüsü olan pentamidin gibi diamidinler, KL ve VL'yi tedavi etmek için kullanılmaktadır. Dördüncü olarak paromomisin, bir aminosiklitol-aminoglikozit antibiyotik hali hazırda KL tedavisi için kullanılmaktadır ve VL tedavisi için faz III klinik deneylerindedir. Ayrıca tedavide miltefosin de kullanılmaktadır [13, 25, 58].

Leishmaniasis tedavisinde, kullanılan ilk ilaç olan Sb(V)'ler (Pentostam[®] ve Glucantime[®]) 80 yıldan beri kullanılmaktadır [51]. Pentostam[®] veya Glucantime[®], klinik olarak kullanılan birinci basamak antileishmanial ilaçlardır [59]. Bu kemoterapi tedavileri, oldukça toksik ve ilaç direncinin geliştiği kanıtlanmış olan enjekte edilebilir Sb(V)'lere dayanmaktadır [51].

Antimonlar oral olarak aktif değildir [47]. Bu sebeple kas içinden [59] veya uzun süreli damardan uygulama gerektirir [47]. Antimonlar, etkinliğinin azalması ve yüksek toksisitesi nedeniyle dikkatli ve yavaş intravenöz uygulama gerektirir [51]. Ayrıca bu ilaçların son zamanlarda *Leishmania* parazitleri üzerindeki etkilerini yitirmeye başlaması sebebiyle, hastalığın tedavisi için daha yüksek dozlar kullanılmaya başlatılmıştır [25].

Antimonlar, leishmaniasis tedavisinde kullanılmaya devam edilmektedir. Bunlardan bazıları, parazit tarafından geliştirilen ilaç direnci nedeniyle etkili olmamıştır. Bu maddeler; böbrek yetmezliği, akut pankreatit, miyalji, teratojenik, periferik nöropati, hepatotoksisite ve kardiyotoksisite gibi ciddi yan etkilere sahiptir [24].

Parenteral antimonlar uzun yıllardır leishmaniasis tedavisinde altın standart olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, iyi belgelenmiş kardiyovasküler, hepatik ve renal toksisite nedeniyle yakın tıbbi gözetim gerektirirler. Antimonlar, ilaç duyarlılığı olan kişilerde, kronik hastalığı olan kişilerde, yaşlı hastalarda, çok küçük çocuklarda, hamile ve emziren kadınlarda kontrendikedir ve faydaları daha da sınırlıdır. Antimonlar Amerika Birleşik Devletleri'nde hala deneysel olarak sınıflandırılmaktadır. FDA onayına sahip olmadıkları için kullanımları için özel izin gereklidir [15].

Gelişmekte olan pek çok ülkede, leishmaniasis tedavisinde kullanılan antimonları bulmak zordur, çünkü tedavi pahalıdır. Bu finansal yük birden fazla aile üyesinin aynı anda tedavi görmesini gerektiren kırsal endemik bölgelerde artar. Bu engeller nedeniyle, KL'yi olan nispeten az sayıda insan hiçbir zaman antimon tedavisi görememekte ve bu hastaların çoğu tedaviyi tamamlayamamaktadır [15].

Dezavantajlara rağmen, Sb(V) uzun zamandır hem KL hem de VL tedavisinde tercih edilen ilaçlar olmaya devam etmektedir. Antimonlar, günde 15-20 mg Sb(V)/kg arasındaki dozlarda 21-28 gün boyunca intravenöz veya intramusküler olarak verilir [13].

Sodyum Stiboglukonat (SSG) gibi antimonlara karşı direnç gelişmesi nedeniyle Hindistan'ın Bihar bölgesinde tedavinin %50 başarısız olduğu vakalar bildirilmiştir. SSG'nin kalp, karaciğer ve pankreas üzerinde olumsuz etkileri vardır [58]. Birinci basamak ilaçlar, halen diğer ülkelerde kullanılmasına rağmen, Hindistan'da direnç gelişmesi nedeniyle artık Sb(V)'ler kullanılmamaktadır [28]. Sb(V)'ler toksisiteye ve istenmeyen yan etkilere sahiptir. Bu olumsuz özellikler hastanın tedaviyi bırakmasına ve dirençli suşların insidansının artmasına neden olur [60].

Antimonlar uzun süredir leishmaniasis tedavisinde kullanılmasına rağmen, etki mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamamıştır. İn vivo olarak, aktif Sb(III) forma indirgenirler, ancak iyileştirme mekanizması belirsizliğini korur [13].

İkinci basamak tedavi olarak, ilacın etkinliğini arttırmak ve toksisitesini azaltmak için polien antibiyotik amfoterisin B'nin (AmB) lipozomal formülasyonları (Ambisome® [51]) geliştirilmiştir. AmB'nin yeni ve daha ucuz formülasyonları alternatif olarak araştırılmaktadır [28]. AmB deoksikolat (Fungizone®) Hindistan'ın Bihar kentinde ilk basamak tedavi haline gelen ikinci basamak ilaç olarak kabul edilir [51].

AmB, mantar enfeksiyonlarının tedavisi için altın standart olmaya devam etmekte ve leishmaniasis için ikinci basamak tedavi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Terapötik endeksi arttırmak ve AmB'nin toksisitesini azaltmak amacıyla, AmB'nin lipid formları geliştirilmiştir [13]. Lipidik formülasyonlar olan AmB deoxycholate (Fungizone®) ve lipozomal AmB formülasyonları (Ambisome®, Amphocil®, Abelcet®), toksisiteyi azalttığı için leishmaniasis tedavisinde daha iyi bir yarı ömür ve daha yüksek etkinlik sergilemiştir [13].

Maalesef, ilaçların pahalı olması ve bağışıklık sistemi düşük olan hastalarda hastalığın nüks etmesi, özellikle gelişmekte olan ülkelerde ilaçların sınırlandırılmasının ana sebepleridir [13, 51]. Klinik bir AmB direnci rapor edilmemiş olmasına rağmen, ilaca dirençli *L. donovani* mutantlarının *in vitro* kültürlendiği de bilinmektedir. Bu, AmB kullanımını daha yaygın hale geldikçe klinik direnç geliştirme olasılığını gösterir [13].

Leishmaniasisin ilk oral tedavisi 2002 yılında, başlangıçta antikanser ajan olarak kullanılan bir alkilfosfolipid olan miltefosin kullanılarak geliştirilmiştir [28]. Oral antineoplastik ajan olan miltefosin, VL için ilk etkili oral tedavi ve HIV hastaları için alternatif bir tedavi olarak tanıtılmıştır. Hamilelik çağındaki kadınlarda, teratojenik potansiyel ve direnç gelişimi miltefosinin başlıca kısıtlanma sebepleridir [51].

Hindistan'ın alt kısmında özellikle leishmaniasise karşı etkili olarak bilinen tek oral ilaç, başlangıçta kansere yönelik bir alkil fosfolipid bileşiği olan miltefosindir. Miltefosinin sakıncaları; mide-bağırsak toksisitesi, teratogenez ve karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının azalmasıdır. Brezilya'da hastalığın, insan formlarına karşı miltefosin etkinliği tartışmalıdır ve köpek tedavisi için en son kabul edilen ilaca direncin muhtemelen artacağı şeklindedir [31].

Miltefosin, lipozomal AmB gibi ilaçların uzun yarı ömürlerine bağlı olarak dirence karşı etkisi azalabilir. Bu ilaçların farmakokinetiği, vücutta uzun yarı ömre sahip olması ve bunların alt terapötik düzeylerde tedavi sırasında kalıcılığı ve birikimi ile tanımlanır. Bu, özellikle Hindistan Yarımadası gibi antropotik odaklarda refrakter parazitlere yol açar. Ancak, Doğu Afrika'da, özellikle okuma-yazma oranı düşük olan ve kötü sağlık tesislerine sahip başka bir antropotik ve yoksulluk çeken bölge olan Sudan'da direncin artması yönünde benzer riskler görülmektedir [38].

Miltefosinin ayrıca VL'ye karşı etkili olduğu bildirilmektedir, ancak aktivitesi Yeni Dünya KL'ye karşı sınırlı görünmektedir. DSÖ'nün Tropikal Hastalığı, Araştırma ve Eğitim Özel Programı, aşıların gelişiminin ve alternatif tedavilerin öncelikli olduğunu bildirmiştir. Bilim adamları tarafından leishmaniasis için geliştirilen alternatif tedavilerden biri de bitkisel ürünlerdir [15].

Pentamidin gibi diamidinler, leishmaniasis tedavisinde 1940'ların başlarından beri kullanılmaktadır. Pentamidin, mitokondriyal seviyede replikasyon ve transkripsiyonu inhibe ederek parazitin büyümesini inhibe eder [13].

Pentamidin, AmB ve paromomisin gibi alternatif bileşikler, sitotoksositeye rağmen dirençli vakalar için ikincil tedavi seçenekleridir [60]. AmB ve miltefosin etkili bir şekilde kullanılmaktadır ancak yüksek maliyetleri ve terapötik komplikasyonları endemik bölgelerde kullanımlarını sınırlamaktadır [59]. Miltefosin, AmB ve pentamidin gibi ilaçlar oldukça verimlidir ancak birçok nedenden ötürü yetersiz kalmaktadırlar. Antimonlar gibi bu ilaçlar da birçok hastayı tedaviyi erken bırakmaya zorlayan ciddi yan etkilere sebep olmuştur [38].

Farklı klinik belirtilerine rağmen, KL ve VL tedavisi için genellikle Sb(V) bileşikleri, ilaca direnç veya intoleransı durumunda pentamidin ve AmB formülasyonları kullanılmaktadır [31].

Antibakteriyel bir ajan olan paromomisinin ilk olarak otuz yıl önce antileishmanial aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Antileishmanial aktivitesinin keşfedilmesinden bu yana paromomisin hem KL hem de VL'nin tedavisinde etkin olduğunu göstermiştir. Paromomisinin parazit membranlarının dengesizleşmesini indükleyerek etki ettiği gösterilmiştir. Diğer antileishmanial ilaçlarda olduğu gibi, parenteral paromomisin uygulaması ototoksosite ve miyokardit dahil olmak üzere sakıncalara sahiptir [13].

Leishmaniasis kemoterapisinde, KL ve VL tedavisi için bir aminoglikozid antibiyotiği olan paromomisin ve VL tedavisi için 8-aminokinolin olan sitamaquin yaklaşık 10 yıl önce kullanılmaya başlanmıştır [28].

Aminoglikozid antibiyotik paromomisinin parenteral bir formülasyonu klinik çalışmalarda %94 etkinlik göstermiştir ve Hindistan'da VL için tanıtılmıştır. Kabaca keşfedilen 17.000 bitki türünün, tıbbi alanda yaklaşık 3000 türün kullanıldığı tahmin edilmektedir [51].

AmB, paromomisin ve pentamidin gibi ikinci ve üçüncü basamak tedavileri leishmaniasise karşı bazen etkilidir ancak aynı zamanda ciddi yan etkileri de vardır. Paromomisin kas içi uygulamasının yaklaşık on yıl önce yapıldığı bir çalışmada, antimon tedavisinden önce başarısız olan hastalar da dahil olmak üzere, VL vakalarının yaklaşık %95'inin iyileştiği tespit edilmiştir [15].

Bu ilaçların tümünün etkileri, hastalığın klinik formuna, hastanın yaşına ve ikamet edilen bölgeye bağlıdır. Mevcut tüm ilaçların; hayati risk oluşturan yan etkileri, uzun tedavi döngüleri, düşük etkinlikleri, parazitlerin ilaçlara karşı artan direnci ve yüksek toksisitesi gibi birçok sakıncası vardır. Bu ilaçların uygulanması; bu sakıncalar, tedavi süresinin uzun olması ve yüksek maliyet nedeniyle sınırlandırılmıştır [58]. Hastanede yatış da gerekmektedir [51].

Leishmaniasisin çeşitli klinik bulguları arasında *L. donovani* veya *L. infantum*'a bağlı VL tedavi edilmezse öldürücüdür [17]. Hastalığın başlamasından sonraki iki yıl içinde vakaların %95'inden fazlasında ölümcüldür [39].

Son zamanlarda, antileishmanial ajanlar üzerinde yapılan araştırmaların sayısı iki nedenden dolayı önemli ölçüde artmıştır. Birincisi, toksik ve pahalı olan antimon türevleri gibi çeşitli tedavilerin gösterdiği yan etkilerdir. İkincisi, çeşitli *Leishmania* türlerinin sentetik moleküllere karşı direnç geliştirmesi sonucu bulaşıcı hastalıkların ortaya tekrar tekrar çıkmasıdır. Bu iki durum, etkili ve güvenli olan antileishmanial ilaçlar üzerinde farmakolojik araştırmalara yöneltmiştir [55].

Sb(V) uygulamaları tedavide başarısız olduğunda uygulanan AmB, miltefosin ve pentamidin gibi diğer antileishmanial ilaçlar da çeşitli yan etkilere sahiptir ve yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında diyabet ve hatta ölüme neden olabilir [25].

Bitki ürünleri, farklı hastalık türlerini tedavi etmek için geleneksel tıpta kullanılmaktadır ve yeni bir ilaç bulunması için iyi bir alternatif olarak kabul edilmektedir. Ticari potansiyeli olan antileishmanial ilaç olabilecek bitkilerden izole edilen ümit verici bileşikler vardır [57].

Sentetik ilaçların yerine, antik çağlardaki leishmaniasis tedavisinde kullanılan tıbbi bitkiler gibi doğal kaynaklardan aktif moleküller aranması alternatif bir yöntemdir [24]. Bitkisel kökenli doğal ürünler, bu keşifler için potansiyel araçlardır ve dünya çapında insanlar için ampirik olarak paraziter hastalıkların tedavisi için yüzyıllar boyunca kullanılmış ve klinik ve laboratuvar araştırmalarını teşvik etmiştir [56].

Etnofarmakoloji, farklı leishmanial aktiviteleri olan özütleri ve bileşikleri karakterize etmek için önemli bir bilim dalıdır [61]. Doğal tedaviler, günümüzdeki tedavide önemli bir rol oynamıştır [24].

Doğal kökenli 1184 yeni ilaç, 1981-2006 yılları arasında bulunmuş ve bunların %28'i bitkilerden elde edilmiştir. Öte yandan, yeni sentetik ilaçların %24'ü, tıbbi bitkilerden elde edilen aktif moleküller olan temel moleküllerdir veya bunlardan türetilmiştir. Bir başka raporda, 2000 ve 2005 yılları arasında, her biri yapısal ve biyolojik çeşitlilik sergileyen 23 yeni doğal kaynaklı ilaç piyasaya sürülmüştür. Bu nedenle, doğal ürünler, yeni ilaçların önemli bir kaynağı olan ve olmaya devam eden ve yeni etken maddelerin geliştirilmesi için prototip moleküller oluşturan, ölçülebilir bir kimyasal yapı zenginliği oluşturmaktadır [24].

Etkili ilaçların yokluğunda, bu tür hastalıklarla mücadele etmek için toksik olmayan, güvenli, daha verimli ve daha ucuz olan bitki türevleri (flavonoidler) veya bitki özleri gibi şifalı bitkilerden yeni doğal ilaçların keşfedilmesine acil ihtiyaç vardır [58]. Bitki bazlı bileşikler, daha az toksisiteye sebep olur ve bu tropikal hastalığı tedavi etmek için kullanılan mevcut kemoterapilerde bir devrime neden olabilir [61]. Leishmaniasis tedavisi için daha yeni, daha ucuz, güçlü ve güvenli bir antileishmanial bileşiklere acil ihtiyaç vardır [59].

Leishmaniasis tedavisi için ilaçlara erişim, en fazla vaka yüküne sahip olan fakir ülkelerde zordur. DSÖ, sivil toplum kuruluşları ve üreticilerin ilaçlara erişimi iyileştirme çabaları olsa da ilaçlara erişim sorunu devam etmektedir. Birçok *Leishmania*'nın endemik olduğu ülkelerdeki yetersiz sağlık sistemleri bağlamında, aşağıdakiler de dahil olmak üzere ilaçlara erişimin zorluğuna bir dizi faktör katkıda bulunmaktadır:

- İlaçlar nispeten pahalıdır ve bu nedenle genellikle temin edilememektedir.
- Ulusal tedavi protokolleri çoğu zaman en son gelişmeleri yansıtmamakta olup ya az sayıda ilaç dahil edilmiş ya da hiçbir antileishmanial ilaç ulusal temel ilaçlar listesine dahil edilmemiştir.
- Düşük gelire sahip ülkelerde tercihli fiyatlar için pazarlık edilen ilaçlar, bu ülkelerdeki şirketler tarafından her zaman karlı bir pazar bulunmadığından kayıtlı değildir. Daha az vaka olan birçok ülke de ilaçları kaydetmemiştir.
- İlaçların tedariki sürekli değildir. Çoğu antileishmanial ilaç sadece bir üretici tarafından üretilmektedir. Kalite, düşük üretim kapasitesi ve yeterli ihtiyaç tahmininin olmaması (siparişler için uzun teslimat süreleri ile sonuçlanan) ile ilgili sorunlar endemik ülkelerde düzenli olarak stok kırılmalarına neden olmaktadır.

Bu gibi durumlarda erişilebilecek merkezi tampon stokları yoktur ve ilaç ihtiyaçlarını belirtmek için bir platform yoktur. Bu, küresel olarak ihtiyaç duyulan miktarları ve ilaç üretiminin uygun planlamasını tahmin etmede büyük bir zorluk teşkil etmektedir [62].

Buna karşılık, DSÖ sağlık hizmetlerine ve özellikle de gerekli ilaçlara eşit erişimin artırılmasında önemli çabalar sarf etmiştir. Başlıca yapılanlar aşağıda belirtilmiştir:

- VL için mevcut beş ilacın ikisinin fiyatının, lipozomal AmB için %90 ve meglumin antimonat için %60 oranında düşürülmesi
- DSÖ Model Temel İlaçlar Listesinde (17. baskı) iki yeni ilaç dahil olmak üzere (2007 yılında paromomisin ve 2008'de lipozomal AmB) [62].

Gilead Sciences, 2016'da 380.000 flakon AmBisome[®] (enjeksiyon için lipozomal AmB) bağışına (DSÖ aracılığıyla) 5 yıllık yeni bir anlaşma imzalamış ve gelişmiş tanı ve tedavi için fon sağlamıştır. 2021 yılına kadar olan bu yeni anlaşma, Güneydoğu Asya ve Doğu Afrika'daki uygun endemik ülkelerdeki 445.000 flakon lipozomal AmB enjeksiyonunun, 500.000 VL vakasının tedavi edilmesini öngören 2011'de yapılan anlaşmasını uzatmıştır [62].

2.10 Leishmaniasisten Korunma ve Kontrol

Hastalık hakkında yetersiz bilgi ve sağlık politikalarının eksikliği, dünyanın her köşesinde artan *Leishmania* parazitlerinin ortadan kaldırılmasındaki başlıca engellerdir. Leishmaniasis, yoksulluk sınırının altında yaşayan gelişmekte olan ülkelerdeki insanları etkileyen, hayatı tehdit eden bir hastalıktır. Nüfusun endemik olmayan bölgelere göçü ve endemik bölgelerde turist aktiviteleri, yeni alanlarda hastalıkların yayılmasının temel nedenidir. Endemik ülkelerde hastalığın yayılmasını kontrol etmek için, hem vektör hem de parazitler için etkili kontrol önlemleri gerekmektedir [33].

Ölümlerin artmasının nedenleri arasında kırsaldan kente göç, endemik bölgelere bağışıklığı olmayan popülasyonlar getiren projeler, bağışıklığı azaltan yetersiz beslenme, kalabalık yoksul kenar mahallelerde sosyoekonomik bozulma ve *Leishmania*/HIV koinfeksiyonu ortaya çıkmaktadır. Buna rağmen, gerçek leishmaniasis prevalansının, resmi olarak bildirilen rakamlardan oldukça fazla olduğu tahmin edilmektedir [21].

Çünkü çoğu vaka, özellikle hastaların tıbbi tesislere erişemediği yerlerde, teşhis edilmeden veya bildirilmeden devam etmektedir. Ayrıca, hastalığın ekonomik yükü çok büyüktür ve ciddi maliyetler (tıbbi bakım ve tedavi, iş gücünün zayıflaması) projelerin uygulanmasını olumsuz yönde etkilemektedir [21].

Hastalığın insidansı son birkaç on yılda birçok bölgede istikrarlı bir şekilde artmaktadır. Bunun bir nedeni, HIV/AIDS'e bağlı olarak bağışıklık yeterliliği azalmış kişilerin sayısındaki büyük artıştır. Diğer nedenler arasında, küresel iklim değişikliği ve endemik insan nüfusu için enfeksiyon riskinin artmasına neden olan kum sineği vektörünün konakçı üremesini destekleyen gelişmekte olan ülkelerde birincil yağmur ormanlarının ormansızlaştırılması bulunmaktadır. Artan deniz aşırı seyahatler ve endemik bölgelere askeri yayılma da hastalık prevalansının artmasında rol oynamıştır [15].

Büyük epidemiyolojik önemine rağmen, leishmaniasis DSÖ tarafından sağlığın teşviki ve geliştirilmesini finanse eden farklı kamu ve özel kuruluşlar tarafından ihmal edilmiş bir hastalık olarak kabul edilmektedir [14].

Çoğu vektör kaynaklı hastalıkta olduğu gibi, insanın vektöre maruz kalmasına engel olmak korunma için en iyi yöntemdir. Kum sineği en çok alacakaranlıktan şafağa kadar etkindir. Standart sivrisinek ağlarından sığılacak kadar küçüktür. Bu nedenle, gece faaliyetlerinden kaçınmak, cilde N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET) gibi böcek öldürücüleri sürmek, permethrin gibi suya dayanıklı böcek öldürücü uygulanmış giysiler giymek ve gece vantilatör kullanmak insan-vektör maruziyetini azaltır. Dikloro Difenil Trikloroetan (DDT), kum sineklerini yok etmek için tercih edilen yöntem olmaya devam etmektedir. Sayıları azaltmak için başka bir yöntem ise üremeyi engellemektir. İç ve dış mekanları böcek ilaçlarıyla ilaçlama, üremeyi durdurmak için diğer bir yöntemdir. Kum sinekleri karanlık ve nemli ortamlarda ürerler. Bu ortamlarda kireçtaşı gibi nem emici yapı malzemelerinin kullanılması üremenin azaltılmasını sağlar. Bu yöntemlerin tümü, böcek ilaçlarına karşı direnç gelişmesine rağmen birlikte kullanıldıklarında kum sineklerinin ısırılmalarına maruz kalma riskini büyük ölçüde azaltırlar [13].

2.11 Leishmaniasisin Tanısında Kullanılan Yöntemler

Konak ve parazitin türü ve gibi çeşitli faktörlere göre klinik belirtiler farklılıklar gösterir. Hastalık birçok deri lezyonuyla karıştırılabilmesi nedeniyle tanısı için farklı teknikler kullanılmaktadır [47].

Parazitolojik tanı, özellikle yüksek özgüllüğü nedeniyle leishmaniasis tanısında altın standarttır. Mikroskopik inceleme, invaziv prosedürler gerektirir ve *in vitro* parazit izolasyonu zor ve zaman alıcıdır [63]. Leishmaniasisin tanısında; Dolaylı Floresan Antikor Testi (IFAT), Direkt Antiglobulin Testi (DAT), Enzim Bağlı İmmunosorbent Test (ELISA), C-ELISA, Dot-ELISA testleri kullanılmaktadır [49].

KL'nin tanısı; epidemiyolojik veriler, laboratuvar sonuçları, olgunun hikayesi ve klinik bulguların tümü dikkate alınarak yapılır. Rutin tanıda kültür yöntemleri ve direkt mikroskopi en sık kullanılan yöntemlerdir. Moleküler yöntemler ise daha çok araştırma amaçlı olarak kullanılmaktadır [47].

2.11.1 Kültür Yöntemleri

Kültür ortamında canlı parazitlerin belirlenmesi, leishmaniasis tanısında kullanılan kültür yöntemlerini diğer yöntemlerden farklı kılmaktadır. Hastadan alınan örneklerde bulunan amastigotların, kültür ortamında promastigotlara dönüşmesi kültür yöntemlerinin temelidir. Leishmaniasis tanısında kültür, serolojik tanı yöntemlerinde kullanılmak üzere yeteri kadar antijen elde etmek, türün belirlenmesi ile *in vivo* çalışmalarda kullanılması için yeteri kadar parazit elde etmek, ilaç çalışmalarını *in vitro* yapabilmek ve makrofaj-amastigot arasındaki ilişkiyi belirlemek için ilk sırada gelen tanı yöntemidir. Leishmaniasis tanısında altın standart olarak kabul edilen kültür tanı yöntemlerinin duyarlılığı ancak invaziv yöntemler kullanılarak sağlanabilmektedir [3].

2.11.1.1 *Leishmania* Parazitlerinin Kültürünün Yapılması

Hem promastigot hem de amastigot formlar için *Leishmania* parazitlerinin *in vitro* kültürü yapılabilmektedir. Sıcaklık, besin kaynağı, pH ve serum bileşenleri bakımından amastigot ve promastigot formlarındaki parazitlerin büyüme ortamları arasında ciddi farklar bulunur. Promastigotların aksenik amastigotlara dönüştürülebilmesinin tetiklenmesi için, sıcaklık ve pH'nın değiştirilmesi önemli bir role sahiptir [3].

Biyokimya, hücre biyolojisi ve immünoloji alanlarında çalışmalar, *Leishmania* parazitlerinin kültürünün yapılmasıyla da sağlanmış olur. *Leishmania* promastigot kültürü, leishmaniasisli hayvanlardan elde edilen biyopsi örnekleri uygun besiyerine ekilerek yapılır. *Leishmania* parazitleri ilk önce hareketli promastigotlara dönüşerek sonrasında çoğalmaya başlar [3].

