

**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KUTANÖZ LEİSHMANİASİS HASTALARINDA
SİTOKİN GEN POLİMORFİZMİ VE GENETİK
YATKINLIK**

Fatma Esin AYDIN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gönül ASLAN

MERSİN- 2016

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KUTANÖZ LEİSHMANİASİS HASTALARINDA
SİTOKİN GEN POLİMORFİZMİ VE GENETİK
YATKINLIK**

Fatma Esin AYDIN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gönül ASLAN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE TMAD (FEA) 2013-4 (DR) nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 47

MERSİN- 2016

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Prof. Dr. Gönül ASLAN danışmanlığında doktora öğrencisi Fatma Esin AYDIN tarafından hazırlanan “**Kutanöz Leishmaniasis Hastalarında Sitokin Gen Polimorfizmi ve Genetik Yatkınlık**” başlıklı çalışma aşağıdaki jüri tarafından ‘Doktora Tezi’ olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

27/06/2016

Prof. Dr. Gönül ASLAN
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı/Danışman

Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Burçin ÖZER
Mustafa Kemal Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Candan ÖZTURK
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Nuran DELİALİOLU
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 18.07.2016 tarih ve 2016/231 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Fehmi ATEŞ

TEŞEKKÜR

Öncelikle hayatımın diğer alanlarında olduğu gibi akademik hayatımda da ilgisini, yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bir akademisyen olarak kendisini örnek aldığım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN' a sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmamın her aşamasında sabırla yardımını ve desteğini hiç eksik etmeyen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER' e ve Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mahmut ÜLGER' e özellikle çok teşekkür ederim. Lisansüstü eğitimime katkılarından dolayı anabilim dalımızın diğer öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Prof. Dr. Nuran DELIALIOĞLU, Sayın Prof. Dr. Feza OTAĞ' teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmamın bulgularının değerlendirilmesi ve istatistiksel analizlerinin yapılması aşamasında katkılarından dolayı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN' e teşekkür ederim. Tez çalışmamızın hasta klinik örneklerinin toplanmasında emeği geçen T.C. Sağlık Bakanlığı Şanlıurfa Valiliği Remziye Erseven Şark Çıbanı Teşhis ve Tedavi Merkezi sorumlusu Sayın Mehmet Muratoğlu' na da teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez çalışmam sırasında da beni manevi olarak destekleyen tüm aileme ve sevgili eşim Kadir KIRIK' a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. KL Genel Tanım	4
2.2. KL Tarihçe	4
2.2.1. Eski Dünya (Doğu Yarımküre)'da KL.....	4
2.2.2. Yeni Dünya (Batı Yarımküre)'da KL	6
2.3. KL Etkenleri ve Özellikleri	7
2.3.1. <i>Leishmania</i> türleri	7
2.3.2. <i>Leishmania</i> Taksonomisi ve Sınıflandırılması.....	8
2.3.3. <i>Leishmania</i> Vektörleri.....	9
2.3.4. <i>Leishmania</i> Rezervuarları	10
2.3.5. <i>Leishmania</i> Morfolojisi	10
2.3.6. <i>Leishmania</i> Yaşam Döngüsü.....	11
2.4. KL Bulaş Yolları:	11
2.5. KL Epidemiyolojisi	12
2.5.1. Dünyada KL	13
2.5.2. Türkiye'de KL.....	13
2.5.3. KL ve Göç	14

2.6.	KL Klinik Tablo	15
2.7.	KL Klinik Tanı ve Belirtiler	15
2.8.	KL Tedavisi	17
2.8.1.	KL Tedavi Uygulamaları	18
2.8.2.	Diğer Tedavi Seçenekleri	19
2.9.	KL Parazitolojik Tanı	21
2.9.1.	KL Tanısında İnceleme Örneklerinin Alınması	22
2.9.2.	İnceleme Örneklerinin Boyanması	23
2.9.3.	İnceleme Örneklerinin Mikroskopisi	23
2.9.4.	Parazit Kültürü	24
2.9.5.	KL Laboratuvar Tanı Akış Şeması	25
2.10.	KL Korunma ve Kontrol	26
2.11.	KL İmmünolojisi	29
2.11.1.	KL İmmünopatogenez	29
2.11.1.1.	Parazit-vektör ilişkisi ve immünopatogenez	29
2.11.1.2.	Vektör-memeli konak ilişkisi ve immünopatogenez	30
2.11.1.3.	Parazit- memeli konak ilişkisi ve immünopatogenez	30
2.11.2.	KL' ye Direnç ve Duyarlılık	35
2.11.3.	KL ve Aşı Çalışmaları	36
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1.	Hasta ve Sağlıklı Kontrol Grubunu Oluşturan Örnekler	38
3.2.	Kullanılan Araç ve Gereçler	38
3.2.1.	Kullanılan Cihazlar	38
3.2.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
3.2.3.	Kullanılan Boyalar ve Çözeltiler	41
3.3.	Yöntemler	42
3.3.1.	Parazitolojik Tanı Yöntemleri	42
3.3.2.	Moleküler Yöntemler	44
3.3.2.1.	Genomik DNA Ekstraksiyonu	44
3.3.2.2.	Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Belirlenmesi	45
3.3.2.2.1.	TNF- α Geni Promoter -308 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi	45

3.3.2.2.2.	IFN- γ Geni +874 T/A Tek Nükleotid Polimorfizmi	47
3.3.2.2.3.	IL-10 geni Promoter -1082 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi.....	50
3.3.2.2.4.	IL-12B p40 Geni 1188 A/C Tek Nükleotid Polimorfizmi.....	52
3.3.2.2.5.	IL-4 Geni Promoter -590 C/T Tek Nükleotid Polimorfizmi	55
3.3.2.3.	Agaroz Jel Elektrophorez İşlemi	59
3.3.2.4.	Tek Nükleotid Polimorfizmlerinden Sorumlu Gen Bölgelerinin Tespiti	60
3.3.3.	İstatistiksel Analiz	61
4.	BULGULAR.....	62
4.1.	Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının Genel Özellikleri	62
4.2.	Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları	63
4.2.1.	TNF- α Geni Promoter -308 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları.....	63
4.2.2.	IFN- γ Geni +874 T/A Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları.....	65
4.2.3.	IL-10 Geni Promoter -1082 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları.....	67
4.2.4.	IL-12B p40 Geni 1188 A/C Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları...	69
4.2.5.	IL-4 Geni Promoter -590 C/T Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları 71	
5.	TARTIŞMA.....	74
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	84
7.	KAYNAKLAR	89
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	96

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Leishmania</i> cinsinin subgenusları, kompleksleri ve bu komplekslere bağlı türler.....	8
Şekil 2.2. <i>Leishmania</i> vektörü <i>Phlebotomus papatasi</i> (dişi ve erkek kumsineği).....	9
Şekil 2.3. <i>Leishmania</i> parazitinin promastigot ve amastigot formları.....	10
Şekil 2.4. <i>Leishmania</i> parazitinin yaşam döngüsü.....	11
Şekil 2.5. Şark çıbanı tansısında alınabilecek örnekler ve tanı yöntemleri için akış şeması.....	26
Şekil 3.1. Tez çalışmasına dahil ettiğimiz bir çocuk hastanın sağ bacağına üzeri kurutlu KL lezyonu	43
Şekil 4.1. TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizminin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 184 bç'lik bölgenin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü	64
Şekil 4.2. IFN- γ geni +874 T/A tek nükleotid polimorfizminin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 261 bç'lik bölge ile insan büyüme hormonunun 426 bç'lik bölgesinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü	66
Şekil 4.3. IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid polimorfizminin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 550 bç'lik bölge ile insan büyüme hormonunun 426 bç'lik bölgesinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	67
Şekil 4.4. IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 233 bç'lik bölgenin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	69
Şekil 4.5. IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 233 bç'lik bölgenin <i>TaqI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonrası 233, 165 ve 68 bç'lik RFLP ürünlerinin %1.5'luk agaroz jelelektroforez görüntüsü.....	70
Şekil 4.6. IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen	

bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 254
bç'lik bölgenin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü.....71

Şekil 4.7. IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen
bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 254
bç'lik bölgenin *Bsm*FI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonrası 254 ve
210 bç'lik RFLP ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez
görüntüsü.....72



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. TNF- α geni promoter -308 G/A polimorfizmi ARMS PZR yönteminde kullanılan primer dizileri.....	45
Çizelge 3.2. TNF- α geni promoter -308 G/A polimorfizmi ARMS PZR reaksiyon karışımı.....	46
Çizelge 3.3. TNF- α geni promoter -308 G/A polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan ARMS PZR koşulları.....	47
Çizelge 3.4. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi ARMS PZR yönteminde kullanılan primer dizileri.....	47
Çizelge 3.5. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizminde kullanılan internal kontrol primer dizileri.....	48
Çizelge 3.6. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi ARMS PZR reaksiyon karışımı.....	49
Çizelge 3.7. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan ARMS PZR koşulları.....	49
Çizelge 3.8. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizmi ARMS PZR yönteminde kullanılan primer dizileri.....	50
Çizelge 3.9. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizminde kullanılan internal kontrol primer dizileri.....	50
Çizelge 3.10. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizmi ARMS PZR reaksiyon karışımı.....	51
Çizelge 3.11. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan ARMS PZR koşulları.....	52
Çizelge 3.12. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri.....	53
Çizelge 3.13. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi PZR reaksiyon karışımı.....	53
Çizelge 3.14. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları.....	54
Çizelge 3.15. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi RFLP reaksiyon karışımı.....	54

Çizelge 3.16. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi restriksiyonunda kullanılan RFLP koşulları.....	55
Çizelge 3.17. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri.....	56
Çizelge 3.18. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi PZR reaksiyon karışımı.....	56
Çizelge 3.19. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları.....	57
Çizelge 3.20. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi RFLP reaksiyon karışımı.....	58
Çizelge 3.21. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi restriksiyonunda kullanılan RFLP koşulları.....	58
Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının demografik özellikleri.....	62
Çizelge 4.2. Hasta grubunu oluşturan 55 kişinin tanısına göre demografik verilerin Karşılaştırılması.....	63
Çizelge 4.3. Hasta ve kontrol grupları arasında TNF- α geni promoter -308 G/A bölgesi tek nükleotid gen polimorfizmi allel ve genotip dağılımı	64
Çizelge 4.4. Hasta ve kontrol grupları arasında IFN- γ geni +874 T/A bölgesi tek nükleotid gen polimorfizmi allel ve genotip dağılımı	66
Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol grupları arasında IL-10 geni promoter -1082 G/A bölgesi tek nükleotid gen polimorfizmi allel ve genotip dağılımı	68
Çizelge 4.6. Hasta ve kontrol grupları arasında IL-12B p40 geni 1188 A/C bölgesi tek nükleotid gen polimorfizmi allel ve genotip dağılımı	70
Çizelge 4.7. Hasta ve kontrol grupları arasında IL-4 geni promoter -590 C/T bölgesi tek nükleotid gen polimorfizmi allel ve genotip dağılımı	73
Çizelge 6.1. Hasta ve kontrol grupları arasında IL-4 -590 C/T, TNF- α 308 G/A, IFN- γ +874 T/A, IL-10 -1082 G/A ve IL-12B p40 1188 A/C gen bölgeleri tek nükleotid polimorfizmleri allel ve genotip dağılımlarının karşılaştırılması	86

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ARMS	Amplification Refractory Mutational System
ASH	Antijen Sunucu Hücre
CD	Cluster od Designation
DH	Dendritik Hücre
DKL	Diffüz Kutanöz Leishmaniasis
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFN-γ	İnterferon Gamma
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz
KL	Kutanöz Leishmaniasis
MHC	Major Histocompatibility Complex
MKL	Mukokutanöz Leishmaniasis
NK	Natural Killer Doğal Öldürücü
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
NO	Nitrik Oksit
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PKDL	Post Kala azar Dermal Leishmaniasis
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SF	Serum Fizyolojik
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Th	T helper
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
VL	Viseral Leishmaniasis

ÖZET

Kutanöz Leishmaniasis Hastalarında Sitokin Gen Polimorfizmi ve Genetik Yatkınlık

Kutanöz Leishmaniasis (KL) tüm dünyada yayılım gösteren paraziter bir enfeksiyon hastalığıdır. KL enfeksiyonlarına yakalanmada konağın genetik yatkınlığı önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmanın amacı bazı sitokin gen bölgelerinde görülen tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) KL'ye genetik yatkınlıkla ilişkisini belirlemektir.

Çalışmaya Şanlıurfa ilinde yaşayan 55 KL hastası ve 110 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. TNF- α promoter - 308 G/A, IFN- γ +874 T/A, IL-12B p40 1188 A/C, IL-10 promoter -1082 G/A and IL-4 promoter -590 C/T gen bölgelerindeki SNP'leri saptamak için periferik kan örneklerinden ekstrakte edilen genomik DNA 'Polimerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism- (PCR-RFLP)' ve 'Amplification Refractory Mutational System-PCR (ARMS-PCR)' yöntemleri ile genotiplendirilmiştir.

Hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında, TNF- α promoter -308 G/A ve IL-4 promoter -590 C/T SNP'leri allel (TNF- α : $p < 0.001$, IL-4: $p: 0.004$) ve genotip (TNF- α : $p=0.001$, IL-4: $p: 0.001$) dağılımlarında anlamlı bir farklılık saptanırken IFN- γ +874 A/T, IL-12B p40 1188 A/C ve IL-10 promoter -1082 G/A SNP'leri allel (IFN- γ : $p= 0.414$, IL12: $p= 0.93$, IL-10: $p=0.148$) ve genotip (IFN- γ : $p= 0.133$, IL12: $p=0.86$, IL-10: $p < 0.001$) dağılımlarında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmaya göre TNF- α 308 G/A ve IL-4-590 C/T SNP'leri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde KL'ye genetik yatkınlıkla ilişkili bulunmuştur. Sitokin gen polimorfizmlerinin KL'ye genetik yatkınlıkla ilişkisi ile ilgili Türkiye'de herhangi bir yayının bulunmaması ve diğer ülkelerde de çok az sayıda yayın yapılmış olması nedeniyle daha geniş popülasyonlarla yapılmış daha fazla sayıda çalışma önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kutanöz leishmaniasis, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12, Polimorfizm, SNP

ABSTRACT

Cytokine Gene Polymorphisms in Cutaneous Leishmaniasis Patients and Genetic Susceptibility.

Cutaneous Leishmaniasis (CL) is a global parasitic infectious disease. The host's genetic susceptibility play an important role in CL. The aim of this study is to determine the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in certain cytokine genes and genetic susceptibility to CL.

A total 55 CL patients and 110 healthy controls living in Sanliurfa provinence were included in this study. Genomic DNA extracted from peeripheral blood samples were genotyped by 'Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism- (PCR-RFLP)' and 'Amplification Refractory Mutational System- PCR (ARMS-PCR)' methods for detection of SNPs at TNF- α promoter - 308 G/A, IFN- γ +874 T/A, IL-12B p40 1188 A/C, IL-10 promoter -1082 G/A and IL-4 promoter -590 C/T gene loccus.

A significant difference was noted in the allele (TNF- α : $p < 0.001$, IL-4: $p = 0.004$) and genotype (TNF- α : $p = 0.001$, IL-4: $p = 0.001$) frequencies of the TNF- α promoter -308 G/A and IL-4 promoter -590 C/T SNPs between patients and controls. However, no significant difference was noted in the allele (IFN- γ : $p = 0.414$, IL12: $p = 0.93$, IL-10: $p = 0.148$) or genotype (IFN- γ : $p = 0.133$, IL12: $p = 0.86$, IL-10: $p < 0.001$) frequencies of the IFN- γ +874 A/T, IL-12B p40 1188 A/C and IL-10 promoter -1082 G/A SNPs between patients and controls.

In conclusion, this study indicates that SNPs at TNF- α 308 G/A and IL-4-590 C/T are significantly associated with susceptibilty to CL. As there is no published data in Turkey and only a few publications from other countries on association of cytokine gene polymorphisms and genetic susceptibility to CL further investigations with larger populations are recommended.

Key words: Cutaneous Leishmaniasis, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12, Polymorphism, SNP

1. GİRİŞ

Kutanöz Leishmaniasis (KL) ; tüm dünyada yayılım gösteren, zorunlu hücre içi protozoon parazitlerinden *Leishmania* cinsine türlerin neden olduğu, vektör enfekte dişi kum sineklerinin ısırmasıyla hayvanlardan insanlara veya insanlardan insanlara bulaşan, genellikle deriyi ve bazen de mukozaları tutan, tedavi ile veya kendiliğinden iyileşebilen, ömür boyu bağışıklık bırakan paraziter bir enfeksiyon hastalığıdır (1) .

KL etkeni tek hücreli protozoon parazitlerinin *Kinetoplastida* takımı, *Trypanosomatidae* ailesinde yer alan *Leishmania* cinsine ait türlerdir. Memelileri enfekte eden 30 farklı *Leishmania* türü bulunmaktadır. Bu türlerden 21'i insanlarda enfeksiyonlara neden olmaktadır (2) . Ülkemizde en çok *L. tropica*, nadiren *L. major* ve *L. infantum* türleri, KL enfeksiyonuna yol açarlar (1).

Leishmania cinsi parazitlerin yaşam döngülerinde morfolojik olarak amastigot ve promastigot olmak üzere iki yaşam formu vardır. Amastigot formu memeli konakta görülen kamçısız ve hareketsiz formudur. Promastigot formu ise vektörde veya laboratuvarında kültür ortamında görülen kamçılı ve hareketli formudur (1, 3) .

Leishmania parazitlerini bulaştıran vektörler kum sineği adı verilen *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* cinsi sineklerdir. Bu sineklerin dişileri insanları ve bazı omurgalı hayvanların kanını emerek beslenirken parazitleri insanlara bulaştırırlar (1, 4) .

Kum sineğinin ısırması sonucu insan derisine geçen promastigotlar ısırtık yarasındaki makrofajlar ve mononükleer fagositik hücreler içerisinde amastigot formlara dönüşürler. Amastigotlar bölünerek çoğalırlar ve diğer mononükleer fagositik hücreleri enfekte ederler. Kan emme sırasında tekrar kum sineğine geçen amastigotlar promastigotlara dönüşürler ve başka insanlara ve ya memeli hayvanlara bulaştırılırlar (2) .

KL, ülkemizde halk arasında “Şark Çıbanı, Antep Çıbanı, Halep Çıbanı, Yıl Çıbanı, Güzellik Yarası” gibi farklı isimlerle bilinmektedir. KL; genellikle sinek

ısırmasına daha fazla maruz kalan, vücudun giysilerle örtülmeyen baş, boyun, kol ve bacak gibi açıkta kalan kısımlarındaki deride, bazen de mukozalarda, deride bir iz bırakarak kendiliğinden iyileşebilen bir deri hastalığıdır (5) .

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından altı önemli tropikal hastalıktan biri olarak kabul edilen Leishmaniasis, başta Afrika, Asya ve Latin Amerika kıtaları olmak üzere toplam 98 ülkede endemik olarak görülmekte ve 310 milyon insan bu enfeksiyona karşı risk altındadır. Her yıl yaklaşık 2 milyon yeni enfeksiyon bildirilmektedir. Tüm dünyada her yıl yaklaşık 300. 000 yeni Viseral Leishmaniasis (VL) vakası bildirilirken 1.2 milyon yeni KL vakası bildirilmektedir (6)

Ülkemizde 7 coğrafik bölgede hem VL hem de KL görülmektedir. Türkiye’de VL enfeksiyonlarından *L. infantum* sorumludur ve en çok Ege, Akdeniz ve İç Anadolu bölgelerinde sporadik olarak bildirilmektedir. KL ise en çok Güneydoğu Anadolu bölgesinde daha sonra Akdeniz Bölgesi’nden bildirilmiştir (7).

KL ülkemizde bildirim zorunlu bir hastalık olup Sağlık Bakanlığı verilerine göre Türkiye’de 1990-2014 yıllarında 53.847 KL olgusu saptanmış bu olguların büyük çoğunluğu Şanlıurfa ilinden ,daha sonra sırasıyla Adana, Osmaniye, Hatay, Diyarbakır, İçel ve Kahramanmaraş illerinden bildirilmiştir (8).

KL ayrıca Türkiye’nin İran ve Suriye gibi komşularında da halen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Suriye’de yaşanan savaştan kaçarak ülkemize sığınan ve sayıları 2 milyonu aşan mülteciler başta KL olmak üzere birçok bulaşıcı hastalığın ülkemize taşınması riskini ortaya çıkarmıştır. Türkiye’de 2013 yılında 2.268 yerli ve 2000’den fazla Suriyeli KL olgusu rapor edilmiştir (8).

KL ile mücadelede kombine müdahale stratejileri gerektirir. Zoonotik leishmaniasisin kontrolünde rezervuar konakların kontrolü önemli iken, antropotik leishmaniasiste ise olguların saptanması, sürveyans ve uygun tedavisi önemlidir. Rezervuarlara ve vekörlere yönelik olarak yerleşim alanları ve çevresinde sineklerle ve kemirgenlerle mücadele edilmelidir. Tedavide seçilmesi gereken birincil ilaç beş değerlikli antimon bileşikleridir. Hastalığın kontrolünde aşılama önemlidir fakat dünyada henüz etkili ve lisanslı bir KL aşısı yoktur (5,8).

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de halen önemli bir halk sağlığı sorunu olan KL’nin insanlarda enfeksiyona neden olması birçok faktöre bağlı

olabilmektedir. Bu faktörlerden birisi de konağın genetik yatkınlığıdır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda akut ve kronik birçok enfeksiyon hastalığının konağın genetik yapısının etkisi ile ortaya çıktığına işaret eden bulgular gittikçe artmaktadır. Enfeksiyöz ajanlara karşı konak immün yanıtını belirleyen birçok gende tek nükleotid polimorfizmleri (Single Nucleotide Polymorphism=SNP) saptanmıştır (9) .

KL'ye konağın genetik yatkınlığını saptamada öncelikli olarak hücrel immün yanıtta kilit rol oynayan sitokinleri kodlayan gen bölgelerindeki SNP'leri araştırmak önemli olmaktadır. Bu çalışmada, KL'ye immün yanıtta kilit rol oynadığı düşünülen çeşitli sitokinlerin salınımdan sorumlu gen bölgelerinde saptanan tek nükleotid polimorfizmlerinin KL'ye genetik yatkınlıkla ilişkisini belirlemek amaçlanmıştır. Bunun için; KL hastaları ve sağlıklı kontrol grubundan alınan tam kan örneklerinden izole edilen DNA örnekleri "Amplification Refractory Mutational System- Polimerase Chain reaction (ARMS-PCR) " ve "PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism-(PCR-RFLP) " yöntemleriyle analiz edilmiş, TNF- α geni promoter -308 G/A, IFN- γ geni +874 T/A, IL-12B p40 geni - 1188 A/C, IL-10 geni promoter -1082 G/A, IL-4 geni promoter -590 C/T bölgelerinde tek nükleotid polimorfizm varlığı araştırılmış, bulgular istatistiksel analizlerle değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KL Genel Tanım:

KL; tüm dünyada yayılım gösteren, zorunlu hücre içi protozoon parazitlerinden *Leishmania* cinsine ait türlerin neden olduğu, enfekte dişi kum sineklerinin ısırmasıyla hayvanlardan insanlara veya insanlardan insanlara bulaşan, genellikle deriyi ve bazen de mukozaları tutan, tedavi ile veya kendiliğinden iyileşebilen, ömür boyu bağışıklık bırakan vektör kaynaklı bir paraziter enfeksiyon hastalığıdır (1).

2.2. KL Tarihçe:

2.2.1. Eski Dünya (Doğu Yarımküre)'da KL:

KL oldukça eski bir hastalıktır. Hastalığın deride görülen formu olan KL lezyonlarını tanımlayan belgelere ilk kez M.Ö. 7. yüzyılda Asur Kralı Ashurbanipal' in kütüphanesinde bulunan taş tabletlerde rastlanmıştır. Bu tabletlerdeki bilgilerin ise M.Ö. 1500-2500' den kalma olabileceği düşünülmüştür. M.Ö. 2000'li yıllarda Mısır'da yazılmış tıbbi metinler içeren Ebers Papirüslerinde "Nil Çıbanı" olarak da bu hastalıktan bahsedilmiştir. 10.yy'da yaşamış olan İranlı hekim İbn-i Sina(Avicenna) Afganistan'ın kuzeyinde yaşayan hastalarda gördüğü bu hastalığı Belh Yarası (Balkh Sore) olarak tanımlamıştır. 10. yüzyılda "Şark Çıbanı, Doğu Yarası (Oriental Sore)" olarak bilinen KL, görüldüğü ülke veya bölgeye göre farklı isimler almıştır. Türkiye'de "Şark Çıbanı, Antep Çıbanı, Yıl Çıbanı, Suriye'de Halep Çıbanı, Afganistan'da "Balk Yarası", Türkmenistan'da "Penjdeh Yarası", Hindistan'da "Delhi Çıbanı", Irak'da "Bağdat Çıbanı" olarak adlandırılmıştır. Hindistan'da bu hastalığın iç organları tutan öldürücü formu olan VL ise "Kala-Azar (Kara Ateş)" olarak bilinmekteydi. 1756 yılında Alexander

Russell Türk bir hastayı klinik olarak tanımlamış ve günümüzde ülkemizde şark çıbanı olarak bilinen bu hastalığa “Halep Çıbanı” adını vermiştir. 1885 yılında Hindistan Ordusu’nda hekim olarak görev yapan David Douglas Cunningham “Delhi Çıbanı” olarak isimlendirdiği hastalığı mantar hastalığı olarak nitelendirmiştir. 1898 yılında Rus Ordusu hekimlerinden Peter Borovsky, Özbekistan’ın Taşkent Hastanesi’nde görev yaparken hastalığın etkeni olan paraziti keşfetmiş ve hastalığa “Doğu Yarası” adını vermiştir. 1903 yılında, İskoç Ordusu doktor olarak görev yapan William Leishman, Hindistan’da “dum-dum ateşi” adı verilen hastalığa yakalanmış bir askerin dalağında gördüğü cisimcikleri *Trypanosoma* parazitleri olarak isimlendirmiştir. Aynı yıl, Hindistan’da Madras Üniversitesi’nde profesör olarak görev yapan Charles Donovan, benzer hastaların dalağından aynı paraziti gözlemlemiş, bu parazitlerin *Trypanosoma* olmadığını belirtmiştir. Bundan sonra bu parazitler “Leishman-Donovan cisimcikleri” olarak isimlendirilmiştir. Bu parazitleri *Leishmania* cinsi içerisinde tanımlamasıyla parazite artık “*Leishmania donovani*” ismi verilmiştir. Parazite ilk önce “*Piroplasma donovani*” adı verilmiş ancak daha sonra İngiliz Hekim Dr. Ronald Ross’un “*Leishmania*” cinsini tanımlamasıyla kala azar etkeni “*Leishmania donovani*” adını almıştır. Önceleri Dr. Ross parazitin bir sporozoan olduğuna inanırken, 1904 yılında Leonard Rogers paraziti besiyerinde üretilen kamçılu formunu ortaya koyunca, parazitin hemoflagellat olduğu açıklık kazanmıştır. 1908’de Nicole ve Compté de aynı paraziti Tunus’da köpeklerde göstermiştir. Akdeniz Havza’sında yer alan ülkelerdeki Kala Azar’ın genellikle çocuklarda görülmesi nedeniyle, buradaki parazitin farklı olduğuna inanılarak “*Leishmania infantum*” adı verilmiştir. 1907’de Patton kala azarlı hastalardan beslenen tahtakurularının midesinde kamçılu protomastigotların geliştiğini gözlemlemiştir. Bu gözlem araştırmacıları vektörün araştırılmasında yanlış denemelere yönlendirmiş ve 12 yıldan daha fazla süre tahtakurusunun bulaşımındaki rolü araştırılmıştır. 1921 yılında *Leishmania* parazitlerinin *Phlebotomus* cinsi kum sinekleri tarafından insanlara bulaştığını ispatlayan ilk araştırmacılar ise Edouard ve Etienne adlı Sergent kardeşlerdir. Akdeniz ülkelerinde köpekler üzerinde beslenen pirelerin vektör olduğundan şüphelenilmiş fakat Nicolle ve Anderson(1924) pirelerin kendilerine özgü promastigotlara sahip olduklarını ve vektörlük yapmadıklarını

saptamışlardır. 1924’de Kala Azar komisyonu Sinton’un gözlemine dayanarak Hindistan’da hastalığın bulunduğu bölgeler ile belli bir tatarcık türünün (*Phlebotomus argentipes*) dağılımının örtüştüğünü bildirmiş ve Knowles, Napier ve Smith Kalkütta’daki kala azarın vektörü olarak tatarcık sinekleri hakkında epidemiyolojik deliller bulmuşlardır. Fakat tatarcıklar tarafından bulaşın gösterilmesinde zorluklar yaşanmıştır. 1939’da Smith, Haldar ve Ahmed, tatarcıklar bir kez kan emdikten sonra, tekrar kan emme yerine kuru üzüm üzerinde beslendiklerinde, taşıdıkları kamçılılıkların aşırı miktarda ürediğini ve pirelerdeki veba basiline olduğu gibi farinksi tıkadıklarını saptamışlardır. Bu araştırmacılar sonra bu tatarcıkları hamsterler üzerinde beslemişler ve hamsterların hepsinin enfekte olduğunu görmüşlerdir. KL’nin insana bulaşımı ise 1941’de gösterilmiştir. Adler ve Ber, gönüllü denekleri enfekte *Phlebotomus papatasi*’nin ısırmasını sağlamışlar ve onları *Leishmania major* ile enfekte etmişlerdir.1942’de ise Swaminath, Shortt ve Andersen, 6 gönüllünün enfekte *Phlebotomus argentipes*’in ısırmasıyla enfekte olduklarını göstermişlerdir (1, 10, 11,12).

