

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BALB/c FARELERDE OLUŞTURULAN KUTANÖZ LEYİŞMANYOZUN
TEDAVİSİ ÜZERİNE MAKROFAJ SPESİFİK ANTİKOR BAĞLI GRAFEN
OKSİT NANOPARTİKÜLLERİ İLE FOTOTERMAL UYGULAMANIN ETKİSİ**

Necati ÖZPINAR

DOKTORA TEZİ

PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT

SİVAS 2017

“BALB/c Farelerde Oluşturulan Kutanöz Leyişmanyozun Tedavisi Üzerine Makrofaj Spesifik Antikor Bağlı Grafen Oksit Nanopartikülleri ile Fototermal Uygulamannın etkisi” adlı **Doktora** Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Parazitoloji** Ana Bilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

(Başkan) Prof. Dr. Serpil DEğERLİ _____
(Üye) Prof. Dr. Melih AKYOL _____
(Üye) Prof. Dr. Semra ÖZÇELİK _____
(Üye) Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN _____
(Danışman) Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT _____

ONAY

Bu tez çalışması, .././2017 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT
SAğLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

ÖZET

BALB/c FARELERDE OLUŞTURULAN KUTANÖZ LEYİŞMANYOZUN TEDAVİSİ ÜZERİNE MAKROFAJ SPESİFİK ANTİKOR BAĞLI GRAFEN OKSİT NANOPARTİKÜLLERİ İLE FOTOTERMAL UYGULAMANIN ETKİSİ

Necati ÖZPINAR

Doktora Tezi

Parazitoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT

2017, 77 sayfa

Kutanöz leyişmanyoz (KL), dünyada kozmopolit bir dağılım gösteren ve milyonlarca insanı etkileyen, zoonoz ve antropoz karakterli bir protozoon hastalığıdır. İnsanların endemik bölgelere seyahatlerinin çoğalmasa, siyasi ve ekonomik sebeplerle yapılan göçler endemik olmayan bölgelerde de bu enfeksiyonun görülme sıklığını arttırmıştır.

KL'un tedavisinde kullanılan ilaçların özellikle karaciğer ve böbrekler üzerine toksik etkilerinin olması, bazı *Leishmania* türlerinin ilaçlara direnç kazanması, pahalı olmaları gibi nedenler araştırmacıları daha güvenilir, daha etkili ve daha ucuz bir tedavi seçeneğini aramaya yöneltmiştir. Bu çalışmadaki amacımız, Balb/c farelerde oluşturulan KL modelinde makrofajlara spesifik antikora bağlı grafen oksit (GO) nanopartikülleri ve fototermal uygulamanın (FTU) birlikte KL üzerne etkisini araştırmaktır.

Çalışmada BALB/c ırkı fareler, ayak tabanlarına *Leishmania major* amastigotları inoküle edilerek enfekte edildi. İnokülasyondan 21 gün sonra enfekte hayvanlar 6 deney grubu (GO+15 sn FTU, GO+30 sn FTU, makrofaj spesifik antikor (MSA) ile modifiye edilen GO +15 sn FTU, MSA ile modifiye edilen GO+30 sn FTU, 15 sn FTU, 30 sn FTU), 3 kontrol grubu (miltefosin, negatif ve pozitif kontrol) olacak şekilde gruplara ayrıldı. GO ve makrofaja spesifik antikor kimyasal yöntemlerle bağlandı ve bu bağlanma FT-IR ve elementer analizlerle doğrulandı. GO+MSA'un makrofajlara bağlandığını test etmek amacıyla sentezlenen molekül enfekte farelere verilerek immünohistokimyasal analiz yapıldı. Nanopartiküller, yara bölgesi yakınına derialtı yolla enjekte edildi ve 24 saat sonra tedavi prosedürü uygulandı. Tedavinin 5. ve 10. gününde sonra lezyonlar klinik (eritem ve ödem) olarak 10. gününde ise hem klinik hem de

histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak pre-inflamatuar sitokinlerin (TNF- α , IL-1, IL-6 ve IFN- γ) şiddeti değerlendirildi.