Leishmania, tek hücreli parazitler arasında en fazla üzerinde çalışılan kültürlerden biridir. Klinik örneklerin kültür ortamlarına eklenmesinden sonra parazitin promastigot formunun kesin tanı koyulması için ürediğinin gösterilmesi önemlidir. Klasik besiyeri olan Novy, Nicole ve Mc Neal (NNN) ve çeşitlemelerinin yanı sıra ticari olarak satışı yapılan besiyerleri *Leishmania* parazitlerinin *in vitro* kültürü için kullanılmaktadır. Promastigotların NNN besiyerindeki üremesi, 22–26°C’de inkübasyonla 2-28 gün arasında değişmektedir [64].

Katı, yarı katı ve sıvı olarak üç çeşit besiyeri *Leishmania* üretimi için kullanılmaktadır. Sıvı besiyerlerinde Fetal Sığır Serum (FBS) veya eritrosit lizati parazitlerin üremesinde en önemli maddelerdir. RPMI-1640, Minimal Essential Medium, Schneider’s Drosophyla Medium ve Medium-199 sık kullanılan diğer besiyerleridir [64].

2.11.1.2 Klasik Kültür

Hastalığa sebep olan ajanın doku örneklerinden izole edilmesini en yüksek duyarlılıkta sağlayan tanı yöntemidir. Bu yöntem günümüzde halen *Leishmania* suşlarının kültürünün yapılması ve adaptasyonu için kullanılmakta olup, suşlar omurgalı ve omurgasız konaklardan direkt olarak izole edilebilmektedir. NNN besiyerinin bazı dezavantajları vardır. Hazırlanması karışık ve standartlaştırılması zordur. Yöntemin kullanımını; zaman alması, pahalı olması, saha çalışmalarında uygulanmasının zor olması oldukça sınırlandırmaktadır [65-68].

KL’nin tanısında, tüplerin ağzı kapalıyken bile hareketli promastigotların saptanabilmesi klasik kültür yöntemlerinin en önemli avantajı olup kontaminasyon riskini azaltır. Bu yöntemle lezyonda bulunan amastigot miktarı, kültürün pozitifliğini saptamayla yakından ilişkilidir. Mevcut kültür yöntemlerinde duyarlılık, kronik durumlarda parazit sayısının azalması sebebiyle oldukça düşüktür. Bu yöntemlerin sonuçlarının belirlenmesinin 15-30 gün sürmesi diğer bir dezavantajdır [64, 69].

2.11.1.3 Mikro Kültür

Mikro kültür yöntemi, Allahverdiyev ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Sadece sıvı besiyerinden ve 70µl'lik kapiler tüplerden oluşturulmuştur. Bu yöntem ile tanı için az miktarda besiyerine ihtiyaç vardır. Ayrıca, geleneksel tüp kullanımına kıyasla kapiler tüplerin kullanılması maliyetin neredeyse 10 kat azalmasını sağlamıştır. Bunun yanı sıra yöntemin hazırlanmasının ve yapılışının kolay olması ve parazit sayısı az olsa bile diğer yöntemlerden daha hassas olması önemli bir avantajdır. Bu yöntemle *in vitro* ortamda sayıca az olan amastigotların ne kadarının hareketli promastigotlara dönüştüğü kolayca bulunabilir. Bu yöntem, KL ve VL'nin hızlı şekilde tanısında ve parazit genotipi tespitinde çok kolaylık sağlamıştır [65, 69].

2.11.1.4 *In vivo* Kültür

Parazitler, laboratuvar hayvanlarına aşılama yapılmasından sonra enfekte olan örneklerle gösterilebilirler. Hayvan aşılması, genel olarak tanı testi olarak kullanılmaz. Parazit izolasyonu için alternatif bir yöntemdir ancak alternatif tanı yöntemlerinin geliştirilmesiyle yaygın şekilde kullanılmamaktadır. Hem *in vitro* kültür hemde *in vivo* kültür sonucunda tespit edilen promastigotlar, parazitin genotiplerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Hamsterların ve BALB/c farelerin *Leishmania* parazitinin çeşitleriyle enfeksiyona duyarlı oldukları görülmüştür. En uygun hayvan olan altın hamster, *Leishmania* suşlarının çoğunda duyarlıdır. *L. infantum* ve *L. donovani* suşları için aşı çoğunlukla periton kesesinden yapılır. Hem amastigotlar hemde promastigotlar hayvanı enfekte edebilirler. Enfeksiyon belirtilerini gözlemlemek için hayvan haftalık olarak tetkik edilir. Bu enfeksiyonlar; kutanöz lezyonlar, metastatik lezyonlar ya da karaciğer ve dalak büyümesi olabilir. Biyopsiyle hayvanın dalak ve karaciğerinden amastigotlar toplanabilir. Bu sayede prosedürün devamının sağlanması için enfekte olan parazitlerin kaynağının yaşamasına izin verilmiş olunur. Enfeksiyon yok ise, 4 ay sonra hayvan öldürülür ve parazit için dalak ve karaciğerden örnekler alınır [3].

2.11.2 Serolojik Yöntemler

Leishmaniasis teşhisinde uygulanan birçok serolojik test mevcuttur. Bunlar; ELISA, DAT, IFAT, Immunoblotting (WB), Hızlı K39 Bazlı İmmünokromatografik Test (ICT) ve İndirekt Hemaglutinasyon Testi'dir (IHA) [63]. Bu testler arasında; IFAT, DAT ve ELISA Amerikan KL tanısı için en sık değerlendirilen testlerdir [70].

En yaygın serolojik teknikler IFAT, ELISA, WB ve DAT'dir [13]. Serolojik yöntemler, hem VL'nin ve hem MKL'nin teşhisinde kayda değer bir immün yanıtı sebep olan en faydalı testlerdir [13].

Doğrudan yöntemler, mikroskopik inceleme, kültür veya PCR ile parazitin gösterilmesine dayanır. Dolaylı yöntemler arasında Leishmanin Deri Testi (LDT) ve IFAT, DAT, ELISA veya ilkel *Leishmania* antijenleri, WB veya İmmünokromatografik Test (ICT) dahil olmak üzere çeşitli tekniklerle antikor tespiti yapılır [71]. Canım Ateş ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, IFAT'ın düşük maliyetli olduğu ve yüksek hassasiyete sahip olduğu gösterilmiştir [72].

Antileishmanial antikorlar, immünokompetan hastalarda yüksek tanısal değere sahiptir ve VL tanısı için duyarlılık ve özgüllüğe göre değişen çok çeşitli serolojik yöntemler mevcuttur. Bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler için, serolojik araştırmalar kesin bir tanı yöntemi olarak kabul edilmez. Çünkü bu hastaların çok büyük bir kısmı Avrupa ve Afrika'da yapılan çalışmalara dayanan standart tekniklerle saptanabilen antikorlar barındırmaz. Dahası, HIV ile enfekte hastalarda VL tanısı için bir serolojik tekniğin diğerinden daha üstün olup olamayacağına ve küresel bölgeler arasında test performansında farklılık olup olmadığına dair bazı şüpheler vardır [63].

Zeyrek ve arkadaşları, Türkiye'de KL tanısı için bir ELISA sisteminin %78,4 duyarlılığa ve %69,3 özgüllüğe sahip olduğunu bildirmiştir [73]. Romero ve arkadaşları, bir ELISA sisteminin *L. mexicana* antijenine sahip %89 ve *L. braziliensis* antijenine sahip %71'lik bir duyarlılığa sahip olduğunu bildirmiştir [74]. Jensen ve arkadaşları, sekansa spesifik bir peptid antijeni kullanarak *L. major* enfekte olmuş 33 KL hastasında %67 duyarlılık ile bir ELISA testi bildirmiştir [75].

Liyofilize antijen kullanan bir DAT kiti ticari olarak temin edilebilmektedir. Bu test genellikle, test merkezlerine erişimi olmayan uzak bölgelerde test yapılmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca sahada kullanım için VL'ye özgü bir yüzey antijeni tespit eden K39 adı verilen bir ölçme çubuğu ve idrarda antijenleri tespit edebilen yeni bir Lateks Aglutinasyon Testi (KATEX) mevcuttur. Teşhis imkanlarının artırılması, leishmaniasis ile mücadelede önemli bir unsurdur [13]. Bu teşhis yöntemlerinin tamamında, tanı merkezlerinde eğitimli personel eksikliği ve ekipmanların pahalı olmasından kaynaklanan sorunlarla karşılaşmaktadır [13].

2.11.3 Moleküler Yöntemler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda, çocuklarda ve hastalığın erken evrelerinde olan bireylerde, yüksek hassasiyet ve özgüllükte az miktarda parazit DNA'nın amplifikasyonu için kesin bir moleküler tekniktir [76].

2002-2012 yılları arasında, VL tanısı için çeşitli parazit genlerini hedef alan çeşitli moleküler teknikler geliştirilmiştir. PCR bazlı metot, başarıyla kullanılan en yaygın moleküler testtir ve kullanımı, immünosupresif hastalarda özellikle umut verici görünmektedir. Bu teknik, VL tanısı için geleneksel tanı yöntemlerinden daha hızlı, hassas ve daha spesifik olarak ortaya çıkmıştır [63]. PKDL için ideal teşhis metodu smearlerde parazitin kültür veya PCR ile gösterilmesidir [44]. *Leishmania*'nın varlığını kesin olarak tespit etmek için kültür ve PCR gibi spesifik metotlar kullanılmalıdır [72].

PCR, leishmaniasisin tüm formlarının tanımlanmasını sağlayan invaziv olmayan bir prosedürdür. Spesifik problemlerin kullanılması, KL'nin nedensel türleri arasında ayırım yapılmasını mümkün kılmıştır. Xenodiagnosis* yöntemiyle VL'yi teşhis etmek için kum sineğinin kullanılması gerekir. Bu yöntemle, hasta kum sineğinden kan örneği aldıktan 48 saat sonra promastigotların varlığı incelenmektedir [13].

Deri biyopsisi, Giemsa boyalı preparatlar, kan, parafinize materyal ve kemik iliği aspiratı gibi farklı klinik örneklerde tespit edilen az sayıdaki *Leishmania* DNA'sını saptanabilmesi moleküler bazlı yöntemlerin en önemli avantajı olduğu bildirilmektedir. Doğru teşhisin, prognozun değerlendirilmesinde ve uygun tedavi seçiminde öneminin büyük olduğu bilinmektedir. Birçok çalışmada kültür yöntemi, PCR yönteminden sonra duyarlılıkta ikinci sırada yer alan yöntem olarak bildirilmektedir. Ancak direkt mikroskopik inceleme, kültür ve PCR yöntemlerinin üçü karşılaştırıldığında KL tanısında kültür yönteminin daha duyarlı bir yöntem olduğu da tespit edilmiştir. KL tanısında bu üç yöntemin birlikte kullanılmasının duyarlılık ve özgüllüğü arttıracığı, böylece birçok olgunun daha kolay tanımlanmasını sağlayacağı düşünülmektedir [47].

* Hastalık etkeni taşımayan emici böceğin, hasta üzerinde beslenmesini takiben böcek dışısında mikroskopik muayene ile hastalık etkeninin araştırılması esasına dayalı tanı yöntemi; özellikle Güney Amerika tripanozomiyazi'na sebep olan *Trypanosoma cruzi*'nin bu esasa dayanarak belirlenmesini amaçlayan tanı yöntemi; ksenodiyagnoz.

3. FLAVONOİDLER VE RUTİN

3.1 Flavonoidler

Flavonoidler, üç-karbon atomlu heterosiklik bir halka ile birbirine bağlanmış iki aromatik halka içeren bir temel flavan çekirdeği olan bir grup polifenolik bileşiktir. Bu bileşikler doğal olarak meyve ve sebzelerde bulunur ve kansere karşı antioksidanlar ve koruyucu maddeler olarak bilinir [77]. Çoğunlukla O-glikosile edilmiş polifenolik bileşiklerdir [78].

Flavonoidler, büyük doğal polifenol ailesine ait geniş bir bitki sekonder metabolit sınıfıdır. Meyveler, sebzeler, tahıllar, baklagiller, kakao, zeytinyağı, çay, kahve ve şarap gibi bitki kaynaklı yiyecek ve içeceklerde bulunurlar. Böylece insan beslenmesinin önemli bir bileşenini oluştururlar. Bitki polifenollerini başlangıçta bitki pigmentasyonu ve tat vermede önemli olarak kabul edilmiştir. Daha sonra bitkinin büyümesinde ve üremesinde önemli bir rol oynadıkları, ayrıca patojenlere karşı direnç sağladıkları ve mahsullerinin hastalıklardan koruduğu kabul edilmiştir [79].

Flavonoidler, insan diyetlerindeki en önemli polifenollerdir ve çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle genel olarak ilgi çekmektedir. Flavonoid glikozitlerin sindirim enzimlerinin antioksidan potansiyeli ve inhibisyonu çok sık rapor edilmektedir. Flavonoid glikozitler arasında, flavonol ve flavon glikozitler, diğer flavonoidlerden daha sık belirtilmektedir. Flavonoidin aglikona bağlanmış şeker kısmı genel olarak bir dereceye kadar absorpsiyon, dağılım ve metabolizmayı etkiler ve anti-HIV, anti-rotavirüs, anti-stres, antialerjik ve anti-adipojenik aktivite dahil olmak üzere belirli tipte biyolojik aktiviteleri artırır [59].

Son zamanlarda, gıda polifenolik bileşiklerine olan ilgi, antioksidan kapasitelerinin yanı sıra, temel olarak hücre çoğalmasının, hücre fonksiyonunun ve iltihaplanma reaksiyonlarının düzenlenmesinde rol alan birçok moleküler yolu modüle etme kabiliyetleri nedeniyle giderek artmıştır. Bu nedenle, dikkat edilmesi gereken önemli nokta; kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif süreçler ve karaciğeri, bağırsakları, böbrekleri ve akciğeri etkileyen diğer kronik hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde olduğu gibi insan sağlığı üzerindeki olası yararlı etkilerine yoğunlaşmaktır [79].

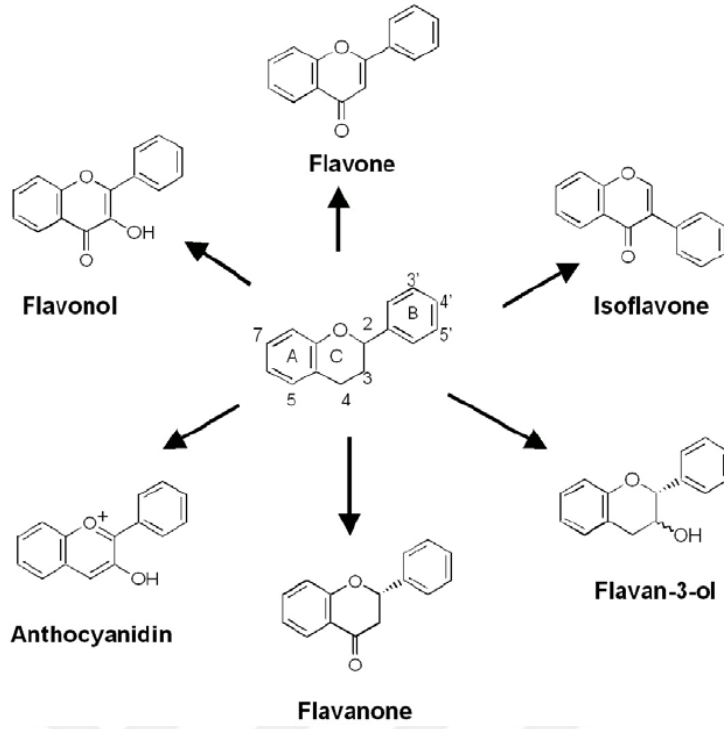
Bilinen antioksidan ve antienflamatuar özellikleri nedeniyle flavonoidler, birçok hastalığın ortaya çıkmasını ve ilerlemesini önlemeye önemli bir katkı yapabilir, ancak biyoyararlanımlarının önemli ölçüde iyileştirilmesi ve hastalıklı organ veya aparata verilmelerinin optimize edilmesi gerekir [79].

Daha iyi antileishmanial bileşikler için devam eden arayışta, kolay ve ucuz yolla elde edilebilen bitki türevli ürünler önem kazanmaktadır. Tıbbi bitkilerin aktif bileşenlerinin izolasyonu ve saflaştırılması, 19. yüzyılda ilaç endüstrisinin kurulmasına yol açan ana güçlerden biridir. Dünyada sadece bugüne kadar güçlü kemoterapötik özellikler gösteren yaklaşık 250.000 bitki türü tespit edilmiştir. Bitkileri ilaç kaynakları olarak tanımlamak için çok fazla araştırma yapılmalıdır. Özellikle bazı bitki metabolitlerinin güçlü antileishmanial aktivitesi olan fito-bileşenleri içerdiği gösterilmiştir [11].

3.1.1 Flavonoidlerin Yapısı ve Alt Sınıfları

Flavonoidler, lineer üç karbonlu bir zincir (C6-C3-C6) ile birleştirilen iki benzen halkasından oluşan difenil propanların temel bir kimyasal yapısına sahiptir. Çoğu durumda, merkezi üç karbon, benzen halkalarından biri ile kapalı bir piran halka oluşturur, böylece A, B ve C olarak adlandırılan üç halkada düzenlenmiş 15 karbon atomlu bir yapı oluşturur. Flavonoidlerin çeşitli sınıfları oksidasyon derecesinde ve C halkasının ikame modelinde farklılık gösterirken, bir sınıf içindeki tek tek bileşikler A ve B halkalarının ikame modelinde farklıdır. Heterosiklik C-halkasındaki değişikliklere bağlı olarak, flavonoidler yedi alt sınıfa ayrılabilir. Bunlar; flavonlar (örneğin, apigenin, luteolin, diosmetin, chrysin), flavonoller (kuersetin, kaempferol, myricetin, galangin, fisetin), flavanonlar (örneğin, narkenin, hesperitin, eriokolilikol), flavanonoller (taksifolin), flavanoller veya kateşinler (kateşin, epikateşin, epigalloatekin, epigallokatekin gallat), izoflavonlardır (genistin, daidzein, glisit, puerarin, antosidin, anhidrid, malidine) [79].

Flavonoidler, çok sayıda çeşitli ve oldukça karmaşık yapılar veren O-glikosilasyon, C-glikosilasyon, O-asilasyon, halka yoğunlaştırma ve polimerizasyon gibi çeşitli değişikliklere uğrayabilir [79].

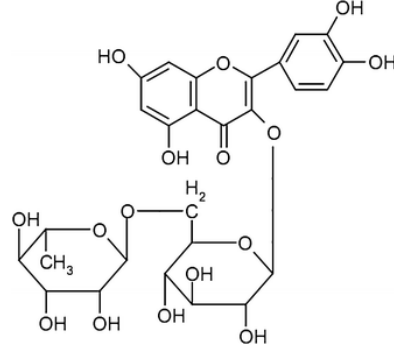


Şekil 3.1 Flavonoidlerin alt sınıflarının yapısı [80]

Flavonoidlerin potansiyel terapötik moleküler olarak rolü, son birkaç yıl içerisinde, farklı hastalıklara ilişkin faydalı ve koruyucu etkilerine yönelik kanıtların artması nedeniyle büyük önem kazanmıştır. Temel olarak güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteleri olan rutin, birçok terapötik özelliğe sahip bir diyet flavonoididir. Flavonoidler arasında rutin, flavonoller grubundadır ve kuersetinin glikozid formudur. Birçok çalışma, diğer hastalıkların yanı sıra nörodejeneratif hastalıkları, kardiyovasküler hastalıkları ve cilt kanserini önlemekte mükemmel fayda göstermiştir [78].

3.2 Rutin

Rutin 1842'de keşfedilmiş ve tıpta kılcal damar geçirgenliği ve çatlaması ile ilgili vasküler bozuklukları tedavi etmek için kullanılmıştır. Birçok bitki kaynağında bulunan en yaygın kuersetin glikozitlerden biridir [78]. Bitki türleri arasında en yüksek rutin konsantrasyonu üzüm ve karabuğdayda bulunmuştur. Bu bileşik esas olarak meyve kabukları, yaprakları, çiçekleri ve kökleri gibi bitkilerin farklı kısımlarında bulunur [78]. Karabuğday, Japon Soforası, aloe, alıç, ginkgo ve hünnap gibi bazı bitkiler rutin açısından zengindir [81]. Elma, turunçgiller, siyah çay, çarkıfelek çiçeği ve dahil olmak üzere bazı bitkisel ürünlerinde de bulunur [82].



Şekil 3.2 Rutinin Kimyasal Yapısı [83]

Rutin ilk kez, bu bileşene adını veren *ruta graveolens L.*'de (sedef otu) bulunmuştur. Rutin tahıllarda bulunmamaktadır. Rutin, farklı üzüm (*vitis vinifera L.*) çeşitlerinin kabuklarından elde edilen ekstralarında bulunmuştur. Rutin ayrıca, kuşkonmazın kladofillerinde yüksek miktarda bulunur. Rutin, halk hekimliğinde kullanılan bir Afrika bitkisi olan Gubeish'te (*Guiera senegalensis*) de bulunmaktadır. Tablo 3.1'de görüldüğü gibi, rutin, diğerlerinin yanı sıra kapari, soğan, kuşkonmaz ve deniz topalaklarının farklı bölümlerinde de bulunur [78].

Rutosid, sophorin, rutinrihidrat, quercetin-3-O-rutinosid olarak bilinen bir narenciye flavonoid glikozit olan Rutin; greyfurt, portakal, limon gibi meyve kabuklarında bol miktarda bulunur [84]. Rutin, aynı zamanda P vitamini olarak da bilinir [78].

Tablo 3.1 Farklı Bitki Kaynaklarındaki Rutin İçeriği [78]

Bitki adı	Bitkinin bölümü	İçerik (mg/100 g d.w.)	Kaynak
Sedefotu (<i>Ruta graveolens L.</i>)	Yapraklar	3100	Proestos ve arkadaşları (2006)
Bilinen karabuğday (<i>Fagopyrum sculentum Moench.</i>)	Kabuklar Tohumlar	3250 157 10	Kocevaz Glavac ve arkadaşları (2017)
Tartar karabuğday (<i>Fagopyrum tataricum Gaertn.</i>)	Tohumlar	1250	Fabjan ve arkadaşları (2003)
Üzüm (<i>Vitis vinifera L.</i>)		1592 89	Lacopinict ve arkadaşları (2008)
Amaranthus melezi (<i>Amaranthus cruentus</i>)	Tohumlar Yapraklar	8 2450	Kalinova ve Dadakova (2009)
Gubeish (<i>Guiera senegalensis</i>)	Yapraklar	242	Perwez ve arkadaşları (2017)
Kapari (<i>Capparis spinosa L.</i>)	Tomurcuklar Yapraklar Meyveler	1800 2760 280	Musallam ve arkadaşları (2012)

Soğanlar (<i>Allium cepa L.</i>)	Kırmızı Soğan Zarlari	6	Shi ve arkadaşları (2016)
Deniz topalak (<i>Hippophae rhamnoides L.</i>)	Yapraklar	300	Zu ve arkadaşları (2006)
Kuşkonmaz (<i>Asparagus officinalis L.</i>)	Yeşil sivri kısım Üst Alt	670 190 2900	Motoki ve arkadaşları (2012)
<i>Bauhinia fortificata L.</i>	Yapraklar	377	Toloza-Zambrano ve arkadaşları (2015)
Sarı kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>)	Yapraklar	2400	Wach ve arkadaşları (2007)
Elma (<i>Malus pumila L.</i>)	Kabuklar	800	Wach ve arkadaşları (2007)

Rutin ve hemen hemen tüm flavonoid grupları, serbest radikal temizleyicileri görevi gören antioksidan aktiviteye sahiptir [78]. Rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rutinoside); antimikrobiyal, antifungal ve anti-alerjik yararlar dahil olmak üzere birçok farmakolojik özelliğe sahiptir [38]. Ayrıca, antiviral, antiprotozoal, antitümör, antialerjik, anti-inflamatuar, antiülser, anti-oksidasyon, anti-diyabet, miyokardiyal koruma, vazodilatör, immünomodülatör ve bilişsel bozulma önleme aktiviteleri klinik olarak önemlidir. Bu çalışmalar, terapötik uygulamalarda rutin potansiyelini vurgulamaktadır [85]. Rutin, serum kolesterol düşürücü, anti-aritmi ve kolon kanseri önleyici aktivitelere sahiptir [81]. Aynı zamanda, yaşlanma karşıtıdır ve hipertansiyon ve vasküler fragilité tedavisinde yaygın olarak kullanılır [86]. Bileşik; antikarsinojenik, nöron koruyucu, damar koruyucu ve kalbi koruyan aktiviteler de gösterir [82]. Nörodejenerasyon, karaciğer ve böbrek toksisitesi, hiperglisemi ve hipertansiyon gibi durumlarda mükemmel terapötik potansiyele sahiptir [38]. Özellikle, rutin kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde olumlu bir rol oynadığı bildirilmiştir. Örneğin, rutin, pirarubisin kaynaklı kardiyotoksosite, izoproterenol kaynaklı kalp fibrozu veya kardiyak hasar ve pirarubisin kaynaklı kalp fonksiyon bozukluğuna karşı korumuştur [87]. Önceki çalışmalar, rutin, hücreyi koruyan, pıhtı oluşumuna sebep olan agregasyonu engelleyen ve kanın pıhtılaşmasını engelleyen ya da oluşan pıhtıyı eriten aktivitelerini göstermiştir [88]. Rutinin, cildi ve sinirleri oksidatif hasardan koruduğu, arterioskleroz riskini azalttığı ve kılcal kırılabilirlik ve yüksek tansiyonu önlediği gösterilmiştir [89].