2.2.2. Yeni Dünya (Batı Yarımküre)’ da Leishmaniasis:

Yeni Dünya’ da görülen KL vakaları da çok eski yıllara dayanmaktadır. Amerika kıtalarında, Ekvator ve Peru’da Inkalar öncesinden kalma M.S. 1. yy’ a ait çömlüklerin üzerinde resmedilmiş deri ve yüz lezyonları şekilleri KL’ye dair ilk kanıtlardandır. 15. ve 16. yüzyıla Inka dönemine ait bazı belgelerde lepra lezyonlarına benzer yaralar oluşturması nedeniyle KL lezyonlarının “beyaz lepra” veya “ vadi hastalığı (valley sickness)” ,“And Hastalığı (Andean sickness)” olarak adlandırıldığı bilinmektedir. 16 yy.’da İspanya’lı misyonerlerin yazdıkları metinlerde 5 yy.’dan kalma KL hastası insan heykellerinden bahsetmişlerdir. O zamanlarda Eski Dünya Leishmaniasis’i ile Yeni Dünya Leishmaniasisi’ nin aynı olduğu düşünülmekteydi. Ancak 1911 yılında Gaspar Vianna adlı araştırmacı Güney Amerika’daki türler ile Afrika ve Hindistandan’daki türlerin birbirinden farklı olduğunu keşfetmiş, Güney Amerika’daki bu yeni türe “*Leishmania braziliensis*” adı verilmiştir. 1895 yılında Moreira bu hastalığın varlığını keşfetmiş ve hastalığa “Biskra Nodülü” ismini vermiştir. 1895 yılında Breda, aynı hastalığı Brezilya’ya gidip İtalya’ya geri dönen göçmenlerde

tanımlamıştır. 1908 yılında Portekiz’de çok sayıda insanın bu hastalığa yakalandığı bildirilmiştir. Etkeni henüz keşfedilmese de bu hastalık o bölgede “Bauru ülseri, Kuzeydoğu Yarası, Keskin Yara” gibi isimlerle anılmıştır. 1909 yılında Adolfo Lindenberg bu hastalığa neden olan parazitin *Leishmania* paraziti olduğunu açıklamıştır. 1911 yılında Pedroso ve Dias da Silva, Bauru ülserli hastalardan paraziti izole etmiş ve laboratuvar ortamında “Neal, Nory ve Nicolle (NNN) Medium” adı verilen besiyerinde kültürünü yapmışlardır. 1922 yılında ilk kez Brezilya’da parazitin hayvan inokülasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 1922 yılında Yeni Dünya Leishmaniasis’inin vektörünün *Phlebotomus* türleri değil *Lutzomyia* cinsi kum sinekleri olduğu keşfedilmiştir. 1923 yılında bir insana deneysel olarak *Leishmania brasiliensis* paraziti inoküle edilmiştir. Son yıllarda ise Ralph Lainson ve arkadaşları tarafından keşfedilen türler çeşitli kompleksler içerisinde yeniden sınıflandırılmıştır (10, 13).

2.3. KL Etkenleri ve Özellikleri:

2.3.1. *Leishmania* türleri:

Memelileri enfekte eden 30 farklı *Leishmania* türü bulunmaktadır. Bu türlerden 21’i insanlarda enfeksiyonlara neden olmaktadır. İnsanları enfekte eden *Leishmania* türleri dört kompleks altında toplanmaktadır (2) ;

- ***L. donovani* kompleksi:** (*L.d. donovani*, *L.d. infantum*, *L.d. chagasi*)
- ***L. tropica* kompleksi:** (*L. t. tropica*, *L.t. minor*, *L.t. major*, *L.t. aethiopica*,)
- ***L. mexicana* kompleksi:** (*L.m. mexicana*, *L.m. amazonensis*, *L.m. venezuelensis*, *L. m. garnhami*, *L.m. pifanoi*)
- ***L. braziliensis* kompleksi:** (*L. b. braziliensis*, *L.b. guyanensis*, *L.b. panamensis*, *L.b. peruviana*, *L.b. lainsoni*, *L.b colombiensis*, *L.b. naiffi*, *L.b. shawii*)

VL’ye *L. donovani* kompleksi türleri neden olurken Mukokutanöz KL (MKL) etkenleri ise *L. mexicana* kompleksi ve *L.braziliensis* kompleksi türleridir. KL etkenleri Eski Dünya’ da *L. tropica* kompleksi ve *L. donovani* kompleksi, Yeni Dünya’da ise *L. mexicana* kompleksi türleridir (14, 15). Ülkemizde ise en çok *L.*

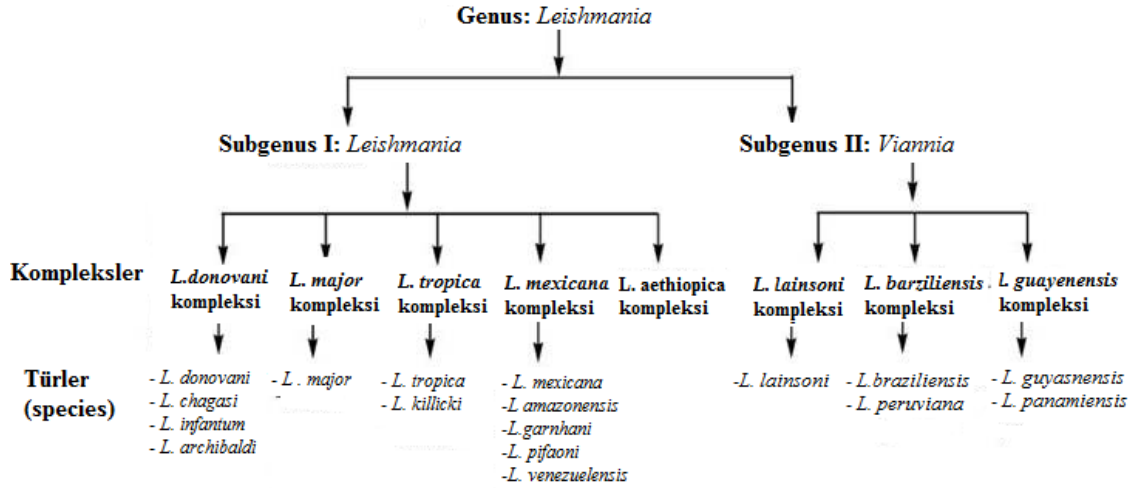
tropica türü, nadiren *L. major* ve *L.infantum* türleri KL enfeksiyonlarına neden olmaktadır (1) Ancak son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *L.major* türünün neden olduğu KL vaka sayılarının artmaya başladığı bildirilmiştir (16,17).

2.3.2. .Leishmania Taksonomisi ve Sınıflandırılması:

Leishmania türlerinin taksonomik sınıflandırılması aşağıdaki gibi kabul edilmektedir (18);

Alem (Kingdom):	Protista (Haeckel, 1866)
Altalem (Subkingdom):	Protozoa (Goldfuss, 1817)
Şube (Phylum):	Sarcomastigophora (Honigberg & Balamuth, 1963)
Altşube (Subphylum):	Mastigophora (Deising, 1866)
Sınıf (Class):	Zoomastigophora (Calkins, 1909)
Takım (Order):	Kinetoplastida (Honigber, 1963, Vickerman, 1976)
Aile (Family):	Trypanosomatidae(Doflein, 1901, Grobben, 1905)
Cins (Genus):	<i>Leishmania</i> (Ross, 1903)
Tür (species) :	<i>Leishmania</i> spp.

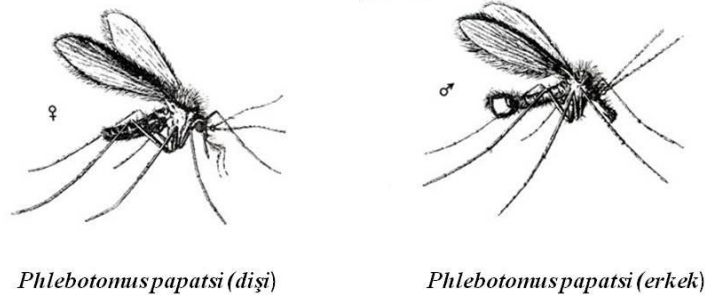
1987 yılında izoenzim ve moleküler markerlar kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalar değerlendirilmiş ve *Leishmania* cinsine ait türler *Leishmania* ve *Viannia* olmak üzere iki alt cins (subgenus) altında toplanmıştır (Şekil 2.1). Her bir subgenus komplekslere ayrılır ve her komplekste farklı türler bulunmaktadır (19,20).



Şekil 2.1. *Leishmania* cinsinin subgenusları, kompleksleri ve bu komplekslere bağlı türler (20).

2.3.3. *Leishmania* Vektörleri:

Leishmania parazitlerini bulaştıran vektörler “kum sineği” adı verilen sivrisineklerdir. Tropik ve ılıman iklimlerde yaşayan bu sineklerin dişileri omurgalı hayvanların kanını emerek beslenirler. Eski Dünya Leishmaniasis’ inin vektörü *Phlebotomus* cinsi kum sinekleri (Şekil 2.2) iken Yeni Dünya Leishmaniasis’inin vektörü ise *Lutzomyia* cinsi dişi kum sinekleridir . *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* cinsine ait 50 farklı kum sineği türünün insanlara paraziti bulaştırdığı bilinmektedir (1, 4, 21).



Şekil 2.2. *Leishmania* vektörü *Phlebotomus papatasi* (dişi ve erkek kum sineği) (22)

Enfekte rezervuar konak veya insandan kan emme yoluyla kum sineklerine geçen parazit, vektörün vücudunda morfolojik ve biyolojik olarak değişime uğramakta, vektörün tekrar kan emmek için bir omurgalıyı ısırması durumunda parazit yeni bir konağa geçmektedir (1).

Kum sinekleri ülkemizde halk arasında “tatarcık, yakarca, yakağan, güpdüşen” isimleriyle bilinmektedir (1). Ülkemizde yapılan çalışmalarda KL’in kesin vektörlerinin *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti* ve *Phlebotomus tobbi* türleri olduğu bildirilmiştir (23,24).

Phlebotomus’lar gün batımı ile gün doğumu arasında kan emerler. Gündüzleri ise ağaç kovukları, ahır, gübre yığınları, duvar çatlakları, elbise dolapları ve tuvalet/banyo köşelerinde saklanırlar. *Phlebotomus*’ların yaşaması için asgari %45-60 oranlarında nem gereklidir (23, 25).

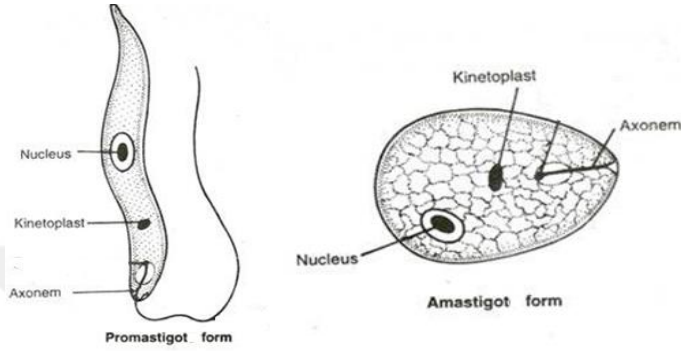
2.3.4. Leishmania Rezervuarları:

Leishmania türlerinin bilinen rezervuarları (doğal kaynakları); insanlar, vahşi ve evcil karnivorlar (kedi, köpek, çakal, kurt vs.), küçük memeliler (kemirgenler), oposumlar, karıncayiyenler ve tembel hayvanlardır (1, 12, 26).

2.3.5. Leishmania Morfolojisi:

Leishmania cinsi parazitlerin yaşam döngülerinde morfolojik olarak “amastigot” ve “promastigot” olmak üzere iki yaşam formu vardır (Şekil 2.3). Amastigot formu memeli konakta görülen kamçısız ve hareketsiz formudur. 2.5-6.8 µm büyüklüğünde, yuvarlak, oval şekilli, hareketsiz, konakta 37 °C’de uzunlamasına bölünerek çoğalabilen, geçmişte Leishman-donovan cisimcikleri olarak tanımlanan yapılardır. Parçalı çekirdekli lökositler, monositler ve endotel hücreleri içinde tek tek veya gruplar halinde veya hücre dışında görülebilmektedirler. Sitoplazmalarında diğer organellere ek olarak nukleusa bitişik kinetoplast adı verilen ve kinetoplast-DNA içeren bir organel bulunmaktadır. Sitoplazmada bir bleforoplast(kamçı kökü) ve kamçının sitoplazmada kalan kısmı olan aksonem adı verilen yapılar da bulunmaktadır. Promastigot formu ise vektörde görülen kamçılı ve hareketli formudur. 15-20 µm boyunda, mekik şeklinde, tek kamçılı, 27°C’de

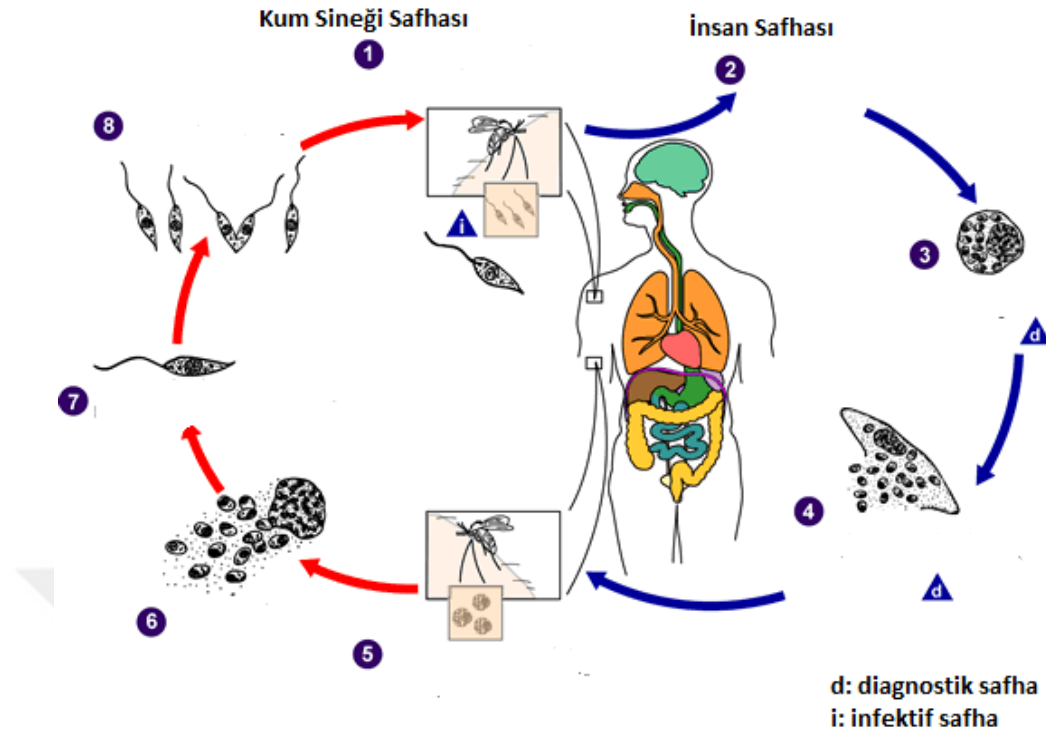
vektör içinde uzunlamasına bölünerek çoğalabilen, kum sineklerinin bağırsaklarında ve amastigot formların uygun besiyerlerinde şekil değiştirmesinden sonra görülen formudur. Serbest bir kamçısı, bleforablast, kinetoplast ve aksonemi bulunmaktadır (1, 3).



Şekil 2.3. *Leishmania* parazitinin promastigot ve amastigot formları (27).

2.3.5. *Leishmania* Yaşam Döngüsü:

Leishmania parazitlerinin memeli konakta ve vektör kum sineklerinde geçirdiği safhalar Şekil 2.4.' deki gibi özetlenebilir ;



Şekil 2.4. *Leishmania* parazitinin yaşam döngüsü 1. Kum sineği kan emme sırasında ağız kısmındaki promastigotları insan derisine enjekte eder. 2. Promastigotlar ısırık yarasındaki makrofajlar veya diğer mononükleer fagositik hücreler tarafından fagosite edilirler. 3. Promastigotlar bu hücreler içerisinde kamçılarını kaybederler ve amastigotlara dönüşürler. 4. Amastigotlar bölünerek çoğalırlar ve diğer mononükleer fagositik hücreleri enfekte ederler 5,6. Kan emme sırasında amastigotlar kum sineğinin sindirim kanalına yerleşir. 7. Kum sineğinin midesinde amastigotlar promastigotlara dönüşürler. 8. Kum sineğinin sindirim kanalında çoğalan promastigotlar ağız kısmına doğru geç ederler (2).

2.4. KL Bulaş Yolları:

Leishmania parazitleri vektör kum sinekleri aracılığıyla zoonotik (hayvandan hayvana) veya antroponotik (insandan insana) bulaş yoluyla bulaşır. *L. donovani* ve *L. tropica* türleri çoğunlukla antroponotik iken diğer türler zoonotiktir (21). *Leishmania* türleri çoğunlukla vektör aracılığıyla bulaşsa da, nadiren konjenital yolla anneden bebeğe de geçebilmektedir. Ayrıca tranfüzyonla veya kontamine enjektörlerle meydana gelebilecek kazalar nedeniyle parenteral yolla da bulaşabilmektedir (1, 4).

2.5. KL Epidemiyolojisi:

KL'nin görülme sıklığı bölgenin ekolojik, iklim, vektör ve rezervuarların coğrafik dağılımıyla yakından ilişkilidir. Hem konağın yaşam ve davranış biçimleri, hem de vektörün üreme ve yaşam özellikleri KL epidemiyolojisinde önem taşımaktadır. Endemik bölgeden endemik olmayan bölgeye göçlerle gelen enfekte kişilerin uygun vektör ve çevre-iklim şartları varsa hastalığı o bölgeye taşınmaları mümkündür. Aynı zamanda da enfekte olmayan kişiler endemik bölgeye geldiklerinde bölgenin yerleşik insanlarından daha fazla enfeksiyon riskine sahip olmaktadır. Bu nedenlerle KL epidemileri sıklıkla göçmenlerde ve duyarlı olmayan kişilerin endemik bölgelere gelmesi ile ortaya çıkar. Endemik bölgelerin çoğunda leishmaniasis fokal odakları vardır. Bu alanlar vektörü, paraziti ve rezervuar konağı etkileyen mikro-ekolojik durumlarla ilişkilidir. Hastalığın dağılım ve yayılımı ekonomik durum, davranış ve çevre değişiklikleri ile ilişkilidir. Yeni yerleşim yerleri, orman alanlarına yerleşimler, ormanların yok edilmesi, kırsal alanlardan şehirlere göç, hızlı ve plansız şehirleşme, köpek ve kemirgen popülasyonunda artış, insektisit kullanımında azalma, immünsüprese konak sayısında artış, barajların inşası, yeni sulama projeleri, başta savaş ve doğal afet olmak üzere çeşitli nedenlerle göçler hastalığın yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Küresel ısınma ve buna bağlı iklim değişikliklerinin etkisiyle vektör canlıların popülasyonlarında artış olacağı, üreme ve yaşam alanlarının deniz seviyesinden daha yükseklere ve kuzey enlemlere doğru genişleyeceği düşünülmektedir. (8).

KL iklime duyarlı bir hastalık olup; sıcaklık, yağış ve nem oranlarındaki değişimler; dağılımlarını, hayatta kalma sürelerini ve popülasyon büyüklüklerini değiştirerek tatarcıklara ve rezervuar konaklara etki edebilir. Çarpık kentleşme ve kentlere göç sonucu rodent rezervuar konakların yoğun bulunduğu alanlarda varoşların oluşması bu alanlarda leishmaniasis insidansında artışa neden olmuştur. Antroponotik tip enfeksiyonlarda epidemi riski daha yüksektir. Epidemiler vektör habitatındaki değişiklikler, kitleler halinde insan hareketleri (mevsimsel, savaş, doğal afet gibi nedenlerle) ve malnutrisyon gibi immüniteyi azaltan durumlarla ilişkilidir. Non-endemik alanlardaki epidemilerde çocuklar ve erişkinler daha çok

etkilenir. Endemik alanlarda ise daha çok çocuklar etkilenir, erişkinlerin çoğu daha önce subklinik veya klinik olarak hastalığı geçirdiklerinden bağışıklırlar (8).

2.5.1. Dünyada KL:

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından altı önemli tropikal hastalıktan biri olarak kabul edilen Leishmaniasis başta Afrika, Asya ve Latin Amerika kıtaları olmak üzere toplam 98 ülkede endemik olarak görülmekte ve 310 milyon insan bu enfeksiyona karşı risk altındadır. Her yıl yaklaşık 2 milyon yeni enfeksiyon bildirilmektedir. Tüm dünyada her yıl yaklaşık 300. 000 yeni VL vakası bildirilirken 1.2 milyon yeni KL vakası bildirilmektedir (6, 28)

KL enfeksiyonun tüm dünyada yayılımı oldukça geniştir. Vakaların üçte biri üç ayrı epidemiyolojik bölgede görülmektedir. Bunlar; Amerika kıtaları, Akdeniz Havzası ve Ortadoğu'dan Merkez Asya'ya kadar uzanan Batı Asya bölgesidir. VL olgularının %90'ından fazlası Hindistan, Bangladeş, Sudan, Güney Sudan, Etiyopya ve Brezilya'da görülürken, KL olgularının ise %70-75'i Afganistan, Cezayir, Kolombiya, Brezilya, İran, Suriye, Etiyopya, Kuzey Sudan, Kosta Rika ve Peru'da görülmektedir (28).

2.5.2. Türkiye'de KL:

Türkiye KL'nin endemik olduğu ülkelerden biridir. Türkiye'de Leishmaniasis'in KL ve VL olmak üzere 2 klinik şekli görülmektedir. Dünya genelinde olduğu gibi Türkiye'de de KL olgularına daha sık rastlanmaktadır (5,7).

Ülkemizde 7 coğrafik bölgede hem VL hem de KL görülmektedir Türkiye'de VL enfeksiyonlarından *L. infantum* sorumludur ve en çok Ege, Akdeniz ve İç Anadolu bölgelerinde sporadik olarak bildirilmektedir. (7). Ülkemizde en sık görülen KL etkeni *Leishmania tropica* antroponotik (insan-vektör-insan geçişli) özelliktedir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde hastalık etkeninin *L. tropica*, Doğu Akdeniz Bolgesi'nde ise *L. infantum* ve *L. tropica* olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda *L.*

major'un etken olduğu KL vakalarının arttığına dair yayınlar bulunmaktadır. (16, 17, 29).

KL ülkemizde bildirim zorunlu bir hastalık olup T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre Türkiye'de 1990-2014 yıllarında bildirilen 53.847 KL olgusu saptanmış bu olguların büyük çoğunluğu Şanlıurfa ilinden daha sonra sırasıyla Adana, Osmaniye, Hatay, Diyarbakır, İçel ve Kahramanmaraş illerinden bildirilmiştir (8).

Bildirim zorunlu hastalıklardan olan KL, bulaşıcı hastalıklar bildirim sisteminde grup A hastalıklar içerisinde yer almaktadır. Buna göre KL, ülke genelindeki tüm özel ve kamu sağlık merkezlerinde tanı konulup tedaviye başlanması diğer yandan hastaya ait bilgilerin İl Sağlık Müdürlüğü'ne iletilmesi zorunludur. Bildirim yapılması sonrasında tedavide kullanılan beş değerli antimon bileşiklerindeki illerde Sağlık Müdürlükleri tarafından ücretsiz olarak sağlanmaktadır (29).

2.5.3. KL ve Göç:

Türkiye'nin bulunduğu bölgede, özellikle Irak, İran ve Suriye gibi komşularında KL halen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Suriye'deki iç savaş nedeniyle ülkemize göç eden mültecilerde hastalığın sıklıkla görülmesi nedeniyle özellikle Güneydoğu Anadolu illerimizde hastalık önemli bir boyut kazanmıştır (30,31). Suriye'de yaşanan savaştan kaçarak ülkemize sığınan ve sayıları 2 milyonu aşan mülteciler başta KL olmak üzere birçok bulaşıcı hastalığın ülkemize taşınması riskini ortaya çıkarmıştır. Türkiye'de 2013 yılında 2.268 yerli ve 2000'den fazla Suriyeli KL olgusu rapor edilmiştir (8). Birleşmiş Milletler Mülteciler Yüksek Komiserliği'nin hazırladığı rapora göre ülkemizde Suriyeli mülteci sayısı 2 milyona ulaşmıştır. Suriye'de 2009 yılında 46.398, 2010 yılında 42.165 KL ve 2011 yılında ise 43.000 den fazla KL vakası bildirilmiştir. İç savaşın devam ettiği ülkede son zamanlardaki yıllık vaka sayısının 250.000 olduğu tahmin edilmektedir. KL hastası Suriyeli mültecilerin bir kısmı ülkemize gelmekte ve bu kişilerin bir kısmı kamplarda bir kısmı ise değişik şehirlerimize yerleşmektedir. Bu kişilerin durumları T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu ilgili birimleri tarafından takip edilmekte ve kayıt altına alınmaya çalışılmaktadır. Suriyeli mültecilerden büyük bir kısmının KL hastası olup ülkemize paraziti kolayca taşımaktadırlar. Ortadoğu'da

KL tedavisinde kullanılan antimon bileşiklerine karşı dirençli olgular bildirilmeye başlamıştır. Dirençli vakaların zamanında tespit edilemeyip sayısı ve bölgelerinin artması durumunda bu hastalıkla mücadele oldukça zor ve sorunlu olacaktır (32).

2.6. KL Klinik Tablo:

Coğrafi bölgeye bağlı olarak birçok farklı *Leishmania* türü insanlarda farklı klinik formlarda hastalıklara neden olmaktadır. İnsanlarda klinik olarak 3 farklı klinik tablo ortaya çıkmaktadır; dalak, karaciğer, kemik iliği gibi iç organları tutan “VL” , deride lokalize yaralara neden olan “KL” ve deri ve mukozaların birleştiği yerde ülser ve kabuklaşmalara neden olan “MKL” . Ayrıca *L. donovani*’ nin etken olduğu Kala Azar (VL) enfeksiyonlarında tedavi sonrası deride ortaya çıkan “Post-Kala Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL)” ve baskılanmış hücrel immün cevap sonucu ülserleşmeyen, nekrotize olmayan ve kendiliğinden iyileşmeyen “Diffüz Kutanoz Leishmaniasis (DKL)” adı verilen iki klinik tablo son yıllarda kabul edilmiştir. (1, 14, 33).