Tedavinin 5. gününde en iyi sonucu makrofaj spesifik antikor ile modifiye edilen GO +15 sn FTU grubunda elde edildi (%50 tam iyileşme). Bu grupta 10. günde tam iyileşme oranı %75'e yükseldi. 10. günde yapılan histopatolojik değerlendirmede yoğun bir myofibroblastlar ve anjiyogenezis görüldü. Bu durum iyileşme sürecinin bir göstergesi olarak yorumlandı. İmmünohistokimyasal değerlendirmede ise pre-inflamatuar sitokinlerde diğer gruplara göre belirgin bir azalma saptandı.

Bu çalışma, GO ile makrofaj spesifik antikor bağlanarak nanopartikülün makrofaj yüzeyine tutunmasını ve fototerapi ile enfekte makrofajların ve içlerindeki amastigotların öldürülmesini sağlayan ve 5 gün gibi kısa sürede tedaviye yanıt alınabilen dünya literatüründeki ilk çalışmadır. Bulgularımız, bu tedavi protokolünün yeni bir tedavi adayı olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kutanöz Leyişmanyoz, *Leishmania*, BALB/c, Nanopartikül, Grafen oksit, Fototerapi

ABSTRACT

THE EFFECT OF PHOTOTHERMAL APPLICATION WITH MACROPHAGE-SPECIFIC ANTIBODY RELATED GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON THE TREATMENT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS CREATED IN BALB/c MICE

Necati ÖZPINAR

Ph.D. Thesis

Department of Parasitology

Supervisor: Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT

2017, 77 pages

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a protozoa disease with a zoonotic and anthroponotic character, showing cosmopolitan distribution throughout the world and affecting millions of people. The increase in people travelling to endemic areas and migration for political or economic reasons have increased the frequency of this infection seen in non-endemic areas.

As the drugs used in the treatment of CL have toxic effects, especially on the liver and kidneys, some *Leishmania* species have become drug-resistant and the drugs are expensive, this has directed researchers to investigate more reliable, more effective and cheaper treatment options. The aim of this study was to investigate the effect of macrophage-specific antibody bound graphene oxide (GO) nanoparticles together with photothermal application (PTA) on a CL model created in BALB/c mice. This treatment protocol has not been previously used.

BALB/c mice were infected by inoculation of *Leishmania major* amastigotes to the soles of the feet. At 21 days after the inoculation, the infected animals were separated into 6 study groups (GO+15 secs PTA, GO+30 secs PTA, macrophage specific antibody (MSA) modified GO +15 secs PTA, MSA modified GO+30 secs PTA, 15 secs PTA, 30 secs PTA), and 3 control groups (miltefosine, negative and positive control).

GO and MSA were bound together with chemical methods and this binding was confirmed with PT-IR and element analyses. To test the binding of GO+MSA to macrophages, immunohistochemical analysis was applied by administering the

synthesized molecule to the infected mice. Nanoparticles were injected subcutaneously to the wound area and the treatment procedure was applied after 24 hours. The lesions were clinically evaluated (erythema and oedema) on the 5th and 10th days of treatment and on the 10th day, in addition to clinical evaluation, the severity of pre-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6 and IFN- γ) was evaluated histopathologically and immunohistochemically.

On the 5th day of treatment, the best result was obtained in the MSA modified GO+15 secs PTA group (50% full recovery). In this group, the full recovery rate increased to 75% on the 10th day. In the histopathological evaluation made on the 10th day, intense myofibroblasts and angiogenesis were observed. This was interpreted as an indicator of the healing process. In the immunohistochemical evaluation, a significant reduction was determined in pre-inflammatory cytokines compared to the other groups.