Rutin nöröprotektif etkisi, dünya popülasyonunda nörölojik bozuklukların ve beyin patolojilerinin yaygınlaşması nedeniyle en çok araştırılan etkilerinden biridir. Beyin oksidatif hasara karşı çok hassastır ve düşük antioksidan koruma seviyeleri, rutin gibi flavonoidleri antioksidan özellikleri nedeniyle potansiyel farmakolojik ajanlara dönüştürür. Rutin önemli anti-inflamatuar etkilere sahiptir [78].

Gastrik proton pompasını inhibe ederek mukus koruyucu ve ülser önleyici etkiler gösterir. Rutin, ayrıca serbest radikal kaynaklı sitotoksosite ve lipit peroksidasyonunu inhibe etmek ve bunun yanı sıra C vitamini emilimini arttırırken oksidasyonunu önlemek için kullanılabilir. Bu nedenle, rutin muhtemelen bazı hastalıkları önlemek için kullanılabilir [82].

Kanser ve diyabet gibi çeşitli kronik hastalıkların tedavisinde rutin rolünü kanıtlayan birçok rapor vardır. Nörödejenerasyon, karaciğer ve böbrek toksisitesi, hiperglisemi ve hipertansiyon gibi durumlarda mükemmel terapötik potansiyele sahiptir [38]. Hidrofobik bir polifenolik flavonoid fitokimyasal olan rutin; lösemi, kolon, nöröblastom, kolorektal, hepatoselüler karsinom, pulmoner metastaz ve meme kanseri gibi birçok kansere karşı *in vitro* ve *in vivo* olarak kemoterapinin yan etkilerini önleyici aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Önceki çalışmalar, NP şeklindeki rutin, kemoterapinin yan etkilerini önleyici etkinliği ile arzu edilen biyoyararlanım sergilediğini göstermektedir [90].

Rutin özleri, tıbbi tedavinin bir parçası olarak kullanılabilir ve farmasötik endüstrisinde önemli flavonoidlerdir. Bitki bazlı rutin için farklı ekstraksiyon yöntemleri vardır. Bunlar; ultrason, mikrodalga, mekanokimyasal, kızılötesi ve basınç destekli yöntemler gibi farklı tekniklerdir [78].

Rutin; gıda, ilaç, kozmetik ve diğer sektörlerde geniş bir uygulama alanına sahiptir [81]. Bitkisel ilaçlarda restoratif, multivitamin preparatları ve kan damarı koruması için ilaç olarak kullanılır. Aynı zamanda hemofili semptomlarını azaltır, kılcal geçirgenliği azaltır, venöz ödemi önler, ayrıca trombosit agregasyonunu inhibe eder, aldoz redüktaz aktivitesini, tiroid peroksidaz aktivitesini ve vasküler endotelial büyüme faktörünü engeller. Ayrıca, okside LDL-kolesterolün sitotoksik etkisini azalttığı ve kalp krizi riskini düşürdüğü bildirilmiştir [84].

Karabuğday gibi rutin içeriği yüksek farklı bitkisel kaynaklardan elde edilen özütler ve bileşenler, fonksiyonel gıdalara dahil edilebilir veya nutrasötikler ve tıbbi ürünlerde kullanılabilir. Kapsülleme yoluyla rutin stabilizasyonu ve biyoyararlanımının iyileştirilmesi için farklı stratejiler geliştirilmiştir. Rutin kolona ulaştığında probiyotik bakteriler tarafından metabolize edilir, bu da kuersetin oluşumunu ve rutin metabolitlerinin faydalı antioksidan ve antiinflamatuvar etki göstermesini sağlar [78].

Bitki kaynaklı doğal ürünler, yeni ilaç modüllerini keşfetmek için araştırılabilecek çok çeşitli moleküller içerir. Aynı soydaki flavonoidlerin birçok bileşiğinin *Leishmania*'nın birçok türüne karşı etkili olduğu bulunmuştur [38]. Flavonoidler, *L. donovani*'ye karşı *in vitro* aktivite göstermiştir [77].

Rutin ile tedavi edilen diyabetik sıçanların, böbreklerinde lipid peroksidasyon ürünlerinin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca rutin, canlılıklarını önemli ölçüde arttırarak çeşitli radyasyon türlerine maruz kalan memeli germ hücreleri üzerinde sitoprotektif etkiler uygulamıştır [88].

İlaç keşif teknolojisindeki gelişmelere ve sanayilere göre doğal ürünlere olan ilginin azalmasına rağmen doğal ürünler iyi bir lider kaynak olmaya devam etmektedir. Etnofarmakolojik yaklaşım, farmakolojik potansiyellerini doğrulamak için bir rehber olarak geleneksel tıpta kullanılan bitkilerin seçilmesinde etkili bir yöntemi temsil etmektedir. Bu, biyolojik aktiviteye sahip yeni kimyasal maddelerin keşfedilmesini sağlar. Bitki özleri ile gösterilen antileishmanial aktivite; kinonlar, alkaloidler, iridoitler ve flavonoidler gibi farklı sekonder metabolit gruplarına ait bileşiklere dayandırılmıştır [54].

Yeni, daha etkili, daha az toksik ve uygun maliyetli antileishmanial ilaçların geliştirilmesi, sadece rasyonel ilaç tasarımına değil, aynı zamanda fitokimyasal antiparazitik bir kaynak olarak doğanın kullanılması önemli bir hedeftir. Bitki özlerinin veya izole edilmiş doğal ürünlerin antiparaziter aktivitesinin değerlendirilmesi, yeni verimli ilaçların geliştirilmesi için çekici bir yaklaşım oluşturmaktadır [28].

3.2.1 Rutin Molekülünün Biyolojik Etkileri

3.2.1.1 Antioksidan Etkileri

Oksidatif stresi ve moleküler sonuçlarını önlemek için birçok doğal antioksidan kullanılır. Bu bileşiklerden biri, iyi bilinen bir nutrasötik olan, bitki kaynaklı bir flavonoid olan rutindir [88].

Rutin, çok çeşitli farmakolojik aktivitelere ve önemli antioksidan özelliklere sahiptir. Toksisitesi, diğer biyoflavonoidlerden önemli ölçüde azdır ve oksitlenemeyen bir moleküldür. Bu nitelikler, rutin in oldukça güçlü ve nispeten güvenli bir antioksidan olabileceğini göstermektedir [91].

Rutin in antioksidan aktivitesinin, rutin in mükemmel oksidasyon direncine sahip olduğu kanıtlanmıştır [92]. Rutin in antioksidan aktivitesi, gelişmiş Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretiminin yanı sıra antioksidan sistemin yıkımını etkili bir şekilde önlemiştir [93]. Rutin in, yüksek ROS temizleme aktivitesi ve antioksidan kapasitesinin bir sonucu olan kan damarlarının kılcal damarlarını güçlendirdiği bildirilmiştir [94]. Polifenol yapıları nedeniyle, flavonoidler ROS'nin doğrudan süpürülmesiyle serbest radikallerin neden olduğu hasarı önleyebilir. Rutin, elektronları hidroksil radikalleri ve süperoksit radikalleri gibi serbest radikallere bağışlayarak serbest radikal zincir reaksiyonlarını sonlandıran daha stabil, reaktif olmayan türlere dönüştürür [88].

Rutin; romatoid artrit lökositlerinde, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz gibi ROS oluşumundan sorumlu enzimleri inhibe ederek oksidatif stresi önleyebilir. ROS seviyeleri üzerindeki bu doğrudan etkilere ek olarak, rutin; süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerini arttırarak ve sıçan beyin hücrelerinde gözlenen glutatyon seviyelerini yükselterek antioksidan kapasiteyi arttırır. Ayrıca, bu flavonoid, siklooksijenazların ve lipoksijenazların aktivitelerini inhibe eder, böylece insan nötrofillerinde pro-inflamatuar işlemleri azaltır [88].

3.2.1.2 Antibiyofilm Etkileri

Rutin, bir bakteri olan *Streptococcus suis*'in (*S. suis*) çoğalmasını engellemeden etkili biyofilm inhibisyonu göstermektedir [95].

Rutin, dulavratotu yaprağında ana anti-biyofilm bileşikleri olarak tanımlanmıştır ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca rutin, anti-biyofilm aktivitesine önemli katkı sağlar. Rutinin *Syringa oblata Lindl.*'deki ana anti-biyofilm bileşikleri olarak doğrulandığı gösterilmiştir. Ayrıca, rutinin *Syringa oblata Lindl* sulu ekstraktındaki ana anti-biyofilm bileşikleri olarak doğrulandığını ve *S. suis* biyofilmlerini *in vitro* olarak etkilediğini göstermiştir. Rutinin *in vitro* kapsüllenmiş polisakkarit biyosentezini etkileyerek *S. suis*'in biyofilm oluşumunu engellediği kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, rutin yeni bir doğal biyofilm inhibitörü olarak kullanılabilir ve moleküler mekanizması farmakolojik ve klinik uygulamaları için temel sağlamaktadır [95].

3.2.1.3 Antidepresan Etkileri

Rutinin yaklaşık on yıl önce antidepresan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Sinaptik yarıқта serotonin ve noradrenalinin mevcudiyetinin artırılması, antidepresan etkisinden sorumlu mekanizma olduğu düşünülmektedir [96].

Noldner ve Schotz tarafından yapılan bir araştırma, ortalama rutin konsantrasyonunun yaklaşık %3 olduğu *Hypericum perforatum* bitkisinin antidepresan aktivitesinde rutinin, önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [97].

Hypericum perforatum, pek çok ülkede hafif ila orta dereceli depresyon tedavisi için kullanılan bir bitkidir. Bu gözlem, rutinin *Schinus molle L.*'nin (Anacardiaceae) antidepresan benzeri etkisi için önemli olabileceği hipotezini yükseltmiştir. *Schinus molle*'nin (Yalancı Karabiber) antidepresan özelliğinde rutinin önemli bir rolü olduğu öne sürülmektedir. Oral yolla uygulanan rutinin, antidepresan benzeri spesifik bir etki ürettiği gösterilmiştir [98].

Noldner ve Schotz tarafından yapılan çalışma sonucunda, sergilenen antidepresan etkisi muhtemelen *Hypericum Montbretti* özütündeki yüksek rutin konsantrasyonu ile ilişkilidir. Bu çalışma, ilk kez *Hypericum Montbretti*'nin antidepresan aktivitesinin kanıtlarını göstermektedir ve kemirgenlerde rutinin antidepresan aktivitesini bildiren önceki makaleleri desteklemektedir [96, 99].

Herrera-Ruiz tarafından yapılan bir araştırma, *Byrsonima Crassifolia*'nın flavonoid içeriği üzerinde standardize edilmiş metanolik ekstraktın farelerde zorunlu yüzdürme testinde potansiyel antidepresan benzeri etkilere sahip olduğunu ve oral olarak uygulandığında kabul edilebilir toksik düzeyde olduğunu göstermiştir [97].

Araştırmadaki bulgular, rutin antidepresan etkide rol oynayabileceğini göstermektedir. Bilindiği kadarıyla, bu çalışma *Byrsonima Crassifolia*'da bulunan nöroaktif flavonoid rutin varlığının ilk raporunu oluşturmaktadır [97].

Farelerin beyindeki monoamin nörotransmitterlerinin nörokimyasal analizleri, *Hemerocallis citrina*'nın önemli antidepresan etkilerini ortaya koymuştur. Bu durum antidepresan etkisinin öncelikle flavonoidlerin, özellikle rutin ve hesperidinin katkılarıyla ilişkili olduğunu doğrulamaktadır [100].

Rutin ve kuersetinin, depresif semptomatolojinin tedavisinde yararlı olacağı, Parkinson ve Alzheimer hastalarının tedavisinde önemli bir rol oynayacağı tahmin edilmektedir. Rutin, serotonerjik ve noradrenerjik sistemin dahil olduğu farelerde antidepresan benzeri etkiler açısından başarıyla test edilmiştir. [101].

3.2.1.4 Antikanserojen Etkileri

İn vitro çalışmalar, rutin *in vitro* ve *in vivo* kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki sergilediği gösterilmiştir. Rutin, farelerde SW480 tümörüne karşı antitümör etkileri gösteren önceki çalışmalara benzer şekilde tümör hacminin azalmasıyla birlikte tümör büyümesinde belirgin bir gerileme sağlamıştır. Rutinin, insan nöroblastom hücrelerinde hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Rutinin, farelerde Ehrlich tümörüne karşı *in vivo* antitümör aktivite sergilediği ve MCF-7 ve PANC-1 hücrelerine ve her iki hücre hattında indüklenen apoptoza karşı sitotoksik bir etki sergilediği gösterilmiştir. Rutin kanser tedavisi için iyi bir seçenek olabilir. Özellikle, yalnızca kanser kemoterapisinde veya diğer antikanser ilaçlarla kombinasyon halinde kullanımına izin verebilecek insanlar üzerindeki antikanser aktivitelerini doğrulamak için klinik olarak kabul edilebilir yan etkilerle daha ileri deneyler ve klinik denemelerin ardından kullanılması kabul edilebilir olduğu bulunmuştur [102].

Rutin ile tedavi edilen gruplar, karaciğer ağırlığının azaldığını ve vücut ağırlığının belirgin şekilde arttığını, rutin N-Nitrosodiethylamine kaynaklı hepatoselüler karsinomlu sıçanlarda tümörü baskıladığı gösterilmiştir. Rutin, gelecekte Hepatoselüler karsinomun tedavisi için ümit verici bir ajan olarak kullanılması için yeni bir terapötik yaklaşım sağlayabilen geleneksel kemo önleyici maddeye yardımcı olarak kullanılabilir olduğu bulunmuştur [103].

3.2.1.5 Gastrik Ülser Koruması

Rutin, farmakolojik etkilerinin çok olması ile bilinmektedir. Rutin keçi gastrik mukozal homojenatında önemli proton pompası inhibe edici aktivite göstermiştir. Flavonoidlerin mükemmel antioksidanlar olduğu kanıtlanmıştır. Bir kısmı mukozal içerikte prostaglandinin arttırılmasında yetkindir. Bunun yanı sıra, kılcal bütünlüğü korurlar ve mukus zarının normal işlevini eski haline getirirler. Hidrojen-potasyum ATPaz, asitliği indükleyen anahtar bir enzimdir. Rutinin *in vitro* hidrojen-potasyum ATPaz inhibe etme kabiliyeti incelenmiştir. Protein pompasının inhibisyonu sayesinde, rutin antiülser bir potansiyel gösterdiği sonuçtan açıkça anlaşılmıştır. Rutinin asidin salgılanmasından sorumlu bir anahtar enzim olan hidrojen-potasyum ATPazı inhibe ettiği ve böylece antiülser aktivite gösterdiği sonucuna varılabildiği bulunmuştur [104].

Yapılan bir çalışmada, rutin oksidatif stresin baskılanması ve nötrofil infiltrasyonunun inhibisyonu yoluyla indometazine bağlı gastropatiye karşı koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Rutin ile tedavi sonrası tüm gruplarda ülserojen kaynaklı gastrik hasarı önemli ölçüde azalmıştır. Bu etki ülserin neden olduğu gruplarla karşılaştırıldığında tüm doz seviyelerinde anlamlı olduğu bulunmuştur. Rutin, serbest radikal hasarına karşı mukozal dokuların C vitamini içeriğinde artışa neden olarak artış göstererek koruyucu bir etki göstermiştir. Rutinin anti-ülser yararının, en azından, antioksidan ve serbest radikal temizleyici potansiyelleriyle kısmen bağlantılı olabildiği kanısına varılmıştır [89].

4. NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER

İlaç dağıtım sistemleri, terapötik etkilerini sergilemek üzere farmasötik bileşikleri ve biyoaktif bileşikleri sürekli ve gelişmiş bir şekilde belirli lokalizasyonlara taşımak için kullanılır [9, 85]. Mevcut ilaç dağıtım sistemleri, ilacın farmakokinetiği ve hastanın klinik geçmişinin yanı sıra hastanın tedaviye cevabını iyileştirmek amacıyla geliştirilmiştir. Düşük sulu çözünürlüğe sahip fitokimyasallar, formülasyonların geliştirilmesinde zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Bu zorluğun üstesinden gelmek için, sudaki çözünürlüğü ve dolayısıyla biyoyararlanımı ve biyolojik aktiviteyi iyileştiren bu tür bileşiklerin kapsüllemesi gerekmektedir [85].

Polimerik nanopartiküller, son zamanlarda flavonoidlerin kapsüllemesi için potansiyel taşıyıcı olarak değerlendirilmiştir. Çünkü kolloidal yapıları, gastrointestinal mukoza ve kan-beyin bariyeri dahil olmak üzere vücuttaki çeşitli bariyerleri geçmesini sağlayabilmektedir [79].

Son on yılda, aktif bileşenlerin kolloidal nanotaşıyıcılarda kapsüllemesi, ilaç ve kozmetik endüstrisinde ilaç dağıtımını için muazzam bir potansiyele sahiptir. Daha etkin ve kontrollü bir ilaç dağıtımını elde ederken, kapsüllemiş maddenin bazı fizikokimyasal özelliklerini arttırmak amacıyla bir ilacın/bileşiğin bir taşıyıcı madde içinde tutulmasını sağlar. Elde edilen partiküllerin nanometre büyüklüğü, biyolojik hücrelerle yapışma ve etkileşimlerinde önemli bir rol oynar ve hücre zarları içinden etkili bir geçiş ve kan akışında stabilite sağlar. Bu nedenle nanokapsülasyonun, çeşitli tıbbi ilaçların ve suda çözünen veya çözünmeyen hassas biyoaktif moleküllerin, biyolojik olarak emilimlerini artırarak terapötik etkisini arttırdığı bildirilmektedir. Ayrıca, nanopartiküllerin yapısı ve morfolojisi, matrisin ilaç dağıtımını kontrol etmek için partikül/su arayüzünde ilaç difüzyonuna engel olarak işlev görmesini sağlar. Bahsedilen bu avantajlar nedeniyle, sayısız nanopartikül tipinin, çeşitli parçalanma ve etkinlik değerlendirme aşamalarında olduğu bilinmektedir. Özellikle biyobozunur polimerik malzemelere odaklanılmıştır. Çeşitli araştırmalar, bu nanotaşıyıcıların, uçucu veya termal olarak hassas bileşiklerin stabilitesini artırması, ilaç etkinliğini artırması, kontrollü ilaç salımı ve hücre hedefli ilaç dağıtımını gibi sayısız avantajlar sunduğunu kanıtlamıştır [105].

Polimerler ayrıca geleneksel taşıyıcı malzemeler üzerinde gelişmiş özellikler sağlamak ve yeterli biyouyumluluk ve biyobozunurluk gibi gerekli özellikleri sağlamak için kimyasal olarak işlevselleştirilebilir [105].

Nanopartikülleri sentezlemek için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmıştır. Nanopartiküllerin fitokimyasallarla sentezi, daha yeşil, toksik olmayan ve çevresel olarak kabul edilebilir bir prosedürdür [106].

Nanopartiküller; emülsiyon çözücü-eyaporasyon, salting-out, ultrasonik sprey piroliz, nanoçöktürme, diyaliz ve süperkritik sıvı teknolojisi gibi farklı yöntemlerle hazırlanabilmektedir [107, 108].

Nanoteknolojideki ilerleme, biyoloji ve tıp alanında çok ilgi çekici uygulamalara ulaşılmış olan nanopartiküllerin gelişmesine yol açmıştır. Nanopartiküller 100 nm civarında büyüklüğe sahip küresel ve katı yapılardır. Bunlar doğal veya sentetik polimerlerden hazırlanır. Polimerik nanopartiküller mikron altı büyüklükte koloidal parçacıklardır. Hidrofilik ve hidrofobik küçük moleküllerin, polimerik matris içinde kapsüllenerek veya yüzeyinde adsorpsiyon veya konjugasyon yoluyla oluşturulan nanopartiküllerinden, aşılarda ve biyolojik makromoleküller gibi çok çeşitli ilaçlar hazırlanabilir. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için literatürde birkaç polimer ele alınmıştır, ancak PLGA gibi kopolimer kullanımı, ilaç dağıtımını ve biyomedikal uygulamalar için biyomateryal olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır [12].

Hem doğal polimerler (kollajen, kitin, kitosan, keratin, ipek ve elastin, nişasta, selüloz, pektin vb.) hem de sentetik polimerler (poli (laktik asit), poli (glikolik asit), poli (laktik asit-ko-glikolik asit) ve poli (ϵ -kaprolakton) vb.) biyomateryal olarak kullanılabilir [109].

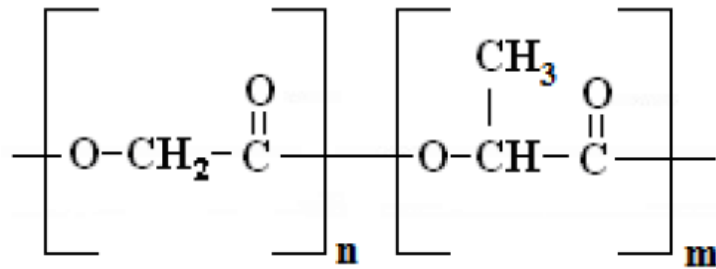
4.1 Sentetik Polimerler

Nanokapsüllemelerde kullanılan polimerler, metabolik işlemlerle monomere metabolize edilen ve normal metabolik yollar vasıtasıyla vücuttan çıkan biyolojik olarak bozunabilen bir polimerlerdir [12]. Dünya çapında birçok araştırmacı, ilaçların güvenli ve verimli dağıtımını sağlayan etkili ilaç dağıtım araçlarını araştırmaktadır [110].

PLGA ilaç salım modellerinde yaygın olarak uygulanmıştır. Bunun sebebi PLGA'nın, ilacın dağılımından sonra cerrahi müdahale gerektirmeyen, biyouyumlu, biyobozunur ve toksik olmayan bir polimer olmasıdır [9]. Literatürde, elde edilen sonuçlardan boş PLGA nanopartiküllerinin toksik olmadığı bulunmuştur [111].

PLGA, ilaç ve farmasötikler için kullanılabilen en etkili biyouyumlu ve biyobozunur polimerlerden biridir. Biyobozunur polimerik nanopartiküller için PLGA, özellikle yüksek hidrofobikliği, güçlü mekanik mukavemeti, kontrollü ilaç salımı, biyobozunurluğu, biyouyumluluğu ve düşük toksisitesi nedeniyle hidrofobik yapısı göz önüne alındığında, antimikrobiyal bileşiklerin kapsüllemesi için uygun bir sistemdir [110].

Tüm biyomalzemeler arasında PLGA, FDA ve Avrupa İlaç Ajansı tarafından onaylanan mikropartiküller veya implantlar yoluyla insanlarda kontrollü ilaç salımı için geniş kabul görmüştür. Mükemmel biyouyumluluk, düşük sistemik toksisite ve ayarlanabilir mekanik özelliklere sahip biyobozunur bir polimer olarak PLGA, aktif molekülleri sert ortamlardan korumak ve bunların ağız yoluyla veya parenteral uygulama yoluyla verilmesini ve alımını arttırmak için yaygın şekilde ilaç taşıyıcı olarak kullanılır. İçine konulan moleküllerin tamamen salımı, kolektif bir ilaç difüzyon işlemi, ester bağ hidrolizi ve polimer matrisinin kütle erozyonu yoluyla elde edilir [10].



Şekil 4.1 PLGA polimerinin kimyasal yapısı [108]

PLGA bazlı ilaç dağıtım sistemleri; parçacıklar, lifler, iskeleler, filmler ve kaplamalar gibi herhangi bir şekil ve ebatla kolayca oluşturulabilir. Çok çeşitli sentetik ve doğal ilaçları birleştirmek ve dağıtmak için kullanılabilir. Çok sayıda hidrofobik madde, antimikrobiyal etkinliği kanıtlanmış olan PLGA matrisleri içine enkapsüle edilmiştir. Örneğin klorheksidin, karanfil veya kekikten elde edilen uçucu yağlar, kuersetin ve rutin flavonoidleri, karvon ve karvakrol monoterpeneri, anetol fenil, sinamaldehit, ve fusidik asit fenilpropanoidleridir [10].

Son on yılda, PLGA nanopartikül sistemlerinde aktif maddelerin kapsüllenmesinin hassas biyoaktif bileşikleri koruduğu, çözünürlüğünü arttırdığı ve bunların tıbbi, farmakolojik ve gıda endüstrilerindeki biyoyararlanımını geliştirdiği vurgulanmıştır. Günlük yaşamda tüketilen meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunan kuersetin biyoflavonoidinin kullanımını sınırlayan faktörler olan suda çözünürlük, dengesizlik, emilim ve geçirgenliğin, PLGA nanopartikül sistemlerinin kapsüllenmesiyle aşılması hedeflenmiştir [110].

PLGA'nın fizyokimyasal özellikleri, bozunmalarından ve ilaç salma kinetiklerinden sorumludur. Bu özellikler; moleküler ağırlık, dağılım indeksi, hidrofobiklik ve kristallinite ile kontrol edilebilir. PLGA nanopartikülleri sürekli veya yavaş ilaç salım paterni gösterirken, PLGA nanopartiküllerinin daha küçük boyutu daha iyi farmakokinetik profil sağlar. Öte yandan, endoplazmik retikulum sisteminde immünojenik reaksiyona ve birikmeye neden olmak için büyük boyutlu nanopartiküllerden kaçınılması gerekir. Güvenlik sorunu önemli bir parametredir. Bunun için, farklı nanopartikül tipleri test edilmeli ve tüm bu yönleri kontrol etmek için çeşitli fizyokimyasal özellikleri izlenmelidir [12].