2.7. KL Klinik Tanı ve Belirtiler :

KL düşünülen lezyonların klinik belirtileri aşağıdaki gibidir (1) ;

- Genellikle vücudun giysi ile örtülmeyen açık olan kısımlarındaki deriye lokalize,
- Uzun süredir (en az bir ay) iyileşmeyen,
- Sekonder olarak bakterilerle enfekte olmadıkça ağrısız,
- Eritemli papül, nodül, nodulo-ülseratif, plak, ülsere plak şeklinde lezyon,
- Ülserleşmiş lezyonların üzerinde alta sıkıca yapışık krutlu, kenarları lastik silgi kıvamında endürasyon gösteren (merkezinde krateri olan volkan biçiminde) lezyon,
- Lezyonlar, yaz aylarında ve geceleri aktif olan tatarcık sineğinin beslenmek için kan emdiği deri bölgesinde, 4-8 aylık inkübasyon döneminden sonra ortaya

çıkan, ağrısız eritemli bir papül şeklinde başlar. Lezyon, 1-2 ay içerisinde giderek büyüyerek 1-2cm çaplı nodüle dönüşür. Nodüler lezyon zaman içerisinde merkezden ülserleşerek krutla kaplanır. Tedavisiz olgularda lezyon doğal seyri genellikle 1-1,5 yıllık süreç içinde ömür boyu süren depresif skar bırakarak iyileşir. İyileşmeden sonra kişiyi ömür boyu reinfeksiyonlara karşı koruyan doğal bir bağışıklık gelişir.

- Non-endemik bölgelerde benzer özelliklere sahip lezyonlara rastlanıldığında özellikle yaz aylarında endemik bölgelere seyahat öyküsü açısından ayrıntılı anamnez alınmalıdır.

KL lezyonu yüz ve ekstremiteler gibi giysiyle örtülmeyen alanlarda, eritemli bir papül olarak başlar ve yavaşça ağrısız ve yumuşak veya üzeri kurutlu bir nodüle dönüşür. Bu süreç kişiye göre değişir ve 2-8 ay kadar sürer. Nodüller genellikle volkan tarzında ülserleşirler. Papül veya nodüller bazen ülserleşmeden de iyileşebilirler. Lezyon sayısı birden çok olabilir ve multipl lezyonlar genellikle aynı özelliktedirler. KL 1-1,5 yıl içinde tedavi edilmese bile sosyal, estetik ve psikik problemlere neden olabilen bölgesel bir stigma, sikatris dokusu ile iyileşir. Dokudaki inflamasyona ve ülserin derinliğine bağlı olarak sikatris dokusu çok ufak belirsiz olabileceği gibi oldukça geniş ve belirgin de olabilir. Üzeri krutlu olan lezyonlarda krut kaldırılınca ağrısız, kırmızı, sulantılı ülser görülür. Ülsere lezyon üzerindeki alta sıkıca yapışık sert krut kaldırıldığında krutun alt yüzünde çiviye benzer çıkıntılar görülür, bunlara Türk Dermatolog Dr. Hulusi Behçet'in "Çivi belirtisi (Signe de clou)" adı verilir. Lezyon kenarlarının normal deriden ortadaki krater şeklindeki ülsere doğru bir eğimle yükselmesi ise "volkan belirtisi" olarak tanımlanır (29).

KL lezyonları 2 yıl içinde tedavi ile ya da spontan olarak iyileşmez ise kronik KL (KKL) olarak adlandırılır. Genelde %5-10 oranında görülen KKL lezyonları daha çok ağrısız, iyileşmeyen ülseratif bir nodül veya infiltrate, diffuz geniş bir plak şeklinde yüzde ve el sırtlarında görülür. Rezidivan KL (RKL) tamamen ya da kısmen iyileşmiş bir KL sikatris dokusunun periferinde, sınırında yeni eritemli kırmızı-sarımsı papüllerin ortaya çıkması ve bunların bir araya gelip birleşmesi ile kendini gösterir. KL lezyonu tamamen iyileştikten 1-2 yıl sonra bile

papüller ortaya çıkabilir. Tedaviye oldukça güç yanıt verirler. Lupus vulgarise benzerliği nedeniyle “Lupoid leishmaniasis” adı da verilir. *Leishmania* parazitinin farklı türlerinin neden olduğu KL lezyonları, klinik görünümüne bakılarak ayırt edilmeye ve etken tahmin edilmeye çalışılmış, *L. major*’un “ıslak”, *L. tropica*’nın “kuru” tip KL lezyonlarına neden olduğu varsayılmıştır. Günümüzde etken artık klinik görünümünden çok izoenzim analizi veya molekuler biyolojik yöntemlerle belirlenmektedir (29)

2.8. KL Tedavisi:

KL tedavi edilmeden gelişen immunité ile kendiliğinden atrofik sikatris bırakarak iyileşebilmektedir. KL mortalite ve belirgin fiziksel morbiditeye yol açmadığından endeminin yaşandığı ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunu olarak görülmemiştir. Ancak aktif KL lezyonu olanlar kadar KL sikatrisi olanlarda da depresyon, anksiyete ve yaşam kalitesinde azalma saptanmıştır. Bu nedenle KL iyileşse bile sürekli bir sosyal ve ruhsal morbidite nedeni olabilmektedir. KL tedavi edilmezse genellikle 1-1,5 yılda atrofik sikatris bırakarak kendiliğinden iyileşir ancak tanı konulan tüm hastalar tedavi edilmelidir. Erken tedavi ile enfeksiyon zinciri kırılır, yeni olgular önlenerek yeni enfeksiyon alanlarının oluşması engellenir (29)

Tedavide seçilmesi gereken birincil ilaç beş değerlikli antimon bileşikleridir. Eğer lezyonlarda herhangi bir sekonder enfeksiyon yoksa hemen, eğer varsa öncelikle uygun antimikrobiyal tedavisinden sonra tedaviye başlanmalıdır. Tanısı parazitolojik olarak doğrulanmış bütün olgular tedaviye alınmalıdır. Ancak baş-boyun bölgesi dışında, çapı 1cm’den küçük ve tek olan lezyonlar gelişiminin belli aralıklarla takip edilmesi kaydıyla tedavisiz bırakılabilirler. Gebe ve emziren anneler için sistemik veya intralezyonel tedavi önerilmemektedir. Belirgin kardiyak, renal, hepatik ve hematolojik hastalığı bulunan olgularda “intralezyonel enjeksiyon tedavisi” tercih edilmelidir.

Mukozal veya yarı-mukozal tutulumu olan tüm olgular, lokalizasyon itibari ile iyileştiğinde fonksiyon bozukluğuna yol açma riskine sahip lezyonu olan olgular, burun ve kulak sayvanı gibi altında kıkırdaklı dokunun bulunduğu deri bölgelerinde

gelişmiş ülser ve enflamatuvar lezyonlu olgular, çapı 5cm' nin üzerinde olan enflamatuvar veya ülser lezyonlu olgular, rezidivan ya da kronik formda lezyonu bulunan olgular, altta yara iyileşmesini geciktiren kronik veya immün yetmezlikle seyreden hastalığı olan ya da immün süpresif tedavi alan olgular ve multiple (çoklu) lezyonlu olgularda “Sistemik antimon tedavisi” tercih edilmelidir (1, 12).

KL’de iyileşme yavaş olup, tedaviden sonra da devam eder. Lezyonlar tedavinin sonunda nadiren tam iyileşir. Tedaviye yanıt genellikle klinik görünümüne göre değerlendirilir. Tedaviyi izleyen 4-6 haftada lezyon 2/3 oranında küçülmeli, ödem ve inflamasyon düzelmeli, ülser reepitelize olmalı ve yeni lezyonlar gelişmemelidir. Ülserlerin reepitelizasyonu veya tam klinik iyileşme genellikle tedaviyi izleyen üç ayda olur. Tedaviden sonra hastalar relaps açısından 6-12 ay süresince izlenmelidir (8).

2.8.1. KL Tedavi Uygulamaları:

- **Sistemik antimon tedavisi:**

10-20mg /kg/gün beş değerlikli antimon 12-15 gün süreyle parenteral olarak uygulanır. Sodyum stiboglukonat IM ve IV uygulanabilirken Meglumine antimonate IM derin enjeksiyon şeklinde uygulanır. Birinci kür tedaviden sonra bir ay ara verilir ve lezyon bu süre sonunda tekrar değerlendirilir. Gerekirse ikinci kür tedavi uygulanır (1).

- **İntralezyonel Enjeksiyon Tedavisi:**

Antimonun lokal olarak enjeksiyonu erken dönemdeki, iltihapsız lezyonlar için oldukça faydalıdır. İlaç doğrudan enjektöre çekilir ve lezyonun içine intradermal olarak, lezyon tamamen beyazlaşana kadar enjekte edilir. Subkutan dokuya veya damar içerisine kaçırmadan uygulanmalıdır. Optimal doz lezyonun tamamını beyazlatan dozdur. Lezyon ülser ise, ilacın dışarı sızmasını önlemek için

enjeksiyon ülser kenarına , ülsere paralel olarak uygulanır.Haftada 1-2 kez olmak üzere 5 doz enjeksiyon genellikle yeterlidir. Bir ay sonra yapılan kontrollerde lezyonda tam iyileşme sağlanamamış ise ikinci kür tedavi uygulanır. Tedavisi tamamlanan olguların relapslar açısından üç ayda bir, bir yıl süre ile takip edilmesi uygundur. Relapsların çoğu 3-6 ayda meydana gelmektedir (1).

2.8.2. Diğer Tedavi Seçenekleri:

Kriyoterapinin etkinliği klinik çalışmalarda %53 ile 100 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir. Kriyoterapi ve takiben yapılan İL SbV şeklindeki lokal tedavi daha etkili bulunmuştur. Küçük, non-ülsere yeni lezyonlarda tek başına kriyoterapi yapılabilir. Bu uygulama iyileşme olana kadar üç haftada bir tekrarlanabilir. Kriyoterapi eritem, ödem, bül oluşumu, kalıcı pigment değişiklikleri ve sikatris oluşumuna neden olabilir(8).

Termoterapi az sayıda, küçük ve göz kapağı, burun, dudak, kulak lokalizasyonlu olmayan lezyonlarda kriyoterapiye alternatif bir tedavi olarak kullanılabilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) bu amaçla kullanım için onay almış termoterapi cihazı vardır. Bu cihaz ile yapılan ısı tedavisinden 2-3 ay sonra %53 ile 73 arasında değişen klinik iyileşme oranları bildirilmiştir. Uygulama ağırlı olduğundan lokal anestezi gerekir. Termoterapi mukozal ve lenfokutanöz yayılma potansiyeli olan lezyonlarda kullanılmamalıdır. Ayrıca yüzeysel sinirler, kıkırdak, burun, dudak ve göz kapağı üzerine doğrudan uygulanmamalıdır. İlave olarak termoterapi ve kriyoterapi sistemik tedaviden sonra iyileşmeyen rezidüel lezyonların tedavisinde kullanılabilir. Ayrıca gebe ve emziren kadınlarda da her iki tedavi de uygundur (8).

Fotodinamik tedavi reaktif oksijen ürünleri oluşturarak dokuda harabiyete neden olur. Bu amaçla hedef dokuda seçici olarak biriken bir foto duyarlandırıcı (5-aminolaevulinic acid gibi) alındıktan sonra ışınlama yapılır. Nispeten yeni olan bu tedavi yöntemine ilişkin veriler sınırlıdır. Eski Dünya KL'li olgularda tedaviden 2 ay sonra %93 oranında tam klinik iyileşme bildirilmiştir. Tedavide ayrıca lokal

eksizyon, küretaj veya elektrodeseikasyon da uygulanabileceği belirtilse de relaps riskinin yüksek olması nedeniyle tercih edilmemelidir (1, 8).

Uzun süreli parenteral kullanım, toksisite, endemik bölgelerdeki yüksek maliyet, özellikle Hindistan ve Sudan'da görülen dirençli olgular ve HIV'le koinfekte kişilerde tedavi başarısızlığı gibi sorunlar nedeniyle leishmaniasis hastalığına karşı yeni ilaçlar üzerinde çalışmalar başlamıştır (34).

İkincil ilaçlardan aminosidin, pentamidin ve ketokonazol gibi alternatif ilaçlarda bulunmakta fakat klinik olarak etkinliği bilinmemektedir. Rifampisin'in KL lezyonlarına etkili olduğu bildirilmiştir fakat tüberküloz ve lepranın endemik olduğu bölgelerde kullanımı uygun görülmemektedir. Miltefosin adı verilen ilaç oral yolla kullanıldığında oldukça etkili olduğu görülmüştür. Aminosidin, paramomisin ve metil benzethonyum klorid'in beyaz yumuşak parafin ile karıştırılmasıyla elde edilen topikal merhem uygulaması *L. major*' un etken olduğu KL lezyonlarında etkili olduğu belirtilmektedir. Antimonlara dirençli hastalarda Amphoteresin B kullanılmaktadır. İyileşmeyen kronik KL vakalarında oral ketoconazolün etkili olduğu bildirilmiştir. Klotrimazol, Itrakonazol, Dapson gibi ajanların da KL tedavisinde etkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır. Sitamakin Primakin analogudur. VL'de oral kullanımı ile ilgili çalışmalar sürmektedir. Pirazinamid hücre içi *L.major*'e karşı etkili bulunmuştur. Bitki ekstraktlarının kullanımı makrofajlarda amastigot yükünü azaltan "propolis" "*Toxus baccata*", "afidikolin", "Hipokrellin" gibi ürünlerin amastigot ve promastigotlara etkilerinin yanı sıra immün sistem üzerinde de etkili oldukları gösterilmiştir. Kombinasyon tedavileri Beş değerli antimon bileşikleriyle birlikte topikal immunomodulatör olan "imikuimod" etkin bulunmuştur. Bu ilacın makrofajlarca nitrik oksit yapımını stimüle ettiği ileri sürülmüştür. Paromomisin-sodyum stiboglukonat, miltefosin-amfoterisin B veya paromomisin, flukonazol-miltefosin ve bitki orijinli immunomodulator olan "picroliv" kombinasyonlarıyla başarılı sonuçlar alınmıştır. Bazı sitokinlerle birlikte kombinasyonlar da denenmektedir (Amfoterisin B ile IL-12, anti CD40, anti IL-10 kombinasyonları gibi) (1, 34).

Leishmaniasis'te proteaz inhibitörlerinin kullanımı üzerinde de çalışılmaktadır. Örneğin amastigotlarda virulansta rol alan sistein proteazlar önemli ilaç hedefleridir. Antimikrobiyal peptitlerin (AMPs) de antileishmanial aktiviteleri

üzerinde araştırmalar sürmektedir (Dermaseptin, Temporin gibi). Plazma membranı AMPs'lerin esas biyolojik hedefidir. AMPs'ler *Leishmania* membran yapılarını ve fosfolipid kompozisyonlarını değiştirebilirler. Ancak parazite ait GP63 gibi bazı yüzey metalloproteazların, *Leishmania*'ları antimikrobiyal peptitlerin etkisinden koruduğu, bu nedenle bazı türlerin antimikrobiyal peptitlere dirençli olduğu saptanmıştır (1, 34).

2.9. KL Parazitolojik Tanı:

KL klinik tanısıyla uyumlu her olgu, direkt parazitolojik tanı yöntemleri ile doğrulanmalıdır. Serolojik testler gibi indirekt tanı yöntemlerinin KL tanısında değeri yoktur (35).

KL'nin parazitolojik tanısı üç şekilde yapılabilir;

- Mikroskopik inceleme
- Parazit kültürü
- Moleküler Tanı

Mikroskopik inceleme ile KL tanısı, deri kazıntılarında veya biyopsi örneklerinden hazırlanan Giemsa veya benzeri bir boya ile boyanmış preparatlarda parazitin görülmesi şeklinde doğrudan konabilir. Lezyondan yapılan yaymalarda *Leishmania* amastigotlarının görülmesi kesin tanı koydurucu olduğu için, şark çıbanı şüpheli olgularda öncelikli tanı yöntemi Giemsa boyanmış yaymaların incelenmesidir (36).

Parazit kültürü ile KL tanısında hasta örneklerinden kültür yapılabilir. Bu amaçla NNN besiyeri gibi besiyerleri kullanılabilir. Kültürde promastigot formların saptanması kesin tanı bulgusudur ve "*Leishmania* spp üredi" şeklinde rapor verilir (35).

Moleküler Tanı Yöntemleri' yle de KL tanısı konulabilmektedir. Moleküler testler oldukça duyarlı ve özgüdür. *Leishmania* DNA'sının saptanması kesin tanı kriteridir. Örnekte *Leishmania* spp varlığını saptamak için, çeşitli *Leishmania* türlerinde ortak olan rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) bölgesi kullanılır. Ayrıca

kinetoplastik DNA, telomerik sekanslar, gp63, minieksonlar, β -tubulin gibi hedefler de kullanılmıştır. Piyasada gerçek zamanlı PCR kitleri de bulunmaktadır (35, 36, 37).

2.9.1. KL Tanısında İnceleme Örneklerinin Alınması:

KL parazitolojik tanısı için başlıca deri lezyonlarından kazıntı, aspirat veya biyopsi örnekleri alınabilir. Buna göre örneklerin alınmasında aşağıdaki hususlara dikkat edilmelidir (35);

- Örneklerden hazırlanan yayma preparatlar hasta başında hazırlanmalı ve sabitlenmeli; her birinin rodajlı kısmına hastanın adı yazıldıktan sonra birbirine temas etmeyecek şekilde uygun bir lam kutusu için yerleştirilerek laboratuvara gönderilmelidir.
- Kültür için alınan örnekler laboratuvardan temin edilmiş NNN besiyerine konarak, oda sıcaklığında 24-48 saat içinde laboratuvara nakledilmelidir. Eğer besiyeri temin edilemiyor veya besiyeri gelene dek hasta bekletilemiyorsa örnekler bir steril, pH' ı nötral (~7-7.4) tamponlu solüsyona (tamponlu tuzlu su, %10 fetal dana serumu içeren RPMI, Eagle, Schneider veya Tobie vasatları) konarak, oda sıcaklığında 24-48 saat içinde gönderilmelidir.
- Eğer birden fazla lezyon varsa; sekonder enfeksiyonu olmayan bir lezyon seçilmelidir, en yeni/aktif lezyondan örnek alınmalıdır.
- Lezyonun orta kısımlarında nekrotik dokular bulunduğu için dolayı, örnek lezyon kenarından alınmalıdır. Kabuk varsa kaldırılarak kabuğun altından ve yaranın kenarından örnek alınır.
- Bakteriyel veya fungal kontaminasyon promastigotların üremesini inhibe edebileceğinden, kültür için örnekler alınırken aseptik koşulların sağlanmasına azami dikkat gösterilmelidir.
- Deri lezyonundan örnekler kazıntı yöntemi ya da ince iğne aspirasyon tekniği ile dermatoloji uzmanı tarafından veya bu konuda eğitim almış bir hekim tarafından alınabilir.

- Elde edilen materyal 3-4 adet lam üzerine nazikçe yayılır.
- Yayımlar havada kurutulur ve üzerine saf metanol konarak fikse edilir.

- **Kazıntı örneği alma yöntemi:**

Lezyon %70'lik alkolle iyice temizlenir. Lezyonun kenarı iki parmak arasında iyice sıkılır ve bir bistüri ile 0.5 cm uzunluğunda ve 2-3 mm derinliğinde bir insizyon yapılır. Gazlı bez yardımı ile insizyon üzerindeki kan damlası alınır, bu süre içerisinde lezyon kenarına iki parmak ile yapılan basıya devam edilerek kanama önlenir. Bistüri ucu ile insizyonun iç kısmına insizyona dik olacak şekilde kazıma işlemi yapılır ve mümkün olduğunca kansız seröz bir materyal elde edilmeye çalışılır. Elde edilen bu materyal lam üzerine yayılır, metanolle fikse edilir (35).

- **İnce iğne aspirasyon yöntemi:**

Sağlam deriden lezyon kenarına doğru 0.3 mL steril SF içeren enjektör ile girilir; deri içine 0.1-0.3 mL SF verilir ve iğne hafifçe öne arkaya ve içerde döndürerek ve pompalanarak hareket ettirilir ve aspire ederek en az 0.1mL örnek alınır. Elde edilen bu materyal lam üzerine yayılır, metanolle fikse edilir (35).

2.9.2. İnceleme Örneklerinin Boyanması:

KL tanısı için deri lezyonundan hazırlanmış ve metanolde fikse edilmiş yayımlar Giemsa boyama yöntemi ile boyanır. Metanolle fikse edilmiş ve kurutulmuş yayma preparatları Giemsa solüsyonu içeren şalenin içine konur ve 10 dk bekletilir. Yayma lamları şaleden çıkarılır ve tamponlu su içine batırılır; 3-4 kez batırıp çıkarılarak yıkanır. Lamlar düşey pozisyonda dizilir ve havada kurutulur (35).

2.9.3. İnceleme Örneklerinin Mikroskopisi:

KL tanısı deri lezyonundan hazırlanmış ve boyanmış yayma preparatları immersiyon objektifi (100X) kullanılarak ışık mikroskopunda incelenir. 100× objektif

ile yapılan incelemede negatif sonuç vermeden önce, tercihen preparatın kenarlarını kapsayacak şekilde 300 mikroskop alanı taranmalıdır. *Leishmania* amastigotları makrofajların içinde veya dışında çok küçük (3 ila 5 µm) yuvarlak veya oval organizmalar şeklinde görülürler. Bir amastigotta kırmızı-mor nükleus, oldukça küçük daha koyu kırmızı-mor boyanmış kinetoplast ve açık mavi sitoplazma ayırt edilir. Giemsa boyanmış yaymaların mikroskopik incelenmesi sonucu *Leishmania* spp amastigot formlarının saptanması ile parazitolojik olarak “kesin tanı” konur; “*Leishmania* spp amastigotları görüldü” şeklinde rapor edilir (35).

2.9.4. Parazit Kültürü:

Leishmania spp. izolasyonu için kültür mikroskopik tanıya destektir ve tanı şansını yükseltmek için kullanılmalıdır. En çok tercih edilen besiyeri NNN’ besiyeridir. NNN besiyeri - bifazik, kanlı bir besiyeridir; laboratuvarında hazırlanır. Ayrıca Offutt’un modifikasyonu veya Evan’ in modifiye ettiği Tobie’ nin besiyeri, ve/veya Schneider’in in *Drosophila* besiyeri gibi Modifiye NNN besiyerleri de *Leishmania* izolasyonunda kullanılabilir ve laboratuvarında hazırlanabilirler. Bazıları izolasyonda başarı şansını artırmak için örneklerin iki farklı besiyerine inokülasyonunu önermektedir. Ticari olarak mevcut hücre kültürü besiyeri RPMI 1640, Schneider’in besiyeri veya Medium 199 da kullanılabilir (35).

- **NNN Besiyeri Kültürü ve değerlendirme:**

- **NNN Besiyerinin Hazırlanışı:**

500 mL’lik bir erlen içinde NaCl ve agar suyla karıştırılır. 121°C’de 15 dk. otoklavlanır. Besiyeri 50-55°C’ye soğutulur; aseptik koşullarda içine 10 mL defibrine tavşan kanı ve 1 mL antibiyotik stok solüsyonu (Penisilin (20.000 U/mL) ve Streptomisin (20.000 µg/mL) eklenir. Aseptik koşullarda tüplere 4’er mL dağıtılır. Tüpler hemen 10°’lik bir açı ile yatırılır. Katılaştır katılaştırmaz, dip kısımda kondansasyon sıvısının oluşması için tüpler dik bir şekilde bir spora yerleştirilir ve

buzdolabına kaldırılır. Tüpler besiyerinin adı, hazırlama/son kullanma tarihi yazılarak etiketlenir; raf ömrü 3 haftadır. Buzdolabında saklanır. (35).

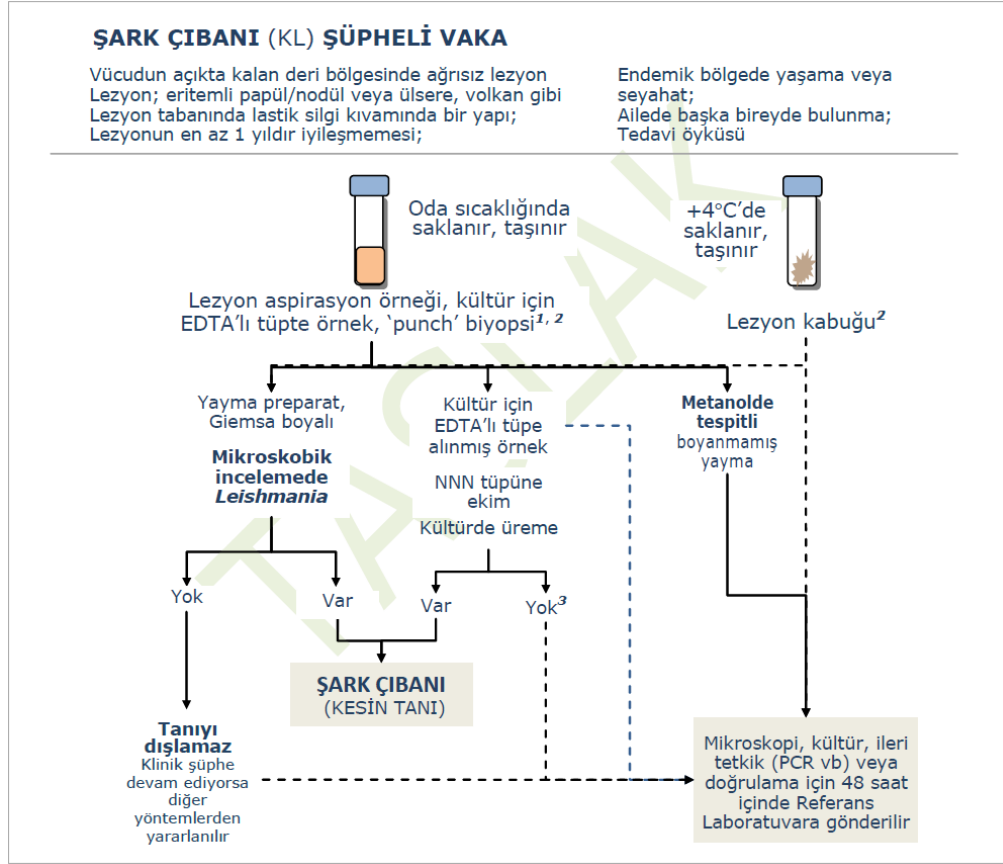
- **NNN Kültürü Değerlendirme:**

Mümkünse örnekler hasta başında kültür tüplerine inoküle edilmelidir. Örnekler doğrudan laboratuvara gelmiş ise önce kültüre alınmalıdır. KL deri lezyonu örnekleri aseptik şartlarda biyogüvenlik kabini içerisinde ya da bek alevi başında NNN veya tercih edilen bir başka besiyerine ekilir. Tüpler inokülasyon öncesinde oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır. Örnek inoküle edilmeden önce besiyeri tüpleri buzdolabından çıkarılır ve oda sıcaklığına gelmeleri için beklenir. Dipte birikmiş kondansasyon sıvısı üzerine 1 mL steril tamponlu SF veya PBS eklenerek besiyeri ekim yapmaya hazır hale getirilir. Tüplerin üzerine hastanın adı, protokol numarası, ekim tarihi yazılır. Her bir örnek en az 2 kültür tüpüne ekilmelidir. Aspirat örnekleri ve biyopsi parçaları NNN besiyerinin dip sıvısına ekilir. Fazla miktarda örnek inokülasyonu gelişimi baskılayabileceği için bir tüpe 2-3 damladan fazla örnek konmamalıdır. Ekimden sonra tüpler, 23-25°C’de 45° lik açı ile soğutmalı etüvde inkübe edilir. Ekilen örneklerde etken varsa, genellikle 5-7 günde promastigotlar gözlenir. Eğer 10-15 gün sonra üreme yoksa yeni pasaj yapılarak her iki tüp birlikte de izlenebilir. Üremenin olup olmadığına, besiyerinin sıvı fazından alınan örneklerin incelenmesi ile karar verilir. 4 hafta boyunca 2-3 üç günde bir besiyerinin sıvı fazından örnek alınıp lam-lamel arası veya Giemsa boyalı preparatlar hazırlanır ve mikroskopta kamçılı promastigotların varlığı yönünden değerlendirilir. Üreme varsa *Leishmania spp.*’nin yapay besiyerinde üreyen formu olan kamçılı promastigotların varlığı gözlenir. Kültürlerden genellikle 3-7 gün içerisinde pozitif sonuç alınır. Normal şartlarda pozitif örneklerin yaklaşık %70’inde üreme olmaktadır. Kültürler, negatif sonuç vermeden önce, 2-3 gün aralıklarla 4 hafta boyunca üreme varlığı açısından kontrol edilmelidir. Kültürde promastigot formların saptanması kesin tanı bulgusudur ve “*Leishmania spp. üredi*” şeklinde rapor verilir (35).

2.9.5. KL Laboratuvar Tanı Akış Şeması:

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu tarafından hazırlanan Şark Çıbanı’ nın Mikrobiyolojik Tanısı rehberine göre şark çıbanı

tansısında alınabilecek örnekler ve tanı yöntemleri için akış şeması Şekil 2.5.' deki gibidir (35).