This study is the first study in world literature to show the attachment of MSA bound GO nanoparticles to the macrophage surface and the death of infected macrophages and the amastigotes within them with phototherapy and that a response to treatment can be obtained within a short period, such as 5 days. These findings indicate that this treatment protocol could be a new treatment possibility.

Key Words: Cutaneous leishmaniasis, *Leishmania*, BALB/c, Nanoparticle, Graphene oxide, Phototherapy

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen başta danışman hocam Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT olmak üzere bütün hocalarıma, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Reyhan EğİLMEZ ve Serkan ÇELİKGÜN'e, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Ahmet ÖZBİLGİN ve İbrahim ÇAVUŐ'a, FT-IR ve elementer analizlerde yardımcı olan Doç.Dr. Murat ERDEM'e, Fatih AKYILDIZ'a Hayatımın her anında birlikte olmaktan mutluluk ve huzur duyduğum eşim Yrd.Doç.Dr. Hülya ÖZPINAR'a sevgili kızım Ceren'e ve oğlum Umut'a, Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'na ve Air Liquide firmasına katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
YÖNERGE	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xv
KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Sınıflandırma	2
2.2. Morfolojisi	3
2.3. Yaşam Döngüsü	5
2.4. <i>Leishmania</i> Türlerinin Hayatta Kalma Stratejisi	8
2.5. Klinik Görünüm.....	9
2.6. Dünya’da Kutanöz Leyişmanyoz Dağılımı	11
2.7. Türkiye’de Kutanöz Leyişmanyoz Dağılımı	11
2.8. Vektör	12
2.9. İmmünolojisi	14
2.10. Leyişmanyozla Karşı Aşı Stratejileri	16
2.10.1. Canlı Aşılar	17
2.10.2. Canlı- Zayıflatılmış Aşılar	17
2.10.3. Ölü Aşılar.....	18
2.10.4. Fraksiyonel Alt birim Aşıları	18
2.10.5. Çıplak DNA Aşıları	19
2.10.6. Rekombinant ve Sentetik Aşılar	19

2.10.7. Aşı olarak Anti-tatarcık Tükürüğü Bileşenleri	20
2.10.8. Adjuvanların Dağıtımı	20
2.11. Leyişmanyozda Deneysel Hayvan Modelleri	21
2.11.1 Fare	21
2.11.2. Hamster	22
2.11.3. Kobay.....	22
2.11.4. Köpek.....	23
2.12. Leyişmanyozda En Son Tedavi Yöntemleri	23
2.12.1 Güncel İlaçlar.....	23
2.12.2. Leyişmanyozu Karşı Kullanılan Doğal Ürünler	24
2.13. Anti-Leyişmanyoz İlaç İçin Potansiyel Hedefler	25
2.14. Leyişmanyoz Tedavisi İçin Yeni Bir Tedavi Yöntemi, Nanopartikül Teknolojisi	26
2.15. <i>Leishmania</i> Enfeksiyonu Sırasında Konak Hücre miRNA Ekspresyonunun Modülasyonu ve Yeni Terapötik Bir Molekül olarak miRNA'nın ortaya çıkışı.....	26
2.16. Leyişmanyozda Serum Kolesterol Seviyesi Değişimleri ve Terapötik Ajan Olarak Kolesterol.....	28
2.17. Leyişmanyozu Karşı Terapötik Bir Ajan Olarak miRNA'nın Geleceği	28
2.18. Nanoteknoloji ve Nanotıp	29
3. MATERYAL ve METOD	31
3.1. Deney Hayvanları ve Deney Grupları	31
3.2. Parazit İnokülasyonu.....	31
3.3. Deneysel Kutanöz Leyişmanyozis Modelinin Oluşturulması	32
3.4. Makrofaj Spesifik Antikor bağlı Grafen Oksit Nanopartiküllerin Hazırlanması	35
3.5. GO+MSA Sentezinin Doğrulanması	35
3.5.1. FT-IR Analizi.....	35
3.5.2. Elementel Analiz.....	36
3.6. GO+MSA Nanopartikülünün Kutanöz Leyişmanyozis Farelerde Doku İçinde Makrofajlara Bağlanabildiğinin Doğrulanması	36
3.7. Tedavisi.....	36
3.8. Tedavinin Etkisinin Belirlenmesi	38