Leishmaniasis, *protozoa* grubunda yer alan *Leishmania* parazitlerinin neden olduğu, bu parazitlerin konakçı fagositlerin içinde hayatta kalma ve çoğalma yetenekleri ile karakterize edilen bir hastalık grubudur. Bu özellik, etkili antileishmanial terapötik ajanlarının geliştirilmesinde büyük bir problem teşkil eder, çünkü parazitin hücre içi lokalizasyonu, hücrelere kolayca dağılmayan ilaçların etkisine engel olabilir. Bu nedenle, antileishmanial bileşiklerini enfekte hücrelere gönderebilen ilaç taşıyıcılarının kullanılması, bu ilaçların terapötik etkinliğini arttırmalı ve aynı zamanda ilacın farmakokinetik ve biyodağılım profillerini değiştirerek toksisitelerini azaltmalıdır. Aslında, polimerik nanopartiküller, antileishmanial bileşiklerin dağıtımı için nanotaşıyıcı olarak test edilmiştir. Genel olarak, bu sistemler ilaç etkinliğinde bir artışa ve toksisitede bir azalmaya yol açarak tedavi oranını iyileştirmiştir [112].

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Gereç

5.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Deneysel çalışmalarımızda aşağıdaki cihazlar kullanıldı.

- Bidistile Su Cihazı (Purelab Flex Elga)
- Dondurucular (Beko(+4,-20°C), Arçelik(+4,-20°C))
- ELISA 96 kuyulu plakalar (TPP)
- ELISA çoklu plak okuyucu (ThermoLabsystem Multiskan Ascent)
- Hava akımlı kabin (Laminar flow) (Thermo Scientific Hera safe)
- Hassas terazi (Sartorius, CP 225D)
- Hücre kültürü flaskları 25cm² ve 75 cm²lik (TPP)
- İnkübatör (New Brunswick Scientific CO-150)
- Otoklav (Hirayama, Hiclave HVE-50)
- Pipet tabancası (Thermo)
- Santrifüj tüpleri - 1,5, 15, 50 ml (Eppendorf)
- Serolojik pipetler - 1, 5,10 ml (Blau Brand Germany)
- Sonikatör (Bandelin Sonorex)
- Ters (invert) mikroskop (Olympus DP71)
- Thoma lamı (Marienfeld)
- Vorteks (Heidolp Reax top)
- 10, 100, 1000 µl'lik mikropipetler (Thermo)
- 0,22 µm'lik şırınga filtresi (İsolab)
- 10 ml'lik enjektör (Ayset)

5.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma)
- Fetal Bovine Serum (Gibco)
- Formaldehit (%37) (Applichem)
- Formalin solüsyon (%10)
- Gentamisin (Sigma)

- Parafin (J.T. Baker)
- PBS (Sigma)
- Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) (Sigma Aldrich)
- RPMI-1640 (Fenol redli) besiyerleri (GIBCO Invitrogen)
- Rutin Hidrat (Sigma)
- Saf Su
- Thiazoly blue tetrazolium bromide (MTT) (Sigma)

5.1.3 Çözeltilerin Hazırlanması

5.1.3.1 RPMI 1640 Medyumun Hazırlanması

L-glutamin içeren RPMI 1640'ın 500 ml'sinin içerisine 10 mg/ml gentamisinden 2,5 ml eklenmesiyle stok hazırlanmış oldu. Kültürde kullanılmak üzere %10 FBS içeren besiyeri hazırlanması için, çözeltiden alınan 45 ml'ye 5 ml FBS eklendi. Steril bir şekilde +4°C'de saklandı.

5.1.3.2 MTT Solüsyonunun Hazırlanması

Deneyleerde kullanılacak olan MTT, prosüdüre uygun şekilde hazırlandı. Hassas terazide 10 mg/ml için 15 mg MTT tartılıp Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) ile 1,5 ml'ye tamamlandı. MTT steril PBS'te vorteks yardımıyla çözdürüldü ve 0,22 µm'lik şırınga filtreden geçirilerek steril hale getirildi. 96 kuyucuklu mikroplağın her kuyucuğuna 10 µl eklendi.

5.1.3.3 Fosfat Tampon Solüsyonunun (PBS) Hazırlanması

900 ml deiyonize suda; 8 g sodyum klorür (NaCl), 0,2 g potasyum klorür (KCl), 1,44 g disodyum fosfat (Na₂HPO₄) ve 0,24 g potasyum fosfat (KH₂PO₄) çözüldürüldü. Son hacim deiyonize su eklenerek 1 litreye tamamlandı ve pH 7,4'e ayarlandı. Cam şişeler içerisinde 121°C'ye ayarlanan otoklavda 20 dakika steril edildi.

5.2 Yöntem

Deneyleerde VL etkeni *L. infantum* promastigot kültürü kullanıldı. Yapılan tüm çalışmalar, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı laboratuvarlarında Sayın Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV ve ekibinin destekleri ve tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ'in gözetiminde gerçekleşmiştir.

Çalışmalarda mikroskobik olarak (morfoloji, parazit sayımı) ile MTT yöntemi kullanılarak RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotları üzerinde proliferasyona etkisi ve antileishmanial etkinliği incelendi.

5.2.1 Rutin Nanopartikülünün Sentezlenmesi

RTN-PLGA NP'lerinin sentezlenmesi, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği bölümü öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kadriye Kızılbey tarafından yapıldı.

Rutin maddesinin nanopartikül üretiminden öncesi kimyasal özellikleri ile bu molekülde uygulanacak nanopartikül hazırlama yöntemleri araştırılmıştır. Bu molekül için uygun yöntemlerden biri olan, tekli emülsiyon-çözücü (W/O) evaporasyon yönteminin nanopartikül hazırlama yöntemi kullanılarak RTN-PLGA NP'leri sentezlenmiştir. Bu değerlendirme RTN maddesinin kimyasal özellikleri de göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. Bu yöntem için 30 mg RTN ve 100 mg PLGA tartılmıştır. 0,5 ml propilen glikol içerisinde 30 mg RTN ve 1,5 ml diklorometan içerisinde 100 mg PLGA organik fazlarda çözündürülmüştür ve sonra karıştırılmıştır. Karışım manyetik karıştırıcı yardımıyla yavaşça %5'lik 4 ml polivinil alkolün (PVA) içerisine eklenmiştir. Daha sonra 2 dakika %80 güç ile sonikasyon yapılmıştır. Bu organik çözeltiler, sulu PVA çözeltisi ile organik fazın buharlaşması için bir gece boyunca buz banyosu içinde manyetik bir karıştırıcıda karışmaya bırakılmıştır. 24 saat sonra santrifüj işleminin yapılmasıyla nanopartikül çöktürülmüştür. Bu işlem 40 dakika boyunca 9000 rpm'de 4°C'de yapılmıştır. Santrifüjlendikten sonra çökmüş parçacıklar toplanıp, fazla PVA'yı çıkarmak için üç kez ultra saf su ile yıkanmıştır. Sonra üretilen nanopartiküller liyofilizatörde kurutulmuştur. Nanopartiküller, -80°C'de saklanmıştır [109, 113].

Abamor tarafından yapılan bir çalışmada, kuersetin molekülü ile kapsüllenmiş poli- ϵ -kaprolakton (PCL) NP'lerinin *L. infantum* promastigotları ve amastigotları üzerindeki *in vitro* antileishmanial aktiviteleri araştırılmıştır. Kuersetinin PCL NP'leri ile kapsüllenmesi, tekli emülsiyon (W/O) çözücü evaporasyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır [114].

Arasoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, tekli emülsiyon (W/O) çözücü evaporasyon yöntemi, PLC NP'leri tarafından kuersetinin kapsüllenmesinde kullanılan nano-çöktürme ve salting-out tekniklerinden daha başarılı olduğu gösterilmiştir. Tekli emülsiyon-çözücü evaporasyon yöntemi kullanılarak sentezlenen nanopartiküllerin, daha yüksek reaksiyon verimine (RY) sahip oldukları ve diğer tekniklerle sentezlenen nanopartiküllerle karşılaştırıldığında daha önemli bir antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur [114].

5.2.2 Rutin Nanopartikülünün Karakterizasyonu

RTN-PLGA NP'lerinin karakterizasyonu, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği bölümü öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kadriye Kızılbey tarafından yapıldı.

Tekli emülsiyon (W/O) çözücü evaporasyon yöntemi kullanılarak sentezlenen RTN-PLGA NP'lerinin boyut analizi ve diğer karakterizasyon testleri; zeta-sizer, UV-vis spektroskopi, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve taramalı elektron mikroskopu (SEM) cihazları kullanılarak yapılmıştır. RY, kurutulan RTN-PLGA NP'lerinin, kullanılan RTN ve PLGA miktarlarının toplamına oranı ile tespit edilmiştir. Enkapsüle edilen RTN'nin belirlenmesinde, sentezlenen nanopartiküllerin katı fazda elde edilmesi için santrifüj işleminden yapılmıştır. Daha sonra üçer defa yapılan yıkama işlemleri sonucunda elde edilen üst fazların 354 nm'de ultraviyole-görünür bölge (UV-Vis) spektroskopisi kullanılarak absorbans değeri ölçülmüştür. RTN-PLGA NP'lerinin etken yükleme kapasitesi, UV-Vis spektroskopi kullanılarak belirlenmiştir. Etken yükleme verimi, sentezde kullanılan etken madde miktarının kurutularak elde edilen nanopartikül miktarına oranı ile tespit edilmiştir. Nanopartiküllerin ortalama parçacık boyutu, zeta potansiyel ve çoklu dağılım indisi değerleri dinamik ışık saçma yöntemiyle belirlenmiştir [109, 113].

Zeta potansiyeli, temel partikül karakteristiğidir ve partikül stabilitesini etkiler. PLGA NP'sinin zeta potansiyeli ile ilgili yapılan tüm çalışmalar, bir yüzey aktif madde olarak PVA ile hazırlanan PLGA NP'lerinin negatif bir yüzey yüküne sahip olduğunu göstermiştir [115].

FTIR organik bileşiklerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Optik izomerler hariç bütün bileşiklerin kızılötesi spektrumu bir diğerinden farklıdır. Kızıl ötesi bölgesi, elektromanyetik spektrumun görünür bölgesiyle mikro dalga bölgesi arasında yer alan kısmıdır. SEM, odaklanmış bir elektron demeti vasıtasıyla numune yüzeyini tarayarak görüntü oluşturan bir elektron mikroskobu türüdür. Elektronlar numunedeki atomlarla etkileşime girerek numune yüzeyindeki kompozisyon ve topografi hakkında bilgileri barındıran farklı sinyaller üretmektedir. Liyofilize edilen nanopartikül *in vitro* salım için değerlendirilmiştir. RTN NP'lerinin üzerlerine 5'er ml PBS eklenerek 37°C'de 60 rpm'deki çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiştir. Daha sonra belli aralıklarla 354 nm'de UV-Vis spektroskopisiyle ölçümler yapılmıştır [109, 113].

RTN-PLGA NP'leri, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği bölümü öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kadriye KIZILBEY'den temin edildi.

Deneilerde kullanılan NP'lerin özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

Tekli emülsiyon-çözücü evaporasyon yöntemi olan nanopartikül hazırlama yöntemiyle sentezlenen RTN NP'lerinin 5.1'de belirtilen formül ile %RY (Reaksiyon Verimi) değeri 100 mg'da 67 ± 3 olarak hesaplanan nanopartiküller tarafımızca kullanılmıştır [109].

$$\%RY = \frac{\text{Üretilen Nanopartikül Miktarı (mg)}}{\text{PLGA Miktarı (mg)} + \text{RTN Miktarı (mg)}} \times 100 \quad (5.1) \quad [109]$$

5.2'de belirtilen formül kullanılarak RTN-PLGA NP'lerinin, %EE (Enkapsülasyon Etkinliği) değeri 100 mg'da 87 ± 6 olarak hesaplanan nanopartiküller tarafımızca kullanılmıştır [109].

$$\%EE = \frac{\text{Nanopartikül İçinde Bulunan Etken Madde Miktarı (mg)}}{\text{Kullanılan Toplam Madde Miktarı (mg)}} \times 100 \quad (5.2) \quad [109]$$

RTN-PLGA NP'lerinin; %87 enkapsülasyon etkinliğine, 570.3 ± 66.13 nm partikül boyutuna ve 0.524 ± 0.046 polidispersite indeksine ve -1.80 ± 0.912 zeta potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir [109].

5.2.3 *Leishmania* Promastigot Kültürünün Yapılması

VL etkeni olan *L. infantum* promastigotları (MON-1) Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEY' den temin edildi.

Leishmania parazitlerinin kültürü %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyerlerinde 27°C soğutmalı etüvde gerçekleştirildi. %10 inaktive FBS ile Gentamisin içeren Fenol redli RPMI 1640 besiyerine pasajlayarak üretilen *L. infantum* promastigotları kullanıldı. Deney süresince, 27°C soğutmalı etüvde steril bir şekilde saklandı. Parazitlerin morfolojik durumu ve gelişimi ters mikroskop kullanılarak günlük olarak izlendi. Kültürün pasajı haftada bir olmak üzere yapıldı. Pasaj öncesi kültürden örnek alınarak, ortamın pH'ı, parazitlerin morfolojileri ve hareketlilikleri incelenerek sayımları yapıldı. Her eppendorfte 1×10^6 parazit/ml olacak şekilde parazit ekimi kültürden alınarak yapıldı. Deneyleerde kullanılan *L. infantum* kültürü Şekil 5.1'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1 *L. infantum* kültürü (20x)

5.2.4 Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı

Deneyleerde, 3 günlük *L. infantum* kültürü kullanıldı. Parazitlerin sayımı için Thoma lamı kullandığından, *L. infantum* kültüründeki parazit sayısı Thoma lamında sayım yapılarak belirlendi. Kültür ortamında bulunan parazitler hareketli olduklarından Thoma lamında sayım yapılması zordur. Bunun için parazitleri sabitlemek üzere formalin kullanılır. Bu nedenle sayım yapmak için, homojenize edilmiş *L. infantum* kültüründen alınan parazitler %10'luk formalinle karıştırılıp 5–10 dakika bekletildi. Sayım için belirlenmiş olan seyreltme katsayısı 10^7 dur.

Thoma lamının her iki bölümüne de formalin içeren 10'ar µl parazit kültürlü solüsyon damlatıldı. Ters mikroskopta parazit sayımı yapılarak her iki bölmenin ortalaması alındı ve kültürün 1 ml'sinde 8,8 milyon parazit olduğu tespit edildi.

Thoma lamında 5.3'te belirtilen formül kullanılarak sayım yapıldı.

Parazit sayısı= Ortalama hücre sayısı x Seyreltme katsayısı x Thoma lamı sabiti (5.3)

- Parazit sayısı: 1 ml'deki parazitlerin sayısı
- Ortalama parazit sayısı: Thoma lamının hem alt hem üst kısmında bulunan 16 adet karedeki parazitlerin aritmetik ortalaması
- Seyreltme katsayısı: 10
- Thoma lamı sabiti: 10.000

5.2.5 RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin ve Antileishmanial Etkinliklerinin İncelenmesi

Bu çalışmada ilk kez olarak, RTN'nin etkinliğini arttırmak amacıyla, RTN ve RTN-PLGA NP'leri *L. infantum* parazitleri üzerindeki antileishmanial etkinlikleri incelenmiştir. Öncelikle kullanılacak etken madde olan RTN'nin deneylerde kullanılacak olan konsantrasyonları belirlenmiştir.

RTN, suda düşük çözünürlüğü sebebiyle klinik uygulamaları kısıtlamaktadır [109]. Kuersetin molekülünün de suda düşük çözünürlüğü klinik uygulamalarda kullanılabilirliğini azaltmaktadır. Bu nedenle çözünürlüğünü, biyoyararlanımını ve terapötik etkinliğini arttırmak için kuersetinin taşıyıcı sistemler tarafından kapsüllenmesi uygun bir yöntem olarak kabul edilmiştir. Son yıllarda, kuersetinin suda düşük çözünürlüğü sebebiyle ve terapötik etkinliğini arttırmak için kuersetin yüklü polimerik taşıyıcı sistemlerin üretilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır [114]. RTN molekülü de kuersetin gibi suda düşük çözünürlüğü sebebiyle taşıyıcı sistemler tarafından kapsülленerek antileishmanial etkinliğinin artırılması amaçlanmıştır.

Chauhan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, insan lösemi monosit hücre dizisi (THP-1) RTN'nin 20, 50, 100, 200 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Aynı çalışmada *L. donovani* promastigot kültürüne 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır [38].

Literatürde kullanılan RTN konsantrasyonları göz önünde bulundurularak deney konsantrasyonları planlanmıştır.

Ayrıca, do Nascimento ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; *L. (V.) braziliensis* promastigotları; propolisin etanolik ekstresi ve kırmızı propolis ekstraktının NP'lerinin; 30, 40, 50, 60, 80, 100, 160, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000 µg/ml konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır [107]. Bu değerler de deneylerde kullanılan konsantrasyonlara örnek olarak kullanılmıştır.

Eppendorf tüplerine, her tüpte 1 milyon/ml parazit olacak şekilde *L. infantum* kültüründen hesaplanarak eklendi. Her deney için minimum üç örnek kullanıldı. Formül 5.3'ten bulunan parazit sayısına göre doğru orantı ile ml olarak alınan parazitlerin üzerine besiyeri 1 ml'ye tamamlanacak şekilde eklendi. Promastigot kültürü 27°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Eppendorf tüplerine ekimi yapılan kültür üzerinde uygulanan konsantrasyon örnekleri ve kontrol grupları Tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1 RTN ve RTN-PLGA NP konsantrasyon örnekleri ve kontrol grupları

KONTROL	RTN 10 µg/ml	RTN 25 µg/ml	RTN 50 µg/ml	RTN 100 µg/ml	RTN 250 µg/ml	RTN 500 µg/ml	RTN 750 µg/ml	RTN 1000 µg/ml
KONTROL	RTN 10 µg/ml	RTN 25 µg/ml	RTN 50 µg/ml	RTN 100 µg/ml	RTN 250 µg/ml	RTN 500 µg/ml	RTN 750 µg/ml	RTN 1000 µg/ml
KONTROL	RTN 10 µg/ml	RTN 25 µg/ml	RTN 50 µg/ml	RTN 100 µg/ml	RTN 250 µg/ml	RTN 500 µg/ml	RTN 750 µg/ml	RTN 1000 µg/ml
	BESİYERİ-RTN 10 µg/ml	BESİYERİ-RTN 25 µg/ml	BESİYERİ-RTN 50 µg/ml	BESİYERİ-RTN 100 µg/ml	BESİYERİ-RTN 250 µg/ml	BESİYERİ-RTN 500 µg/ml	BESİYERİ-RTN 750 µg/ml	BESİYERİ-RTN 1000 µg/ml
BESİYERİ-KONTROL	RTN-PLGA 10 µg/ml	RTN-PLGA 25 µg/ml	RTN-PLGA 50 µg/ml	RTN-PLGA 100 µg/ml	RTN-PLGA 250 µg/ml	RTN-PLGA 500 µg/ml	RTN-PLGA 750 µg/ml	RTN-PLGA 1000 µg/ml
BESİYERİ-KONTROL	RTN-PLGA 10 µg/ml	RTN-PLGA 25 µg/ml	RTN-PLGA 50 µg/ml	RTN-PLGA 100 µg/ml	RTN-PLGA 250 µg/ml	RTN-PLGA 500 µg/ml	RTN-PLGA 750 µg/ml	RTN-PLGA 1000 µg/ml
BESİYERİ-KONTROL	RTN-PLGA 10 µg/ml	RTN-PLGA 25 µg/ml	RTN-PLGA 50 µg/ml	RTN-PLGA 100 µg/ml	RTN-PLGA 250 µg/ml	RTN-PLGA 500 µg/ml	RTN-PLGA 750 µg/ml	RTN-PLGA 1000 µg/ml
	BESİYERİ-RTN-PLGA 10 µg/ml	BESİYERİ-RTN-PLGA 25 µg/ml	BESİYERİ-RTN-PLGA 50 µg/ml	BESİYERİ-RTN-PLGA 100 µg/ml	BESİYERİ-RTN-PLGA 250 µg/ml	BESİYERİ-RTN-PLGA 500 µg/ml	BESİYERİ-RTN-PLGA 750 µg/ml	BESİYERİ-RTN-PLGA 1000 µg/ml

RTN-PLGA NP'lerinin; %RY, %EE ve Etken Yükleme Kapasite'leri hesaplanarak kullanılacak olan nanopartikül miktarı belirlendi. Bu hesabın ayrıntısı 5.2.1'de verilmiştir. RTN ve RTN-PLGA NP'leri, konsantrasyonları 5 mg/ml olacak şekilde saf suda çözdürülerek stoklar hazırlandı. İnkübasyonun ardından RTN ve RTN-PLGA NP'leri, konsantrasyonları 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml olacak şekilde 1 ml'lik hacimlerde hazırlandı. Ayrıca kontrol grupları olarak, sadece parazit içeren örnekler de hazırlandı. Daha sonra kontrol ve deney grubundaki farklı konsantrasyona maruz kalan promastigot kültürü 27°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin belirlenen konsantrasyonlarının uygulanmasının üzerinden geçen 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki proliferasyona etkisi ve antileishmanial etkinlik değerlendirildi. Buna göre *L. infantum* promastigotlarının Thoma lamı vasıtasıyla eppendorflardaki parazit sayıları tespit edilerek proliferasyonu değerlendirilirken, antileishmanial etkinliğin belirlenmesi için MTT yöntemi ile parazitlerin % canlılıkları hesabı ile yapıldı.

5.2.5.1 Farklı Konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

Kültürün adapte olması için 27°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından, RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin konsantrasyonları farklı eppendorf tüpleri içerisindeki promastigotlar üzerinde denenmek üzere eklendi.

24., 48., 72. ve 96. saatteki proliferasyona etkisini ölçmek için her eppendorften alınan 90 µl örnek alındı. Bu örnekler, RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarının her birinden 10 µl alınıp üzerine 90 µl formalin eklenerek hazırlandı. Ters mikroskopta, mikroplakaya aktarılmış örneklerde bulunan parazitlerin durumları gözlemlendi ve yorumlandı. Parazitlerin canlılığı 5.4'te belirtilen formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Deney Grubu}}{\text{Kontrol}} \times 100 \quad (5.4) \quad [106]$$

Parazit sayısı Thoma lamı yardımıyla ters mikroskopta bakılarak sayıldı. Mikroskop altında hareketli promastigotlar belirgin bir şekilde görülmektedir. Böylelikle örnekler kendi aralarında ve kontrol grubu ile kıyaslanarak incelenmiştir.

5.2.5.2 Farklı Konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin Promastigot Kültüründe Antileishmanial Etkinliklerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

MTT testi, doğal ve sentetik bileşiklerin sitotoksik etkilerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir kolorimetrik yöntemdir [55]. Bu test, hücrelerin mitokondriyal aktivitesini ölçerek proliferasyon ve hücre canlılığı için bir analizdir. Bu testte canlı hücreler suda çözünür sarı renkteki tetrazolyum tuzunu suda çözünmeyen mor formazana dönüştürmektedirler [111]. Bir reaktan olan MTT tuzu, canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimiyle reaksiyona girer ve formazan kristalleri ile ifade edilen bileşikler oluşturur [116]. Bu nedenle, oluşan formazan kristallerinin miktarı, canlı hücrelerin sayısı ile orantılıdır [111].

RTN'nin antileishmanial aktivitesi, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) analizi kullanılarak araştırıldı. *L. infantum* promastigotları (10^6 parazit/ml), 96 oyuklu bir plakaya ekildi.

Daha sonra, zaman kaybetmeden kuyucukların her birine 10 µl steril MTT solüsyonundan (5 mg/ml) eklendikten sonra 4 saat karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda parazit canlılığının göstergesi olan formazan kristallerinin parazit kümelerinin içerisinde oluştuğu gözlenmiştir. Formazan kristallerini çözmek için mikropalak kuyucuklarının her birine 100 µL DMSO eklendi ve aynı koşullarda 30 dakika bekletildi.

ELISA reader (ThermoLabsystem Multiskan Ascent) ile absorbans değerleri alındı. Parazitlerin bulunduğu kuyucuklardaki parazitlerin canlılığı hesaplanır. Parazitlerin bulunduğu kuyucuk değerinden parazitlerin bulunmadığı kuyucuklardaki değerlerin ortalaması çıkartılarak sonuçlar değerlendirildi. ELISA reader Şekil 5.3'te gösterilmiştir.



Şekil 5.2 (a) ELISA reader cihazı (b) MTT solüsyonu eklenen mikropalak görüntüsü

30 dakika bekletildikten sonra plaka 540 nm dalga boyunda ELISA reader cihazında okutularak, kuyucuklardaki promastigotların absorbans değerleri, yani yoğunlukları tespit edilir. Parazit kümelerinde olduğu gözlenen formazan kristallerinin soğurucu değeri ELISA reader cihazında okundu. Bu sayede hücrelerin canlılığı tayin edilmiştir. Böylece RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotlarının canlılığı üzerindeki etkisi belirlenmiş oldu.

Örneklerin antileishmanial etkinliğini ölçmek için 24. saatte yapılan işlemlerden sonra eppendorfler, 48., 72. ve 96. saatte tekrarlanmak üzere 27°C'de inkübasyona bırakıldı.



6. BULGULAR

Bu çalışmada eşsiz biyolojik ve kimyasal özelliklere sahip PLGA NP'lerinin güvenli ve yeni bir antileishmanial ajanın etkinliği araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında, antileishmanial aktivitesi olduğu düşünülen flavonoidlerden biri olan RTN ve etkinliğinin daha fazla olduğu düşünülen RTN-PLGA NP'leri araştırılmıştır. *L. infantum* promastigotları, RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Promastigot kültürüne uygulanan etken madde sonrası kontrol ve deney gruplarının 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki proliferasyonunun % canlılığa etkisi ve antileishmanial etkinlikleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotları üzerindeki proliferasyonu; 24., 48., 72. ve 96. saatlerde 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlara maruz bırakılan etken madde sonrasında parazit sayımı yapılarak % canlılık değerleri incelendi. Parazitlerin % canlılık değerleri, RTN ve RTN-PLGA NP'leri için saat bazında ve kendi aralarında kıyaslanabilmesi için ayrı ayrı grafikler hazırlanarak değerlendirilmiştir.

RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotları üzerindeki antileishmanial etkinlikleri ise MTT yöntemiyle belirlendi. Parazitlerin % canlılık değerleri, RTN ve RTN-PLGA NP'leri için saat bazında ve kendi aralarında kıyaslanabilmesi için ayrı ayrı grafiklerde belirtilmiştir.

6.1 Nanopartiküllerin Konsantrasyon Hesabı

Sonuçların doğru değerlendirilebilmesi için bölüm 5.2'deki hesaplamalar dikkate alınarak 6.1'deki %DL değeri hesabı yapıldı. RTN-PLGA NP'leri, 30 mg RTN ve 100 mg PLGA kullanılarak hazırlandığından toplam 130 mg için %RY değeri 86,775 mg olarak hesaplanmıştır. 30 mg RTN kullanılması sebebiyle %EE'nin 25,965 mg olduğu hesaplanmıştır. 6.1'de verilen formül ile Etken Yükleme Kapasitesi (%DL) değeri hesaplanmıştır.

$$\%DL = \frac{\text{Enkapsüle Olan Madde Miktarı (mg)}}{\text{Elde Edilen Kuru Nanopartikül Miktarı (mg)}} \times \%100 \quad (6.1) \quad [109]$$

RTN-PLGA NP'lerinin 86,775 mg'ında 25,965 mg RTN bulundu. Buna göre, 1 mg nanopartikülde 0,299 mg RTN bulunduğu hesaplanmıştır. 6.1'de verilen formül kullanılarak %DL değeri de %29,9 olarak hesaplanmıştır.

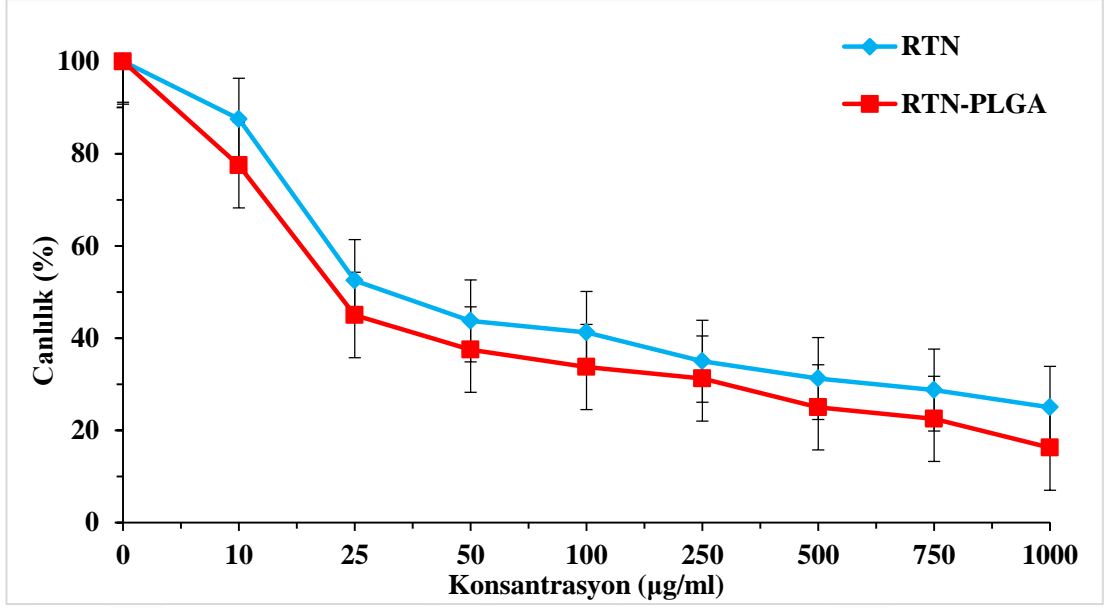
RTN-PLGA NP'lerinin 1 mg/ml'sinde 0,299 mg RTN olduğu hesaplandıktan sonra ilaç konsantrasyonları 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml olacak şekilde hazırlandı.

6.2 Farklı Konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin Sonucu

RTN ve RTN-PLGA uygulamalarının üzerinden geçen 24., 48., 72. ve 96. saatlerde *L. infantum* promastigotlarının proliferasyonuna etkisi belirtilen periyotların sonunda eppendorflardaki parazit sayılarının Thoma lamı ile sayılmasıyla tespit edildi.

RTN'nin ve RTN-PLGA'nın farklı konsantrasyonlarına (10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml) maruz bırakılan *L. infantum* promastigotlarının parazit sayımına göre 24., 48., 72. ve 96. saatlerde proliferasyonuna etkisi sonucu % canlılık değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların grafikleri Şekil 6.1, 6.3, 6.6, 6.8, 6.10, 6.11'de verilmiştir. Ayrıca mikroskopik görüntüler Şekil 6.2, 6.4, 6.5, 6.9'da verilmiştir.

Şekil 6.1'de RTN ve RTN-PLGA NP'lerine maruz kalan *L. infantum* promastigotlarının 24. saatteki proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri gösterilmektedir. RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin özellikle 25 µg/ml'lik konsantrasyonunda kontrol grubuyla kıyaslandığında *L. infantum* parazitlerinin sayısında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Ayrıca, RTN-PLGA NP'lerinin uygulandığı konsantrasyonlarda parazitlerin proliferasyon değerlerinin RTN'ye kıyasla daha fazla azaldığı tespit edilmiştir. Hem RTN'nin hemde RTN-PLGA NP'lerinin 25 µg/ml konsantrasyonu ve daha yoğun konsantrasyonlarına maruz kalan parazitlerin % canlılık değerleri kontrol grubuna göre büyük ölçüde azalırken; kendi aralarında korelasyon gösterdiği de görülmüştür. 24. saatte RTN-PLGA NP'leri tüm konsantrasyonlarda RTN'ye kıyasla daha etkili olduğu ve beklendiği gibi en büyük etkiyi 1000 µg/ml'lik konsantrasyonda göstermiştir.



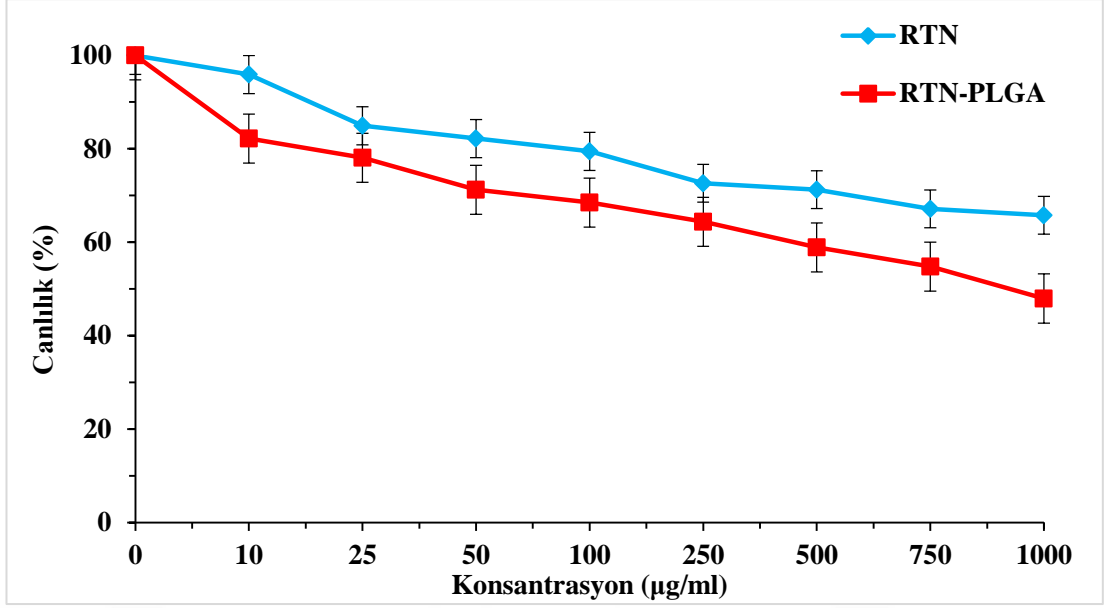
Şekil 6.1 Farklı konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri (24. saat)

24. saatte hem RTN hemde RTN-PLGA NP'lerinin 25 µg/ml'lik konsantrasyonlarında *L. infantum* promastigotlarının % canlılık değerlerinin kontrole kıyasla azaldığı mikroskobik olarak da görülmüştür. Konsantrasyon arttıkça Şekil 6.2'de görüldüğü gibi kümeleşmelerde azalmıştır. Kümeleşmeler yuvarlak içine alınmıştır.



Şekil 6.2 24. saatte (a) Kontrol, 25 µg/ml'lik konsantrasyonda (b) RTN'ye (c) RTN-PLGA NP'lerine maruz kalan *L. infantum* promastigot kümelerinin mikroskobik görüntüsü (10x)

Şekil 6.3'te RTN ve RTN-PLGA NP'lerine maruz kalan *L. infantum* promastigotlarının 48. saatteki proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri gösterilmektedir. RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin 48. saatte de % canlılık değerleri korelasyon göstermektedir. Tüm konsantrasyonlarda RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin % canlılık değerlerinin konsantrasyon arttıkça azaldığı görülmektedir. Ayrıca yine RTN-PLGA'nın her konsantrasyonda daha etkili olduğu görülmektedir.



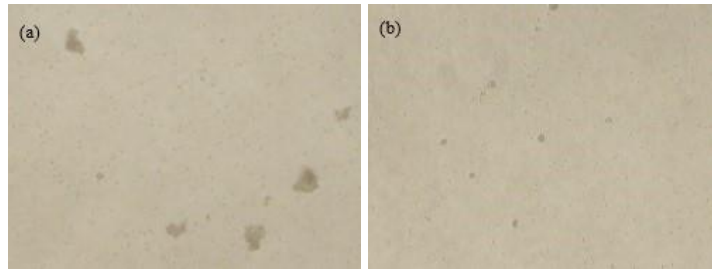
Şekil 6.3 Farklı konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri (48. saat)

Şekil 6.4'te RTN konsantrasyonu arttıkça *L. infantum* promastigot kümelerinin yok olduğu görülmektedir.



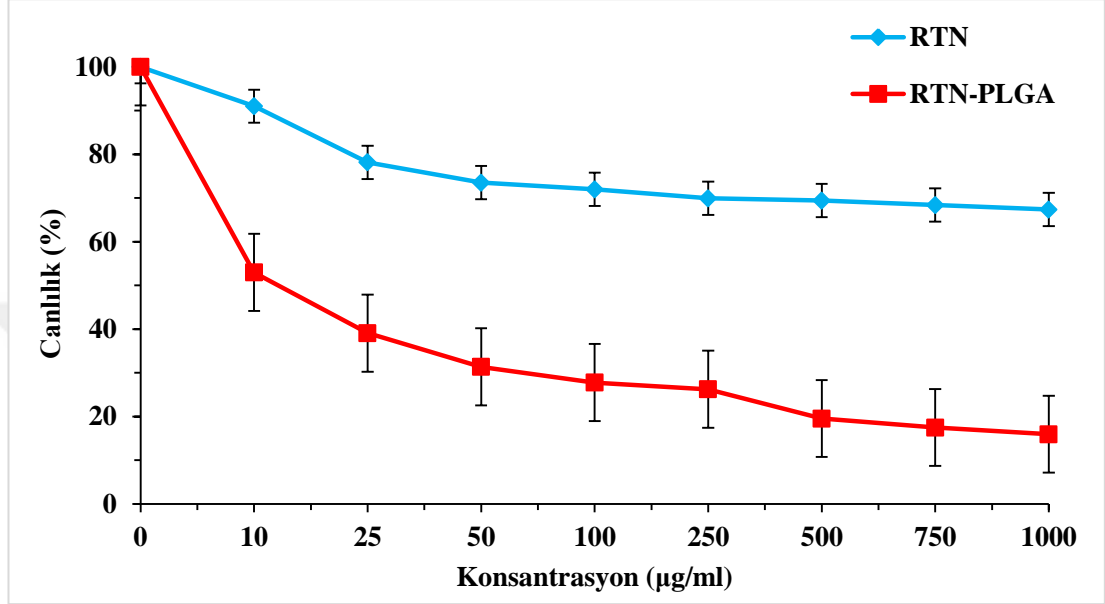
Şekil 6.4 48. saatte (a) 250 µg/ml'lik, (b) 500 µg/ml'lik, (c) 1000 µg/ml'lik konsantrasyonda RTN'ye maruz kalan *L. infantum* promastigot kümelerinin mikroskopik görüntüleri (10x)

Şekil 6.5'te aynı büyütmeye görülen *L. infantum* promastigot kültürünün, RTN-PLGA konsantrasyonu arttıkça parazit sayısı azalırken kümeleşme bazında da azalma net olarak görülmektedir.



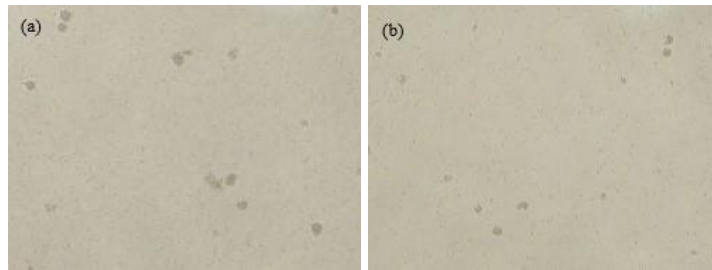
Şekil 6.5 48. saatte (a) 10 µg/ml'lik, (b) 1000 µg/ml'lik konsantrasyonda RTN-PLGA'ya maruz kalan *L. infantum* promastigot kümelerinin mikroskopik görüntüleri (10x)

Şekil 6.6'da RTN ve RTN-PLGA NP'lerine maruz kalan *L. infantum* promastigotlarının 72. saatteki proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri gösterilmektedir. RTN-PLGA NP'lerinin 750 µg/ml'lik konsantrasyonunda parazit sayısı RTN'ye kıyasla yaklaşık 4 katı kadar canlılığı azalttığı görülmektedir.



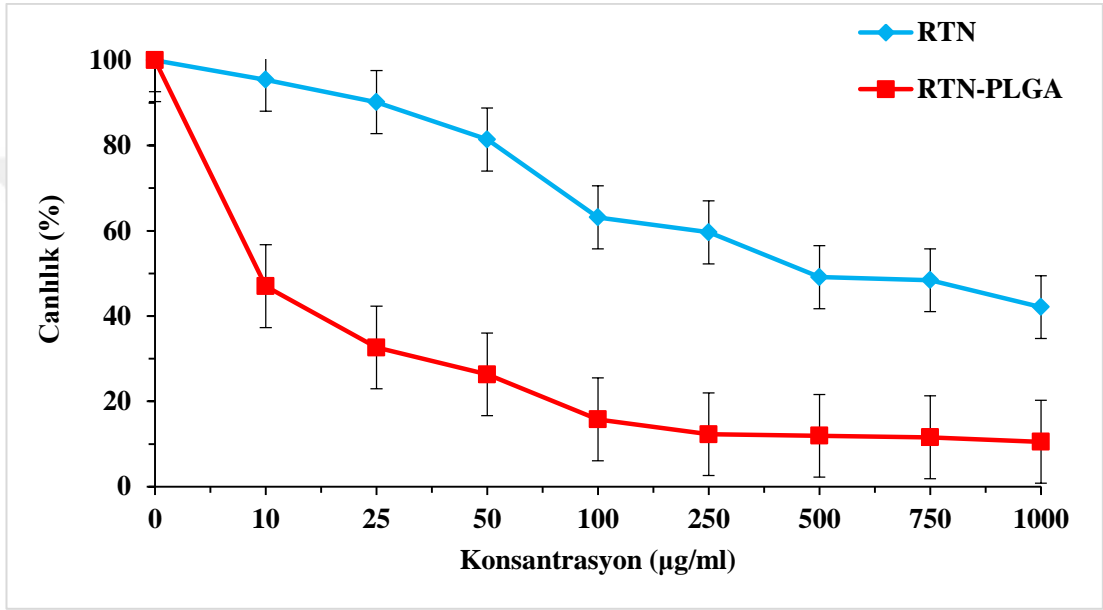
Şekil 6.6 Farklı konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri (72. saat)

Şekil 6.7'de aynı konsantrasyondaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin etkileri karşılaştırıldığında, *L. infantum* promastigot kümelerinin RTN-PLGA NP'lerine maruz kalan örneklerde daha az olduğu görülmektedir.



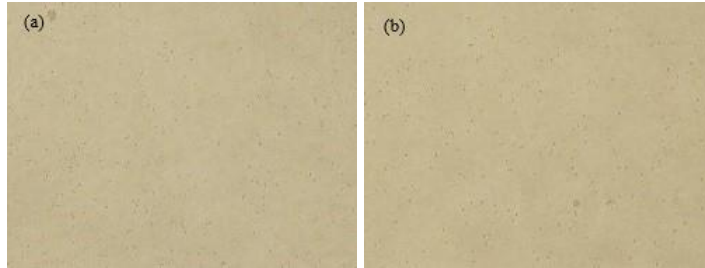
Şekil 6.7 72. saatte 100 µg/ml'lik (a) RTN'ye ve (b) RTN-PLGA konsantrasyonlarına maruz kalan *L. infantum* promastigot kümelerinin mikroskopik görüntüleri (10x)

Şekil 6.8’de, RTN ve RTN-PLGA NP’lerine maruz kalan *L. infantum* promastigotlarının 96. saatteki proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri gösterilmektedir. Grafiğe göre RTN-PLGA NP’lerinin 100 ve 250 µg/ml’lik konsantrasyonlarında % canlılık değerlerinin RTN’ye kıyasla yaklaşık 5 kat azaldığı görülmektedir. Tüm konsantrasyonlarda RTN-PLGA NP’leri yalnız RTN’ye göre *L. infantum* promastigotları üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür. RTN-PLGA NP’lerinin 1000 µg/ml’lik konsantrasyonda % canlılık değerini 10 kat azalttığı görülmüştür.



Şekil 6.8 Farklı konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP’lerinin *L. infantum* promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri (96. saat)

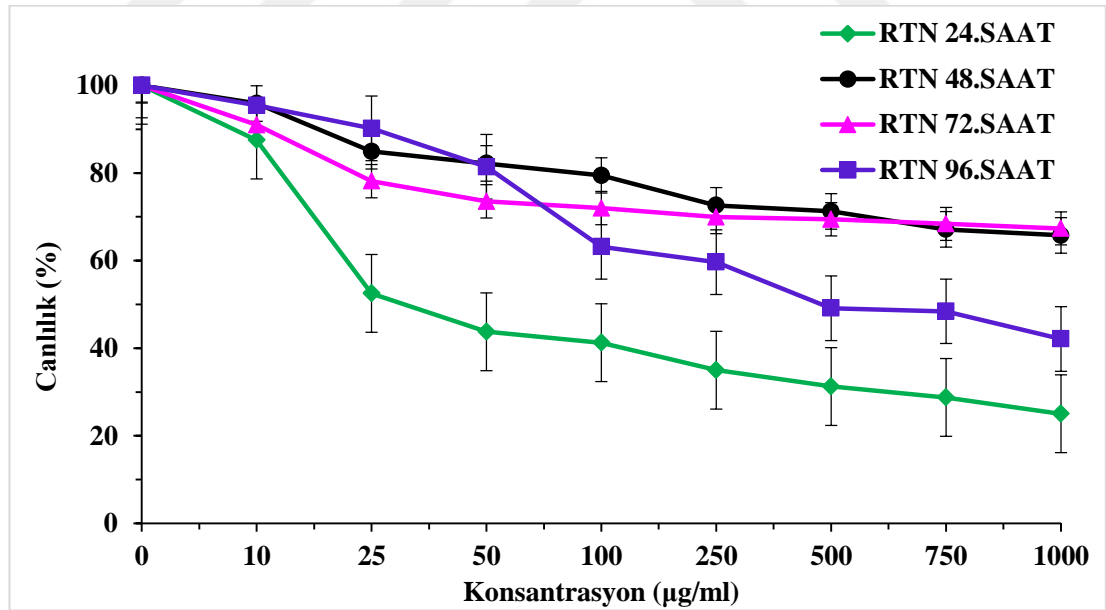
Şekil 6.9’da aynı konsantrasyondaki RTN ve RTN-PLGA NP’lerinin etkileri karşılaştırıldığında, *L. infantum* promastigot kümelerinin RTN-PLGA NP’lerine maruz kalan örneklerde daha az olduğu görülmektedir.



Şekil 6.9 96. saatte 1000 µg/ml’lik (a) RTN’ye ve (b) RTN-PLGA konsantrasyonlarına maruz kalan *L. infantum* promastigot kümelerinin mikroskopik görüntüleri (10x)

Etken maddelerinin eklenmesinin ardından geçen 24 saatlik inkübasyon sonunda kontrol grubundaki parazit sayısı $5 \times 10^6/\text{ml}$ 'ye, 48. saatte $6 \times 10^6/\text{ml}$ 'ye, 72. saatte $8 \times 10^6/\text{ml}$ 'ye, 96. saatte ise $11 \times 10^6/\text{ml}$ 'ye yükselmiştir.

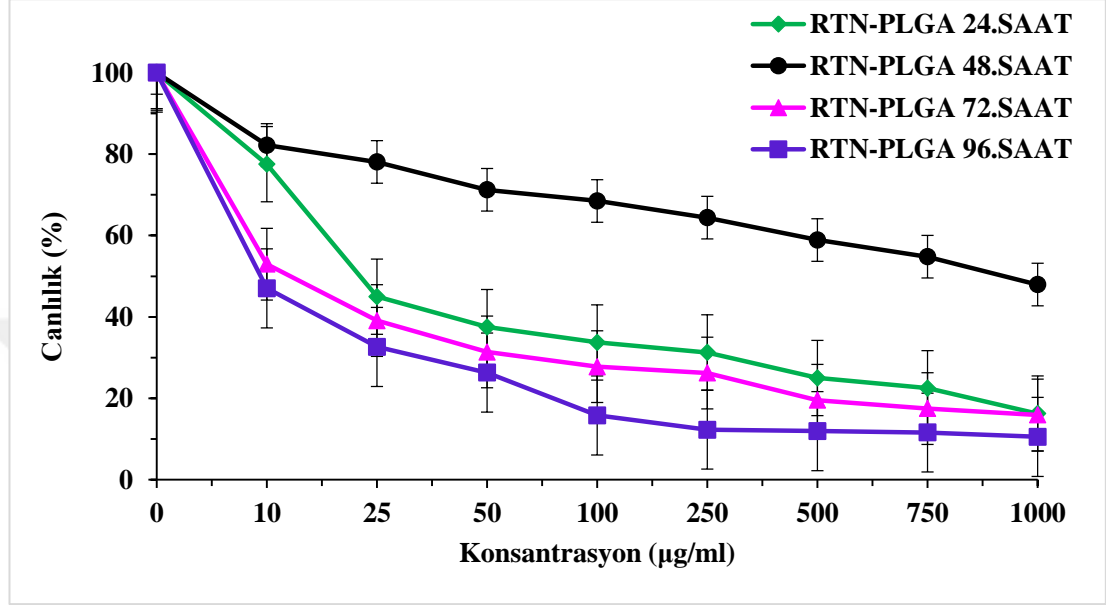
Şekil 6.10'da görüldüğü gibi, RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri konsantrasyon arttıkça her saat azalmaktadır. 10 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda RTN uygulamalarının parazit sayısının 24. ve 48. saatlerde kontrole yakın olduğu tespit edilmiştir. Aynı konsantrasyonun 72. saatinde parazit sayısının arttığı görülmektedir. Buna karşın 72. saat haricindeki tüm saatlerde konsantrasyon arttıkça parazit sayısının azaldığı görülmektedir. Ancak 72. saatte RTN'nin 10 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonundaki parazit sayısı diğer konsantrasyonlara kıyasla daha fazladır ve aynı saatte 25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda keskin bir düşüş görülmüştür. 72. saatte 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonların daha düşük konsantrasyonlara göre parazit sayısındaki artışı önlediği belirlenmiştir. 96. saatte ise 250, 500, 750 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda 72. saate göre parazit sayısında oldukça düşüş görülmektedir.



Şekil 6.10 Farklı konsantrasyonlardaki RTN'nin *L. infantum* promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri (24, 48, 72 ve 96. saat)

Şekil 6.11'de farklı konsantrasyonlarda RTN-PLGA NP'lerine maruz kalan gruplarda, tüm saatlerde RTN-PLGA NP'lerinin kontrole kıyasla parazit sayısını azalttığı görülmüştür.

Ayrıca RTN-PLGA NP'lerinin 50 µg/ml ve daha yoğun olan tüm konsantrasyonları 72. saatte, *L. infantum* promastigotlarının % canlılık değerlerini kontrole kıyasla %50'nin altına düşürdüğü görülmektedir. RTN-PLGA NP'leri 96. saatte *L. infantum* promastigotlarının proliferasyonunu 100 µg/ml ve daha yoğun olan tüm konsantrasyonlarında 4 ila 6 kat arasında azaltmıştır.