Şekil 2.5. Şark çibanı tansısında alınabilecek örnekler ve tanı yöntemleri için akış şeması. (35)

2.10. KL Korunma ve Kontrol:

Leishmaniasisin önlenmesi ve kontrol altına alınabilmesi kombine müdahale stratejileri gerektirir. Zoonotik leishmaniasisin kontrolünde rezervuar konakların kontrolü önemli iken, antroponotik leishmaniasiste ise olguların saptanması, sürveyans ve uygun tedavisi önemlidir. Rezervuarlara yönelik olarak yerleşim alanları ve çevresinde kemirgenlerle mücadele edilmelidir. Kemirgen yuvalarının ve beslenme ortamlarının tahrip edilmesi zoonotik KL'nin kontrolünde etkilidir. Ayrıca sokak köpeklerinin veteriner takibi yapılmalı, uygun ürünlerle kum sineklerinden korunmaları sağlanmalıdır. Vektör kontrolünde kimyasallar, çevresel

iyileştirme ve kişisel korunma gibi kontrol yöntemleri uygulanabilir. Vektör mücadelesinde kum sineklerinin üreme ve gizlenme alanlarının kontrolü ve tahribi oldukça önemlidir. Bu kapsamda; kum sineklerinin gündüz saklandıkları evlerin, ahırların ve tuvaletlerin duvarlarındaki yarık ve çatlakların sıvanarak onarılması, kireçle badanlanması gereklidir. Ayrıca organik atıkların düzenli olarak toplanması ve çimlerin belirli aralıklarla biçilmesi de faydalı olmaktadır. Kimyasal mücadele kapsamında; evlerin, ahırların, hayvan barınaklarının iç ve dış duvarlarına rezidüel insektisitlerle uygulama yapılmalıdır. Vektör-insan ilişkisini kesmek amacıyla özellikle insektisit emdirilmiş cibinlikler ve perdelerin kullanılması etkili olmaktadır. Yine kum sineklerinin aktif olduğu saatlerde dışarı çıkılmaması, uzun kollu giysiler giyilmesi ve sinek kovucu ürünler kullanılması da vektör tarafından ısırılma olasılığını azaltacaktır (8).

Tatarcıkların üreme, dinlenme ve beslenme ortamlarının farklı olması, erişkin ve larvaları ile yapılacak mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Organik besinlerin bol olarak bulunduğu nemli olan her ortamda üreyebilmekte, erişkinleri gündüzleri karanlık, rüzgar almayan her yerde saklanabilmektedir. Bu özellikleri dikkate alındığında larva döneminde mücadele hemen hemen olanaksızlaşırken, erişkinler için farklı dönemlerde farklı mücadele teknikleri uygulanmalıdır. Vektör ve rezervuar kontrol yöntemlerinin maliyeti yüksek olup iyi bir altyapıya gereksinim göstermektedir. Kalıcı insektisitlerle vektör kontrolü, yaşam alanlarının etrafında ve içinde mücadelede etkili olabilmekte fakat vahşi doğada kendi içinde bulaşmaları önlemede etkili olamamaktadır. Erişkinlerin olası dinlenme yerleri olan evlerin içinde, hayvan barınaklarında, evlerin çevresindeki ağaç kovuklarında, kemirgen yuvalarında kalıcı insektisitlerle korunma yapılabilir. Sivrisinek ergin mücadelesi yapılan bölgelerde kısmen tatarcık ergin mücadelesi de yapılmış olmaktadır. KL'de cilt lezyonları vektör tatarcıklar için son derece uygun beslenme yerleri oldukları için lezyonun bir bandaj ile kapatılması yaranın tatarcıklar fiziksel temasını ortadan kaldırması açısından önemlidir (1).

Hastaların tanı konulur konulmaz tedaviye başlamaları bulaştırıcılığı önleyeceği için önemlidir. Mevsimlik çalışan işçiler gibi çalışma amaçlı kitlesel yerdeğiştirmelerde, gidilen yerdeki sağlık kuruluşlarında dermatologlar tarafından kişilerin şark çıbanı açısından kontrol edilmeleri gerekmektedir.

Endemik bölgelerde cibinlik veya insektisitli cibinlik kullanımının teşvik edilmesi, ev ve hayvan barınaklarının fiziksel koşullarının iyileştirilmesi, hastalığın sık görüldüğü şark çıbanı merkezlerinin kurulması, halkın bilinçlendirilmesi için eğitimler düzenlenmesi ve sağlık ile ilgili kuruluşların konuya hassasiyet göstermeleri gerekmektedir (1).

Ülkemizde KL epidemiyolojisinde sosyoekonomik, politik ve çevresel faktörler belirleyici rol oynamaktadır. Ülkemizdeki ulaşımın kolaylaşmasıyla gerek çalışmak gerekse de gezi amaçlı yolculukların artması, çeşitli nedenlerle kırsaldan kentlere göçlerin artışı ile buna paralel olarak yetersiz altyapı ve sağlıksız koşullarda barınma zorunluluğu, kentlerin köyleşmesi gibi faktörler yıllardır Güneydoğu Anadolu'da sınırlı yerleşim gösteren hastalığın yayılımındaki en önemli belirleyicilerdir. Göç edenler kırsaldaki yaşam tarzlarını, üretim biçimlerini ve alışkanlıklarını aynen göç ettikleri kentlerde de sürdürmeye çalışmaktadır. Altyapısız çarpık kentleşme Leishmaniasis için en önemli küresel risk faktörü olup hastalığın özellikle antroponotik odaklardaki sürekliliğine katkıda bulunmaktadır. Kentlerin kenar kesimlerinde hızlı ve plansız oluşan bu yerleşim yerlerinde su, kanalizasyon gibi alt yapı eksiklikleri uygun olmayan bir yaşam ortamı oluşturmaktadır. Şanlıurfa gibi KL sürekliliği görülen endemik alanlarda kentsel altyapı eksikliklerinin yanında evlerle iç içe ahırların varlığı, ahırlarda biriktirilen organik maddeler ve yakıt olarak kullanılan tezek yığınları görülmektedir. Şanlıurfa'da şehrin altyapısı daha iyi ve apartmanlardan oluşan kısımlarında KL hemen hiç görülmezken yakın bölgedeki alt yapı yetersizlikleri olan gecekonduların ve hayvan barınaklarının bulunduğu kesimlerinde yoğun olarak KL görülmektedir. Antroponotik KL'de özellikle ana kaynak hastaların tedavi edilmemesinin yanı sıra, vektör kum sineklerinin kullanılan insektisitlere direnç kazanması veya kalıcı insektisit uygulamasının etkin ve yeterli yapılamaması da hastalığın yaygınlaşmasında önemli rol oynamaktadır. Endemik alanlarda insektisit kullanılarak vektör mücadelesi ile kum sineği yoğunluğu azalınca KL olgu sayısında da azalma görülmektedir. Ancak sadece insektisit vektör mücadelesinde yeterli olmamaktadır. Saha çalışmaları yapılmalı, topluma hastalığın nedenleri ve tedavi yolları ile ilgili bilgi verilmeli, hastalık sağlık kuruluşları ve ilgili diğer kuruluşlar tarafından ihmal edilmemelidir (29).

2.11. KL İmmünolojisi:

2.11.1. KL İmmünopatogenez :

Leishmania enfeksiyonlarının kontrolünde, hücrel immünite ile beraber, parazitin invaziv özelliği, tropizmi, patojenitesi ve konağın genetik alt yapısına bağlı olarak geliştirdiği immünite ile vektörün evrimsel açıdan sahip olduğu avantajların tamamının rol aldığı etkileşimler sorumludur. Bu ökaryotik patojenler omurgalı immün sisteminde evrimleşmişlerdir ve en tipik özellikleri uzun süreli kronik enfeksiyon yapmalarıdır. Konakla etkileşimlerinde, doğal bağışık yanıtı aşmaları en temel ve hastalığın gidişini belirleyen en önemli basamaktır. Hümorale efektör mekanizmalardan (kompleman sistemi gibi) kaçmaları ve hücrel toksik metabolit ve lizozomal enzimlere dayanmaları gerekmektedir. Bu nedenle, fagozomal kompartmanlarda yeniden şekillenmeye sebep olmaları ve hücrel sinyal yolları ile interferensta bulunarak antijen sunumunu ve dendritik hücrelerin (DH) immün regülasyonunu bozmaları da adaptif immüniteyi ele geçirmeleri açısından çok önemlidir (38).

Leishmaniasis immünopatogenezi 3 ayrı aşamayı içine alan bir etkileşim zinciri olarak ele alınabilir (38);

- Parazit-vektör ilişkisi ve immünopatogenez
- Vektör-memeli konak ilişkisi ve immünopatogenez
- Parazit-memeli konak ilişkisi ve immünopatogenez

2.11.1.1. Parazit-vektör ilişkisi ve immünopatogenez:

Dişi *Phlebotom* kan emerek amastigotu alır, barsağında promastigota çevirir. Promastigot, ekstraselüler olarak vektör barsağındaki mikrovillüslara tutunur. Bölünme yeteneği olan bu prosiklik promastigot, bölünme yeteneğini kaybetmiş metasiklik promastigota dönüştüğünde (metasiklogenez) memeli konak için enfektif olan formunu kazanır. Ortalama 1-1000 metasiklik promastigot ile

döngüsünü tamamlar. Vektör, bir sonraki konak teması vakti geldiğinde, maksimum enfektif kapasitesine erişmiş olur (38).

Vektör-memeli konak ilişkisi ve immünopatogenez:

Vektör kan emmek için deri ile tekrar temasa geçer ve metasiklik promastigotu dermise enjekte eder. Leishmaniasis oluşumunda sadece metasiklik promastigotun enjekte edilmesi yeterli değildir. Promastigotun, mekanik hareketle dermisin derin tabakalarına itilmesi gereklidir, aksi halde hedeflediği dermal kapillere ulaşması zordur. Çok daha önemli bir nokta, inokülasyon bölgesindeki doğal immün engellerin aşılması gerekliliğidir. Vektörün tükrüğündeki hyaluronidaz-maksadılan gibi vazodilatatör etkili salgılar, enjeksiyon bölgesinde hızlı bir şekilde hareket ederek temel immün engellerin aşılmasını sağlar ve enfeksiyonun başlamasına yardımcı olur (38).

2.11.1.2. Parazit- memeli konak ilişkisi ve immünopatogenez:

- **Doğal İmmün Yanıtın Aşılması:**

Leishmania parazitleri memeli konağa vektör kum sineğinin ısırmasıyla bulaşmaktadır. Kum sineğinin insana inoküle ettiği tükürükte bulunan promastigotlar konağın immün cevabına yön vermede kritik rol oynamaktadır. Metasiklik promastigotlar, deriye ulaştıktan sonra nötrofiller, makrofajlar, dendritik hücreler, keratonsitler ve langerhans hücreleri gibi birçok hücreyle etkileşime girerler ve intraselüler amastigotlara dönüşürler. Parazitlerin makrofajlarca fagositozu monosit ve nötrofillerin devreye girmesine yol açar (39).

Leishmania enfeksiyonlarının önlenmesinde nötrofiller üç farklı şekilde rol oynamaktadır; fagositoz sonrası intraselüler öldürme, nötrofil ekstraselüler tuzaklar (NET'ler)'in salınımıyla ekstraselüler öldürme, makrofajlarla kooperasyon aracılığıyla öldürme. Ayrıca, promastigotların nötrofiller içerisine alınması hücrel apoptotik sinyalleri inhibe eder ve bu sayede nötrofillerin ömrü uzar. "Truva atı" rolü oynayan bu uzun ömürlü nötrofiller Leishmania parazitlerini öldüremezler ve

parazitin makrofaj gibi diğer hücelere yayılmasında rol oynarlar. Yapılan kimi çalışmalarda *L. braziliensis* kaynaklı KL enfeksiyonlarında nötrofillerin koruyucu rol oynadığı, *L.major* kaynaklı KL enfeksiyonlarında ise tam tersi olarak nötrofillerin koruyucu rol oynamadığı gözlemlenmiştir (39).

Enfeksiyonun ilk günlerinde nötrofillerin rolü daha çok iken enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında monositlerin rolü daha büyüktür. Enfeksiyondan bir hafta sonra monositler enfeksiyon bölgesine göç ederler ve parazitleri ihtiva eden monosit kaynaklı dendritik hücelere farklılaşırlar. Monosit kaynaklı dendritik hücelere proinflamatuvar sitokinlerden IL-12 salınımı yaparak Th1 hücelerini aktive ederler ve NK hücelerinin aktivasyonu ile IFN- γ üretimini sağlayarak KL enfeksiyonlarını önleyen Th1 tipi hücesel immün cevabın oluşumunda kilit rol oynarlar. Yapılan çalışmalarda enfekte DH'lerden IL-12 salınımı sayesinde *L. major* kaynaklı KL enfeksiyonlarının önlediği bildirilmiştir (39).

Doku makrofajlarının ise KL enfeksiyonlarında ikili rolleri vardır. Parazitte enfekte makrofajlar IFN- γ ve TNF alfa ile klasik yoldan aktive olurlarsa indüklenebilir nitrik oksit (iNOs) adı verilen sitotoksik bir enzim salgılayarak makrofaj içindeki *Leishmania* parazitlerini öldürürler. IL-4 gibi sitokinler tarafından aktive olan makrofajlar parazitin hayatta kalabildiği ve çoğaldığı konak hüceler olarak rol yaparlar. Bu makrofajlar sitotoksik enzimler salgılamadıkları için *Leishmania* parazitlerini çoğaltıcı etkiye sahiptir (39)

Doğal Öldürücü Hücelere olan NK hüceleri de KL'e karşı doğal bağışıklıkta önemlidir. NK hüceleri *Leishmania* antijeni ile karşılaşmaları durumunda proliferasyon olarak IFN- γ üretirler ve parazit çoğalmasını durdurucu etki gösterirler. NK hüceleri enfekte makrofajları ve parazitleri lizis yoluyla öldürerek enfeksiyonun kontrol altına alınmasını sağlarlar. Fakat bu etkinin parazit türlerine göre değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (39).

- **Kazanılmış İmmün Yanıtın Aşılması:**

Leishmania'lar zorunlu hücre içi parazitler olmaları nedeniyle enfeksiyonun kontrolünde kazanılmış immün yanıt mekanizmalarından hücesel immün cevap

etkilidir. CD4+ ve CD8+ yardımcı T hücreleri (Th) ve salgıladıkları sitokinler hücrel immün cevapta öncül rol oynarlar (39).

- **CD4+ Th Hücrelerinin rolü:**

Deney hayvanları ile yapılan çalışmalar CD4+ Th hücreleri tarafından IFN- γ üretiminin *L. major* kaynaklı KL enfeksiyonlarına dirençten, IL-4 üretiminin ise KL enfeksiyonlarına duyarlılıktan sorumlu olduğunu göstermiştir. KL enfeksiyonlarının gidişatını T hücrelerinin polarize olacağı Th hücre tipi belirlenmektedir. KL enfeksiyonlarında Th1 tipi klonlar koruyucu rol oynarken, Th2 tipi klonlar koruyucu olmamaktadırlar. Yapılan diğer destekleyici çalışmalar da göstermektedir ki Th1/Th2 tipi hücrelerin ürettiği sitokinlerin dengesi KL enfeksiyonlarının gidişatını belirlemektedir. KL enfeksiyonlarına dirençte CD4+ Th1 hücreleri tarafından salınan IFN- γ sitokini olurken, KL enfeksiyonlarına duyarlılıkta ise CD4+ Th2 hücreleri tarafından erken salınan IL-4 sitokinleri rol oynamaktadır. Antijen sunucu DH'lerden salınan IL-12 sitokininin miktarı Th1/Th2 tipi immün yanıtı yön vermektedir. Yapılan çalışmalarda DH'ler tarafından az miktarda IL-12 salınımı T hücrelerinin Th1 hücrelerine polarizasyonuna, çok miktarda IL-12 salınımının ise a Th2 hücrelerine polarizasyonunda rol aldığını göstermiştir. Ayrıca KL'ye duyarlı farelerin IL-12 ile tedavi edilmesi durumunda iyileşme gösterdikleri belirlenmiştir (39).

- **CD8+ T hücrelerinin rolü:**

Aktive olmuş CD8+ T hücreleri de makrofajları aktive eden IFN- γ ürettiği için KL enfeksiyonlarına karşı hücrel immün yanıtta önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar bu görüşü desteklemektedir. CD8+ T hücreleri olmayan farelerin Th2 yönünde immün cevap geliştirdikleri ve KL enfeksiyonlarına duyarlı oldukları görülürken, CD8+ T hücreleri olan farelerin Th1 yönünde immün cevap oluşturarak KL enfeksiyonlarına dirençli oldukları gözlemlenmiştir (39).

- **Sitokinlerin rolü:**

Sitokinler, hücrelerarası haberleşmede rol oynayan, çeşitli biyolojik fonksiyonları düzenleyen protein yapısındaki maddelerdir. Özellikle immün yanıt ve inflamasyonda önemli rolleri bulunmaktadır. Farklı sitokinler bir hücrede aynı sinyal yollarını tetikleyebilir ya da bir sitokin farklı hücrelerde farklı sinyal yollarını uyarabilir. Sitokinlerin KL enfeksiyonlardan korunmada taşıdıkları önem bilinmektedir (40)

- **İnterferon gamma (IFN- γ) sitokininin rolü:**

IFN- γ KL enfeksiyonlarına dirençte kritik bir öneme sahip sitokindir. IFN- γ makrofajları aktive ederek makrofajların parazitleri öldürücü mikrobisidal molekülleri üretmelerini sağlarlar. Ayrıca IFN- γ salınımı, Th2 tipi sitokinlerin salınımını engellediği için Th2 tipi immün cevap baskılanır, KL enfeksiyonun ilerlemesi önlenir. Farelerle yapılan çalışmalar bu bilgiyi desteklemiştir. Farelere anti-IFN- γ antikoru verildiğinde Th2 tipi immün yanıt devreye girmiş ve fareler KL enfeksiyonuna duyarlı hale gelmişlerdir. Tam tersi olarak IFN- γ enjekte edilmiş KL enfeksiyonu olan farelerin ise Th1 tipi immün yanıt oluşturarak iyileştikleri görülmüştür (39).

- **Tümör Nekroz Faktör (TNF) Sitokinlerinin Rolü:**

TNF ailesi sitokinlerin de KL enfeksiyonlarının gidişatında önemli rolleri bulunmaktadır. TNF ailesi sitokinlerin, IFN- γ sitokini ile birlikte sinerjistik etki göstererek KL enfeksiyonlarından korunmada ve iyileşmede rol oynadıkları bildirilmiştir. TNF gen bölgesi eksik olan farelerde makrofajların nitrik oksit (NO) üretemedikleri ve makrofaj içerisindeki parazitleri öldüremedikleri gözlemlenmiştir. Tam tersi olarak TNF gen bölgesi olan farelerin TNF sitokini üretebildikleri için makrofajlar içerisindeki parazitleri öldürdükleri gözlemlenmiştir. Ayrıca KL ile enfekte edilmiş farelere tedavi amaçlı TNF

verildiğinde lezyonlarda azalma ve iyileşme gözlemlenirken, tam tersi olarak anti-TNF antikorları verilmesi durumunda KL lezyonlarının sayının arttığı ve enfeksiyonun daha da ilerlediği gözlemlenmiştir (39).

- **İnterlökin 4 (IL-4) ve İnterlökin -13 (IL-13) sitokinlerinin Rolü:**

IL-4 ve IL-13 KL enfeksiyonuna duyarlılıktan sorumlu Th2 tipi sitokinlerdir. Bu sitokinler IL12, TNF-alfa gibi sitokinlerin salınımını baskırlar ve makrofaj aktivasyonu engellerler. Parazitler makrofajlarca öldüremediği için yani Th1 tipi immün yanıt baskılandığı için enfeksiyon KL'ye duyarlılıkla sonuçlanır. Yapılan çalışmalar yüksek seviyede IL-4 sitokini üretiminin KL enfeksiyonun ilerlemesine yol açtığını göstermiştir. Ayrıca IL-4'ü nötralize eden antikorlar enjekte edildiğinde farelerin KL'ye direnç gösterdikleri bildirilmiştir. Ancak yapılan bir çalışmada farklı *L. major* suşları kullanılmış, IL-4 geni olmayan farelerin sulardan biri ile yapılan enfeksiyona direnç gösterdiği saptanırken, diğeri ile yapılan enfeksiyon duyarlı olduğu saptanmıştır. Bu durum Th2 tipi başka sitokinin de KL'ye duyarlılıkta rol alabileceğini düşündürmüştür. Yapılan bir çalışmada *L. major* ile enfekte farelerde IL-13'ün hastalığı ilerlettiği bildirilmiştir (39).

- **İnterlökin 10 (IL-10) Sitokininin Rolü:**

IL-10 KL enfeksiyonlarına duyarlılıktan sorumlu Th2 tipi sitokinlerden biridir. IL-10 direkt olarak Th1 tipi hücrelerinin IFN- γ üretimini önler. IL-10, ayrıca makrofajların aktive olarak IFN- γ üretmesini de bloke ederler. Bu sayede makrofajlar NO üretmedikleri için parazitleri öldüremezler. Regülatör T hücreleri (Treg) tarafından üretilen IL-10 parazit persistansı ile de ilişkilidir. Treg hücreleri tarafından üretilen IL-10 sitokininin persistan kronik KL enfeksiyonlarına yol açtığı bildirilmiştir (39).

- **İnterlökin 17 (IL-17) Sitokininin ve Th17 Hücrelerinin Rolü:**

Th17 hücresi IL-17 sitokini üreten yeni bir Th hücre grubudur. IL-17 sitokinin immün aracılı hastalıklarda patolojik rol oynarken bazı enfeksiyon hastalıklarında koruyucu rol oynadığı bildirilmiştir. IL-17 salınımının KL'ye duyarlılığa yol açtığı çeşitli hayvan deneylerinde gösterilmiştir. IL-17 gen bölgesi olmayan farelerde *L. major* enfeksiyonları hafif seyrederken, IL-17 gen bölgesi olan farelerde hastalık daha şiddetli seyretmektedir. IL-17'nin enfeksiyon hastalıklarında patolojik rol oynadığı kesin değildir. Yapılan çalışmalarda *Leishmania* türlerine göre IL-17'nin farklı roller oynadığı gösterilmiştir. Örneğin, yapılan bir çalışmada IL-17 ve Th17 hücrelerinin *L. donovani* enfeksiyonlarında hastalığın iyileşmesinde rol aldığı bildirilirken, bir başka çalışmada *L. braziliensis* enfeksiyonlarında patolojik rol oynadığı ve hastalığa duyarlılıktan sorumlu olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak KL enfeksiyonlarında IL-17' nin rolü *Leishmania* türlerine göre değişmektedir (39).

- **Regülatör T Hücrelerin (Treg) Rolü:**

Treg'ler, CD4+CD25+Foxp3+ T hücre grubunda yer alan immün sisteminin aktivasyonunu baskılayarak immün cevabın düzenlenmesinde rol alan hücrelerdir. *L. major* enfeksiyonları sırasında Treg hücreleri primer enfeksiyon bölgesinde birikirler ve efektör T hücreler tarafından parazit eliminasyonunu baskırlar, hastalığın kronikleşmesine aracılık ederler ve sayıca azalmaları parazitlerin yok edilmesini sağlar. T reg hücreleri ayrıca *Leishmania* reaktivasyonunda da rol oynar. Treg hücrelerinin enfeksiyon bölgesinde birikmesi sonucu enfeksiyonun daha uzun sürmesine ve parazitlerin daha uzun süre hayatta kalmasına yol açmaktadır (9).

2.11.2. KL'ye Direnç ve Duyarlılık:

Leishmania enfeksiyonlarına direnç ya da duyarlılıktan hücrel immün cevapta kilit rol oynayan Th1/Th2 dengesi sorumludur. Enfeksiyonun başlangıcında, hem dirençli hem duyarlı konaklarda karışık (Th1/Th2) sitokin cevabı söz konusudur. Önemli olan hangi tip yanıtın baskınlık sağlayacağıdır. Th1/Th2 dengesinin Th1 yönüne kayması KL'ye dirençlilik ve ya iyileşme sağlarken, dengenin Th2 yönüne kayması KL'ye duyarlık ve ya enfeksiyonun ilerlemesinden sorumludur. Bu görüş çeşitli deneysel çalışmalarla desteklenmiştir. Duyarlı ve dirençli farelerle yapılan deneysel *L.major* enfeksiyonlarında Th1 cevabının baskın olması, lezyonların iyileşmesine neden olurken, Th2 cevabının, ilerleyen hastalık tablolarına neden olduğu gözlenmiştir. (38, 39, 41,42, 43, 44).

KL'de iyileşme makrofajların leishmanisidal duruma aktive olması ile gerçekleşir. Bu olay T helper-1 (Th1) tipi immün yanıt aracılığıyla gerçekleşir. Th1 tipi immün yanıt sayesinde latent kronik enfeksiyonların tekrar oluşması da engellenmiş olur. Th1 tipi immün yanıt antijen sunucu DH hücreler tarafından antijenlerin CD4 ve CD8 T hücrelere sunulması ve IL-12, IFN- γ ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin sekresyonu ile karakterizedir (41).

IL-4, IL-10, IL-13, TGF β gibi Th2 tipi sitokinler ise makrofajları deaktive ederek ve koruyucu sitokinlerin salgılanmasını önleyerek Th2 tipi immün yanıtın oluşmasında rol oynarlar. Th2 tipi immün yanıt kronik ve ya rekkürren KL enfeksiyonlarına yol açar. DKL veya MKL' e dönüşen enfeksiyonlarda da Th2 tipi sitokin konsantrasyonları yüksektir. Bu nedenle bu enfeksiyonlara sahip hastalarda kendiliğinden iyileşme görülmez (41).

2.11. 3. KL ve Aşı Çalışmaları:

Enfeksiyonu geçiren kişiler parazit türüne göre hastalığa karşı hayat boyu bağışıklık kazanırlar. KL'e karşı kullanılabilecek lisanslı bir ticari bir aşı henüz yoktur. Aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Tüm paraziter hastalıklar içinde KL'in, aşı geliştirilmesine en uygun olan enfeksiyon olduğu düşünülmektedir. Parazitin oldukça basit bir yaşam döngüsüne sahip olması, özellikle KL'de gözlenen hastalığın resolüsyonunu takiben re-enfeksiyona direnç

sağlanması ve deneysel modellerin ortaya koymuş olduğu, Th1 tipteki hücre sel immün yanıtın hastalığa karşı mutlak koruyuculuğu, aşı hedefi için uygunluk oluşturmaktadır. Uygun bir *Leishmania* aşısı geniş etkili, çapraz koruyuculuğa sahip ve uzun süreli etki gösterebilen bir aşı olmalıdır. Yapılan çalışmalar *Leishmania* enfeksiyonlarından korunmak için, belirli hücre gruplarının aktivasyonlarının gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu hücre grupları DH'ler, CD4+ ve CD8+ T hücreler ile makrofajlardır (45).

Tümörlere ve bazı diğer kronik enfeksiyonlara karşı geliştirilen ve başarı gösteren “DH bazlı aşılar”, KL'ye karşı da denenmektedir. DH'lerin mikroorganizmalarla ve adaptif immünite açısından T hücreleri ile etkileşimleri daha net ortaya çıkarıldıkça, bu hücrelerin immünoterapötik amaçlı manipülasyonları olanaklı hale gelmektedir. Belirli adjuvanların, sitokinlerin, *Leishmania* antijenik peptitleri ile kombinasyonları ya da ex vivo olarak antijenler ile tetiklenen DH'ler, *Leishmania* aşı veya aşı taşıyıcısı olarak kullanılabilir. DH'ler ayrıca, yakın gelecekte immünoterapötik olarak kullanılabilir (38).

Sitokin ve adjuvanlarla kombine edilmiş parazit antijenlerinin, plazmid DNA'sı tarafından kodlandığı DNA bazlı aşılar diğer grup yeni aşılarıdır. Literatürde örneği olan bu aşı yaklaşımı, hem CD4+ hem CD8+ T hücre grubunu uyartabilme kapasitesine sahiptir (38).

Son yıllarda önemi ortaya konmuş olan, vektörün tükrüğündeki immünomodülatör etkili bir takım maddeler de aşı bileşiklerine eklenmeye başlamıştır. “Transmission blocking vaccine” adı verilen bu yeni aşılar, maksadılan gibi regülatör fonksiyonlu parazitik maddeleri içermekte ve vektör tekrar konakla temasa geçtiğinde lokal inflamasyona neden olarak enjekte edilen parazitin yaşamını engellemektedir (38).