TABLÖLAR

Sayfa No

Tablo 1. Anti-leyişmanyal Aktiviteye Sahip Bazı Bitkisel Droglar	25
Tablo 2. Nanoformölasyonu Hazırlanan Başlıca Bitki Bileşenleri	26
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Deney Grupları ve Hayvan Sayıları	31
Tablo 4. Tedavinin 5'inci Gününde Gruplardaki Klinik Değerlendirme Verileri	46
Tablo 5. Tedavinin 10'uncu Gününde Gruplardaki Klinik Değerlendirme Verileri	49
Tablo 6. Histopatolojik Değerlendirmede Gruplardaki Enfeksiyonun/Yangının Derecesi ve Ortalama Amastigot Sayıları.....	46
Tablo 7. İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçlarına Göre Sitokinlerin Durumu	56

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 1. <i>Leishmania</i> spp. Amastigot ve Promastigot Formlarının Görünümü.....	3
Şekil 2. <i>Leishmania</i> spp. Promastigot ve Amastigot Formlarının Şematik Görünümü	4
Şekil 3. <i>Leishmania</i> spp. Prosiklik Promastigot, Metasiklik Promastigot ve Amastigot Formlarının Elektron Mikroskopundaki Görünümü	5
Şekil 4. Leyişmanyozun Kum Sineğindeki Evrimi ve Parazitin Konağına Transferi.....	6
Şekil 5. <i>Leishmania</i> Türlerinin Yaşam Döngüsü.....	7
Şekil 6. Kum Sineği Görünümü	14
Şekil 7: <i>Leishmania</i> 'da İmmünolojik Yanıt	16
Şekil 8. Kutanöz Leyişmanyoz Oluşturulan Fare Deneyinde Değdirme ve İnokülasyon Sıvısından Preparat Hazırlama.....	32
Şekil 9. Amastigotların Değdirme Preparat ve İnokülasyon Sıvısındaki Görünümü	33
Şekil 10. İnokülasyon Sıvısının Homojenizasyonu	33
Şekil 11. İnokülasyon Sıvısının Süzülmesi	34
Şekil 12. İnokülasyon Sıvısının Fare Ayak Tabanına Deri Altı Enjeksiyonu	34
Şekil 13. Oral Yolla Miltefosin Uygulaması	37
Şekil 14. PL-E Pro 808 nm İnfrared Lazer İle Fototermal Uygulama	38
Şekil 15. BALB/c Farelerin Ayak Tabanında Oluşturulan Kutanöz Leyişmanyoz	41
Şekil 16. GO FT-IR Diyagramı	43
Şekil 17. GO+MSA FT-IR Diyagramı	43
Şekil 18. GO+MSA İntralezyonel Enjeksiyonu Sonrası Hedef Makrofajlara Bağlandığını Gösteren İmmünfloresan Boyama Sonuçları	44
Şekil 19. 5 Günlük Tedavi Sonrası GO+FTU 15 sn Grubunda Oluşan Yüzeysel Yanık Görünümü	45
Şekil 20. 5 Günlük Tedavi Sonrası Klinik Görünüm	47
Şekil 21. FTU 30 sn Gruplarında Oluşan Yanık Yaraları	48
Şekil 22. 10 Günlük Tedavi Sonrası Klinik Görünüm	50
Şekil 23. Hematoksilen Eosin Boyama	52

Şekil 24. GO+MSA FTU15 sn Grubunda Makrofajlar Yakınında ve İçinde Gözlemlenen GO Nanopartikülleri.....	54
Şekil 26. GO+MSA FTU 15 sn Grubunda Tespit Edilen Periostitis Tablosu.....	55
Şekil 27. İmmünohistokimyasal Derecelendirme.....	57