Şekil 6.11 Farklı konsantrasyonlardaki RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin % canlılık değerleri (24, 48, 72 ve 96. saat)

6.3 Farklı Konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* Promastigot Kültüründe MTT Yöntemi ile IC₅₀ Değeri Üzerinden Antileishmanial Etkinliklerinin Belirlenmesinin Sonucu

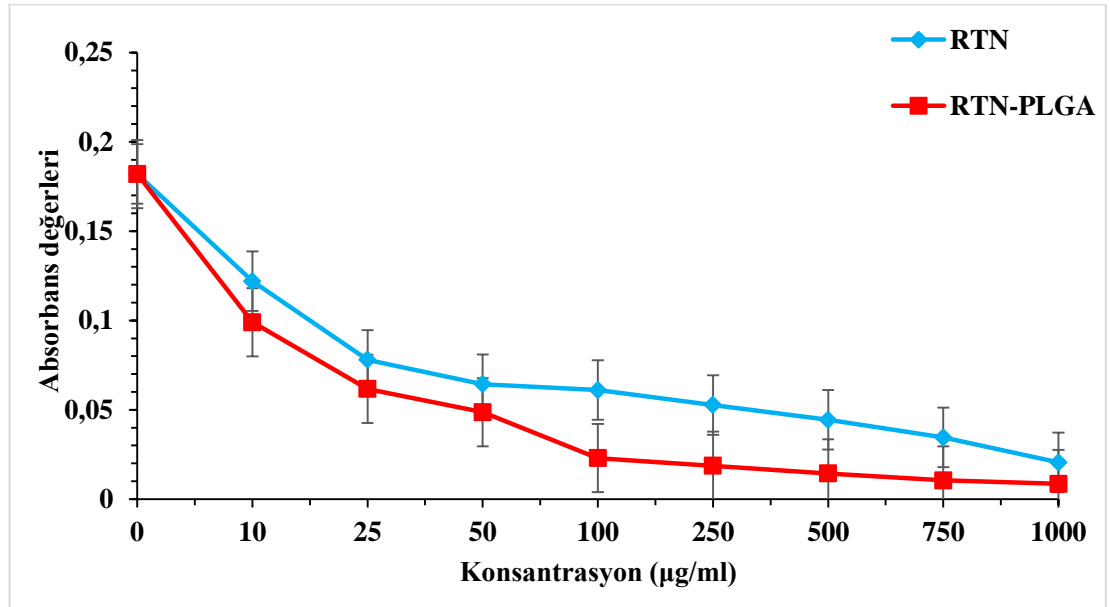
Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda hazırlanmış olan *L. infantum* parazitlerine farklı konsantrasyonda eklenen RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin antileishmanial etkinlikleri MTT yöntemiyle belirlendi. MTT yönteminde yapılan tüm analizler negatif kontrol olan etken uygulanmamış parazitler ile karşılaştırıldı.

MTT analizi, RTN'nin *L. infantum* promastigotlarını değerlendirmek için kullanıldı. Parazitler 96 oyuklu plakalar içerisinde kültürlendi.

İşlemden 24 saat sonra MTT solüsyonu, kültür içindeki hücelere ilave edildi ve plaka 4 saat 27°C'de inkübe edildi. Son olarak, formazan boyasını çözmek için DMSO eklendi. Emilim 540 nm'de ölçüldü. Bu ölçüm *L. infantum* promastigotlarının ekiminden sonra 24., 48., 72., ve 96. saatlerde tekrarlandı.

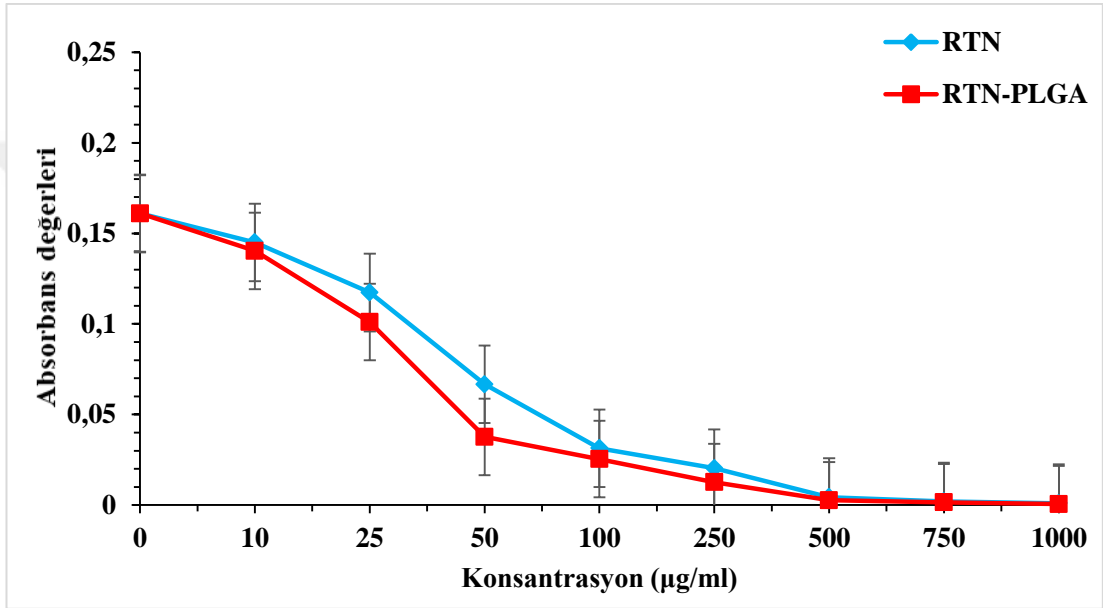
24., 48., 72. ve 96. saatlerde farklı konsantrasyonlardaki RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotlarının antileishmanial etkinliklerinin MTT yöntemi ile absorbands değerleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçların grafikleri Şekil 6.12, 6.13, 6.14, 6.15, 6.16, 6.17'de verilmiştir. Ayrıca mikroplağın MTT solüsyonu eklenmeden önceki ve sonraki görüntüleri Şekil 6.18'de gösterilmiştir.

Şekil 6.12'de, RTN ve RTN-PLGA NP'lerine maruz kalan *L. infantum* parazitlerinin 24. saatteki absorbands değerleri verilmiştir. Grafiğe göre, RTN ve RTN-PLGA NP'leri konsantrasyonlarında parazitlerin canlılık oranlarının anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir. Bununla beraber RTN-PLGA NP'leri konsantrasyonlarında canlılığın her konsantrasyon için RTN'ye kıyasla daha da azaldığı tespit edilmiştir. RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin 10, 25, 50 ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarında absorbands değerleri, konsantrasyon arttıkça büyük oranda düşüş göstermiştir. Şekilde görüldüğü gibi RTN'nin 100, 250 ve 500 µg/ml'lik konsantrasyonlarının etkisi olsa da RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotları üzerinde daha yüksek oranda antileishmanial etkinlik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.



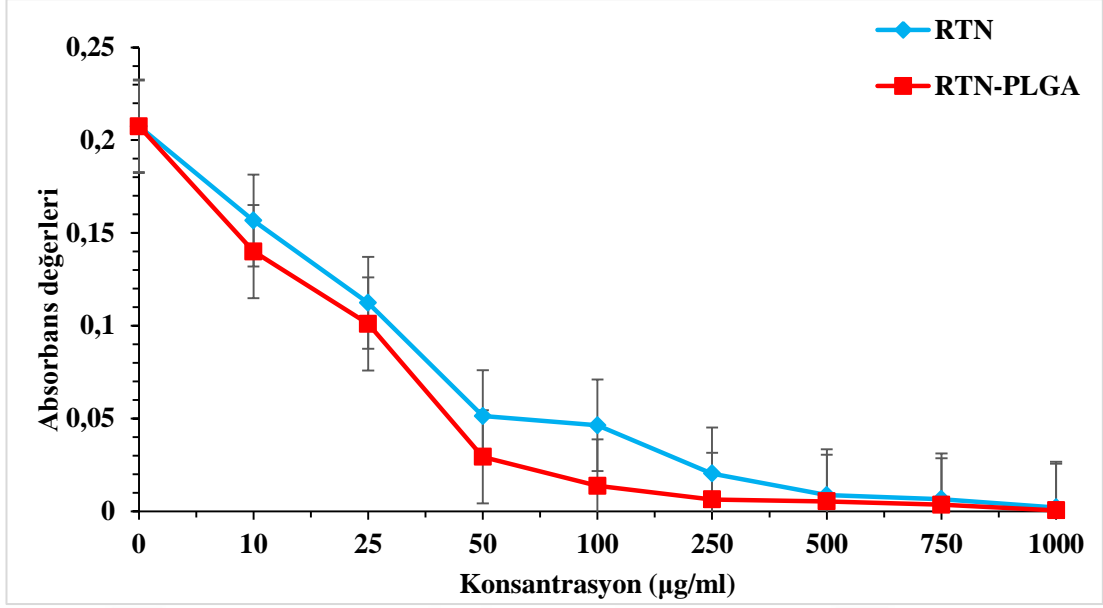
Şekil 6.12 Farklı konsantrasyonlarda RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotları üzerinde antileishmanial etkinliğinin % canlılık değerleri (24. saat)

Şekil 6.13'te, RTN ve RTN-PLGA NP'lerine maruz kalan *L. infantum* parazitlerinin 48. saatteki absorbans değerleri verilmiştir. Grafiğe göre hem RTN hem RTN-PLGA NP'lerinin tüm konsantrasyonlarında parazitlerin absorbans değerlerinin konsantrasyon arttıkça azaldığı gözlenmiştir. RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin 500, 750 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarında absorbans değerlerinin, diğer konsantrasyonlara kıyasla büyük oranda düştüğü görülmüş olup RTN-PLGA NP'lerinin absorbans değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür.



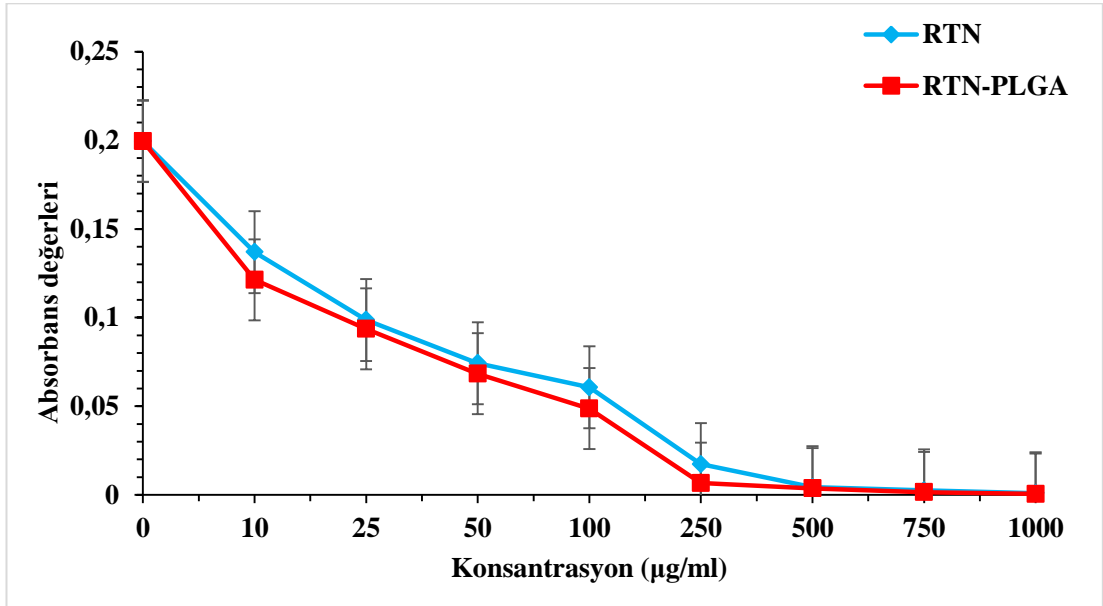
Şekil 6.13 Farklı konsantrasyonlarda RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotları üzerinde antileishmanial etkinliğinin % canlılık değerleri (48. saat)

Şekil 6.14'te RTN ve RTN-PLGA NP'lerine maruz kalan *L. infantum* parazitlerinin 72. saatteki absorbans değerleri verilmiştir. Grafiğe göre hem RTN hem RTN-PLGA NP'lerinin tüm konsantrasyonlarında parazitlerin absorbans değerlerinin konsantrasyon arttıkça azaldığı gözlenmiştir. RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin 100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarında absorbans değerleri, büyük oranda düşüş göstermiştir. RTN-PLGA NP'lerinin 100 µg/ml konsantrasyonuna maruz kalan parazitlerin absorbansı düşük konsantrasyonlara kıyasla büyük fark göstermiştir.



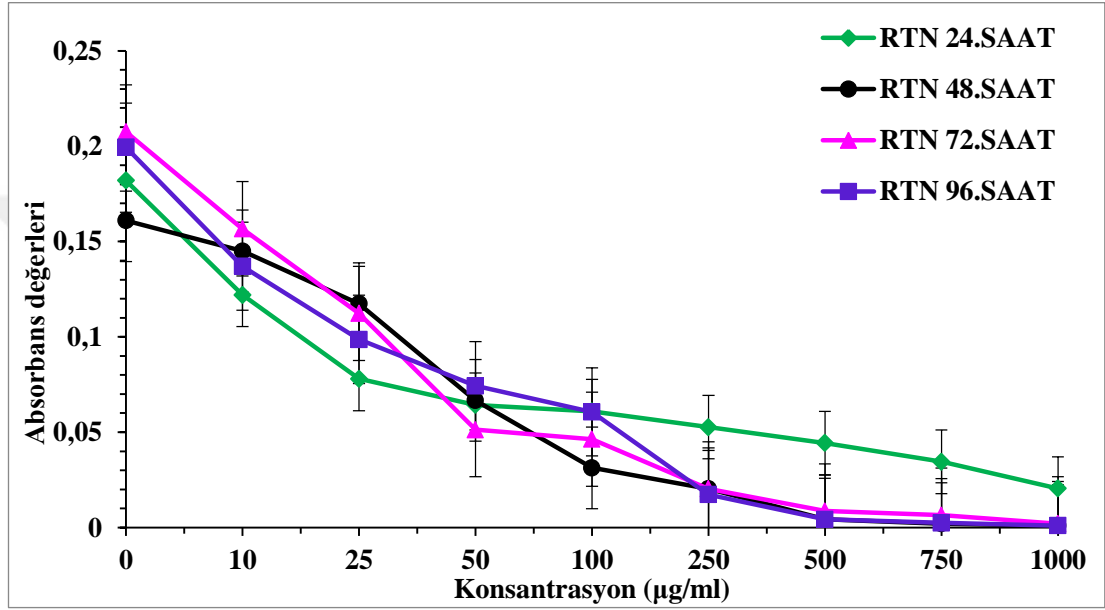
Şekil 6.14 Farklı konsantrasyonlarda RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotları üzerinde antileishmanial etkinliğinin % canlılık değerleri (72. saat)

Şekil 6.15'te görüldüğü gibi, RTN ve RTN-PLGA NP'lerine maruz kalan *L. infantum* parazitlerinin 96. saatteki absorbans değerleri verilmiştir. Grafiğe göre hem RTN hem RTN-PLGA NP'lerinin tüm konsantrasyonlarında parazitlerin absorbans değerlerinin konsantrasyon arttıkça azaldığı gözlenmiştir. RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarında absorbans değerlerinin, 0,0005 ila 0,006 arasında değiştiği görülmüştür.



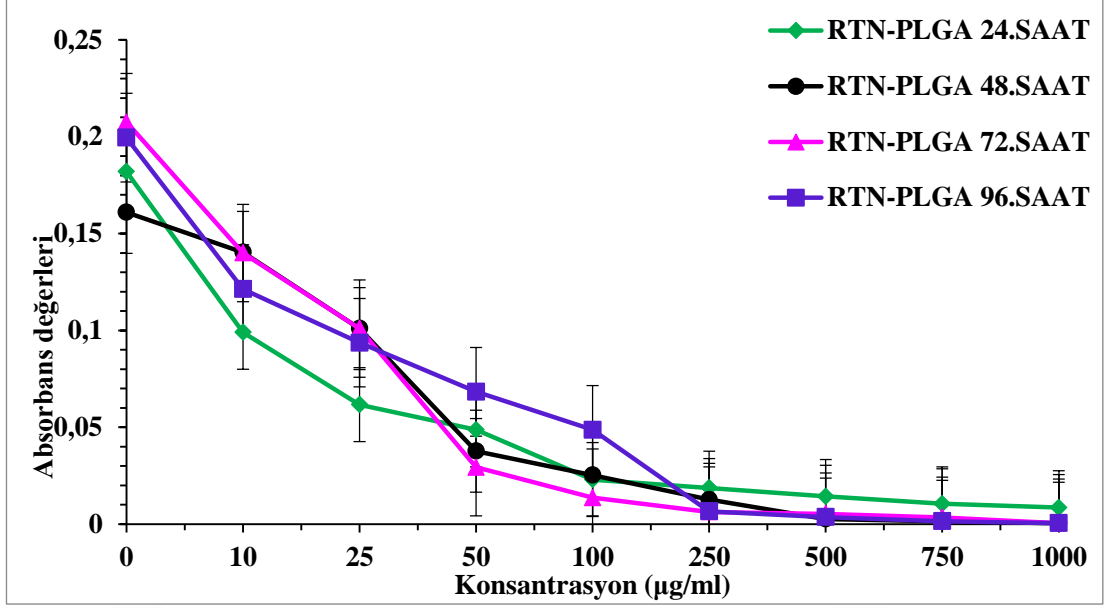
Şekil 6.15 Farklı konsantrasyonlarda RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotları üzerinde antileishmanial etkinliğinin % canlılık değerleri (96. saat)

Şekil 6.16'da görüldüğü gibi, farklı konsantrasyonlarda RTN'ye maruz kalan *L. infantum* promastigotları 24., 48., 72. ve 96. saatlerde tüm konsantrasyonlarda birbirine yakın oranda absorbands göstermiştir. 24. saatte 250, 500, 750 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda etkinlik diğer günlere kıyasla daha azdır. 48, 72 ve 96. saatte, 250, 500, 750 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda absorbands değerleri çok azalmıştır.



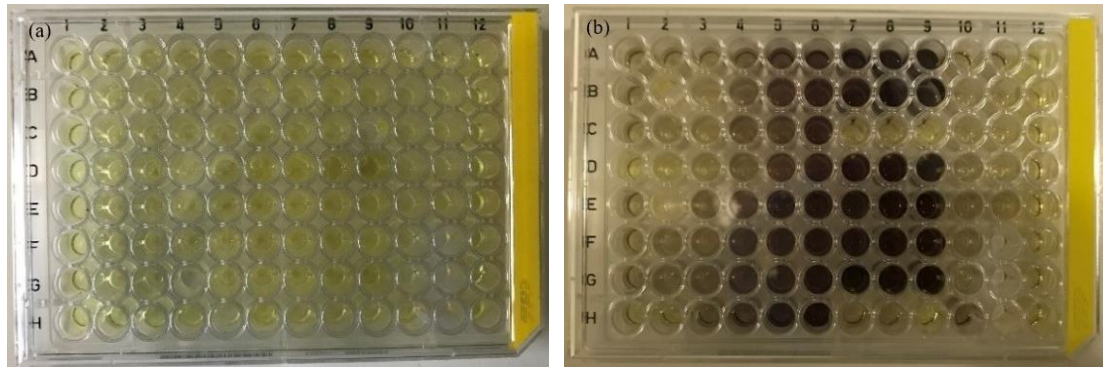
Şekil 6.16 Farklı konsantrasyonlarda RTN'nin *L. infantum* promastigotları üzerinde antileishmanial etkinliğinin 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki % canlılık değerleri

Şekil 6.17'de görüldüğü gibi, 96. saatte 10 ve 25 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda RTN-PLGA NP'lerine maruz kalan *L. infantum* promastigotlarının absorbands değerlerinin, 24. saatte azalmasından sonra 48. saatte artış göstermesi sonrasında 72. ve 96. saatlerde giderek düştüğü gözlenmiştir. 250, 500, 750 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda tüm saatlerde absorbands değerleri birbirine çok yakındır. RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin absorbands değerlerinin, kontrole nazaran büyük ölçüde azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 6.17 Farklı konsantrasyonlarda RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotları üzerinde antileishmanial etkinliğinin 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki % canlılık değerleri

Farklı konsantrasyonlarda RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigot kültürü üzerine MTT solüsyonu eklenmeden önceki ve sonraki görüntüleri Şekil 6.18'de verilmiştir. 6.18 (b)'de MTT solüsyonu eklenip 4 saat bekletildikten sonra mor renkli formazan kristallerinin oluştuğu görülmektedir.



Şekil 6.18 (a) RTN ve RTN-PLGA'ya maruz kalan *L. infantum* promastigot kültürünün MTT solüsyonu eklenmeden önceki ve (b) sonraki mikropalak görüntüleri

Tüm örneklerin IC₅₀ değerleri, promastigotların yarısını inhibe eden konsantrasyonun bulunmasıyla belirlendi [117]. %50 İnhibe Edici Konsantrasyon (IC₅₀), bir molekülün spesifik bir biyolojik veya biyokimyasal fonksiyonu inhibe etme potansiyelinin bir ölçümüdür. Kesin olarak, bu kantitatif ölçüm, belirli bir biyolojik prosesi (veya bir prosesin bileşenini, yani bir enzim, hücre, hücre reseptörü veya mikroorganizmayı) yarı yarıya azaltmak için belirli bir ilacın veya başka bir maddenin (inhibitör) ne kadarının gerekli olduğunu göstermektedir [118]. *Leishmania* canlılığının %50'sini inhibe etmek için gereken konsantrasyon, test edilen konsantrasyonlar kullanılarak bir konsantrasyon-cevap eğrisinin sigmoidal regresyonu uygulanarak belirlenmiştir [119]. IC₅₀ inhibitör konsantrasyonu, doğrusal regresyon analizi veya enterpolasyon kullanılarak hesaplandı (Microsoft Office Excel 2003) [120].

Örneklerin *L. infantum* promastigotlarının antileishmanial etkinlikleri, uygulamalar sonrası IC₅₀ değerlerine göre karşılaştırıldı. Buna göre, farklı konsantrasyonlardaki RTN uygulanan örneklerde, *L. infantum* promastigotlarının IC₅₀ değerinin $29,2 \pm 4,5$ µg/ml olduğu belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda RTN-PLGA NP'leri uygulanan örneklerde ise, *L. infantum* promastigotlarının IC₅₀ değerinin $23,0 \pm 2,7$ µg/ml olduğu belirlenmiştir.

Bu değerler doğrultusunda RTN-PLGA NP'lerinin, RTN'ye kıyasla *L. infantum* promastigotları üzerindeki IC₅₀ değeri ile yüksek antileishmanial etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tüm saatlerdeki tüm konsantrasyonlarda RTN-PLGA NP'leri RTN'ye kıyasla *L. infantum* promastigotları üzerinde daha kararlı antileishmanial etkinlik göstermiştir. MTT deneylerinde besiyeri ve MTT gibi etkenlerin olmasına rağmen antileishmanial etkinlikleri konsantrasyon arttıkça % canlılık azalarak kararlı bir yapı göstermiştir.

7. TARTIŞMA

Leishmaniasiste etkili yeni ilaçlar aramanın temel kriterleri, mevcut tedavi yöntemlerine kıyasla nispeten daha düşük yan etkilerin yanı sıra ilaçların etkinliğidir. Yıllar boyunca pentavalent antimonlar kademeli olarak direnç geliştirdiğinden yeni terapötik alternatifler daha da arzu edilmektedir. Farmasötik endüstrisinin göreceli enerjisi nedeniyle, mevcut antileishmanial ilaçların terapötik yapısı sınırlı kalmaktadır [11].

Çeşitli tıbbi ilaçların ve suda çözünen veya çözünmeyen hassas biyoaktif moleküllerin, biyolojik olarak emilimlerini artırarak terapötik etkisini arttırdığı bildirilmektedir. Bu nedenle etken maddeler nanotaşıyıcılara enkapsüle edilerek daha etkin ve kontrollü bir ilaç dağıtımını elde eder ve hücre zarları içinden etkili bir geçiş sağlar [105].

Bir flavanol olan RTN molekülü, birçok hastalığı tedavi etme kapasitesinden ötürü sık araştırılmakta ve kullanılmaktadır. Literatürde daha önce RTN molekülü PLGA NP'lerinin içerisine enkapsüle edilerek *L. infantum* promastigotları üzerinde çalışılmamıştır. Geniş bir yelpazede araştırma yapılabilecek olan RTN'nin literatürde antileishmanial etkinliğinin araştırılmamasından dolayı bu molekül seçilmiştir.

Bu tez çalışmasında ilk kez *L. infantum* promastigotlarında, leishmaniasis tedavisinde kullanılması amacıyla RTN ve RTN-PLGA NP'leri araştırılmış ve *L. infantum* promastigotları üzerine RTN ve RTN-PLGA NP'leri eklenmiş ve örneklerde canlılık değerlendirilmiştir. Bu amaçla şimdiye kadar hiç çalışılmamış olan bu deneylerde nanokapsüllemenin etkisi literatürdeki araştırmaları desteklemektedir. Deneylerde, RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotlarının proliferasyonuna etkisinin thoma lamında sayım yapılmasıyla ve RTN-PLGA NP'lerinin *in vitro* antileishmanial etkinliklerinin MTT yöntemiyle incelendi. Her iki yöntemde elde edilen sonuçlar doğrultusunda hem % canlılık değerlerinde hem de absorbans değerlerinde konsantrasyon arttıkça azalma görüldü. Böylece deneylerde elde edilen sonuçların birbirine uyumlu olduğu anlaşıldı.

Son yıllarda *Leishmania* parazitleri, dünyanın çeşitli endemik bölgelerinde mevcut ilaçlara karşı direnç gelişmiştir. Literatürde hastaların standart antileishmanial tedaviye cevap vermediğini bildiren birçok çalışma vardır [25].