Özellikle KL'ye karşı umut vaad eden ve klinik kullanıma en yakın iki aşıdan söz etmek mümkündür. Bunlardan birincisi, “Leishmanization (doğal direnç oluşturmak için aktif enfeksiyon oluşturulması)” adı verilen canlı-virülan doğal aşıdır. Bu aşı, otoklavlanmış canlı *L.major*'u içeren, birinci jenerasyon aşıdır. İdeal edilebilmiş bir antijen preparasyonu olamamasına rağmen, Orta Doğu ve Doğu Avrupa'da kullanılmış olan bu aşı, KL'de %0-75 oranında kuvvetli ve uzun süreli koruma sağlarken, virülansının ayarlanamaması ve katlanılamayacak boyutta

lezyonlar oluşturması sebebiyle kullanımdan kaldırılmıştır. řu anda, DSÖ'nün öncelikli optimizasyon programında, endemik bölgelerde rutin kullanıma uygun hale getirilmesine çalışılmaktadır. İkinci aşı ise "Trifusion" adı ile anılan, üç farklı rekombinant *Leishmania* antijenini (TSA, LACK, LeIF), alum adjuvanı ve IL-12 ile kombine halde taşıyan bir rekombinant alt ünite aşısıdır. Bu aşının, hem CD4+ hem CD8+ T hücrelerini indüklediği ve uzun süreli immünite sağlaması aēısından umut veric olduğu düşünölmektedir (38).

Hayvan modelleri ve insan hastalığından elde edilen verilerin ışığında yakın gelecekte uygun bir immünoprofilaksinin geliştirilmesi mümkün görünmektedir. Canlı aşı ve rekombinant alt ünite aşıları hedefe en yakın grubu oluşturmaktadır (38).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Grubunu Oluşturan Örnekler:

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Etik Kurul Başkanlığı'nın "17.04.2009 tarihli ve 2009/55-04 sayılı Etik Kurul Onayı"nı almıştır.

Çalışmaya, 2010 yılında T.C. Sağlık Bakanlığı Şanlıurfa Valiliği'ne bağlı Remziye Erseven Şark Çıbanı Teşhis ve Tedavi Merkezi'ne başvuran 55 KL hastasından alınan deri lezyon örnekleri ve tam kan örnekleri dahil edildi. Sağlıklı kontrol grubunun kanları, KL'nin endemik olarak görüldüğü Şanlıurfa ili'nde yaşayan ve KL öyküsü bulunmayan 110 sağlıklı bireyden elde edildi. Sağlıklı kontrol grubu seçilirken cinsiyet ve yaş ortalamalarının hasta grubu ile uyumlu olmasına dikkat edildi. Tüm hastalara ve sağlıklı kontrol grubuna çalışma hakkında bilgi verildi ve onayı alınan kişiler çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrol grubuna ait kişilerden 3-4 ml periferik kan örneği, içerisinde antikoagülan (EDTA) bulunan tüplere alındı.

3.2.Kullanılan Araç ve Gereçler:

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- PZR cihazı (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler)
- Seviye 2 Biyogüvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich-Universal 32 R)
- Mikrodalga Fırın (Beko-MD 1500)
- Derin Dondurucu (Uğur)
- Soğutmalı Etüv (Memmert)
- Otoklav (Nüve-OT 020)
- Hassas Terazisi (Scaltec)
- Buzdolabı (Indesit)

- Vortex (NM-110)
- Su Banyosu (Memmert)
- Distile su cihazı (Nüve NS 108)
- Mikropipet Seti (Gilson-Pipetman-P 10-P100-P1000)
- Isı bloğu (Techne DB-2D)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler:

- Tris-Hidroklorid (Sigma T- 5941, Lot 31 K5466)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), sodium salt (Lachema-302430300 30354)
- Tris-baz (Sigma-Aldrich-T8937)
- Borik asit (Merck K29935665 204)
- Brom fenol mavisi (SCP Science B7722)
- Giemsa Boyası (Sigma **48900**)
- Triton X-100 (Sigma **X100**)
- Etanol absolut (Riedel- deHaän/ 32221 Germany)
- Kloroform (Merck K28735331 107)
- Agaroz (Sigma- A-9539 lot 013K0008)
- Taq DNA Polimeraz (Fermentas)
- 10X PCR Buffer (Mg Free) (Fermentas)
- 5 mM MgCl₂ (Fermentas)
- 10 mM dNTP Mix (Fermentas)
- Proteinaz K (Sigma P 2308)
- 100 bç'lik Markır (100 bp DNA Step Ladder) (Fermentas)
- %95'lik etil alkol (Sigma E-285 USA)
- Methanol (Sigma **322415 USA**)
- Tween-80 (Sigma P043 USA)
- Etidyum-Bromid (Sigma E8751-1G USA)
- Distile Su
- DNase, RNase içermeyen su (Fermentas)
- Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche 11 796 828 001)

- Primerler
 - IL-12 p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizmi
 - 1188-F, 5'-TTCTATCTGATTTGCTTTA-3'
 - 1188-R, 5'-CCTACATACCTTACAAAGT -3'
 - IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi
 - Antisense 5'-TCAACAAAGCTGATACTCCA-3'
 - Primer A (sense) 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3'
 - Primer T (sense) 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3'
 - IL-10 -1082 G/A tek nükleotid polimorfizmi
 - Antisense 5'-CAGCCCTTCCATTTTACTTTC-3'
 - Primer G (sense) 5'-TACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3'
 - Primer A (sense) 5'-CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3'
 - İnternal kontrol
 - Primer 1 (sense) 5'-GCCTTCCAACCATTCCTTA-3'
 - Primer 2 (antisense) 5'-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3'
 - IL-4 -590 C/T tek nükleotid polimorfizmi
 - Primer 1: (AW41A) 5'-ACTAGGCCTCACCTGATACG-3'
 - Primer 2: (AW41B) 5'-GTTGTAATGCAGTCCTCCTG-3'
 - TNF- α -308 G/A tek nükleotid polimorfizmi
 - Generic primer (antisense) 5'-TCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3'
 - Primer G (sense): 5'-ATAGGTTTTGAGGGGCATGG-3'
 - Primer A (sense): 5'-AATAGGTTTTGAGGGGCATGA-3'
- Kesim Enzimleri
 - *BsmFI* (*FaqI*) (Fermentas ER1811)
 - *TaqI* (Fermentas ER0671)

3.2.3. Kullanılan Boyalar ve Çözeltiler:

- **Giemsa Stok Boya Hazırlanışı:**

- Cam boncuklar 3.0 mm,
- 30 mL Metanol, saf, asetonsuz 270 mL
- Giemsa boya, toz (sertifiye) 3 g
- Gliserol 140 mL

Temiz, kuru, 500 mL'lik bir kahverengi cam şişe alınır; içine önce cam boncuklar konur ve listedeki diğer maddeler veriliş sırasına göre şişeye eklenir. Burgu kapak sıkıca kapatılır. Şişe bir çalkalayıcının üzerine bir açıyla yerleştirilir; orta hızda, en az 14 gün, günde 30-60 dk olacak şekilde çalkalanır. Kapak nem almayacak şekilde daima sıkıca kapalı tutulduğu sürece stok Giemsa oda ısısında süresiz stabildir. Kullanmadan önce şişe çalkalanır. Çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanılacak kadar bir miktar Whatman No 1 filtre kağıdından süzülerek alınır (35).

- **Çalışma Tamponu 0.0067M, pH 7.2:**

- Stok Tampon 10 mL
- Deiyonize su 990 mL

Kullanmadan önce pH kontrol edilir. pH7.2 olmalıdır. Etiketlenir ve oda ısısında saklanır. Raf ömrü 1 aydır (35).

- **Triton X-100, %5'lik:**

- Deiyonize su (56°C'ye ısıtılmış) 95 mL
- Triton X-100 5 mL

Deiyonize su önceden ısıtılır ve Triton X-100 yavaşça eklenir; yavaş çevrilerek karıştırılır (35).

- **%2.5'luk Giemsa Çalışma Boyası Hazırlanışı:**

- Çalışma tamponu 40 mL
- Giemsa stok boya 1 mL
- %5 Triton X-100 20 µL

Günlük olarak taze hazırlanır (testten hemen önce). Eğer çok sayıda lam boyanacaksa boya gün içinde yenilenmelidir. İdeal olarak hazırlanmış bir çalışma boyası 1 saatten sonra kullanılmamalıdır (35).

3.3. Yöntemler:

3.3.1. Parazitolojik Tanı Yöntemleri:

- **KL lezyonlarından kazıntı örneğinin alınışı ve yayma preparat hazırlanışı:**

Çalışmaya dahil edilen hastalardan alınan kazıntı örnekleri Şanlıurfa Valiliği Şark Çıbanı Teşhis ve Tedavi Merkezi'nde çalışan uzman personel tarafından alındı. Şekil 3.1. tez çalışmasına dahil ettiğimiz bir çocuk hastanın sağ bacağındaki üzeri kurutlu KL lezyonunu göstermektedir. Lezyon %70'lik etil alkolle iyice temizlendi. Lezyonun kenarı iki parmak arasında iyice sıkıldı ve bir bistüri ile 0.5 cm uzunluğunda ve 2-3 mm derinliğinde bir insizyon yapıldı. Gazlı bez yardımı ile insizyon üzerindeki kan damlası alındı. Bu süre içerisinde lezyon kenarına iki parmak ile yapılan basıya devam edilerek kanama önlendi. Bistüri ucu ile insizyonun iç kısmına insizyona dik olacak şekilde kazıma işlemi yapıldı ve mümkün olduğunca kansız seröz bir materyal elde edilmeye çalışıldı. Elde edilen bu materyal temiz bir lam üzerine yayıldı ve metanolle fikse edildi. Yaymalar oda ısısında kurumaya bırakıldı.



Şekil 3.1. Tez çalışmasına dahil ettiğimiz bir çocuk hastanın sağ bacağına üzeri kurutlu KL lezyonu (Bu fotoğraf doktora öğrencisi Fatma Esin AYDIN tarafından 2010 yılında Şanlıurfa Şark Çıbanı Teşhis ve Tedavi Merkezi'nde çekilmiştir.)

- **KL lezyonlarından hazırlanan yayma preparatların Giemsa boyası ile boyanması:**

KL tanısı için alınmış deri kazıntı örneklerinden hazırlanmış ve metanolde fikse edilmiş yaymalar Giemsa boyama yöntemi ile boyandı. Metanolla fikse edilmiş ve kurutulmuş yayma preparatlar %2.5'lük Giemsa çalışma solüsyonu içeren şalenin içine kondu ve 10 dk bekletildi. Yayma preparatları şaleden çıkarıldı ve distile su içine 3-4 kez batırıp çıkarılarak yıkandı. Lamalar düşey pozisyonda dizildi ve havada kurutuldu. Lam kutularında arşivlenerek mikroskopi yapıncaya kadar saklandı (35) .

- **Mikroskopik İnceleme ve Değerlendirme:**

KL deri lezyonundan hazırlanmış ve Giemsa boyası ile boyanmış yayma preparatlar immersiyon objektifi (100X) kullanılarak ışık mikroskopunda incelendi. Giemsa boyanmış yayma preparatların mikroskopik incelenmesi sonucu makrofajların içinde veya dışında çok küçük yuvarlak veya oval organizmalar şeklinde *Leishmania* amastigotları görülen preparatlar pozitif olarak değerlendirildi. Bu yöntemle parazitolojik olarak kesin tanısı konulmuş hastalar tez çalışmasına dahil edildi (35).

3.3.2. Moleküler Yöntemler:

3.3.2.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrol grubundan alınan tam kan örneklerindeki lenfosit ve granülositlerden genomik DNA ekstraksiyonu Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche 11 796 828 001)'i kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce "Inhibitor Removal Buffer"a 20 ml ve yıkama tamponu (wash buffer)'na 80 ml absolut etanol eklendi. Liyofilize olan proteinaz K, 4.5 ml DNase/RNase içermeyen distile suda çözüldü ve 50 µl'lik hacimlere ayrılarak -20°C'de çalışılınca kadar saklandı.

- Steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne 200 µl binding buffer ve 40 µl proteinaz K konuldu.
- Bunun üzerine 200 µl tam kan örneği ilave edildi ve vortekslendi.
- 70°C'de 10 dakika bekletildikten sonra üzrene 100 µl izopropil alkol ilave edildi.
- Her bir hasta için ekstraksiyon kitinin içerisinde bulunan toplama tüpü ve filtreli tüpten bir adet hazırlandı ve ependorf tüpteki sıvının tamamı filtreli tüplere aktarıldı.
- Toplama tüpü ve filtreli tüp 9.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak yenisi filtreli tüpün altına yerleştirildi ve filtreli tüpe 500 µl "inhibitor removal buffer" eklenerek tekrar 9.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak yenisi filtreli tüpün altına yerleştirildi ve filtreli tüpe 500 µl yıkama tamponu eklenerek tekrar 9.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Bu basamak bir kez daha tekrarlandı.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılmadan içerisindeki sıvı atık kabına döküldü, toplama tüpü tekrar filtreli tüpün altına yerleştirilerek 12.000 rpm'de 10 saniye yüksek devirde santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak filtreli tüp steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirildi ve üzerine 70°C'de bekleyen "elution buffer"dan 150 µl ilave edilerek oda ısısında 3 dakika beklendi.

- Süre sonunda 9.000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapılarak filtrelili tüpte bulunan sıvının ependorf tüpe geçmesi sağlandı.
- Edile DNA çalışılmaya kadar -80°C’de saklandı.

3.3.2.2. Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrol grubundan alınan kanlarından elde edilen DNA örneklerindeki tek nükleotid polimorfizmlerini tespit etmek için ARMS PZR ve PZR-RFLP yöntemleri kullanıldı.

3.3.2.2.1. TNF- α Geni Promoter -308 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi

TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizmi için ARMS PZR yöntemi Oh ve ark.’nın (46) çalışmalarından seçilmiştir. Bu yöntemde iki adet allel spesifik ve bir adet genel primer kullanılarak polimorfizmden sorumlu gen bölgesi çoğaltıldı (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. TNF- α geni promoter -308 G/A polimorfizmi ARMS PZR yönteminde kullanılan primer dizileri (46).

Polimorfizm bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bç)
TNF- α promoter -308 G/A	Generic primer (antisense)	TCTCGGTTTCTTCTCCATCG	184
	Primer G (sense)	ATAGGTTTTGAGGGGCATGG	
	Primer A (sense)	AATAGGTTTTGAGGGGCATGA	

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. Standart PZR reaksiyonu son hacmi 50 μ l olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu [(NH₄)₂SO₄] (Fermentas), MgCl₂ (Fermentas), dNTP (Fermentas), primerler [Generic primer (antisense), Primer G ve Primer A], Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve ekstrakte edilen DNA konularak hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.2.’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. TNF- α geni promoter -308 G/A polimorfizmi ARMS PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	-308 G nükleotidi	-308 A nükleotidi
Distile su	33.7 µl	33.7 µl
10X PZR tamponu	5 µl	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	4 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl	1 µl
Generic primer (antisense) (100 pmol/µl)	0.5 µl	0.5 µl
Primer G (sense) (100 pmol/µl)	0.5 µl	-
Primer A (sense) (100 pmol/µl)	-	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.3 µl	0.3 µl
Toplam PZR karışımı hacmi	45 µl	45 µl
DNA	5 µl	5 µl
Toplam hacim	50 µl	50 µl

Oluşturulan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait, üzerinde G ve A harfi yazılı steril 0.2 ml'lik PZR tüplerine 45 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 5'er µl DNA örneği konulup termal döngü cihazına yerleştirildi. TNF- α geni promoter -308 G/A polimorfizmi için termal döngü cihazında ARMS PZR koşulları Çizelge 3.3.'teki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.3. TNF- α geni promoter -308 G/A polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan ARMS PZR koşulları (46).

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	64	50 saniye	10
Zincir Uzaması (Extension)	72	40 saniye	
Denatürasyon	95	20 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	59	50 saniye	20
Zincir Uzaması (Extension)	72	50 saniye	
Son Uzaması (Extension)	72	5 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örnekler elektroferez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

3.3.2.2.2. IFN- γ Geni +874 T/A Tek Nükleotid Polimorfizmi

IFN- γ geni +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi için ARMS PZR yöntemi Lopez-Maderuleo ve ark.'nın (47) çalışmalarından seçildi. Bu yöntemde iki adet allel spesifik ve bir adet genel primer kullanılarak polimorfizmden sorumlu gen bölgesi çoğaltıldı (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi ARMS PZR yönteminde kullanılan primer dizileri (47).

Polimorfizm bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bç)
IFN- γ +874 T/A	Antisense primer	TCAACAAAGCTGATACTCCA	261
	Primer A (sense)	TTCTTACAACACAAAATCAAATCA	
	Primer T (sense)	TTCTTACAACACAAAATCAAATCT	

Yine bu gen bölgesi çalışılırken PZR amplifikasyonunun gerçekleştiğini göstermek için insan büyüme hormonu (erişim numarası M13438) nükleotid dizisinden tasarlanan ve 426 bç'lik bölgeyi çoğaltan primerler ARMS PZR reaksiyonunda aynı anda amplifiye edildi (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizminde kullanılan internal kontrol primer dizileri (47).

Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bç)
İnternal kontrol primer 1	GCCTTCCAACCATTCCTTA	426
İnternal kontrol primer 2	TCACGGATTCTGTTGTGTTTC	

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. Standart PZR reaksiyonu son hacmi 50 μ l olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu [(NH₄)₂SO₄] (Fermentas), MgCl₂ (Fermentas), dNTP (Fermentas), primerler [Generic primer (antisense), Primer A, Primer T, İnternal kontrol primer 1 ve İnternal kontrol primer 2], Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve ekstrakte edilen DNA konularak hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.6.'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.6. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi ARMS PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	+874 T nükleotidi	+874 A nükleotidi
Distile su	32.7 μ l	32.7 μ l
10X PZR tamponu	5 μ l	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4 μ l	4 μ l
dNTP mix (10 mM)	1 μ l	1 μ l
İnternal kontrol primer 1	0.5 μ l	0.5 μ l
İnternal kontrol primer 2	0.5 μ l	0.5 μ l
Antisense primer (100 pmol/ μ l)	0.5 μ l	0.5 μ l
Primer A (sense) (100 pmol/ μ l)	-	0.5 μ l
Primer T (sense) (100 pmol/ μ l)	0.5 μ l	-
Taq DNA polimeraz (5 U/ μ l)	0.3 μ l	0.3 μ l
Toplam PZR karışımı hacmi	45 μ l	45 μ l
DNA	5 μ l	5 μ l
Toplam hacim	50 μl	50 μl

Oluşturulan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait, üzerinde A ve T harfi yazılı steril 0.2 ml'lik PZR tüplerine 45 μ l olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 5'er μ l DNA örneği konulup termal döngü cihazına yerleştirildi. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi için termal döngü cihazında ARMS PZR koşulları Çizelge 3.7.'deki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.7. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan ARMS PZR koşulları (47).

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	62	50 saniye	10
Zincir Uzaması (Extension)	72	40 saniye	
Denatürasyon	95	20 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	56	50 saniye	20
Zincir Uzaması (Extension)	72	50 saniye	
Son Uzaması (Extension)	72	5 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

3.3.2.2.3. IL-10 Geni Promoter -1082 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi

IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid polimorfizmi için ARMS PZR yöntemi Lopez-Maderuleo ve ark.'nın (47) çalışmalarından seçildi. Bu yöntemde iki adet allel spesifik ve bir adet genel primer kullanılarak polimorfizmden sorumlu gen bölgesi çoğaltıldı (Çizelge 3.8.).

Çizelge 3.8. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizmi ARMS PZR yönteminde kullanılan primer dizileri (47).

Polimorfizm bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bç)
IL-10 promoter	Antisense primer	CAGCCCTTCCATTTTACTTTC	550
-1082 G/A	Primer G (sense)	TACTAAGGCTTCTTTGGGAG	
	Primer A (sense)	CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG	

Yine bu gen bölgesi çalışılırken PZR amplifikasyonunun gerçekleştiğini göstermek için insan büyüme hormonu (erişim numarası M13438) nükleotid dizisinden tasarlanan ve 426 bç'lik bölgeyi çoğaltan primerler ARMS PZR reaksiyonunda aynı anda amplifiye edildi (Çizelge 3.9.).

Çizelge 3.9. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizminde kullanılan internal kontrol primer dizileri (47).

Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bç)
İnternal kontrol primer 1	GCCTTCCAACCATTCCTTA	426
İnternal kontrol primer 2	TCACGGATTCTGTTGTGTTTC	

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. Standart PZR reaksiyonu son hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu [(NH₄)₂SO₄] (Fermentas), MgCl₂ (Fermentas), dNTP (Fermentas), primerler [Generic primer (antisense), Primer A, Primer T, İnternal kontrol primer 1 ve İnternal kontrol primer 2], Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve ekstrakte edilen DNA konularak hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.10.'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.10. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizmi ARMS PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	-1082 G nükleotidi	-1082 A nükleotidi
Distile su	32.7 µl	32.7 µl
10X PZR tamponu	5 µl	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	4 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl	1 µl
İnternal kontrol primer 1	0.5 µl	0.5 µl
İnternal kontrol primer 2	0.5 µl	0.5 µl
Antisense primer (100 pmol/µl)	0.5 µl	0.5 µl
Primer G (sense) (100 pmol/µl)	0.5 µl	-
Primer A (sense) (100 pmol/µl)	-	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.3 µl	0.3 µl
Toplam PZR karışımı hacmi	45 µl	45 µl
DNA	5 µl	5 µl
Toplam hacim	50 µl	50 µl

Oluşturulan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait, üzerinde G ve A harfi yazılı steril 0,2 ml'lik PZR tüplerine 45 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 5'er µl DNA örneği konulup termal döngü cihazına yerleştirildi. IL-10 geni -1082 G/A polimorfizmi için termal döngü cihazında ARMS PZR koşulları Çizelge 3.11.'deki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.11. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan ARMS PZR koşulları (47).

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	62	50 saniye	10
Zincir Uzaması (Extension)	72	40 saniye	
Denatürasyon	95	20 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	56	50 saniye	20
Zincir Uzaması (Extension)	72	50 saniye	
Son Uzaması (Extension)	72	5 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

3.3.2.2.4. IL-12B p40 Geni 1188 A/C Tek Nükleotid Polimorfizmi

IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizmi için PZR-RFLP yöntemi Hall ve ark.'nın (48) çalışmalarından seçilmiştir. Bu yöntemde polimorfizmden sorumlu gen bölgesi önce primer spesifik PZR tekniği (Çizelge 3.12.) ile çoğaltılmakta daha sonra çoğaltılan bu bölge *TaqI* enzimi ile kesilerek polimorfizm varlığı araştırılmaktadır.

Çizelge 3.12. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri (48).

Polimorfizm bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bp)
IL-12B p40 1188 A/C	1188-F	TTCTATCTGATTTGCTTTA	233
	1188-R	CCTACATACCTTACAAAGT	

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. Standart PZR reaksiyonu son hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu [(NH₄)₂SO₄] (Fermentas), MgCl₂ (Fermentas), dNTP (Fermentas), primerler (1188-F ve 1188-R), *Taq* DNA polimeraz (Fermentas) ve ekstrakte edilen DNA konularak hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.13.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.13. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	Miktar
Distile su	33.7 µl
10X PZR tamponu	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl
1188-F (100 pmol/µl)	0.5 µl
1188-R (100 pmol/µl)	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.3 µl
Toplam PZR karışımı hacmi	45 µl
DNA	5 µl
Toplam hacim	50 µl

Oluşturulan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait steril 0.2 ml'lik PZR tüplerine 45 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 5'er µl DNA örneği konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi için termal döngü cihazında PZR koşulları Çizelge 3.14.'teki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.14. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları (48).

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	43	30 saniye	30
Zincir Uzaması (Extension)	72	1 dakika	
Son Uzaması (Extension)	72	7 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra primer spesifik PZR tekniği ile amplifiye edilen 233 bç'lik bölge *TaqI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi. PZR-RFLP yönteminde her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.15.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.15. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi RFLP reaksiyon karışımı

RFLP malzemeleri	Miktar
Distile su	1.8 µl
10X Buffer <i>TaqI</i>	1 µl
Restriksiyon enzimi (<i>TaqI</i>)	0.2 µl
Toplam RFLP karışımı hacmi	3 µl
PZR ürünü	7 µl
Toplam hacim	10 µl

Oluşturulan RFLP karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait steril 0.2 ml'lik PZR tüplerine 3 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 7'şer µl DNA örneği konulup termal döngü cihazına yerleştirildi. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi için termal döngü cihazında RFLP koşulları Çizelge 3.16.'daki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.16. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi restriksiyonunda kullanılan RFLP koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İnkübasyon	65	16 saat	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örnekler elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

3.3.2.2.5. IL-4 Geni Promoter -590 C/T Tek Nükleotid Polimorfizmi

IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizmi için PZR-RFLP yöntemi Li ve ark.'nın (49) çalışmalarından seçilmiştir. Bu yöntemde polimorfizmden sorumlu gen bölgesi önce primer spesifik PZR tekniği ile (Çizelge 3.17.) çoğaltılmakta daha sonra çoğaltılan bu bölge *BsmFI* enzimi ile kesilerek polimorfizm varlığı araştırılmaktadır.

Çizelge 3.17. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri (49).

Polimorfizm bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bç)
IL-4 promoter -590 C/T	AW41A	ACTAGGCCTCACCTGATACG	254
	AW41B	GTTGTAATGCAGTCCTCCTG	

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. Standart PZR reaksiyonu son hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu [(NH₄)₂SO₄] (Fermentas), MgCl₂ (Fermentas), dNTP (Fermentas), primerler (AW41A ve AW41B), Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve ekstrakte edilen DNA konularak hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.18.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.18. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	Miktar
Distile su	33.7 µl
10X PZR tamponu	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl
AW41A (100 pmol/µl)	0.5 µl
AW41B (100 pmol/µl)	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.3 µl
Toplam PZR karışımı hacmi	45 µl
DNA	5 µl
Toplam hacim	50 µl

Oluşturulan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait steril 0.2 ml'lik PZR tüplerine 45 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 5'er µl DNA örneği konulup termal döngü cihazına yerleştirildi. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi için termal döngü cihazında PZR koşulları Çizelge 3.19.'daki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.19. IL-4 geni promotör -590 C/T polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları (49).

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	50 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	62	50 saniye	30
Zincir Uzaması (Extension)	72	50 saniye	
Son Uzaması (Extension)	72	5 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra primer spesifik PZR tekniği ile amplifiye edilen 254 bp'lik bölge *BsmFI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi. PZR-RFLP yönteminde her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.20.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.20. IL-4 geni promotör -590 C/T polimorfizmi RFLP reaksiyon karışımı

RFLP malzemeleri	Miktar
Distile su	3.3 µl
10X Tango Buffer	1 µl
50X SAM* Buffer	0.2 µl
Restriksiyon enzimi (<i>BsmFI</i>)	0.5 µl
Toplam RFLP karışımı hacmi	5 µl
PZR ürünü	5 µl
Toplam hacim	10 µl

*SAM: S-adenosyl-L-methionine

Oluşturulan RFLP karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait steril 0.2 ml'lik PZR tüplerine 5 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 5'er µl DNA örneği konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. IL-4 geni promotör -

590 C/T polimorfizmi için ısı döngü cihazında RFLP koşulları Çizelge 3.21.'deki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.21. IL-4 geni promotör -590 C/T polimorfizmi restriksiyonunda kullanılan RFLP koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İnkübasyon	37	16 saat	1
Enzim inaktivasyonu	80	20 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

3.3.2.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

ARMS PZR ve PZR-RFLP yöntemleri ile tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgeleri amplifikasyonla çoğaltıldıktan sonra etidyum bromid (Et-Br) ile boyanmış %1.5'lük agaroz jele yüklenerek ürünlerin elektroforezi yapıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, büyüklükleri belli DNA fragmentlerini içeren moleküler ağırlık standardı ile kıyaslanarak saptandı. Elektroforez tamponu olarak Tris-Borik Asit-Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) [TBE] kullanıldı. 10X konsantre stok olarak hazırlanan bu tampon kullanılmadan önce 1X olacak şekilde distile su ile sulandırıldı.