SİMGELER

%	:	Yüzde
<	:	Küçük
>	:	Büyük
μL	:	Mikrolitre
μm	:	Mikrometre
cm	:	Santimetre
dk	:	Dakika
gr	:	Gram
kg	:	Kilogram
mL	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
mM	:	Milimolar
nm	:	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$:	Derece
sn	:	Saniye

KISALTMALAR

ASH	:	Antijen Sunan Hücre
ATP	:	Adenozin Tri Fosfat
DHFR-TS	:	Dihidrofolat Redüktaztimidilat Sentetaz
DKL	:	Diffüz Kutanöz Leyişmanyoz
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
EDC	:	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride
FT-IR	:	Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrofotometre
FTU	:	Fototermal Terapi
GO	:	Grafen Oksit
IFN	:	İnterferon
IL	:	İnterlökin
KL	:	Kutanöz Leyişmanyoz
L	:	<i>Leishmania</i>
LPG	:	Lipofosfolikan
MES	:	2-(N-Morpholino) Ethanesulfonic Acid Hydrate
ML	:	Mukokutanöz Leyişmanyoz
MSA	:	Makrofaj Spesifik Antikor
NHS	:	N-Hydroxysuccinimide
NK	:	Doğal Öldürücü Hücre
PKDL	:	Post Kala Azar Dermal Leyişmaniyozis
RES	:	Retikulo Endotelyal Sistem
SSA	:	Sığır Serum Albümini
TNF	:	Tümör Nekroz Faktör

VL : Visseral Leyişmanyoz



1.GİRİŞ ve AMAÇ

Dünyada kozmopolit bir dağılım gösteren leyişmanyoz, zoonoz ve antroponoz karakterli bir protozoon hastalığıdır. Hastalığın etkeni olan *Leishmania* protozoonları ilk kez 1901 yılında William B. Leishman tarafından tespit edilip isimlendirilmiştir. Leyişmanyozda insan, otuz *Leishmania* türünün yirmi biri tarafından enfekte olabilmektedir. Bu farklı türler morfolojik olarak ayırt edilemezken ayırım biyokimyasal veya moleküler düzeyde gerçekleşmektedir. *Leishmania* parazitleri türlerine göre öldürücü olmayan ve kendiliğinden iyileşen deri lezyonlarından, iç organları tutan ve epidemilerle binlerce insanın ölümüne sebep olabilen enfeksiyonlara kadar değişebilen bir klinik görünüm sergilemektedirler.

Ülkemizde son on yılda, leyişmanyoz vakalarının sayısında önemli bir artış görülmüştür. İnsanların endemik bölgelere seyahatlerinin çoğalması farklı nedenlerle insan hareketlerinin artmasıyla endemik olmayan bölgelerde de kutanöz leyişmanyoz görülmeye başlamıştır. Bu yönüyle leyişmanyoz artık endemik olmayan bölgeler için de önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Tedavi girişimleri başarısızlıkla sonuçlanabilmektedir. Anti-leyişmanyal ilaçlar; toksik, bazı *Leishmania* izolatlarına etkisiz ve pahalı preparatlardır. Bunun yanısıra, son yıllarda nanoteknolojinin gerek tedavi, gerekse tanı amaçlı kullanımı artmıştır. Özellikle çeşitli patojenik ve genetik hastalıkların teşhis ve tanısında, tümör hücrelerinin erken tespitinde bu nanopartiküllerin optik, floresan ve manyetik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Grafen, bu nanopartiküllerden sadece biridir ve mekanik, fiziksel ve optik özelliklerinden dolayı medikal alanda da birçok akademik çalışmaya konu olmuştur.