Mevcut antileishmanial ilaçlar çok pahalıdır ve ciddi yan etkilere sebep olmaktadır. Ayrıca birkaç *Leishmania* türünün mevcut antileishmanial tedavilere direnç geliştirdiği bilinmektedir. Bu nedenle, daha etkili, daha az toksik ve hastalıktan en çok etkilenen yoksul topluluğun erişebileceği yeni terapötik stratejiler geliştirmek için yoğun bir ihtiyaç bulunmaktadır [40]. Potansiyel toksisite ve ortaya çıkan ilaç direnci, yeni oral tedavilerin araştırılmasını haklı kılmaktadır [31]. Antileishmanial ilaçların bazı *Leishmania* parazit türlerine karşı etkisizliği rapor edilmiştir. Bu sınırlamalar nedeniyle, leishmaniasis için yeni ilaçlar ve protokoller araştırılmalıdır [52].

Doğa, arasında flavonoidlerin bulunduğu tıbbi öneme sahip bileşikler için sürekli gelişen bir kaynak olmaya devam etmektedir [47]. Kinonlar (lapakol), alkaloidler (berberin), fenolik türevler (kalkonlar, flavonoidler) ve terpenler dahil birçok doğal ürün araştırılmaktadır [13]. Kalkonlar, son on yılda antileishmanial aktivite ile tanımlanmış 330'dan fazla bileşiği olan biyolojik olarak aktif bir flavonoid sınıfıdır [31]. İlaç geliştirmeye yönelik stratejiler, yalnızca mevcut ilaçları optimize etmeye ve belirlenmiş hedefleri karakterize etmeye değil, aynı zamanda yeni ilaç adayları ve hedeflerini belirlemeye de odaklanmaya devam etmelidir [13].

Tıbbi bitki ekstraktları; antibakteriyel, antioksidan, antitümör, anti-inflamatuar ve antileishmanial etkinlikleri gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir. Tıbbi bitkilerden ekstrakte edilen polifenoller ve flavonoidler gibi fenolik bileşenler, ilaçların keşfinde önemli bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Bu bileşikler antileishmanial etkinlikler de dahil olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahiptirler [55].

Çeşitli flavonoidler içeren farklı yapısal sınıflardan bitki kaynaklı doğal ürünler antileishmanial adaylar olarak araştırılmıştır [50]. Bol miktarda diyet flavonları olan luteolin, kuersetin ve kuersitrin gibi çeşitli flavonoidler, bazı *Leishmania* türlerine karşı etkilidir [53]. Luteolin ve kuersetin flavonlarının *L. donovani* amastigotlarına; licochalcone A olarak tanımlanan kalkonların ise *L. donovani* amastigotlarına ve *L. majör* promastigotlarına karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone (DMC), *L. amazonensis*'in promastigotlarının ve hücre içi amastigotlarının büyümesini inhibe etmiştir. Meksika'da, yaklaşık 20 şifalı bitki, *L. mexicana* üzerinde değerlendirilmiştir [24].

Son on yılda, standart *in vivo* modeller kullanılarak, yerleşik antileishmanial ilaçlar ile karşılaştırılabilir etkinliklerine dayanarak, umut verici antileishmanial bileşikler bildirilmiştir [5].

Domingues Passero ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. major* ve *L. chagasi*'nin promastigot ve amastigot formlarının, *Baccharis Retusa*'dan saflaştırılmış flavonlara duyarlı olduğu belirtilmiştir. Bu veriler, bu cinsin Yeni Dünya'nın farklı parazit türlerine karşı potansiyelini göstermiş ve ayrıca bazı bileşiklerin immünomodülatör aktivitelerini önermiştir. *Ageratum conyzoides*'in (Asteraceae) ham özü ve saflaştırılmış flavonoidleri, *L. donovani* ve *T. cruzi* gibi farklı protozoonlara karşı etkili olduğu görülmüştür [61].

Biyoflavonoidler; kanser, alzheimer hastalığı, diyabet ve yaşlanmada terapötik potansiyel sergiler ve nano ilaçlar geliştirmek için kullanılmaktadır. Çözünürlük, stabilite, özgüllük ve sürekli teslimat durumlarını iyileştirmek için ligand etiketli nanopartikülleri içinde tutulurlar. Önemli bir bitki flavonoid olan RTN, iyi bilinen bir antioksidandır. RTN'nin, *in vitro* ve *in vivo* deneylerde güçlü bir anti-hiperglisemik ve anti-glikatör madde olduğu gösterilmiştir. Ayrıca RTN, diyabetik komplikasyonların yönetiminde önemli bir rol oynayabilir. Nanokapsüllenmiş RTN'nin verilmesi, etkinliğini daha da arttırabilir [121].

Chauhan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, RTN'nin toksisite profili, serumdaki; serum glutamik piruvik transaminaz, serum glutamik oksaloasetik transaminaz ve laktat dehidrogenaz gibi karaciğer enzimlerinin seviyelerinin ve üre, kan üre azotu, ürik asit ve kreatin gibi böbrek sağlığını ölçen enzimlerin seviyelerinin değerlendirilmesiyle test edilmiştir. RTN'nin güvenlik profili, THP-1 karşı hücre toksisite testi ile kanıtlanmıştır. RTN'nin CC₅₀ değeri, kabul edilebilir toksisite sınırında bulunmuştur. RTN'nin IC₅₀ değerinin düşük olması, konakçı için toksik olmayan konsantrasyonlarda hassas ve dirençli parazitlere karşı geniş etki yelpazesiyile, antimonlar gibi ticari olarak temin edilebilen ilaçlara dirençli leishmanial enfeksiyonları tedavi etmek için RTN kullanımının potansiyel olabileceği vurgulanmıştır [38].

RTN'nin IC₅₀ değerlerinin, *L. donovani*'nin duyarlı promastigotları üzerinde $12.64 \pm 0,86 \mu\text{g/ml}$ ve dirençli promastigotlarına üzerinde $13.07 \pm 1,42 \mu\text{g/ml}$ olduğu bulunmuştur [38].

Bu tez çalışmasında, RTN'nin IC₅₀ değerinin *L. infantum* promastigotları üzerinde 29,2 ± 4,5 µg/ml olarak bulunduğu göz önüne alındığında, *L. infantum* promastigotları üzerinde, *L. donovani* promastigotları üzerinde kullanılan RTN konsantrasyonuna kıyasla, yaklaşık 2 katı kadar kullanılması durumunda aynı antileishmanial etkinlik gösterdiği görülmektedir.

Literatürde kuersetin, luteolin ve fisetin gibi bazı flavonoidlerin, IC₅₀ değerlerinin 0,6 ila 0,8 µg/ml aralığında olması ile yüksek antileishmanial aktiviteye sahip olduğu gösterilmektedir. Rutin, kuersetin ve isokuersetin gibi flavonoid glikozitlerde antileishmanial aktivite göstermiştir. Flavonoid kalkanlarının, *Leishmania* parazitlerinin büyümesini önlemede yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [107].

Chen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, kalkanların parazitin mitokondrinin alt yapısını tahrip edebileceğini ve mitokondriyal solunum ve mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesini, özellikle de parazitin spesifik fumarat redüktazının aktivitesini inhibe edebildiği gösterilmiştir [107].

Daha iyi leishmanial ajanlar için yapılan araştırmada, nanobiyoteknoloji tıp alanında büyük dikkat çeken nano ölçekli materyallerin geliştirilmesinde büyük ilgi görmektedir. Bu nanomalzemeler; kataliz, kozmetik ve ilaç dağıtım sistemleri dahil olmak üzere çeşitli disiplinlerdeki uygulamaları bulan benzersiz fizyokimyasal özelliklere sahiptir [40]. Nanoteknolojinin hızlı bir şekilde büyümesiyle, tıp bilimi uygulamaları için farklı nanoparçacıklar sunulmuştur. Nanomalzemeler benzersiz kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptir ve gelecekte farklı ciddi veya kronik hastalıkların tedavisinde kullanılması düşünülmektedir [52].

Chauhan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, RTN'nin, *L. donovani*'nin dirençli suşlarına karşı antileishmanial etkinlik gösterdiği ortaya konulmuştur. RTN'nin (25mg/kg) oral olarak verilmesi parazitlerin büyümesini engelleyebildiği ve toksik etkileri olmadan enfeksiyonu bastırabildiği gösterilmiştir. Böylece RTN'nin, konakçı lehine immün durumu iyileştirerek ve hem hassas hem de dirençli parazitlere karşı ROS ve nitrik oksit (NO) gibi mikrobiyosidal molekülleri üreterek parazit yükünü kontrol etme kapasitesine sahip olduğu kanıtlanmıştır [38].

NO; bakteri, mantar, parazit ve virüslerde konak savunmasında rol oynayan vücuttaki en önemli bağışıklığı etkileyen moleküllerden biridir. NO, hücre içi patojenleri öldürmek için sitokin üretimini ve makrofajları uyararak tekrar enfeksiyonlara bağışıklık tepkisini artırabilir [115].

de Medeiros ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, RTN yüklü mikropartiküllerin farelerde karragenan kaynaklı enflamatuar ağrıda mikrokapsüllenmemiş RTN'ye kıyasla analjezik etkinliği rapor edilmiştir. RTN yüklü mikropartiküller, mikrokapsüllenmemiş RTN'ye kıyasla daha hızlı etki ve artan analjezi sağlamıştır. Mikrokapsülleme, toplam etki süresini de arttırabilir. RTN yüklü mikropartiküller, mikrokapsüllenmemiş RTN'ye kıyasla daha hızlı analjezik etki göstermiştir [85].

Mauludin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda, oral olarak verilen RTN'nin emilimi, tabletler veya kapsüller gibi katı dozaj formlarına dahil edilebilecek bir nanokristal formülasyonu kullanılarak geliştirilebildiği gösterilmiştir [122, 123]. Nanokristal yaklaşım, belirli bir maddenin *in vivo* kinetik çözünürlüğünü, doyma çözünürlüğünü arttıran ve daha büyük bir yüzey alanı ve daha hızlı bir çözünme hızı sağlayan, boyutunun küçültülmesiyle kolaylaştırılması prensibine dayanmaktadır [124]. RTN nanokristallerinin, kinetik çözünürlükte düşük fakat uzun süreli ve çözünme hızında daha belirgin bir artış ile oral uygulama durumunda yayılımı ham ilaçtan daha etkili kılan özelliklere sahip oldukları doğrulanmıştır [122, 123].

da Silva ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *L. amazonensis* arginazın; hyperoside (quercetin-3-O-D-galactoside), guajaverin (quercetin 3-O- α -L-arabinoside), avicularin (quercetin 3-O- α -L-arabinofuranoside), RTN (quercetin-3-rutinoside), miquelianin (quercetin-3-glucuronide) ve rhamnetin (7-O-methylquercetin) tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir [4].

PLGA NP'leri; FDA onaylı olması, biyobozunur ve biyoyumlu olması ve düşük toksisiteye sahip olması nedeniyle nanopartiküler ilaç dağıtım sistemi için yaygın olarak kullanılan bir sentetik kopolimerdir. Biyoyumluluğun yanı sıra uzun süre kontrollü salımlara yol açan biyobozunur özelliklere bağlı olarak, PLGA NP'leri, özellikle bulaşıcı hastalıklara ve kansere karşı geniş çapta çalışılmıştır [113, 115, 125, 126].

PLGA NP'leri antikanser ve antihipertansif özelliğe sahip etken maddelerin taşınmasına yönelik araştırmalarda yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Etken maddeler, nanopartiküllerin yüzeyine bağlanmış veya içine hapsedilmiş halde bulunurlar [113, 125, 127, 128].

PLGA NP'lerinin en önemli özelliklerinden biri; peptidler, ilaçlar, proteinler gibi biyolojik olarak aktif moleküllerin biyouyumluluk ve biyoyararlanımını arttırmaktır. Çeşitli çalışmalarda, antijenik moleküllerin PLGA nanoparçacıklarına enkapsülasyonunun toksisitelerini azalttığı gibi biyoyararlanımlarını arttırdığı gösterilmiştir [115].

Leonarduzzi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, hamsterlarda antileishmanial ajan olarak kuersetin takviyesi için farklı veziküler doğum modelleri araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen türler arasında PLGA polimerlerinden hazırlanan mikrosferler ve polilaktid polimer yapımı nanokapsüller bulunmaktadır. Nanokapsüllerin diğer taşıyıcılara göre bir başka avantajı, yapılarında lipitlerin bulunmaması, dolaşan lipazların saldırısından kaçınılması ve böylece kapsüllenmiş ilacın daha fazla stabilitesinin sağlanması ve kan dolaşımında daha uzun süre kalmasıdır [79].

Abamor tarafından yapılan bir çalışmada, kuersetin yüklü NP'lerin boş NP'lere kıyasla daha büyük olması, kuersetin yüklü PCL NP'leri tarafından verimli ve etkili bir şekilde kapsüllenmesinin bir göstergesi olarak kabul edilebilmektedir. Daha önceki çalışmalarda, ilaç yüklü NP'lerin boş NP'lere kıyasla daha büyük olabileceği belirtilmiştir. Özellikle kanser araştırmalarında, 500 nm'den daha küçük taşıyıcı sistemlerin, ilaçları hedef dokulara ulaştırmada daha başarılı olduğu, dolayısıyla aktif taşıma sağladığı bulunmuştur [114].

Abamor tarafından yapılan bir çalışmada, parazitlerin, 5 µg/ml konsantrasyonunda boş PLGA NP'lerine maruz bırakıldıklarında, parazit kümelerinin canlılık ve metabolik aktivite belirtileri olan yüksek miktarda formazan kristalleri ürettiği görülmüştür. Bu, serbest NP'lerin, düşük konsantrasyonlarda uygulandığında *L. infantum* promastigotları üzerinde herhangi bir toksik etkiye yol açmadığını gösterilmiştir. Benzer şekilde, 50 µg/ml'ye ve 100 µg/ml serbest NP'ye maruz kalan *Leishmania* parazitleri, parazitlerin canlı olduğunu gösteren mor renkli formazan kristalleri ürettiği görülmüştür [117].

Parazitlerin 30 µg/ml'den yüksek konsantrasyonlara maruz kalması, makrofaj hücrelerinin canlılık değerlerini keskin bir şekilde azalttığı bildirilmiştir. IC₅₀ değerlerinden daha yüksek konsantrasyonlarda, makrofajların kompakt yapılarını yitirdiği açıkça gösterilmiş ve formazan kristallerinin üretmediği gözlenmiştir. Boş PLGA NP'leri, 500 ve 1000 µg/ml gibi yüksek konsantrasyonlar kullanıldığında bile sitotoksik etkiye neden olmadığı kanıtlanmıştır. Mikroskopik incelemeyle, PLGA NP'lerinin biyouyumluluğu da doğrulanmıştır. Çünkü farklı konsantrasyonlarda serbest NP'lere maruz kalan tüm test gruplarındaki makrofajların canlı olduğu ve yüksek miktarda formazan kristali ürettiği görülmüştür. Boş PLGA NP'leri, yüksek konsantrasyonlarda kullanılsa bile *L. infantum* amastigotlarında hiçbir antileishmanial aktivite göstermediği tespit edilmiştir [117].

Pandey ve arkadaşları, PLGA NP'lerinde, çeşitli antikanser ilaçların enkapsülasyonu ve *in vitro* ve *in vivo* olarak bildirildiği gibi başarılı şekilde iletilmesi için çeşitli literatürler mevcut olduğunu belirtmiştir. Bu bağlamda, literatürlerin, RTN kapsüllenmiş polimerik nanopartiküller için <100 nm'lik bir partikül boyutunun %39'luk ilaç yükleme kapasitesini gözlemlediğini bildirmiştir. Dahası, literatürler ayrıca RTN yüklü polimerik NP'lerin gelişmiş ilaç hedefli potansiyelini ve gelişmiş biyoyararlanımlarını da rapor etmiştir. RTN-PLGA NP tedavisi, endojen antioksidan seviyesini arttırdığı ve oksidatif stresi büyük ölçüde önlediği ve ROS üretim regülasyonunu düşürdüğü gösterilmiştir. RTN-PLGA NP'leriyle yapılan tedavinin oksidatif stres eylemine karşı geldiği ve kanserin ilerlemesini önlemek için kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir [12].

Ghosh ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, zayıf sulu çözünür oleanolik asidi (OA) yeterince tutabilen ve onu çok uzun sürede serbest bırakabilen OA yüklü PLGA-TPGS NP'leri hazırlanmıştır. İn vitro çalışma, D-α-Tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) stabilize OA yüklü PLGA NP'lerinin SSG'ye karşı dirençli *L. donovani* AG83 vahşi suşun amastigot formuna duyarlı olduğunu göstermiştir. Seçicilik indeksi cinsinden belirlenen *in vitro* antileishmanial aktivitenin, OA yüklü PLGA NP'leri için, vahşi tip suş durumunda saf OA'dan 25 kat daha seçici, SSG'ye karşı dirençli suş durumunda ise 8 kat daha seçici olduğu bulunmuştur. OA yüklü PLGA NP'lerinin formülasyonunun sitotoksitesisi, günümüzde leishmaniasis tedavisinde kullanılan AmB, SSG veya paromomisin gibi standart kemoterapötiklerden önemli ölçüde daha az olduğu görülmüştür [129].

İn vivo verileri yorumlayarak, OA'nın nanoformülasyonunun, *L. donovani* AG83 vahşi tipli amastigotun yükünü etkili bir şekilde baskılayabildiği bulunmuştur. OA'nın VL'ye karşı PLGA-TPGS NP'si içerisinde bir dağıtım sistemi olarak yakın zamanda kullanılabilmesi öne sürülmüştür [129].

Ghosh ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, andrographolide yüklü PLGA NP'leri, hücredeki ilaç toksisitesini azaltabildiği, *in vitro* antileishmanial aktivitesini koruduğu ve *L. donovani* ile enfekte olmuş BALB/c farelerinin dalağındaki serbest andrographolide ile karşılaştırıldığında, etkinliğini 8 ila 10 kat arttırdığı görülmüştür [51].

Abamor tarafından yapılan bir çalışmada, kuersetinin antileishmanial aktivitesinin, parazitlerin mitokondri ve hücre zarlarına zarar veren ve nükleik asit sentezini inhibe eden ROS üretimi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu özelliklerden dolayı, kuersetin ve kuersetin içeren özütler, güçlü antiparaziter maddeler olarak bilinmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, *L. infantum* promastigotları ve amastigotları üzerindeki kuersetin yüklü PCL NP'lerinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 86 ve 144 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Kuersetinin *L. infantum* promastigotları ve amastigotları üzerindeki IC₅₀ değerleri 149 ve 300 µg/ml olarak hesaplanmıştır. PCL NP'leriyle kapsüllenmiş kuersetinin antileishmanial aktivitesinin belirgin şekilde arttığını göstermektedir. Aynı zamanda, kuersetin yüklü PCL NP'lerinin *L. infantum* promastigotları üzerinde amastigotlardan daha etkili olduğu bulunmuştur [114]. Bu tez çalışmasında, RTN-PLGA NP'lerinin IC₅₀ değerinin *L. infantum* promastigotları üzerinde 23,0 ± 2,7 µg/ml olarak bulunduğu göz önüne alındığında, *L. infantum* promastigotları üzerinde kullanılan RTN-PLGA NP'lerinin konsantrasyonlarının kuersetin yüklü PCL NP'lerine kıyasla neredeyse 1/4 oranında kullanılarak aynı antileishmanial etkinlik gösterdiği görülmektedir. Ayrıca, RTN'nin IC₅₀ değerinin *L. infantum* promastigotları üzerinde 29,2 ± 4,5 µg/ml olarak bulunduğu göz önüne alındığında, *L. infantum* promastigotları üzerinde RTN konsantrasyonlarının kuersetine kıyasla yaklaşık 1/5 oranında kullanılarak aynı antileishmanial etkinlik gösterdiği görülmektedir. Özet olarak aynı konsantrasyonlarda kullanılan örnekler baz alındığında; RTN-PLGA NP'lerinin kuersetin yüklü PCL NP'lerine kıyasla ve RTN'nin kuersetine kıyasla daha fazla antileishmanial etkinlik gösterdiği görülmektedir.

Abamor ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, nanoformülasyon salma sistemlerinin karakterizasyonu ve belirlenmesinden sonra, çörek otu yağı (NSO) kapsüllenmiş PCL NP'lerinin *in vitro* *L. infantum* promastigotları ve amastigotları üzerindeki antileishmanial etkileri araştırılmıştır. Test edilen tüm formülasyonların, 192 saatlik inkübasyonda *L. infantum* promastigotlarının %80'inden fazlasını inhibe ettiği saptanmıştır. Ayrıca, yağ yüklü nanopartiküller, makrofajların enfeksiyon indekslerini önemli ölçüde baskılayarak, amastigotların çoğalmasını önlediği gösterilmiştir. NSO yüklü PCL NP'lerinin, herhangi bir bozulma olmadan sürekli yağ salımı yapma, biyoyararlanımı ve çözünürlüğü artırma ve *Leishmania* ile enfekte olmuş dokulara taşıyabilme potansiyeline sahip olduğu kanıtlanmıştır. NSO yüklü PCL NP'lerinin kullanılmasının serbest yağa kıyasla daha avantajlı olduğu bildirilmiştir. NSO kapsüllenmiş PCL NP'lerinin, *L. infantum* promastigotları ve amastigotları üzerinde kayda değer miktarda antileishmanial etkinliğe sahip yağ moleküllerinin sürekli ve artırılmış salınımını sağlayan, son derece başarılı kapsülleme etkinliklerine sahip sistemler olduğu gösterilmiştir [130].

Allahverdiyev ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, TiO₂@Ag nanopartiküllerinin (TiAg-NP) canlılık, metabolik aktivite ve konakçı hücrelerde hayatta kalma gibi biyolojik özelliklerini inhibe ederek *L. tropica* ve *L. infantum* parazitleri üzerinde antileishmanial etkileri olduğu gösterilmiştir. TiAg-NP'nin antileishmanial etkilerinin, görünür ışık nedeniyle arttığı ve iki türün hemen hemen tüm parazitlerinin, TiAg-NP'ne ve görünür ışığa maruz kalmasından dolayı azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca TiAg-NP'nün *L. infantum* parazitlerine karşı karanlıkta *L. tropica* parazitlerine göre daha etkili olduğunu göstermiştir. Ancak görünür ışık koşullarında, her iki türe karşı da benzer bir inhibe edici etki gözlenmiştir [131].

Abamor ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, TiAg-NP'nin ve meglumin antimonatın (MA) toksik olmayan konsantrasyonlarını içeren kombinasyonların *in vitro* ve *in vivo* antileishmanial aktiviteleri incelenmiştir. Kombinasyon uygulamaları, tek başına MA kullanımının aksine, *L. tropica* promastigotlarının proliferasyonlarını 2-5 kat azaltmış ve *L. tropica* amastigotlarının %80 ila %95 arasında değişen oranlarda inhibe edilmesine yol açtığı ve yüksek antileishmanial aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca kombinasyonların; parazitlerin metabolik aktivitelerini azalttığı, hücre ölümüne neden olduğu ve makrofajların parazitleri öldürmek için yoğun olarak NO üretmesi için uyardığı bulunmuştur [25].

Allahverdiyev ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Leishmania* parazitleri tarafından salgılanan eksozomların, leishmaniasisin gelişiminde, *Leishmania*'nın konağın makrofajında hayatta kalması, konağın bağışıklık sistemine direnci ve konağın bağışıklık sistemini tetiklemesindeki rolü üzerinde çalışılmıştır. Kimyasal yapıları nedeniyle izole edilmiş eksozomlar, leishmaniasis ve diğer bulaşıcı hastalıkların tedavisinde nanopartiküler taşıyıcı sistem olarak kullanılmak için büyük bir potansiyel olduğu bildirilmiştir [132].

Yukarıda belirtilen çalışmalarda, bu tez çalışmasında olduğu gibi, etken moleküllerin nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem içerisinde kullanılmasıyla daha fazla antileishmanial etkinlik göstererek daha iyi sonuçlar doğurduğunu gözlemledik. RTN, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler içerisinde kullanıldığında, RTN-PLGA NP'lerinin serbest RTN'ye kıyasla daha fazla antileishmanial etkinlik gösterdiği bu tez çalışmasında tespit edildi. Bu sonuç, önceki çalışmaları doğrular niteliktedir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, ilk kez olarak *L. infantum* promastigotları üzerinde RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *in vitro* antileishmanial etkinlikleri incelenmiştir.

RTN-PLGA NP'lerinin 1000 µg/ml'lik konsantrasyonda % canlılık değerini 10 kat azalttığı görülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda RTN ve RTN-PLGA NP'leri uygulanan örneklerde, *L. infantum* promastigotlarının IC₅₀ değerlerinin sırasıyla; 29,2 ± 4,5 µg/ml ve 23,0 ± 2,7 µg/ml olduğu belirlenmiştir. 48. saatte RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin 500, 750 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarında absorbans değerlerinin, diğer konsantrasyonlara kıyasla büyük oranda düştüğü görülmüş olup RTN-PLGA NP'lerinin absorbans değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar, Dünyada ilk kez olarak leishmaniasise karşı RTN flavonoidinin nanopartiküllenenek tedavide kullanılmasına dayalı yeni bir tedavi yaklaşımının geliştirilebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada RTN'nin ve RTN-PLGA NP'lerinin antileishmanial aktivitesi ile ilgili yararlı bilgiler sağlanmıştır. Bu bilgi leishmaniasis hastalığına karşı yeni ve daha etkili ajanların tasarlanması için bir araç olarak kullanılabilir.

Sonuç olarak, RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin *L. infantum* promastigotlarına karşı antileishmanial aktivitelerinin bulunduğu tespit edilmiştir. RTN ve RTN-PLGA NP'lerinin farklı konsantrasyonlarda, *L. infantum* promastigotlarına karşı etkili olduğu bu çalışma ile gösterilmiş olup, bu konuda yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacağına inanılmaktadır.