- **Agaroz Jelin Hazırlanması**

Bir balon jodede 0.45 gr agaroz 30 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Biraz soğuduktan sonra Et-Br'den 3 µl eklendi. Daha sonra jel, tarakların yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Katılaşana kadar (25-30 dakika) oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek amplifiye edilen ve restriksiyon enzimleri ile kesilen örneklerin yüklenmesine hazır hale getirildi.

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra buzdolabında bekleyen örneklerden 10'ar µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl 1X TBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 süktroz veya gliserol, %0.25 brom fenol mavisi) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan mini tank için 30 mA akım verilerek, örneklerin elektroforezi 30-40 dakika boyunca gerçekleştirildi. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip ederek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu. Jel tanktan çıkarılarak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-translüminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde kayıtları yapıldı.

3.3.2.4. Tek Nükleotid Polimorfizminden Sorumlu Gen Bölgelerinin Tespiti

TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonunda, agaroz jel elektroforez işleminden sonra 184 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölge olarak değerlendirildi.

IFN- γ geni +874 T/A tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonunda, agaroz jel elektroforez işleminden sonra 261 bç ve internal kontrol primerlerinin amplifiye ettiği 426 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölgeler olarak değerlendirildi.

IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonunda, agaroz jel elektroforez işleminden sonra 550 bç ve internal kontrol primerlerinin amplifiye ettiği 426 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölgeler olarak değerlendirildi.

IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizm varlığının PZR-RFLP yöntemi ile araştırılmasında, PZR amplifikasyon ürünlerinin elektroforezi sonrası 233 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölge olarak değerlendirildi. Yine aynı gen bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin *TaqI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucu oluşan RFLP ürünlerinin elektroforezinde 233, 165 ve 68 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölgeler olarak değerlendirildi.

IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizm varlığının PZR-RFLP yöntemi ile araştırılmasında, PZR amplifikasyon ürünlerinin elektroforezi sonrası 254 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölge olarak değerlendirildi. Yine aynı gen bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin *BsmFI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucu oluşan RFLP ürünlerinin elektroforezinde 254, 210 ve 44 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölgeler olarak değerlendirildi.

3.3.3. İstatistiksel Analiz

Hastalık ile genotiplerin ve allellerin ilişkileri ayrı ayrı ki kare veya likelihood ratio testi ile incelenmiştir. Anlamli bulunan genotip ve allel frekansları için p değerleri hesaplanmıştır. Allel ve genotip dağılımı bakımından grupların Hardy-Weinberg dengesi kontrol edilmiştir. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma cinsinden, kategorik değişkenler için ise frekans ve yüzde olarak verilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS v.11.5.1 ve MedCalc v.11.5.0 paket programları ile yapılmıştır. İstatistiksel analizlerde $p < 0.05$ ise sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının Genel Özellikleri

Bu çalışmaya 2010 yılında T.C. Sağlık Bakanlığı Şanlıurfa Valiliği'ne bağlı Şanlıurfa Remziye Erseven Şark Çıbanı Teşhis ve Tedavi Merkezi'ne başvurmuş ve KL tanısı konulmuş 55 hasta dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen 55 hastanın 20 (%36.4) 'si erkek, 35(%63.6)'i kadındı. Hastaların 22 (% 40)'si onsekiz yaşından küçük çocuk hastalar hastalar iken 33 (%60)'ü 18 yaşından büyük yetişkin hastalardı. Hastaların yaş ortalamaları 26.13±14.3 idi. Yaş ve cinsiyet ortalamaları bakımından hasta grubu ile uyumlu olan sağlıklı kontrol grubunu oluşturan 110 kişinin 93 (%84.5)'ü erkek, 17 (%15.5)'si kadındı ve yaş ortalamaları 29.40±11.56 idi (minimum:18, maksimum:57) (Çizelge 4.1) .

Çalışmaya dahil edilen 55 KL hastasının 48 (%87.27) 'i daha önce tedavi görmemiş Akut KL (AKL) hastası, 4 (%7.27)'ü tedaviye dirençli kronik KL (KKL) , 3 (%5.46) 'ü ise iyileşmeden sonra lezyonları yeniden nüks eden Rezidivan KL (RKL) hastasıydı. (Çizelge 4.1)

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının demografik özellikleri

Demografik Özellikler	Hasta Grubu (n=55)	Kontrol Grubu (n=110)
<u>Yaş Ortalaması</u>	26.13±14.34	29.41±11.56
<u>Yaş Grubu</u>		
-Erişkin (>18)	33 (% 60)	90 (%81.8)
-Çocuk (<18)	22 (% 40)	20 (% 18.2)
<u>Cinsiyet</u>		
-Erkek	20 (%36. 36)	93 (%84. 5)
-Kadın	35 (%63. 64)	17 (% 15. 5)

Çizelge 4.2. Hasta grubunu oluşturan 55 kişinin tanısına göre demografik verilerin karşılaştırılması

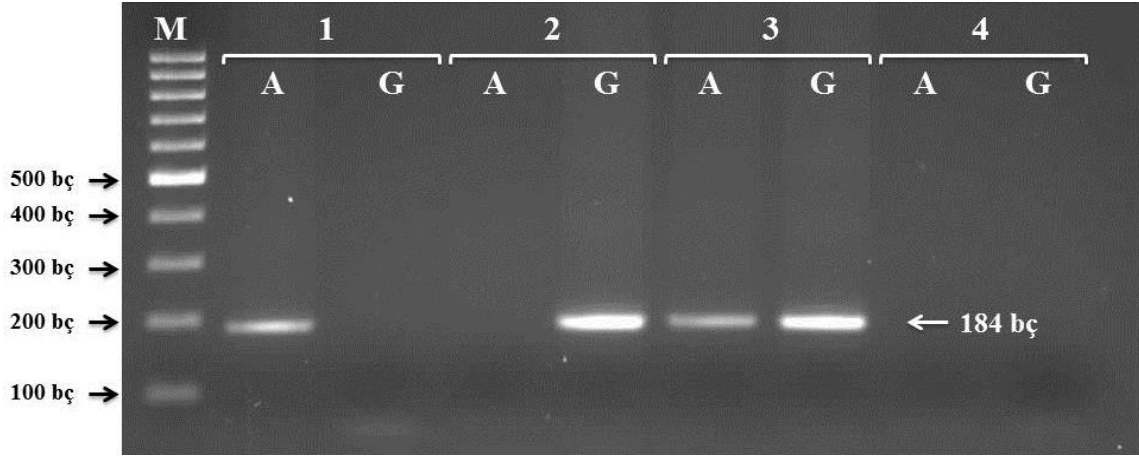
Demografik veri/ Tanı	Akut KL	Kronik KL	Rezidivan KL	Toplam
Hasta Sayısı	48 (%87.27)	4 (%7.27)	3 (%5.45)	55 (%100)
Erkek Hasta	15 (%27.27)	3 (%5.45)	2 (%3.63)	20 (%36.36)
Kadın Hasta	33 (%60)	1 (%1.82)	1 (%1.82)	35 (%63,64)
Çocuk Hasta (<18)	17 (%30.91)	3 (%5.45)	2 (%3.63)	22 (%40)
Erişkin Hasta (>18)	31 (%56.36)	1 (%1.82)	1 (%1.82)	33 (%60)

4.2. Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

Sitokin salınımindan sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmlerin moleküler yöntemlerle araştırılmasında ARMS PZR ve PZR-RFLP yöntemleri kullanıldı.

4.2.1. TNF- α Geni Promoter -308 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizm varlığını araştırmak için ARMS PZR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde iki adet allel spesifik ve bir adet genel primer kullanılarak hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen DNA'ların polimorfizmden sorumlu gen bölgesi amplifiye edildi. Amplifikasyonu sonrası oluşan 184 bp'lik bölgenin %1.5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizminin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 184 bç'lik bölgenin %1.5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), A: A alleli, G: G alleli, 1 nolu örnek: AA Homozigot, 2 nolu örnek: GG Homozigot, 3 nolu örnek: GA Heterozigot, 4 nolu örnek: Negatif kontrol].

Agaroz jel elektroforez sonrası oluşan bant paternlerinin incelenmesi sonrası hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki allel ve genotip dağılımı Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Hasta ve kontrol grupları arasında TNF- α geni promoter -308 G/A bölgesi tek nükleotid gen polimorfizmi allel ve genotip dağılımı

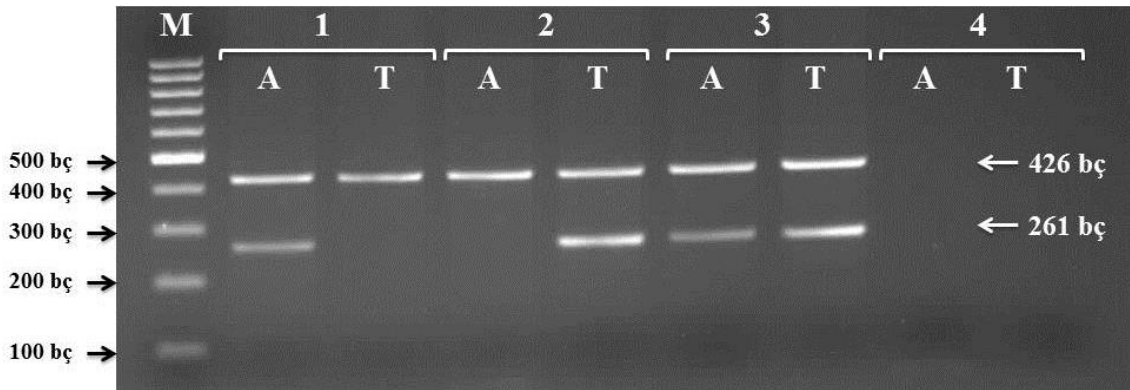
Allel/ Genotip Dağılımları	Hasta Grubu (n=55)	Kontrol Grubu (n=110)	P değeri
<u>TNF-α -308 G\rightarrowA allel</u>			
A alleli	27 (%24,5)	22 (%10,0)	0.001
G alleli	83 (%75,5)	198 (%90,0)	
<u>TNF-α -308 G\rightarrowA genotip</u>			
AA genotipi	4 (%7,3)	0 (0,0%)	0.001
GA genotipi	19 (%34,5)	22 (%20,0)	
GG genotipi	32 (%58,2)	88(%80,0)	

TNF- α geni promoter -308 G/A bölgesi tek nükleotid gen polimorfizmlerinin allel (p:0.001) ve genotip (p: 0.001) dağılımları hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında %5 güven düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmaktadır.

TNF- α geninde görülen tek nükleotid polimorfizmlerinin çalışılan gruplar arasındaki allel dağılımları karşılaştırıldığında; hasta grubunda (%24.5) A allelinin daha sık bulunduğu, sağlıklı kontrol grubunda (%90) ise G allelinin daha sık bulunduğu gözlemlenmiştir. TNF- α geninde görülen tek nükleotid polimorfizmlerinin çalışılan gruplar arasındaki genotip dağılımları karşılaştırıldığında; hasta grubunda (%7.3) AA genotipinin daha sık bulunduğu, sağlıklı kontrol grubunda (%80) ise GG genotipinin daha sık bulunduğu gözlemlenmiştir.

4.2.2. IFN- γ Geni +874 A/T Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

IFN- γ geni +874 A/T tek nükleotid polimorfizm varlığını araştırmak için ARMS PZR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde iki adet allel spesifik ve bir adet genel primer kullanılarak hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen DNA'ların polimorfizmden sorumlu gen bölgesinin 261 bç'lik bölgesi amplifiye edildi. Yine bu gen bölgesi çalışılırken PZR amplifikasyonunun gerçekleştiğini göstermek için insan büyüme hormonu nükleotid dizisinden tasarlanan ve 426 bç'lik bölgeyi amplifiye eden primerler ARMS PZR reaksiyonunda aynı anda kullanıldı. Amplifikasyon sonrası oluşan 261 ve 426 bç'lik bölgelerin %1.5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. IFN- γ geni +874 A/T tek nükleotid polimorfizminin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 261 bç'lik bölge ile insan büyüme hormonunun 426 bç'lik bölgesinin %1.5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), A: A alleli, T: T alleli, 1 nolu örnek: AA Homozigot, 2 nolu örnek: TT Homozigot, 3 nolu örnek: TA Heterozigot, 4 nolu örnek: Negatif kontrol].

Agaroz jel elektroforez sonrası oluşan bant paternlerinin incelenmesi sonrası hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki allel ve genotip dağılımı Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Hasta ve kontrol grupları arasında IFN- γ geni +874 T/A bölgesi tek nükleotid gen polimorfizmi allel ve genotip dağılımları

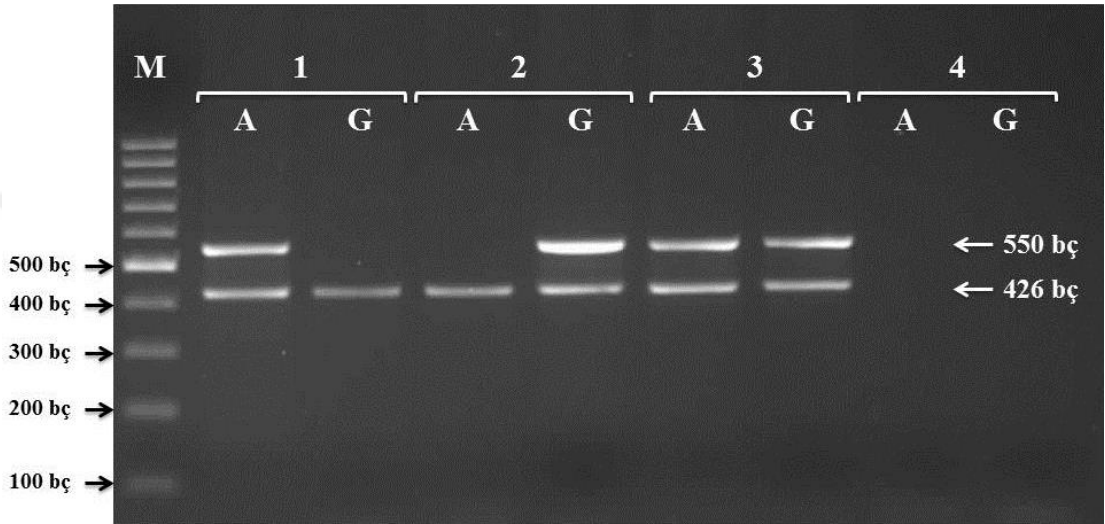
Allel/Genotip Dağılımı	Hasta Grubu (n=55)	Kontrol Grubu (n=110)	P değeri
<u>IFN-γ +874 T\rightarrowA Allel</u>			
A alleli	52 (%47,3)	116 (%52,7)	p: 0.414
T alleli	58 (%52,7)	104 (%47,3)	
<u>IFN-γ +874 T\rightarrowA Genotip</u>			
AA Genotipi	18 (%32,7)	34 (%30,9)	P: 0.133
TA Genotipi	16 (%29,1)	48 (%43,6)	
TT Genotipi	21 (%38,2)	28 (%25,5)	

IFN- γ geni +874 T/A bölgesi tek nükleotid gen polimorfizmlerinin allel (p: 0.414) ve genotip (p: 0.133) dağılımları hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmamaktadır.

4.2.3. IL-10 Geni Promoter -1082 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid polimorfizm varlığını araştırmak için ARMS PZR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde iki adet allel spesifik ve bir adet genel primer kullanılarak hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen DNA'ların polimorfizmden sorumlu gen bölgesinin 550 bç'lik bölgesi amplifiye edildi. Yine bu gen bölgesi çalışılırken PZR amplifikasyonunun

gerçekleştiğini göstermek için insan büyüme hormonu nükleotid dizisinden tasarlanan ve 426 bç'lik bölgeyi amplifiye eden primerler ARMS PZR reaksiyonunda aynı anda kullanıldı. Amplifikasyon sonrası oluşan 550 ve 426 bç'lik bölgelerin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.3. IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid polimorfizminin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 550 bç'lik bölge ile insan büyüme hormonunun 426 bç'lik bölgesinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), A: A alleli, G: G alleli, 1 nolu örnek: AA Homozigot, 2 nolu örnek: GG Homozigot, 3 nolu örnek: GA Heterozigot, 4 nolu örnek: Negatif kontrol].

Agaroz jel elektroforez sonrası oluşan bant paternlerinin incelenmesi sonrası hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki allel ve genotip dağılımı Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

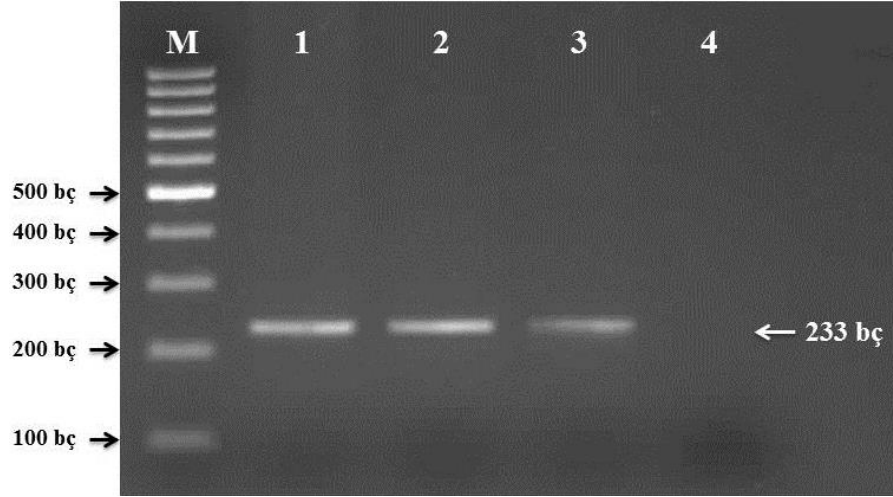
Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol grupları arasında IL-10 geni promoter -1082 G/A bölgesi tek nükleotid gen polimorfizmi allel ve genotip dağılımları

Allel/Genotip Dağılımı	Hasta Grubu (n=84)	Kontrol Grubu (n=110)	P de ğ e ri
IL-10 -1082 G→A Allel			
A alleli	67 (%60,9)	114 (%51.8)	0.148
G alleli	43(%39,1)	106 (%48.2)	
IL-10 -1082 G→A Genotip			
AA	22 (%40,0)	5 (%4.5)	<0.001
GA	23 (%41,8)	104 (%94.5)	
GG	10 (%18,2)	1 (%0.9)	

IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid gen polimorfizminin allel dağılımları (p: 0.148) hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamaktadır. IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid gen polimorfizmlerinin genotip dağılımları (p<0.001) hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmaktadır. Ancak bu gen bölgesi için popülasyonun ve kontrol grubunun dengede olmaması nedeniyle gruplar arası genotip dağılımının karşılaştırılması yapılamamaktadır. (Kontrol Grubu Hardy-Weinberg dengesi p<0.001).

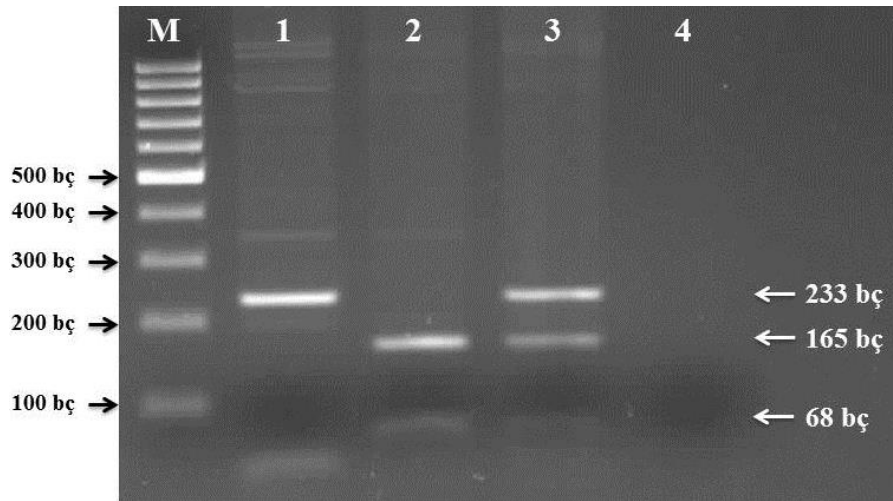
4.2.4. IL-12B p40 Geni 1188 A/C Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizm varlığını araştırmak için PZR-RFLP yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, önce primer spesifik PZR tekniği ile hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen DNA'lar kullanılarak polimorfizmden sorumlu gen bölgesi amplifiye edildi. Amplifikasyon sonrası oluşan 233 bç'lik bölgenin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.4.'te verilmiştir.



Şekil 4.4. IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 233 bç'lik bölgenin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), Kolon 1, 2, 3: 233 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon 4: Negatif kontrol].

Daha sonra amplifiye edilen bu bölge *TaqI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek polimorfizm varlığı araştırıldı. Kesim sonucu oluşan 233, 165 ve 68 bç'lik RFLP ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 233 bç'lik bölgenin *TaqI* restriksiyon

endonükleaz enzimi ile kesimi sonrası 233, 165 ve 68 bç'lik RFLP ürünlerinin %1.5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), Kolon 1: AA Homozigot (233 bç), Kolon 2: CC Homozigot (165 bç+68 bç), Kolon 3: AC Heterozigot (233 bç+165 bç+68 bç), Kolon 4: Negatif kontrol].

Agaroz jel elektroforez sonrası oluşan bant paternlerinin incelenmesi sonrası hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki allel ve genotip dağılımı Çizelge 4.6.'de verilmiştir.

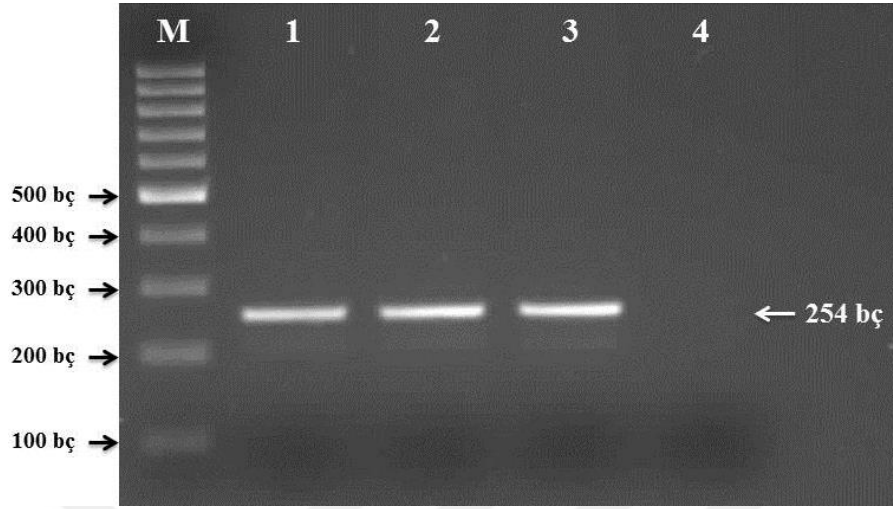
Çizelge 4.6. Hasta ve kontrol grupları arasında IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid gen polimorfizmi allel ve genotip dağılımları

Allel/Genotip Dağılımları	Hasta Grubu (n=55)	Kontrol Grubu (n=110)	P değeri
IL-12B p40 1188 A→C Allel			
A alleli	90 (%81,8)	160 (%72,7)	0.093
C alleli	20 (%18,2)	60 (%27,3)	
IL-12B p40 1188 A→C Genotip			
AA genotipi	35 (%63,6)	58 (%52,7)	0.86
AC genotipi	20 (%36,4)	44 (%40,0)	
CC genotipi	0 (%0,0)	8 (%7,3)	

IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizmi için allel ($p=0.93$) ve genotip ($p=0.86$) dağılımı bakımından hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

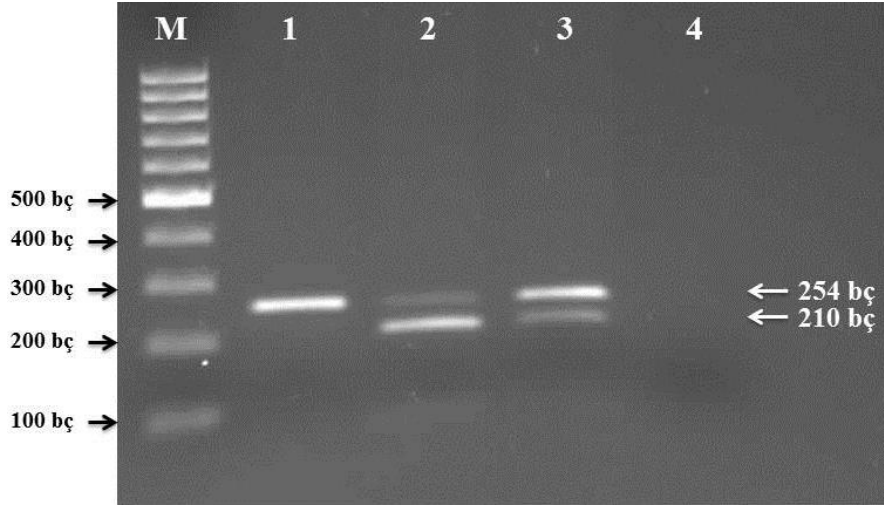
4.2.5. IL-4 Geni Promoter -590 C/T Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizm varlığını araştırmak için PZR-RFLP yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, önce primer spesifik PZR tekniği ile hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen DNA'lar kullanılarak polimorfizmden sorumlu gen bölgesi amplifiye edildi. Amplifikasyon sonrası oluşan 254 bç'lik bölgenin %1.5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 254 bç'lik bölgenin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), Kolon 1, 2, 3: 254 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon 4: Negatif kontrol].

Daha sonra amplifiye edilen bu bölge *BsmFI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek polimorfizm varlığı araştırıldı. Kesim sonucu 254, 210 ve 44 bç'lik RFLP ürünleri oluşmaktadır. 44 bç'lik RFLP ürünü %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde görülememektedir. 254 ve 210 bç'lik RFLP ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 254 bç'lik bölgenin *BsmFI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonrası 254 ve 210 bç'lik RFLP ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü (44 bç'lik RFLP ürünü %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde görülememektedir) [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), Kolon 1: TT Homozigot (254 bç), Kolon 2: CC Homozigot (210 bç+48 bç), Kolon 3: CT Heterozigot (254 bç+210 bç+48 bç), Kolon 4: Negatif kontrol].

Agaroz jel elektroforez sonrası oluşan bant paternlerinin incelenmesi sonrası hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki allel ve genotip dağılımı Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Hasta ve kontrol grupları arasında IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid gen polimorfizmi allel ve genotip dağılımları

Allel/Genotip Dağılımı	Hasta Grubu (n=55)	Kontrol Grubu (n=110)	<i>p</i>
IL-4 -590 C→T Allel			
C alleli	82 (%74,5)	193 (%87.7)	0.004
T alleli	28 (%25,5)	27 (%12.3)	
IL-4 -590 C→T Genotip			

CC genotipi	33 (%60,0)	83 (%75.45)	0.001
CT genotipi	16 (%29,1)	27 (%24.55)	
TT genotipi	6 (%10,9)	0 (%0.00)	

IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid gen polimorfizmlerinin allel (p: 0.004) ve genotip (p: 0.001) dağılımları hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında %5 güven düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmaktadır. IL-4 geninde görülen tek nükleotid polimorfizmlerinin çalışılan gruplar arasındaki allel dağılımları karşılaştırıldığında; hasta grubunda (%25.5) T allelinin daha sık bulunduğu, sağlıklı kontrol grubunda (%87.7) ise C allelinin daha sık bulunduğu gözlemlenmiştir. IL-4 geninde görülen tek nükleotid polimorfizmlerinin çalışılan gruplar arasındaki genotip dağılımları karşılaştırıldığında; hasta grubunda (%10.9) TT genotipinin daha sık bulunduğu, sağlıklı kontrol grubunda (%75) ise CC genotipinin daha sık bulunduğu gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de halen önemli bir halk sağlığı sorunu olan KL enfeksiyonları birçok faktöre bağlı olarak gelişmektedir. Bu faktörlerden birisi de konağın genetik yatkınlığı olabilir. Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda KL' ye karşı etkili immün cevabın oluşturulmasında kritik öneme sahip çeşitli genler ve yollar ortaya çıkarılmış olmasına rağmen insanlarda KL' ye karşı immün cevapta rol alan ve hastalığa genetik yatkınlıkla ilgili mekanizmaların büyük bir kısmı henüz tam olarak bilinmemektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda birçok enfeksiyon hastalığının konağın genetik yapısının etkisi ile ortaya çıktığına işaret eden bulgular gittikçe artmaktadır. Enfeksiyöz ajanlara karşı konak immün yanıtını belirleyen birçok gende SNP'ler saptanmıştır. Bir patolojiye neden olmayan ve toplumda %1'den daha sık görülen Genomik DNA'daki tek nükleotid farkları olan SNP'ler, insanlar arasındaki genetik çeşitliliğin en önemli formudur. SNP'ler bir gen ifadesinin niteliği veya niceliği ile doğrudan ilişkili olup toplumlarda hastalıkların görülme sıklığı, şiddeti, ilaç yararlanımı ve toksisitesi açısından farklar oluşturur. SNP'ler mutasyonlardan farklıdır. Mutasyonlar DNA ya da kromozom yapısında bir değişiklik oluşturan varyasyonlardır. Mutasyonlar hastalık nedeni olabilirken, SNP'ler hastalık nedeni değildir, ancak hastalığa yatkınlık nedeni olabilirler. Konak genlerinde oluşan SNP'ler gen ürünlerinin farklı kodlanması ile veya transkripsiyon kontrolünü etkileyerek konağın hastalığa duyarlılığı veya direnci ile ilişkili olan doğal veya kazanılmış immün cevabı etkileyebilir (9).

Sitokin gen bölgelerinde görülen SNP' lerin malarya, leishmaniasis, lepra, bruselloz, tüberküloz, salmonelloz, hepatit B ve C, Kronik Papilloma virus enfeksiyonları, sınısityal viral enfeksiyonlar gibi bir çok viral, bakteriyel, fungal ve paraziter enfeksiyon hastalığına genetik yatkınlıkta rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (9).

Konağın KL enfeksiyonuna duyarlılığı veya direnci hücresele immün yanıt mekanizmalarından Th1 tipi ve Th2 tipi immün yanıt arasındaki dengeye bağlıdır.

Th1 tipi immün yanıt KL'ye dirençten sorumlu iken Th2 tipi yanıt ise KL'ye duyarlılığa yol açmaktadır. Bu dengeyi sağlamada hücrel immün yanıtta rol alan hücrelerden salınan sitokinlerin rolü büyüktür. Örneğin, IL-12, IFN-gamma, TNF-alfa gibi proinflamatuvar sitokinler Th1 tipi immün yanıtta kilit rol oynarlar ve KL'ye dirençten ve iyileşmeden sorumludurlar. IL-4, IL-10, IL-13 gibi antiinflamatuvar sitokinler ise Th2 tipi immün yanıtta yol açarak KL'ye duyarlılık ve hastalığın oluşumundan sorumludur (41, 50, 51).

KL'ye konağın genetik yatkınlığını saptamada öncelikli olarak hücrel immün yanıtta kilit rol oynayan proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinleri kodlayan gen bölgelerindeki SNP'leri araştırmak önemli olmaktadır. Fakat sitokin gen bölgelerinde görülen SNP'lerin KL'ye genetik yatkınlıkla ilişkisi ile yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. Sadece bu çalışmalarla sitokin genlerinde görülen SNP'lerin KL hastalığına genetik yatkınlıkla ilişkili olduğunu söylemek uygun olmamakta daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ülkemizde ise bu konu ile herhangi bir çalışma bildirilmemiştir. Literatüre katkısı olacağını düşündüğümüz bu çalışmada, KL'ye immün yanıtta kilit rol oynadığı düşünülen çeşitli sitokinlerin salınımdan sorumlu gen bölgelerinde saptanan tek nükleotid gen polimorfizmlerinin KL'ye genetik yatkınlıkla ilişkisini belirlemek amaçlanmıştır.

Proinflamatuvar sitokinlerden IL-12 sitokini T hücrelerinin Th1 tipi hücrelere polarizasyonunu sağlayarak Th1 hücrelerini aktive eder ve NK hücrelerinin aktivasyonu ile IFN- γ üretimini sağlayarak KL enfeksiyonlarını önleyen Th1 tipi hücrel immün cevabın oluşumunda kilit rol oynarlar. Enfekte DH'lerden IL-12 salınımı sayesinde *L. major* kaynaklı KL enfeksiyonlarının önlendiği bildirilmiştir. Antijen sunucu DH'lerden salınan IL-12 sitokininin miktarı Th1/Th2 tipi immün yanıtta yön vermektedir. Yapılan çalışmalarda DH'ler tarafından az miktarda IL-12 salınımı T hücrelerinin Th1 hücrelerine polarizasyonuna, çok miktarda IL-12 salınımının ise Th2 hücrelerine polarizasyonunda rol aldığını göstermiştir. (39, 43, 44).

Ülkemizde ve dünyada IL-12 sitokini kodlayan gen bölgelerinde tek nükleotid polimorfizmlerinin KL'ye yatkınlıkla ilişkisini gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışmaya göre IL-12B p40 1188 A/C gen bölgesi polimorfizmlerinin KL'ye duyarlılık veya dirençle anlamlı bir ilişkisi

bulunmamaktadır. Bu konu ile ilgili dünyada KL hastalarıyla değil VL hastalarıyla yapılmış bir çalışma mevcuttur. *IL12B geni* -1188 pozisyonunda görülen polimorfizmlerin VL'ye duyarlılıkta veya dirençteki rolünü saptamak amacıyla Ahmed ve ark. (2015)'nin 44 Iraklı VL hastası ve 40 sağlıklı kontrolle yaptığı çalışmada IL12 – 1188 polimorfizmleri ile VL arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ancak CC genotipine sahip VL hastalarında daha yüksek düzeyde IL-12 salınımı olduğu bildirilmiştir (52).

IFN- γ sitokini, KL enfeksiyonlarına dirençte kritik bir öneme sahip Th1 tipi pro-inflamatuvar sitokinlerdendir. IFN- γ makrofajları aktive ederek makrofajların parazitleri öldürücü mikrobisidal molekülleri üretmelerini sağlarlar. Ayrıca IFN- γ salınımı, Th2 tipi sitokinlerin salınımını engellediği için Th2 tipi immün cevap baskılanır, KL enfeksiyonunun ilerlemesi önlenir (39, 43, 44).

Ülkemizde IFN- γ sitokini kodlayan gen bölgelerinde tek nükleotid polimorfizmlerinin KL'ye yakınlıkla ilişkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışmada IFN- γ +874 T/A gen bölgesi polimorfizmlerinin KL'ye duyarlılık veya dirençle anlamlı bir ilişkisi bulunmamıştır. Dünyada IFN- γ sitokin gen poliorfizmlerinin KL'ye yakınlıkla ilişkisini belirleyen birkaç çalışma mevcuttur.

Matos ve ark. (2007) IFNG+874T/A gen bölgesinde görülen tek nükleotid polimorfizmlerinin ve in vitro IFN- γ salınımının American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) ile ilişkisini saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada Brezilyalı 136 ATL hastasını (78 KL ve 58 MKL) ve 609 sağlıklı bireyi değerlendirmişlerdir. IFN- γ +874 gen bölgesi tek nükleotid polimorfizmini ARMS-PCR ile periferal kan mononükleer hücrele (PBMC) kültüründen IFN- γ sitokin ölçümünü ise ELISA yöntemiyle analiz etmişlerdir. +874T/A polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. AA genotipine sahip KL hastalarında IFN- γ düzeyi düşük bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışmada IFN- γ +874T/A polimorfizmi KL veya MKL'ye duyarlılıkla ilişkili bulunmamıştır. IFNG +874T/A polimorfizminin KL hastalarında IFN- γ düzeyini düşürdüğü fakat KL hastalığını önlemediği düşünülmektedir (53).

Kamali-Sarvestani ve ark. (2006)'larının İran'da yaptığı çalışmada, 201 kendiliğinden iyileşen KL hastası, 92 asemptomatik enfekte kontrol, 58 KKL

hastası ve 668 normal kontrol grubundan aldıkları kan örneklerini çalışmaya dahil etmişler ve Allele Specific Oligonukleotide Polymerase Chain Reaction (ASO-PCR) ve PCR-RFLP yöntemleri kullanarak TNF- α promoter -308 G/A, TNF- β +252 G/A, IL-4 -590 C/T, IFN- γ +874 A/T sitokin gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmlerini araştırmışlardır. Normal kontrol grubu ile kıyaslandığında IFN- γ +874 A/T polimorfizminin kronik KL hasta grubunda daha az sıklıkta görüldüğü saptanırken, kendiliğinden iyileşen KL hasta grubu ile asemptomatik enfekte kontrol grubu arasında IL-4 -590 C/T polimorfizmi frekansı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada, IL-4 promoter -590 C/T gen bölgesinde görülen fonksiyonel genetik varyantların KL enfeksiyon riskini arttırdığını, IFN- γ +874 A/T gen bölgesinde görülen polimorfizmlerin ise hastalığı KKL'ye çevirebileceğini göstermiştir (54).

Magsood ve ark. (2014)'nin İran'da 86 VL hastası, 82 seropozitif birey ve 99 seronegatif sağlık kontrol grubu olmak üzere 267 bireyi dahil ettikleri çalışmada ARMS- PCR ile IFN- γ geninin +874A/T lokusunda görülen polimorfizmlerin VL ile ilişkisini araştırmışlardır. IFN- γ +874 A alleli sıklığı seropozitif bireylere(54%) kıyasla hasta gurubunda (%75.5) daha yüksek bulunmuştur. IFN- γ TT genotipi en sık seropozitif bireylerde(%34.1) görülürken, en az sıklıkla hasta grubunda(%24.5).görölmüştür. Fakat bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışmaya göre IFN- γ +874A/T polimorfizmlerinin VL ile anlamlı bir ilişkisi bulunmamaktadır (55).

Mohamed ve ark. (2003) IL4 veya IFNGR1 genlerindeki polimorfizmlerin VL'ye duyarlılıkla ilişkisini saptamak amacıyla PKDL öyküsü bulunan veya bulunmayan VL hastalı 59 aile ile yaptıkları çalışmada, Th2 tipi sitokinlerden IL-4 polimorfizmlerinin VL'ye duyarlılıkta rol aldığı, IFNGR1'de görülen polimorfizmlerin ise PKDL'ye duyarlılıkta rol aldığı bildirilmiştir (56).

Ahmed ve ark. (2015) 44 Iraklı VL hastası ve 40 sağlıklı kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada IFN- γ geni +874 bölgesinde görülen SNP'lerin VL ile ilişkisini saptamayı amaçlamışlardır. SNP analizleri sonuçlarına göre; IFN- γ geni +874 allel ve genotipleri hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık göstermiştir. Çalışmada ayrıca, hasta ve kontrol grupları arasındaki IFN- γ

+874 genotipleri farklılığının serum IFN- γ düzeylerini etkilemediği saptanmıştır (57).

Th1 tipi proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α 'nın da KL enfeksiyonlarına direnç ve iyileşmede önemli rolleri bulunmaktadır. TNF ailesi sitokinlerin, IFN- γ sitokini ile birlikte sinerjistik etki göstererek KL enfeksiyonlarından korunmada ve iyileşmede rol oynadıkları bildirilmiştir. TNF gen bölgesi eksik olan farelerde makrofajların NO üretmedikleri ve makrofaj içerisindeki parazitleri öldüremedikleri gözlemlenmiştir. Tam tersi olarak TNF gen bölgesi olan farelerin TNF sitokini üretebildikleri için makrofajlar içerisindeki parazitleri öldürdükleri gözlemlenmiştir. Ayrıca KL ile enfekte edilmiş farelere tedavi amaçlı TNF verildiğinde lezyonlarda azalma ve iyileşme gözlemlenirken, tam tersi olarak anti-TNF antikorları verilmesi durumunda KL lezyonlarının sayının arttığı ve enfeksiyonun daha da ilerlediği gözlemlenmiştir (39, 43, 44).

Ülkemizde TNF- α sitokini kodlayan gen bölgelerinde tek nükleotid polimorfizmlerinin KL'ye yakınlıkla ilişkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışmada TNF- α 308 G/A gen bölgesi polimorfizmlerinin KL'ye duyarlılık veya dirençle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunmuştur. TNF- α 308 G/A geni A alleli ve AA genotipi KL'ye duyarlılıkla ilişkili bulunurken, G alleli ve GG genotipi KL'ye dirençle ilişkili bulunmuştur. TNF- α geninde görülen tek nükleotid polimorfizmlerinin çalışılan KL hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasındaki allel dağılımları karşılaştırıldığında; hasta grubunda (%24.5) A allelinin daha sık bulunduğu, sağlıklı kontrol grubunda (%90) ise G allellinin daha sık bulunduğu, genotip dağılımları karşılaştırıldığında ise; hasta grubunda (%7.3) AA genotipinin daha sık bulunduğu, sağlıklı kontrol grubunda (%80) ise GG genotipinin daha sık bulunduğu gözlemlenmiştir.

Dünyada TNF- α sitokin gen poliorfizmlerinin KL'ye yakınlıkla ilişkisini belirleyen birkaç çalışma mevcuttur. Cabrera ve ark. (1995) 'nın Venezuela'da yaptığı çalışmada, *Leishmania braziliensis* 'in etken olduğu MKL hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında TNF polmorfizmleri araştırılmıştır. Çalışmaya göre, hasta grubunda TNF -beta intron 2 geninde allel 2 açısından homozigotluk görülmesinin MKL'e yakınlığa neden olduğunu göstermiştir. TNF-alfa -308

geninde allel 2 açısından homozigotluk görülmesinin MKL'ye yatkınlığa yol açabileceğini bildirmişlerdir. Hem TNF-alfa hem de TNF-beta polimorfizmlerinin TNF-alfa seviyelerinde fonksiyonel farklılıklara yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmaya göre MKL'ye duyarlılıkta TNF-alfa üretimine etki eden regülatör polimorfizmlerin rol oynayabileceği düşünülmektedir (58).

Mera Ramirez ve ark. (2015)'nin yaptığı bir çalışmada asemptomatik *L. (V) panamensis*'in etken olduğu KL ve KKL hastalarında TNF α , IL-10 and TLR4 genlerindeki SNP sıklığı ve KL'ye duyarlılıkla ilişkisini araştırmışlardır. Afro-amerikan KKL (n=38) ve asemptomatik bireyler (n=43)'den elde edilen DNA örnekleri PZR-RFLP tekniği ile analiz edilmiş, TNF α -308G/A (rs1800629), IL-10 -819C/T (rs1800871), ve TLR4 Asp299Gly (A/G) (rs4986790) ve TLR4Thr399Ile (C/T) (rs4986791) gen bölgelerindeki polimorfizmler araştırılmıştır. TNF α rs1800629 gen bölgesinde A allelinin dağılımı asemptomatik bireylerde daha fazla görülürken, asemptomatik bireylere kıyasla Kronik KL hastalarında IL-10 rs1800871 gen bölgesinde CC genotipi daha sık görülmüştür. Fakat bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Gruplar arasındaki TLR4 rs4986790 veya rs4986791 polimorfizmlerinin sıklığı istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamıştır (59).

Ortiz-Florez ve ark. (2015)'nin yaptığı bir çalışmada Meksika'da iki farklı endemik bölgede yaşayan 79 lokalize KL hastası, 15 VL hastası ve 127 ve 89 lokal olarak eşleştirilmiş kontrol grubunda iki adet TNF- α promotor ve yedi adet SLC11A1 gene bölgesi SNP'lerinin allel, genotip ve haplotip ilişkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak hiçbir TNF- α alleli ve genotipi KL veya VL ile ilişkilendirilmemiştir (60).

IL-4 KL enfeksiyonuna duyarlılıktan sorumlu Th2 tipi sitokinlerdendir. IL-4 sitokini, IL12 ve TNF-alfa gibi sitokinlerin salınımını baskırlar ve makrofaj aktivasyonu engeller. Parazitler makrofajlarca öldüremediği için yani Th1 tipi immün yanıt baskılandığı için enfeksiyon KL'ye duyarlılıkla sonuçlanır (39, 43, 44).

Ülkemizde IL-4 sitokini kodlayan gen bölgelerinde tek nükleotid polimorfizmlerinin KL'ye yatkınlıkla ilişkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız bu çalışmada IL-4 geni promotor -590 C/T tek

nükleotid gen polimorfizmlerinin KL'ye yakınlıkla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid gen polimorfizmlerinin çalışılan gruplar arasındaki allel dağılımları karşılaştırıldığında; hasta grubunda (%25.5) T allelinin daha sık bulunduğu, sağlıklı kontrol grubunda (%87.7) ise C allelinin daha sık bulunduğu gözlemlenmiştir. IL-4 geninde görülen tek nükleotid polimorfizmlerinin çalışılan gruplar arasındaki genotip dağılımları karşılaştırıldığında; hasta grubunda (%10.9) TT genotipinin daha sık bulunduğu, sağlıklı kontrol grubunda (%75) ise CC genotipinin daha sık bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu verilere göre; IL-4 geni promoter -590 C/T bölgesinde T alleli ve TT genotipi KL'ye duyarlılık, C alleli ve CC genotipi KL'ye direnç ile ilişkilendirilmiştir.

IL-4 geni polimorfizmlerinin ve KL'ye duyarlılıkta ve hastalığın ilerlemesinde rol oynadığını gösteren çalışma sayısı oldukça azdır. Kamali-Sarvestani ve ark. (2006) ' larının İran'da KL hastalarıyla yaptığı çalışmada IL-4 promoter -590 C/T gen bölgesinde görülen polimorfizmlerin KL enfeksiyon riskini arttırdığını göstermiştir (54). Mohamed ve ark. (2003) IL-4 polimorfizmlerinin VL'ye duyarlılıkta rol aldığını bildirmişlerdir (56).

IL-10 sitokini KL enfeksiyonlarına duyarlılıktan sorumlu Th2 tipi sitokinlerden biridir. IL-10 direkt olarak Th1 tipi hücrelerinin IFN- γ üretimini önler. IL-10, ayrıca makrofajların aktive olarak IFN- γ üretmesini de bloke ederler. Bu sayede makrofajlar NO üretmedikleri için parazitleri öldüremezler. Treg tarafından üretilen IL-10 parazit persistansı ile de ilişkilidir. Treg hücreleri tarafından üretilen IL-10 sitokinin persistan kronik KL enfeksiyonlarına yol açtığı bildirilmiştir (39, 43, 44).

Ülkemizde IL-10 geni polimorfizmlerinin KL'ye duyarlılık veya dirençle ilişkisini gösteren herhangi bir çalışma bildirilmemiştir. KL hastaları ile yaptığımız çalışmada IL-10 promoter -1082 G/A gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmi sonuçlarına göre allel (IL-10: p=0.148) ve genotip (IL-10: p<0.001 hasta grubu dengedeyken sağlıklı kontrol grubu dengede değil, ayrıca popülasyon dengede değil) dağılımı bakımından hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Sonuç olarak bizim çalışmamıza göre; IL-10 promoter -1082 G/A geni polimorfizminin KL'ye duyarlılıkla ilişkisi bulunmamaktadır.

Kiany ve ark. (2005) İran’da da IL-10 geni polimorfizmleri ile VL ilişkisini saptamak amacıyla 120 pediatrik kala azar hastası, hastaların kardeşlerinden oluşan 57 sağlıklı birey, endemik bölgede yaşayan VL veya KL hikayesi olmayan seropozitif 102 sağlıklı bireyin dahil edildiği çalışmada PZR-RFLP yöntemiyle IL-10 geni promoter bölgesinde -1082G/A, 819T/C, 592A/C olmak üzere 3 farklı polimorfizm araştırılmıştır. Gruplar arasında araştırılan 3 farklı IL-10 gen polimorfizmleri için de genotip ve allel sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır (61).

IL-10’un VL enfeksiyonlarında regülatör rol oynadığı ve bu sitokini kodlayan gen bölgesinde polimorfizm oluşması IL-10 salınımını arttıracığı düşünülmektedir. Hajilooi ve ark. (2013)’ları İranlı bir popülasyonda IL-10 geni -819 pozisyonunda görülen polimorfizmlerin VL ile ilişkisini araştırmışlardır. Çalışma gruplarının seropozitif 100 VL hastası (Grup1), 62 seropozitif asemptomatik VL hastası (Grup 2) ve 128 sağlıklı kontrol grubu (Grup 3) şeklinde kategorize edildiği bu çalışmada IL-10 -819 gen polimorfizmi PZR-RFLP tekniği ile araştırılmıştır. IL-10 -819 (C/T) polimorfizmi VL ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ilişkilendirilirken,CT genotipi diğer gruplara kıyasla VL hasta grubunda daha sık gözlemlendiği belirtilmiştir. C ve T allelleri VL ile ilişkili bulunmamıştır. Sonuç olarak IL-10 geni -819 C/T genotipinin VL için risk faktörü oluşturabileceği ve VL’ye yatkınlığa neden olabileceği söylenebilir (62) .

Salhi ve ark. (2008)’nın yaptıkları çeşitli çalışmalarda aktif KL lezyonlarında Th2 tipi veya karışık tipTh1/Th2 tipi immün yanıtın yüksek düzeyde IL-10 salınımı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacıların *IL10*-819C/T gen bölgesindeki polimorfizm analizleri ile ilgili çalışmalarında C allelinin ve *IL10*-819C/C genotipinin IL-10 salınımını arttırarak ve *L. braziliensis* kaynaklı KL lezyonları riskini arttırdığını bildirmişlerdir (63).

Ahmed ve ark (2015), 44 Iraklı VL hastası ve 40 sağlıklı kontrolle yaptığı çalışmada IL-10 geni -1082, -819 ve -592 pozisyonlarındaki polimorfizmlerin VL’ye yatkınlıkla ilişkisini araştırmışlar, bu gen bölgelerindeki polimorfizmler ile VL arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ancak IL-10 geni -1082 GG genotipine sahip VL hastalarında daha yüksek düzeyde IL-10 salınımı olduğu bildirilmiştir (64).

Bizim çalışmamızda çalışılan sitokin gen bölgeleri dışında dünya farklı sitokin gen polimorfizmlerinin KL ve diğer *Leishmania* enfeksiyonlarıyla ilişkisini değerlendiren çeşitli çalışmalar bildirilmiştir. Moravej ve ark. (2012) İran'da 95 pediatrik VL hastası ve 128 sağlıklı birey ile yaptığı çalışmada PZR-RFLP tekniği ile LT- α (+252A/G) ve IL-1 β (+3953T/C ve -511T/C) gen bölgelerindeki polimorfizmleri araştırmışlar, çalışma grupları arasında LT- α (+252A/G) ve IL-1 β (+3953T/C) gen bölgelerindeki polimorfizmlerin allel ve genotip sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fakat IL-1 β -511 TT genotipi sıklığı kontrol grubunda yüksek iken, IL-1 β -511 CC genotipi ve C alleli hasta grubunda daha yüksek bulunmuştur. IL-1 β CC (-511/+3953) haplotipi kontrol grubuna kıyasla VL hastalarında daha sık görülürken, TT haplotipi hasta grubuna kıyasla kontrol grubunda daha sık görülmüştür. Sonuç olarak; bu çalışmada IL-1 β -511 C alleli, CC genotipi ve CC (-511/+3953) haplotipinin VL'ye duyarlılıkla ilişkili bulunurken, IL-1 β -511 TT genotipi, T alleli, TT haplotipi (-511/+3953) ise VL'ye direnç ile ilişkilendirilmiştir (65).

L. mexicana hem LKL hem de DKL'ye neden olabilmektedir. Bu hastalıkların şiddetini belirleyen faktörler ile bilgiler oldukça azdır. Fernández-Figueroa ve ark (2012)'nin Meksika'da 6'sı DKL'li olan 58 LKL hastası ve 123 sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmada; IL-1RA (+2018), IL-1 β (-511) ve CXCL8 (-251) genlerinde tek nükleotid polimorfizmlerini araştırmışlardır. Sonuç olarak IL-1 β -511 C/T polimorfizmleri LKL'ye duyarlılıkla ilişkilendirilirken, IL-1RA (+2018) ve CXCL8 (-251) genlerinde görülen polimorfizmler LKL ile ilişkilili bulunmamıştır (66).

Th1 tipi sitokinlerden biri olduğu düşünülen IL-18 sitokininin VL'ye dirençte rol oynadığı düşünülmektedir. Kumar ve ark. (2014)'nin Hindistan'da 204 VL ve 267 sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmada IL-18 geninin promotör rs1946519 (-656 G/T) ve rs187238 (-137 G/C) bölgelerinde ve rs549908 (+105 A/C) kodon bölgesindeki görülen SNP'ler PZR-RFLP tekniği ile araştırılmıştır. IL-18 geni -656 pozisyonunda görülen G alleli sıklığı ve GGC/GGA haplotipleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sağlıklı kontrol grubunda daha yüksek iken, TT genotipi ve TGA haplotipi sıklığı VL grubunda daha yüksek

bulunmuştur. Sonuç olarak G alleli taşımak VL'ye karşı koruyucu rol oynamaktadır (67).

Ahmadpour ve ark. (2011) 'nın yaptığı bir çalışmada 91 VL hastası, 105 seronegatif sağlıklı birey ve 78 seropozitif kontrol grubu çalışmaya dahil edilmiş, çalışma grubundan elde edilen DNA örnekleri ARMS-PCR yöntemi ile IL-18 promoter -607A/C alleli açısından analiz edilmiştir. IL-18 promoter -607 CC genotipi gruplar arasında en baskın genotip olarak saptanmış, gruplar arasındaki genotip dağılımı istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamıştır. Sağlıklı seropozitif grup ve hasta grubunda -607AC ve -607AA genotipi en az rastlanan genotipler olmuştur. Sonuç olarak VL hasta grubu, sağlıklı seronegatif ve sağlıklı sero-pozitif bireyler arasında baskın genotipler 607C/C (38.5%), -607A/C (37.1%) ve -607C/C (35.9%) olarak belirlenmiştir (68). Aynı araştırmacıların 2014 yılında İran'da 91 VL hastası ve 106 seronegatif birey ve 79 sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmada ARMS-PCR yöntemini kullanarak IL-18 geni -607A/C ve -137G/C polimorfizmlerinin VL ile ilişkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak IL-18 geni promoter bölgesindeki -607A/C ve -137G/C polimorfizmlerinin VL ile ilişkili olmadığı bulunmuştur (69).

IL-18 sitokininin T hücrelerini uyararak IFN- γ sitokini üretmelerinde ve VL'ye karşı savunmada rol aldığı bilinmektedir. Moravej ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada IL-18 gen polimorfizmleri ile VL'ye duyarlılık arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla 118 pediatrik VL hastası ve 156 sağlıklı kontrolde PCR-PRFLP yöntemi ile IL-18 geni -656 G/T, -137 G/C ve +105A/C (kodon 35/3) pozisyonlarındaki polimorfizmleri araştırmışlardır. Sonuç olarak bu çalışma IL18 geni -656 pozisyonunda T alleleline sahip olan bireylerin VL'ye dirençli olabileceklerini göstermiştir (70).

IL-8'in VL enfeksiyonlarında iyileşmede ve hücrel immün yanıtın aktivasyonunda rol aldığı düşünülmektedir. Hajilooi ve ark (2015). IL- 8 -251 T/A polimorfizminin VL ile ilişkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 91 seropozitif semptomatik VL hastası, 104 seropozitif asemptomatik VL hastası ve 110 sağlıklı kontrol bireyde allel spesifik PCR yöntemi ile IL-8 -251 T/A polimorfizmini araştırmışlardır. IL-8-251 polimorfizmi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde VL ile ilişkili bulunmuştur. TT genotipi VL hasta grubunda daha sık

görülürken diğer gruplarda daha az sıklıkla görülmüştür. IL-8-251 polimorfizmlerinin VL'ye karşı risk faktörü olduğu düşünülmektedir (71).

TGFB1 ve IL-8 sitokinlerinin VL'ye duyarlılıkta ve hastalığın oluşmasında rol oynadıkları düşünülmektedir. Frade ve ark. (2011) 198 VL hastası, 98 seropozitif asemptomatik birey ve 101 seronegatif sağlıklı birey ile yaptığı çalışmada *TGFB1* geni -509 C/T ve +869 T/C ve *IL8* -251 A/T pozisyonlarındaki polimorfizmleri PCR-RFLP tekniği ile araştırmışlardır. Hasta grubunda TGF1 geni -509.'ncü pozisyonunda T alleli sıklığı daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak VL'ye duyarlılıkta ve hastalığın ilerlemesinde TGF1 geni polimorfizmlerinin rol oynadığı düşünülmektedir (72).