Bu çalışma, *L. infantum* promastigotları üzerinde RTN-PLGA NP'lerinin *in vitro* antileishmanial etkinliğinin RTN'ye kıyasla daha fazla olduğunu göstermiştir. Bu gibi bir antileishmanial etkinlik sonucunun bulunmasıyla ilaç olarak kullanılabilirliğinin araştırılması için ileride yapılacak *in vivo* çalışmalara rehber olacağı düşünülmektedir. Böylece leishmaniasisin mevcut tedavisine alternatif olarak kullanılması için, VL etkeni olan *L. infantum* promastigotları üzerinde RTN-PLGA NP'lerinin *in vivo* antileishmanial etkinlik deneylerinin yapılması önerilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız RTN'nin ve RTN-PLGA NP'lerinin antileishmanial etkinliğinden dolayı bu çalışma sonuçlarının *in vivo* modellerle geliştirilerek klinik çalışmalara basamak olması bakımından yararlı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. *Weekly epidemiological record*. WHO, 2016. **91**(22): p. 285-296.
2. Attioua, B., et al., *In vitro antiplasmodial and antileishmanial activities of flavonoids from Anogeissus leiocarpus (Combretaceae)*. *Int J Pharmaceut Rev Res*, 2011. **11**: p. 1-6.
3. Canım Ateş, S., *İstanbul'daki kan merkezlerinden elde edilen donör kan örneklerinde Leishmania parazitlerinin yeni mikrokültür yöntemi ve diğer yöntemler ile karşılaştırmalı incelenmesi*. Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2012.
4. da Silva, E.R., et al., *Dietary polyphenols Rutin, Taxifolin and Quercetin related compounds target Leishmania amazonensis arginase*. *Food & Function*, 2019.
5. Sen, R. and M. Chatterjee, *Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis*. *Phytomedicine*, 2011. **18**(12): p. 1056-1069.
6. Singh, N., et al., *Natural product based leads to fight against leishmaniasis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2014. **22**(1): p. 18-45.
7. Bakoyiannis, I., et al., *Phytochemicals and cognitive health: Are flavonoids doing the trick?* *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019. **109**: p. 1488-1497.
8. Ganeshpurkar, A. and A.K. Saluja, *The Pharmacological Potential of Rutin*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017. **25**(2): p. 149-164.
9. Silva, M.C.P.d., et al., *Antileishmanial and Immunomodulatory Effect of Babassu-Loaded PLGA Microparticles: A Useful Drug Target to Leishmania amazonensis Infection*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. **2018**: p. 1-14.
10. Kemme, M. and R. Heinzl-Wieland, *Quantitative Assessment of Antimicrobial Activity of PLGA Films Loaded with 4-Hexylresorcinol*. *Journal of Functional Biomaterials*, 2018. **9**(1): p. 4.
11. Makadia, H.K. and S.J. Siegel, *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier*. *Polymers*, 2011. **3**(3): p. 1377-1397.
12. Pandey, P., et al., *Implication of nano-antioxidant therapy for treatment of hepatocellular carcinoma using PLGA nanoparticles of rutin*. *Nanomedicine*, 2018. **13**(8): p. 849-870.
13. Yakovich, A.J., *Old targets and new beginnings: a multifaceted approach to combating Leishmaniasis, a neglected tropical disease*. The Ohio State University, Ohio, 2007.
14. Torres-Guerrero, E., et al., *Leishmaniasis: a review*. *F1000Research*, 2017. **6**: p. 750.
15. Avila, A., *Experimental study of the effects of green tea on improving the outcomes of BALB/c mice infected with Leishmania mexicana*. The University of Texas at El Paso, Department of Public Health Sciences, Texas, 2009.
16. Bañuls, A.-L., et al., *A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2016. **10**(3): p. e0004349.
17. Ahuja, K., et al., *Selective elimination of Leptomonas from the in vitro co-culture with Leishmania*. *Parasitology International*, 2015. **64**(4): p. 1-5.

18. Pal, D., *Characterization of Leishmania major β -Carbonic Anhydrase as a Potential Drug Target against Leishmaniasis*. Indian Institute of Science Education and Research Kolkata, Mohanpur, 2017.
19. Vakili, B., et al., *Proteome-scale identification of Leishmania infantum for novel vaccine candidates: A hierarchical subtractive approach*. Computational Biology and Chemistry, 2018. **72**: p. 16-25.
20. Kohl, K., et al., *Importance of polyphosphate in the Leishmania life cycle*. Microbial Cell, 2018. **5**(8): p. 371-384.
21. Hemida, M.M.S., *Identification of Antikinetoplastid Compounds from Psorothamnus Polydenius and P. Arborescens*. Ohio State University, Ohio, 2005.
22. Gossage, S.M., M.E. Rogers, and P.A. Bates, *Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle*. International Journal for Parasitology, 2003. **33**(10): p. 1027-1034.
23. Levinson, W.E., *Review of Medical Microbiology and Immunology 14E*. 2016: McGraw-Hill Education.
24. Gutiérrez-Rebolledo, G.A., S. Drier-Jonas, and M.A. Jiménez-Arellanes, *Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: An update*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2017. **10**(12): p. 1105-1110.
25. Abamor, E.S., et al., *Meglumine antimoniate-TiO₂@Ag nanoparticle combinations reduce toxicity of the drug while enhancing its antileishmanial effect*. Acta Tropica, 2017. **169**: p. 30-42.
26. WHO, *Community-driven programme is key to defeating visceral leishmaniasis in Bangladesh*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: https://www.who.int/leishmaniasis/news/Defeating_visceraleishmaniasis_in_Bangladesh/en/.
27. WHO, *The vector*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: <https://www.who.int/leishmaniasis/disease/vector/en/>.
28. Roussaki, M., et al., *Aurones: A Promising Heterocyclic Scaffold for the Development of Potent Antileishmanial Agents*. International Journal of Medicinal Chemistry, 2012. **2012**: p. 1-8.
29. Aydın Teke, T., et al., *Three Pediatric Cases of Leishmaniasis with Different Clinical Forms and Treatment Regimens*. Turkish Journal of Parasitology, 2015. **39**(2): p. 147-150.
30. WHO, *Vector control*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: <https://www.who.int/leishmaniasis/vector-control/en/>.
31. Sousa-Batista, A.J., et al., *Broad Spectrum and Safety of Oral Treatment with a Promising Nitrosylated Chalcone in Murine Leishmaniasis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2018. **62**(10).
32. WHO, *Cutaneous leishmaniasis*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: https://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniasis/en/.
33. Singh, N., M. Kumar, and R.K. Singh, *Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2012. **5**(6): p. 485-497.
34. WHO, *Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2016*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2016_with_imported_cases.pdf.

35. Harman, M., *Cutaneous Leishmaniasis*. Turkish Journal of Dermatology / Türk Dermatoloji Dergisi, 2015. **9**(4): p. 168-176.
36. Siefert, A.L., *Biomimetic Nanosystems Targeting Antigen-Presenting Cells for Improved Immunotherapeutics*. Yale University, Connecticut, 2015.
37. WHO, *Mucocutaneous leishmaniasis*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: https://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniasis/en/index1.html.
38. Chauhan, K., G. Kaur, and S. Kaur, *Activity of rutin, a potent flavonoid against SSG-sensitive and -resistant Leishmania donovani parasites in experimental leishmaniasis*. International Immunopharmacology, 2018. **64**: p. 372-385.
39. WHO, *WHO responds to visceral leishmaniasis outbreak in Kenya*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: https://www.who.int/leishmaniasis/news/WHO_responds_to_VL_outbreak_kenya/en/.
40. Ahmad, A., et al., *Isatis tinctoria mediated synthesis of amphotericin B-bound silver nanoparticles with enhanced photoinduced antileishmanial activity: A novel green approach*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2016. **161**: p. 17-24.
41. WHO, *Visceral leishmaniasis*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: https://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniasis/en/index2.html.
42. WHO, *Special conditions*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: <https://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/en/>.
43. WHO, *Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2016*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_VL_worldwide_2016_with_imported_cases.pdf.
44. WHO, *Neglected tropical diseases course now accessible via eLearning*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: https://www.who.int/neglected_diseases/news/NTD_course_now_accessible_via_eLearning/en/.
45. Lopes, V.V., et al., *IgG avidity index and complete blood count as biomarkers of clinical disease in naturally infected dogs with Leishmania infantum*. Vet Parasitol, 2018. **261**: p. 96-103.
46. WHO, *Epidemiological situation*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.
47. Ertabaklar, H., et al., *Comparison of Direct Microscopy, Culture and Polymerase Chain Reaction Methods for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis*. Mikrobiyoloji Bulteni, 2015. **49**(1): p. 77-84.
48. WHO, *Diagnosis, detection and surveillance*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: <https://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/en/>.
49. İçen, H., et al., *Diyarbakır bölgesindeki sahihsiz köpeklerde toxoplasmosis, leishmaniasis ve listeriosis seroprevalansı*. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2010. **34**(1): p. 6-10.
50. Grecco, S.d.S., et al., *In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from Baccharis retusa DC. (Asteraceae)*. Experimental Parasitology, 2012. **130**(2): p. 141-145.

51. Ghosh, P., S. Mondal, and T. Bera, *Preparation and Characterization of Andrographolide Nanoparticles for Visceral Leishmaniasis Chemotherapy: In Vitro and in Vivo Evaluations*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2016. **8**(12): p. 102.
52. Jebali, A. and B. Kazemi, *Nano-based antileishmanial agents: A toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis*. Toxicology in Vitro, 2013. **27**(6): p. 1896-1904.
53. Manjolin, L.C., et al., *Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in Leishmania (Leishmania) amazonensis infection*. Food Chemistry, 2013. **141**(3): p. 2253-2262.
54. de Paula, R.C., et al., *In vitro antileishmanial activity of leaf and stem extracts of seven Brazilian plant species*. Journal of Ethnopharmacology, 2019. **232**: p. 155-164.
55. Bouyahya, A., et al., *Antileishmanial potential of medicinal plant extracts from the North-West of Morocco*. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 2018. **7**(1): p. 50-54.
56. Robledo, S.M., et al., *Antileishmanial Effect of 5,3'-Hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanone of Picramnia gracilis Tul. (Picramniaceae) Fruit: In Vitro and In Vivo Studies*. Advances in Pharmacological Sciences, 2015. **2015**: p. 1-8.
57. Lezama-Dávila, C.M., et al., *A New Antileishmanial Preparation of Combined Solamargine and Solasonine Heals Cutaneous Leishmaniasis through Different Immunochemical Pathways*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016. **60**(5): p. 2732-2738.
58. Hammi, K.M., et al., *Antileishmanial activity of Moringa oleifera leaf extracts and potential synergy with amphotericin B*. South African Journal of Botany, 2019.
59. Dwivedi, P., et al., *Click inspired synthesis of antileishmanial triazolyl O-benzylquercetin glycoconjugates*. Glycoconjugate Journal, 2015. **32**(3-4): p. 127-140.
60. Ferreira, C., et al., *Resveratrol Is Active against Leishmania amazonensis: In Vitro Effect of Its Association with Amphotericin B*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014. **58**(10): p. 6197-6208.
61. Domingues Passero, L.F., et al., *Plants used in traditional medicine: extracts and secondary metabolites exhibiting antileishmanial activity*. Current clinical pharmacology, 2014. **9**(3): p. 187-204.
62. WHO, *Access to essential antileishmanial medicines and treatment*. [erişim tarihi 18.06.2019]. elektronik adresi: <https://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>.
63. Boelaert, M., et al., *The Diagnostic Accuracy of Serologic and Molecular Methods for Detecting Visceral Leishmaniasis in HIV Infected Patients: Meta-Analysis*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2012. **6**(5): p. e1665.
64. Yılmazlı, Ö., *Zingiber Officinale ve Nigella Sativa'nın Leishmania spp. Üzerine Anti-leishmanial Etkinliklerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2013.
65. Abamor, E.Ş., *Gümüş (Ag) ve titanyum dioksit (TiO₂) nanopartiküllerinin kütanöz leishmaniasis etkeni L. Tropica parazitleri üzerindeki antileishmanial etkilerinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2010.

66. Özbilgin, A., et al., *Comparison of culture media in the isolation and diagnosis of cutaneous leishmaniasis*. Vol. 4. 2010. 1038-1043.
67. Daneshbod, Y., et al., *Clinical, histopathologic, and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review*. Archives of pathology & laboratory medicine, 2011. **135**(4): p. 478-482.
68. Moritz, A., S. Prinzinger, and N. Bauer, *Canine visceral leishmaniasis: infectious agent, infection, clinical signs, diagnosis, therapy and prophylaxis - a review*. Kleintierpraxis, 2001. **46**(9): p. 533-547.
69. Allahverdiyev, A.M., et al., *A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2004. **70**(3): p. 294-297.
70. Sarkari, B., et al., *Performance of an ELISA and Indirect Immunofluorescence Assay in Serological Diagnosis of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Iran*. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2014. **2014**: p. 1-4.
71. Michel, G., et al., *Importance of worldwide asymptomatic carriers of Leishmania infantum (L. chagasi) in human*. Acta Tropica, 2011. **119**(2-3): p. 69-75.
72. Ates, S.C., et al., *Detection of antileishmanial antibodies in blood sampled from blood bank donors in Istanbul*. Future microbiology, 2012. **7**(6): p. 773-779.
73. Zeyrek, F.Y., M. Korkmaz, and Y. Ozbel, *Serodiagnosis of Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis (ACL) Caused by Leishmania tropica in Sanliurfa Province, Turkey, Where ACL Is Highly Endemic*. Clinical and Vaccine Immunology, 2007. **14**(11): p. 1409-1415.
74. Romero, L.I., et al., *Evaluation of serological assays based on a novel excreted antigen preparation for the diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Panama*. Journal of Microbiological Methods, 2004. **57**(3): p. 391-397.
75. Jensen, A.T.R., et al., *Serodiagnosis of Leishmania donovani infections: assessment of enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant L. donovani gene B protein (GBP) and a peptide sequence of L. donovani GBP*. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1999. **93**(2): p. 157-160.
76. Najafi, A., et al., *Evaluation of Diagnostic Tests for Visceral Leishmaniasis in Iran: A Meta-Analysis*. Journal of Microbiology and Infectious Diseases, 2019: p. 16-22.
77. Lewin, G., et al., *In vitro antileishmanial properties of new flavonoids against Leishmania donovani*. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2011. **1**(3): p. 168-171.
78. Frutos, M.J., L. Rincón-Frutos, and E. Valero-Cases, *Rutin*. 2019: p. 111-117.
79. Leonarduzzi, G., et al., *Design and development of nanovehicle-based delivery systems for preventive or therapeutic supplementation with flavonoids*. Current medicinal chemistry, 2010. **17**(1): p. 74-95.
80. Nishiumi, S., et al., *Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors*. Vol. 3. 2011. 1332-62.
81. Huang, Z., et al., *Effects of rutin and its derivatives on citrinin production by Monascus aurantiacus Li AS3.4384 in liquid fermentation using different types of media*. Food Chemistry, 2019. **284**: p. 205-212.

82. Hassan, F., et al., *Growth Performance, Antioxidant Capacity, Lipid-Related Transcript Expression and the Economics of Broiler Chickens Fed Different Levels of Rutin*. *Animals*, 2018. **9**(1): p. 7.
83. Hosseinzadeh, H. and M. Nassiri-Asl, *Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid*. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2014. **37**(9): p. 783-788.
84. Singh, S., et al., *Rutin protects t-butyl hydroperoxide-induced oxidative impairment via modulating the Nrf2 and iNOS activity*. *Phytomedicine*, 2019. **55**: p. 92-104.
85. de Medeiros, D.C., et al., *Preclinical Evaluation of Rutin-Loaded Microparticles with an Enhanced Analgesic Effect*. *ACS Omega*, 2019. **4**(1): p. 1221-1227.
86. Zhong, T., et al., *Polyphenol oxidase/gold nanoparticles/mesoporous carbon-modified electrode as an electrochemical sensing platform for rutin in dark teas*. *RSC Advances*, 2019. **9**(4): p. 2152-2155.
87. Yang, H., et al., *Rutin alleviates hypoxia/reoxygenation-induced injury in myocardial cells by up-regulating SIRT1 expression*. *Chemico-Biological Interactions*, 2019. **297**: p. 44-49.
88. Gęgotek, A., P. Rybałtowska-Kawałko, and E. Skrzydlewska, *Rutin as a Mediator of Lipid Metabolism and Cellular Signaling Pathways Interactions in Fibroblasts Altered by UVA and UVB Radiation*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. **2017**: p. 1-20.
89. Olaleye, M.T. and A.C. Akinmoladun, *Comparative gastroprotective effect of post-treatment with low doses of rutin and cimetidine in rats*. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2013. **27**(2): p. 138-145.
90. Deepika, M.S., et al., *A novel rutin-fucoidan complex based phytotherapy for cervical cancer through achieving enhanced bioavailability and cancer cell apoptosis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019. **109**: p. 1181-1195.
91. Qu, S., et al., *Rutin Attenuates Vancomycin-Induced Nephrotoxicity by Ameliorating Oxidative Stress, Apoptosis, and Inflammation in Rats*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018. **63**(1).
92. Peng, F., et al., *The application of deep eutectic solvent on the extraction and in vitro antioxidant activity of rutin from Sophora japonica bud*. *Journal of Food Science and Technology*, 2018. **55**(6): p. 2326-2333.
93. Agnieszka, G., et al., *Differences in rutin effect on membrane phospholipids in skin fibroblasts irradiated with UVA and UVB*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018. **124**: p. 568.
94. Gautam, R., et al., *Rutin attenuates intestinal toxicity induced by Methotrexate linked with anti-oxidative and anti-inflammatory effects*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016. **16**(1).
95. Wang, S., et al., *Rutin Inhibits Streptococcus suis Biofilm Formation by Affecting CPS Biosynthesis*. *Frontiers in Pharmacology*, 2017. **8**.
96. Can, Ö.D., et al., *New antidepressant drug candidate: Hypericum montbrettiextract*. *Natural Product Research*, 2011. **25**(15): p. 1469-1472.
97. Herrera-Ruiz, M., et al., *Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from Byrsonima crassifolia*. *Phytomedicine*, 2011. **18**(14): p. 1255-1261.
98. Machado, D.G., et al., *Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from Schinus molle L. in mice: Evidence for the involvement*

- of the serotonergic and noradrenergic systems. *European Journal of Pharmacology*, 2008. **587**(1-3): p. 163-168.
99. Nöldner, M. and K. Schötz, *Rutin is essential for the antidepressant activity of Hypericum perforatum extracts in the forced swimming test*. *Planta Medica*, 2002. **68**(07): p. 577-580.
 100. Du, B., et al., *Antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extracts of Hemerocallis Citrina and its potential active components*. *BMC complementary and alternative medicine*, 2014. **14**(1): p. 326.
 101. Dimpfel, W., *Rat electropharmacograms of the flavonoids rutin and quercetin in comparison to those of moclobemide and clinically used reference drugs suggest antidepressive and/or neuroprotective action*. *Phytomedicine*, 2009. **16**(4): p. 287-294.
 102. Saleh, A., et al., *Rutin and orlistat produce antitumor effects via antioxidant and apoptotic actions*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2018. **392**(2): p. 165-175.
 103. Chandra, Y.P. and A.H.M. Viswanathswamy, *Chemo Preventive Effect of Rutin Against N-Nitrosodiethylamine-Induced and Phenobarbital- Promoted Hepatocellular Carcinoma in Wistar Rats*. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2018. **52**(1): p. 78-86.
 104. Ganeshpurkar, A., et al., *Rutin exerts antiulcer effect by inhibiting the gastric proton pump*. *Indian Journal of Pharmacology*, 2013. **45**(4): p. 415.
 105. Roussaki, M., et al., *Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles*. *Polymer Degradation and Stability*, 2014. **108**: p. 182-187.
 106. Ahmad, A., et al., *Silver and gold nanoparticles from Sargentodoxa cuneata: synthesis, characterization and antileishmanial activity*. *RSC Advances*, 2015. **5**(90): p. 73793-73806.
 107. do Nascimento, T.G., et al., *Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity*. *Nanoscale Research Letters*, 2016. **11**(1).
 108. Derman, S., K. Kızılbey, and Z.M. Akdeste, *Polymeric nanoparticles*. *Sigma*, 2013. **31**: p. 107-120.
 109. Kızılbey, K., *Optimization of Rutin-Loaded PLGA Nanoparticles Synthesized by Single-Emulsion Solvent Evaporation Method*. *ACS Omega*, 2019. **4**(1): p. 555-562.
 110. Arasoğlu, T., et al., *Preparation, characterization, and enhanced antimicrobial activity: quercetin-loaded PLGA nanoparticles against foodborne pathogens*. *Turkish Journal of Biology*, 2017. **41**: p. 127-140.
 111. Derman, S., et al., *The Study Of Synthetic Peptide Loaded PLGA Nanoparticles Cytotoxicity In Vitro*. Vol. 26. 2017. 8.
 112. Costa Lima, S., et al., *In vitro evaluation of bisnaphthalimidopropyl derivatives loaded into pegylated nanoparticles against Leishmania infantum protozoa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012. **39**(5): p. 424-430.
 113. Kirik, T., *Farklı yöntemler kullanılarak rutin yüklü PLGA nanopartiküllerinin sentezi ve karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2018.
 114. Abamor, E.Ş., *A New Approach To The Treatment of Leishmaniasis: Quercetin-Loaded Polycaprolactone Nanoparticles*. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 2018: p. 1071-1082.

115. Derman, S., et al., *Preparation, characterization and immunological evaluation: canine parvovirus synthetic peptide loaded PLGA nanoparticles*. Journal of Biomedical Science, 2015. **22**(1).
116. Abamor, E.S., *Nanopartikül-Glukantim ve Nanopartikül-Nigella Sativa Yağ Kombinasyonlarının Leishmania Tropica'ya Karşı Antileishmanial Etkilerinin İn Vitro ve İn Vivo İncelenmesi ve Kütanoz Leishmaniasis'in Tedavisinde Yeni Yaklaşımların Geliştirilmesi*. Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2014.
117. Abamor, E.S., *Antileishmanial activities of caffeic acid phenethyl ester loaded PLGA nanoparticles against Leishmania infantum promastigotes and amastigotes in vitro*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2017. **10**(1): p. 25-34.
118. Bhattacharjee, A., et al., *Determination of half maximal inhibitory concentration of CaAl layered double hydroxide on cancer cells and its role in the apoptotic pathway*. Applied Clay Science, 2019. **168**: p. 31-35.
119. Mendonça, D.V.C., et al., *Poloxamer 407 (Pluronic® F127)-based polymeric micelles for amphotericin B: In vitro biological activity, toxicity and in vivo therapeutic efficacy against murine tegumentary leishmaniasis*. Experimental Parasitology, 2016. **169**: p. 34-42.
120. Morais-Teixeira, E.d., et al., *The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant Leishmania species of Brazil*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 2011. **106**(4): p. 475-478.
121. Bhattacharjee, A., K. Dhara, and A.S. Chakraborti, *Argpyrimidine-tagged rutin-encapsulated biocompatible (ethylene glycol dimers) nanoparticles: Synthesis, characterization and evaluation for targeted drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2016. **509**(1-2): p. 507-517.
122. Mauludin, R., R.H. Müller, and C.M. Keck, *Development of an oral rutin nanocrystal formulation*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **370**(1-2): p. 202-209.
123. Mauludin, R., R.H. Müller, and C.M. Keck, *Kinetic solubility and dissolution velocity of rutin nanocrystals*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **36**(4-5): p. 502-510.
124. Muller, R.H. and C.M. Keck, *Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles*. Journal of Biotechnology, 2004. **113**(1-3): p. 151-170.
125. Kumari, A., S.K. Yadav, and S.C. Yadav, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **75**(1): p. 1-18.
126. Muthu, M.S., et al., *PLGA nanoparticle formulations of risperidone: preparation and neuropharmacological evaluation*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2009. **5**(3): p. 323-333.
127. Bala, I., S. Hariharan, and M.R. Kumar, *PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art*. Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, 2004. **21**(5).
128. Bejjani, R.A., *Nanoparticles for gene delivery to retinal pigment epithelial cells*. Molecular Vision, 2005.
129. Ghosh, S., N. Kar, and T. Bera, *Oleanolic acid loaded poly lactic co- glycolic acid- vitamin E TPGS nanoparticles for the treatment of Leishmania*

- donovani* infected visceral leishmaniasis. International Journal of Biological Macromolecules, 2016. **93**: p. 961-970.
130. Abamor, E.S., et al., *Nigella sativa* oil entrapped polycaprolactone nanoparticles for leishmaniasis treatment. IET Nanobiotechnology, 2018. **12**(8): p. 1018-1026.
 131. Allahverdiyev, A.M., et al., *Investigation of antileishmanial activities of Tio2@Ag nanoparticles on biological properties of L. tropica and L. infantum parasites, in vitro*. Experimental Parasitology, 2013. **135**(1): p. 55-63.
 132. Allahverdiyev, A.M., et al., *A New Aspect Against Leishmaniasis: Exosomes Obtained from Immune Cells and Parasites*. The Journal of Advances in Parasitology, 2018. **5**(4).



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fulya KAHVECİOĞLU ÇETİN
Doğum Yeri : Üsküdar / İstanbul
Doğum Tarihi : 02.09.1988
e-posta adresi : fulya.kahvecioglu@yeniuyzyil.edu.tr
Adresi : Dumlupınar Mahallesi Şahika Sokak Güzin Sitesi 10B
Daire: 13 Kadıköy / İstanbul

Eğitim Bilgileri

Lise : Mehmed Bayazıd Lisesi (YDA) / Fen Bilimleri
Lisans : İstanbul Üniversitesi / Fizik
Yüksek Lisans : Marmara Üniversitesi / İşletme-Stratejik Marka
Yönetimi (Tezsiz)
Yabancı Dil ve Düzeyi : İngilizce (Upper Intermediate)
İş Deneyimi : İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Öğretim Görevlisi (2015 - Halen)