Sonuç olarak bizim çalışmamızda IL-4-590 C/T ve TNF- α 308 G/A polimorfizmleri ise KL'ye yatkinlıkla ilişkilendirilmiştir. Çalıştığımız diğer sitokin gen polimorfizmlerinin (IFN- γ +874 T/A, IL-10 -1082 G/A, IL-12B p40 1188 A/C) KL'ye duyarlılıkla veya dirençle ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ülkemizde konu ile yeterli veri bulunmamakta, tüm dünyada yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. Az sayıda çalışma ile KL'ye genetik yatkinlıkta sitokin polimorfizmlerinin rolü vardır veya yoktur sonucuna varmak uygun olmamaktadır. Konu ile ilgili daha fazla sayıda yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sitokin gen polimorfizmlerinin KL'ye genetik yatkınlık ile ilişkisini belirlemek amacıyla yaptığımız bu çalışmada KL'ye karşı immün yanıtta kilit rol oynayan sitokinlerin salgılanmasından sorumlu gen bölgelerindeki SNP'ler saptanmıştır. Bunun için; KL hastaları ve sağlıklı kontrol grubundan alınan tam kan örneklerinden izole edilen DNA örnekleri ARMS-PZR ve PZR-RFLP yöntemleriyle analiz edilmiş, Th1 tipi pro-inflamatuvar sitokinlerin TNF- α promoter -308 G/A, IFN- γ +874 A/T, IL-12B p40 geni 1188 A/C gen bölgeleri ile Th2 tipi anti-inflamatuvar sitokinlerin IL-10 promoter -1082 G/A bölgesi ve IL-4 promoter -590 C/T gen bölgeleri tek nükleotid polimorfizmleri araştırılmıştır.

Bu çalışmaya 2010 yılında Şanlıurfa Şark Çıbanı Tanı ve Tedavi Merkezi'ne başvurmuş ve parazitolojik olarak kesin tanısı konulmuş toplam 55 KL hastası dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen 55 hastanın 20 (%36.4) 'si erkek, 35(63.6%)'i kadındı. Hastaların 22 (% 40)' si onsekiz yaşından küçük çocuk hastalar iken 33 (%60)'ü 18 yaşından büyük yetişkin hastalardı. Hastaların yaş ortalamaları 26.13 \pm 14.3 idi. Çalışmaya yaş ve cinsiyet ortalamaları bakımından hasta grubu ile uyumlu olan, KL için endemik bir bölge olan Şanlıurfa ili' nde yaşayan ve KL öyküsü olmayan 110 sağlıklı birey dahil edildi. Sağlıklı kontrol grubunu oluşturan 110 kişinin 93 (%84.5)'ü erkek, 17 (%15.5)'si kadındı ve yaş ortalamaları 29.40 \pm 11.56 idi (minimum:18, maksimum:57).

Hasta grubunu oluşturan 55 KL hastasının 48 (%87.27) 'i daha önce tedavi görmemiş AKL hastası, 4 (%7.27)'ü tedaviye dirençli KKL, 3(%5.46)' ü ise iyileşmeden sonra lezyonları yeniden nüks eden RKL hastasıydı.

Sitokin genleri tek nükleotid polimorfizm analizleri sonuçlarına baktığımızda; 55 KL hastası ve 110 sağlıklı kontrol grubu arasında, TNF- α ve IL-4 sitokinlerinin üretiminden sorumlu TNF- α promoter -308 G/A ve IL-4 promoter -590 C/T gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmi sonuçlarına göre allel (TNF- α : p<0.001, IL-4: p: 0.004) ve genotip (TNF- α : p=0.001, IL-4: p: 0.001) dağılımı bakımından hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında %5 güven

düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Çalışılan gruplar arasındaki TNF- α geni tek nükleotid polimorfizmleri allel dağılımları karşılaştırıldığında; hasta grubunda (%24.5) A allelinin daha sık bulunduğu, sağlıklı kontrol grubunda (%90) ise G allelinin daha sık bulunduğu, genotip dağılımları karşılaştırıldığında ise; hasta grubunda (%7.3) AA genotipinin daha sık bulunduğu, sağlıklı kontrol grubunda (%80) ise GG genotipinin daha sık bulunduğu gözlemlenmiştir. IL-4 geninde görülen tek nükleotid polimorfizmlerinin çalışılan gruplar arasındaki allel dağılımları karşılaştırıldığında; hasta grubunda (%25.5) T allelinin daha sık bulunduğu, sağlıklı kontrol grubunda (%87.7) ise C allelinin daha sık bulunduğu, genotip dağılımları karşılaştırıldığında ise hasta grubunda (%10.9) TT genotipinin daha sık bulunduğu, sağlıklı kontrol grubunda (%75) ise CC genotipinin daha sık bulunduğu gözlemlenmiştir. Ancak IFN- γ , IL-12, IL-10 sitokinlerinin üretiminden sorumlu IFN- γ +874 A/T, IL-12B p40 1188 A/C ve IL-10 promoter -1082 G/A gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmi sonuçlarına göre allel (IFN- γ : p= 0.414, IL12: p= 0.93, IL-10: p=0.148) ve genotip (IFN- γ : p= 0.133, IL12: p=0.86, IL-10: p<0.001 hasta grubu dengedeysen sağlıklı kontrol grubu dengede değil, ayrıca popülasyonun dengede değil) dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Bu verilere göre; popülasyonda TNF- α geni promoter -308 bölgesinde G alleli ve GG genotipine sahip bireylerin KL enfeksiyon riski düşük (KL'ye dirençli) , A alleli ve AA genotipine sahip bireylerin ise KL enfeksiyon riski yüksek (KL'ye duyarlı) olabileceği, IL-4 geni promoter -590 C/T bölgesinde C allele ve CC genotipine sahip bireylerin KL enfeksiyon riski düşük (KL'ye dirençli) , T alleli ve TT genotipine sahip olan bireylerin ise KL enfeksiyon riski yüksek (KL'ye duyarlı) olabileceği söylenebilir (Çizelge 6.1).

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada; istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde IL-4-590 C/T ve TNF- α 308 G/A tek nükleotid polimorfizmleri KL'ye yakınlıkla ilişkilendirilirken, IFN- γ +874 T/A, IL-10 -1082 G/A, IL-12B p40 1188 A/C tek nükleotid polimorfizmleri KL'ye yakınlıkla veya dirençle ilişkilendirilmemiştir.

Çizelge 6.1 Hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında IL-4 -590 C/T, TNF- α 308 G/A, IFN- γ +874 T/A, IL-10 -1082 G/A ve IL-12B p40 1188 A/C gen bölgesi tek nükleotid gen polimorfizmleri allel ve genotip dağılımlarının karşılaştırılması

Allel/Genotip Dağılımı	Hasta grubu (n=55)	Kontrol Grubu (n=110)	<i>p</i> değeri
IL-4 -590 C/T Allel Dağılımı			<i>p=0.004</i>
- C alleli	82 (%74,5)	193 (%87.7)	
- T alleli	28 (%25,5)	27 (%12.3)	
IL-4 -590 C/ T Genotip Dağılımı			<i>p=0.001</i>
- CC genotipi	33 (%60,0)	83 (%75.45)	
- CT genotipi	16 (%29,1)	27 (%24.55)	
- TT genotipi	6 (%10,9)	0 (%0.00)	
TNF-α 308 G/A Allel Dağılımı			<i>p<0.001</i>
- A alleli	27 (%24,5)	22 (%10,0)	
- G alleli	83 (%75,5)	198 (%90,0)	
TNF-α 308 G/A Genotip Dağılımı			<i>p= 0.001</i>
- AA genotipi	4 (%7,3)	0 (0,0%)	
- GA genotipi	19 (%34,5)	22 (%20,0)	
- GG genotipi	32 (%58,2)	88(%80,0)	
IFN-γ +874 T/A Allel Dağılımı			<i>p= 0.414</i>
- A alleli	52 (%47,3)	116 (%52.7)	
- T alleli	58 (%52,7)	104 (%47.3)	
IFN-γ +874 T/A Genotip Dağılımı			<i>p= 0.133</i>
- AA genotipi	18 (%32,7)	34 (%30,9)	
- TA genotipi	16 (%29,1)	48 (%43,6)	
- TT genotipi	21 (%38,2)	28 (%25.5)	
IL-10 -1082 G/A Allel Dağılımı			<i>P= 0.148</i>
- A alleli	67 (%60,9)	114 (%51.8)	
- G alleli	43(%39,1)	106 (%48.2)	
IL-10 -1082 G/A Genotip Dağılımı			<i>p<0.001</i>
- AA genotipi	22 (%40,0)	5 (%4.5)	
- GA genotipi	23 (%41,8)	104 (%94.5)	
- GG genotipi	10 (%18,2)	1 (%0.9)	
IL-12B p40 1188 A/C Allel Dağılımı			<i>p=0.093</i>
- A alleli	90 (%81,8)	160 (%72.7)	
- C alleli	20 (%18,2)	60 (%27.3)	
IL-12B p40 1188 A/C Genotip Dağılımı			<i>p=0.86</i>
- AA genotipi	35 (%63,6)	58 (%52.7)	
- AC genotipi	20 (%36,4)	44 (%40,0)	
- CC genotipi	0 (%0,0)	8 (%7.3)	

KL'ye karşı konağın duyarlılık ya da direncini etkileyen gen bölgelerindeki polimorfizmlerin belirlenmesi, hastalığın klinik seyri ve tahmini açısından son derece önemlidir. Bu nedenle toplumumuzda bu konu üzerine yapılacak çalışmalarla çeşitli gen bölgeleri ile KL'ye genetik yatkınlık arasındaki ilişkilerin tespit edilmesi gerekmektedir. Yapılacak bu çalışmaların sonucunda, hastalığın immüno-patogenezi ve konak savunma mekanizmaları daha ayrıntılı bir şekilde aydınlatılacağı gibi ilaç araştırmalarında yeni farmakolojik hedeflerin belirlenmesine, yeni ve etkinliği daha fazla olan aşuların geliştirilmesine de yardımcı olacaktır.

Yaptığımız bu çalışma nispeten küçük bir popülasyonda gerçekleştirilmiştir. Aynı çalışma farklı popülasyonlarda da denenmelidir. Konağın immün sisteminde sitokin salınımını kontrol eden birçok gen bölgesi bulunmaktadır. Ayrıca bu sitokinlerin salgılandıktan sonra fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için değişik hücrelere bağlanmalarını sağlayan çok sayıda reseptör bulunmaktadır. Gerek sitokin salınımını kontrol eden genlerdeki gerekse bu sitokinlerin bağlandıkları reseptörlerdeki polimorfizmlerin, konağın KL'ye karşı vereceği immün cevabı düzenlediği bilinmektedir. Bu yüzden KL'ye karşı Th1/Th2 dengesini düzenleyen sitokinlerin salınımını kontrol eden bu polimorfizmlerin ayrıntılı bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca KL'ye karşı immün cevapta etkili IL-6, IL-8, IL-18, IL-17 gibi diğer sitokinler ve NRAMP1, CXCR1, HLA-Sınıf I HLA- Sınıf II, CCL2/MCP1 gibi farklı gen bölgelerindeki polimorfizmler de araştırılmalıdır. Çalışmamızda AKL hastası sayısı daha fazladır. RKL ve KKL hastaları sayısının daha çok olduğu çalışmalar da yapılmalıdır. Ayrıca ülkemizde VL hastalarıyla da çalışılma yapılmalıdır. Sitokin genlerinde görülen polimorfizmlerle hasta ve kontrol grubu serum sitokin düzeylerinin karşılaştırıldığı ek çalışmalar da yapılmalıdır. KL etkenlerine göre tek nükleotid polimorfizmlerinin etkisi araştırılmalıdır. Örneğin *L. major* kaynaklı KL ile *L. tropica* kaynaklı KL enfeksiyonlarında polimorfizmlerin rolü ayrı ayrı değerlendirilmelidir.

KL'ye genetik yatkınlıkla ilgili dünyada az sayıda, ülkemizde ise herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Konu ile ilgili daha fazla ve ayrıntılı çalışmalar yapılması önerilmektedir. Yapılacak bu çalışmaların sonucunda, hastalığın immüno-patogenezi ve konak savunma mekanizmaları daha ayrıntılı bir şekilde aydınlatılacağı gibi ilaç

araştırmalarında yeni farmakolojik hedeflerin belirlenmesine, yeni ve etkinliği daha fazla olan aşıların geliştirilmesine de yardımcı olacaktır. Bu çalışmaların değişik ülkelerde farklı popülasyonlar üzerinde yapılarak sonuçlarının değerlendirilmesi, KL'ye karşı daha etkili bir şekilde savaşmamıza olanak sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

1. **Özbel Y, Töz S Ö.** Kan ve Dokularda Görülen Protozoon Hastalıkları: Leishmaniosis. In. *Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları*. Ed. Özcel M A, Özbel Y, Ak M. ed.. İzmir. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No:22. **2007**: 197-241.
2. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**, Atlanta, GA. USA. Leishmaniasis. <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> Erişim Tarihi: **22.06.2016**.
3. **Dedet JP.** Current Status of Epidemiology of Leishmaniasis. Eds: Farrel J.P *World Class Parasites: Volume 4 Leishmania*. Kluwer Academic Publishers. USA. **2002**: 1-10.
4. **Jingran A, Chatterjee M, Madhubala R.** Leishmaniasis: epidemiological trends and diagnosis. In. *Leishmania after the genome*. Ed: Myler P J, Faser N. Caister Academic Press. Norfolk, UK, **2008**: 1-12
5. **Ser Ö, Çetin H.** Kutanöz Leishmaniasis ve Antalya İlindeki Durumu. *Turkiye Parazitol Derg*, **2013**; 37: 84-91
6. **Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation-WHO).** Leishmaniasis. Erişim: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> Erişim tarihi: 22.06. 2016
7. **Ok ÜZ, Balcioğlu İC, Özkan AT, Özensoy S, Özbel Y.** Leishmaniasis in Turkey. *Acta Tropica*, 2002; (84) : 43- 48
8. **Harman M.** Kutanöz Leishmaniasis. *Turk J Dermatol.* 2015; (9):168-76
9. **Liu FX, Presing DH, Tang Y.** Bölüm 48: İnsan genomu, genetik polimorfizm ve hastalıklara yaklaşım. In. *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar*. Ed. Persing DH, Tenover F.C, Versalovic J, Tang Y, Unger ER, Relman DA, White TJ. Çeviri Ed. Tekeli A, Ustaçelebi Ş. 2004 ASM Pres, Washington DC- Palme Yayıncılık, Ankara. **2006**: 643-654
10. **Cox FEG.** History of Human Parasitology. *Clin Microbiol Rev*, **2002**; 15(4): 595–612
11. **Nazzaro G, Rovaris M, Veraldi S.** Leishmaniasis: A Disease With Many Names. *JAMA Dermatol*, **2014** ;150 (11): 1204
12. **Oumeish OM.** Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. *Clinics in Dermatology*, **1999**: 17 (3) : 249-254

13. **Bari A U.** Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease . *Journal of Pakistan Association of Dermatologists* , **2006**; 16: 24-27.
14. **Markell EK, John DT, Krotoski WA.** Other Blood and Tissue Dwelling Protozoa. Leishmania. *Markell and Voge's Medical Parasitology*.Chapter 5. 8th Ed..W.B. Saunders Company.**1999**: 146-160
15. **Mahboudi F, Abolhassani M, Tehrani SR, Azimi M, Asmar M.** Differentiation of Old and New World Leishmania Species at Complex and Species Levels by PCR. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases.* **2002**, 4 (10) : 756-758
16. **Zeyrek FY, Gürses G, Uluca N, doni NY, Toprak Ş, Yeşilova Y, Culha G.** Şanlıurfa'da Şark Çıbanı Etkeni Değişiyor mu? İlk Leishmania major Vakaları. Olgu Sunumu. *Türkiye Parazitoloj Derg*, **2014**; 38: 270-4
17. **Koltas IS, Eroglu F, Alabaz D, Uzun S.** The emergence of *Leishmania major* and *Leishmania donovani* in southern Turkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **2014**; 108 (3): 154-158.
18. **Leishmania classification.** Standford University. Erişim: <http://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2003/Leishmania/Class%20and%20Morph.html> Erişim Tarihi: 22.06.2016.
19. **International Leishmania Network. Leishmania Taxonomy.** Erişim: <http://leishnet.net/site/?q=node/14> Erişim tarihi: 22.06.2016.
20. **Mishra BB, Singh RK, Srivastava A, Tripathi VJ, Tiwari VK.** Fighting Against Leishmaniasis: Search of Alkaloids as Future True Potential Anti-Leishmanial Agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2009**; 107-123
21. **Bari AU, Rahman SB.** Cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, **2008**; (18): 42-48.
22. **Sabin AB, Philip CB, Paul JR.** Phlebotomus (Papataci or Sandfly) Fever Disease of military importance summary of existing knowledge and preliminary report of original investigations. *JAMA.* **1944**;125(9):603-606
23. **Alptekin D, Kasap M, Lüleyap U, Kasap H, Aksoy S, Wilson ML.** Sand flies (Diptera: Phlebotomidae) associated with epidemic cutaneous leishmaniasis in Şanlıurfa, Turkey. *J Med Entomol*, **1999**; (36): 277-281.
24. **Volf P, Ozbel Y, Akkafa F, Svozdova M, Votycka J, Chang KP,** Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey: Relationship of Phlebotomus sergenti with the epidemic of Anthroponic cutaneous leishmaniasis. *J Med Entomol*, **2002**; 39(1):12-15.

25. **Killick-Kendrick R.** , The biology and control of Phlebotominae sandflies. *Clinics in Dermatology*, **1999**; (17) : 279-289
26. **González U, Pinart M, Reveiz L, Alvar J.** Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. **2008**, 4: 1-108
27. **Samishka S.** Parasite *Leishmania donovani*: life cycle, mode of infection.
Erişim: <http://www.yourarticlelibrary.com/zoology/parasite-leishmania-donovani-life-cycle-mode-of-infection-and-treatment/24263/> Erişim tarihi: **22.06.2016**
28. **Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation-WHO).** Global Health Observatory (GHO) data. Leishmaniasis.
Erişim: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/ Erişim Tarihi: **22.06.2016**
29. **Gürel MS, Yeşilova Y, Olgen K, Ozbel Y.** Türkiye’de Kutanöz Leishmaniasisin Durumu. *Türkiye Parazitoloj Derg*, **2012**; 36: 121-9
30. **Korkmaz S, Özgöztası O, Kayıran N.** Gaziantep üniversitesi tıp fakültesi leishmaniasis tanı ve tedavi merkezine başvuran leishmaniasis olgularının değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloj Derg*, **2015**;39:13-6.
31. **Salman IS, Vural A, Unver A.** Suriye İç Savaşı sonrası Nizip’de Kutanöz Leishmaniasis Olguları. *Mikrobiyoloj Bul*, **2014**;48:106-13.
32. **Özbilgin A.** Göç ve Paraziter Hastalıklar. 3. *Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi*. Kongre Kitabı Sözlü Sunum Özeti. Antalya, Türkiye. 18-22 Kasım **2015**.
33. **Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation-WHO).** International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. (ICD-10)-2015-WHO Version 2015 Chapter I Certain infectious and parasitic diseases (A00-B99) Protozoal diseases (B50-B64) 10th Revision. 2015
Erişim: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2015/en#/B55> Erişim tarihi: **22.06. 2016**.
34. **Ergüven S.** Kan ve doku protozoonlarına karşı yeni ilaçlar. *ANKEM Derg*, **2012**; 26 (Ek 2):108-115
35. **T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.** Ulusal Mikrobiyoloji Standartları -Şark Çıbanının (Deri Leishmaniasisinin) Mikrobiyolojik Tanısı (UMS)- P-MT-05. **2015**. Erişim: <http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tani-rehberi/parazitoloji/UMS-P-MT-05-Sark-cibani.pdf>
Erişim tarihi: **22.06.2016**.
36. **Serin MS, Daglioglu K, Bagirova M, Allahverdiyev A, Uzun S, Vural S, Kayar B, Tezcan S, Yetkin M, Aslan G, Emekdas G, Köksal F.** Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation

and polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of miniexon region. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **2005**, 53 (3) 209–214.

37. **Serin MS, Waki K, Chang KP, Aslan G, Direkel S, Otag F, Kayar B, Koksall F, Emekdas G.** Consistence of miniexon polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism and single-copy gene sequence analyses in discriminating *Leishmania* genotypes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **2007**, 57(3): 295–299
38. **Yurdakul P.** Leishmania Enfeksiyonlarının İmmünopatogenezi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, **2005**; 39: 363-381
39. **Okwor I, Mou Z, Liu d, Uzonna J.** Protective immunity and vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Immunology / Microbial Immunology*. **2012**; (3), 128
40. **Yılmaz Ö ,Turgay N.** Sitokin İlişkili Hücre İçi Sinyal İletimi ve Paraziter Enfeksiyonlardaki Önemi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **2009**; 33 (4): 301 – 306
41. **Reithinger R. , Dujardin J C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S.** Cutaneous leishmaniasis Review *Lancet Infect Dis* **2007**; 7: 581–96
42. **Turgay N, Delibaş B, Erdoğan D, Özebel Y.** Şanlıurfa’da Antroponotik Kutanöz Leishmaniasis Hastalarının Hücresel İmmun Cevabı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **2006**; 30 (1): 7-10
43. **Espir TT, Figuera L P, Naif MF, Costa AG, Ortigao MR, Franco AMR.** The Role of Inflammatory, Anti-Inflammatory, and Regulatory Cytokines in Patients Infected with Cutaneous Leishmaniasis in Amazonas State, Brazil. *Journal of Immunology Research*. **2014**.
44. **Roberts MTM.** Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *British Medical Bulletin* **2006**; 75 and 76: 115–130
45. **Gillespie PM, Beaumiera CM, Strycha U, Haywardd T, Hoteza PJ, Bottazzia ME.** Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine*, 2016; 34: 2992–2995
46. **Oh JH, Yang CS, Noh YK, Kweon YM, Jung SS, Son JW, Kong SJ, Yoon JU, Lee JS, Kim HJ, Park JK, Jo EK, Song CH.** Polymorphisms of interleukin-10 and tumour necrosis factor- α genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis. *Respirology*, **2007**; 12(4):594-598.
47. **Lopez-Maderuleo D, Arnalich F, Serantes R, Gonzalez A, Codoceo R, Madero R, Vazquez JJ, Montiel C.** Interferon gama and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **2003**; 167(7):970-975.

48. **Hall MA, McGlenn E, Coakley G, Fisher SA, Boki K, Middleton D, Kaklamani E, Moutsopoulos H, Loughran Jr TP, Ollier WER, Panayi GS, Lanchbury JS.** Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immunemediated disease. *Genes and Immunity*, **2000**; 1(3):219-224.
49. **Li H, Xiaoyan D, Quanhua L, Jie L, Yixiao B.** Single-nucleotide polymorphisms in genes predisposing to asthma in children of Chinese Han nationality. *J Investig Allergol Clin Immunol*, **2009**; 19(5):391-395.
50. **Kemp K.** Cytokine-Producing T Cell Subsets in Human Leishmaniasis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, **2000**; 48;173–176
51. **Nylen S, Eidsmo L.** Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, **2012**, 34, 551–561
52. **Ahmed ZA, Ad'hiah A.H, Idan E.M.** Interleukin-12B gene polymorphism and visceral Leishmaniasis in Iraqi patients. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. **2015**, 5 (16); 49-54
53. **Matos GM et al.** IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence *Leishmania* induced IFN- γ production. *BMC Infectious Diseases* **2007**, 7:33
54. **Kamali-Sarvestani E, Rasouli M, Mortazavi H, Gharesi-Fard B.** Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. *Cytokine*. **2006**; 35: 159-165.
55. **Maghsood AH, Jadideslam G, Fallah M, Bazmani A.** Evaluation of IFN- γ polymorphism in visceral leishmaniasis. *J Res Health Sci* **2014** ;14(2):136-9
56. **Mohamed H S , Ibrahim M E , Miller E N , Peacock C S , Khalil E A G , Cordell H J , Howson J M M, El Hassan A M , Bereir R E H, Blackwell J M .** Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan: linkage and association with IL4 and IFNGR1. *Genes and Immunity*,**2003**; 4, 351–355.
57. **Ahmed ZA, Idan E M, Ad'hiah AH.** A Single Nucleotide Polymorphism of Interferon-gamma Gene (IFNG+874) is not associated with Visceral Leishmaniasis in Iraqi Patients. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*. **2015**, 3 (5) : 737-740
58. **Cabrera M, Shaw M A , Sharples C , Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell J.M.** Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *JEM*, **1995**; 182 (5): 1259
59. **Mera Ramirez A, Castillo A, Orobio Y, Gomez MA and Gallego C** Genotyping of IL-10, TNF α and TLR4 gene polymorphisms in individuals with asymptomatic and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia). Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA 2015 - 11th Congress of the Latin American Association of Immunology. *Front. Immunol* , **2015**

60. **Ortiz-Flores A. et.al.** Association of leishmaniasis with *TNF* alpha promoter and *SLC11A1* gene polymorphisms in patients of two endemic areas in Mexico. *Microbes and Infection*. **2015**, 17(5): 387–394
61. **Kiany S, Rasouli M, Khoshdel A, Alborzi A.** Polymorphisms of IL-10 gene promoter in patients with kala-azar. Conference abstract. ESCMID 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Copenhagen / Denmark, April 2-5, **2005**
62. **Hajilooi M, Sardarian K, Dadmanesh M, Matini M Lotfi P, Bazmani A, Tabatabaiefar M E, Arababadi M K, Momeni M.** Is the IL-10 –819 Polymorphism Associated with Visceral Leishmaniasis? *Inflammation*. **2013**, 36 (6) : 1513-1518.
63. **Salhi A et. al.** Immunological and Genetic Evidence for a Crucial Role of IL-10 in Cutaneous Lesions in Humans Infected with *Leishmania braziliensis*. *The Journal of Immunology* , **2008**; 180(9) : 6139-6148
64. **Ahmed Z A, Idan E M, Ad'hiah A H,** The association of interleukin-10 gene polymorphisms with Visceral Leishmaniasis in a sample of Iraqi patients. *International Journal of Current Research*. **2015**, 7 (8); 19301-19305
65. **Moravej A, Rasouli M, Kalani M, Asaei S, Kiany S, Najafipour S, Koohpayeh A, Abdollahi A.** IL-1 β (-511T/C) gene polymorphism not IL-1 β (+3953T/C) and LT- α (+252A/G) gene variants confers susceptibility to visceral leishmaniasis. *Molecular Biology Reports*. **2012**, 39 (6): 6907-6914
66. **Fernández-Figueroa EA, Rangel-Escareño C, Espinosa-Mateos V, Carrillo-Sánchez K, Salaiza-Suazo N, Carrada-Figueroa G, et al.** Disease Severity in Patients Infected with *Leishmania mexicana* Relates to IL-1 β . *PLoS Negl Trop Dis*. **2012**; 6(5).
67. **Kumar D, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S.** Association of Interleukin-18 Gene Polymorphism with Susceptibility to Visceral Leishmaniasis in Endemic Area of Bihar, an Indian Population Hindawi Publishing Corporation. *The Scientific World Journal* Article ID 852104, **2014**:1-6
68. **Ahmadpour E, Mazloumi-Gavani AS, Bazmani A, Kazemi A H, Babaloo Z.** Prevalence of IL18 -607A/C polymorphism in patients with visceral leishmaniasis. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences* . **2011**; 13(1) : 66-72
69. **Ahmadpour E, Bazmani A, Kohansal MH, Kazemi A, Babaloo Z.** IL-18 gene polymorphism in patients with visceral leishmaniasis in East Azarbaijan, Iran. *Journal of Parasitic Diseases*. **2014**; 1-5
70. **Moravej A , Rasouli M, Asaei s, Kalani M. Mansoori Y.** Association of interleukin-18 gene variants with susceptibility to visceral leishmaniasis in Iranian population. *Molecular Biology Reports*, **2013**;40 (6): 4009-4014

71. **Hajilooi M , Abasi M, Bazmani A, Ahmadi A, Matini M, Solgi G, Sardarian K.** Evaluation of interleukin-8 -251 t/a polymorphisms in visceral leishmaniasis. *J Res Health Sci*, **2015**;15(1):59-61.
72. **Frade AF et.al.** *TGFB1* and *IL8* gene polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infection, Genetics and Evolution*, **2011**; 11(5): 912–916.



ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Mersin ilinde doğdu ve aynı ilde ilkokul, ortaokul ve lise eğitimlerini tamamladı. 2000 yılında Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne başladı ve 2004 yılında mezun oldu. 2004 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve 2007 yılında mezun oldu. 2004-2010 yılları arasında Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak görev yaptı. 2007 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2015-2016 eğitim-öğretim dönemi içerisinde Toros Üniversitesi Meslek Yüksek Okulu'nda öğretim görevlisi olarak görev yaptı. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.