Günümüzde KL tedavisinde kullanılan ilaçlardaki olumsuzluklar araştırmacıları yeni tedavi protokolleri aramaya itmiştir. Bu çalışmada amacımız, daha önce hiç kullanılmamış olan, makrofaj spesifik antikor bağlı grafen oksit nanopartikülleri ve fototermal uygulamanın birlikte kutanöz leyişmanyoz tedavisi üzerine etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Dünyada Antartika dışında bütün kıtalarda dağılım gösteren leişmanyoz zoonoz ve antropoz karakterli dişi kum sineklerinin (Phlebotomus, kum sineği, tatarcık) vektörlük yaptığı milyonlarca insanı etkileyen bir protozoon hastalığıdır. Hastalığın etkeni olan *Leishmania* protozoonları ilk kez 1901 yılında William B. Leishman tarafından tespit edilip isimlendirilmiştir. Morfolojik olarak ayırt edilemeyen *Leishmania* türleri insanda visseral leişmanyoz (VL, kala azar), kutanöz leişmanyoz (KL, şark çıbanı) ve mukokütanöz leişmanyoz (ML) neden olurlar [1, 2].

2.1. Sınıflandırma

Günümüze kadar biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanmış 30 *Leishmania* türünden 21'inin insanı enfekte edebildiği bildirilmiştir [3].

Regnum	:	Animalia
Superphylum	:	Protozoa
Phylum	:	Sarcomastigophora
Subphylum	:	Mastigophora
Class	:	Zoomastigophora
Order	:	Kinetoplastida
Family	:	Trypanosomatidae
Genus	:	<i>Crithidia</i> <i>Endotrypanum</i> <i>Blastocrithidia</i> <i>Herpetomonas</i> <i>Leptomonas</i> <i>Phytomonas</i>
Genus	:	<i>Leishmania</i>
Species	:	<i>Leishmania donovani</i> <i>Leishmania infantum</i> <i>Leishmania chagasi</i> <i>Leishmania tropica</i> <i>Leishmania major</i> <i>Leishmania aethiopica</i>

Leishmania mexicana

Leishmania mexicana

Leishmania amazonensis

Leishmania venezuelensis

Leishmania pifanoi

Leishmania enrietti

Subgenus : *Viannia*

Species : *Leishmania brazillensis* kompleksi

Leishmania brazillensis

Leishmania colombiensis

Leishmania equatorensis

Leishmania peruviana

Leishmania guyanensis

Leishmania guyanensis

Leishmania panamensis

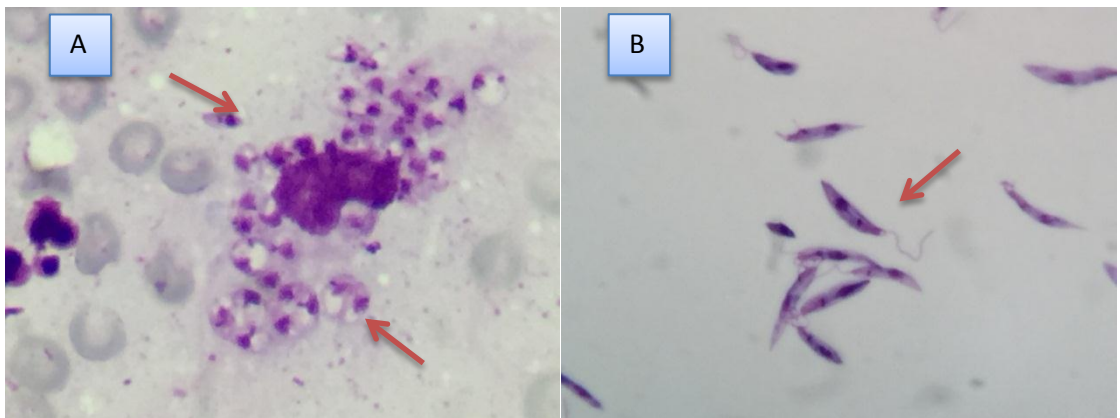
Leishmania shawi

Leishmania lainsoni

Leishmania naiffi

2.2. Morfolojisi

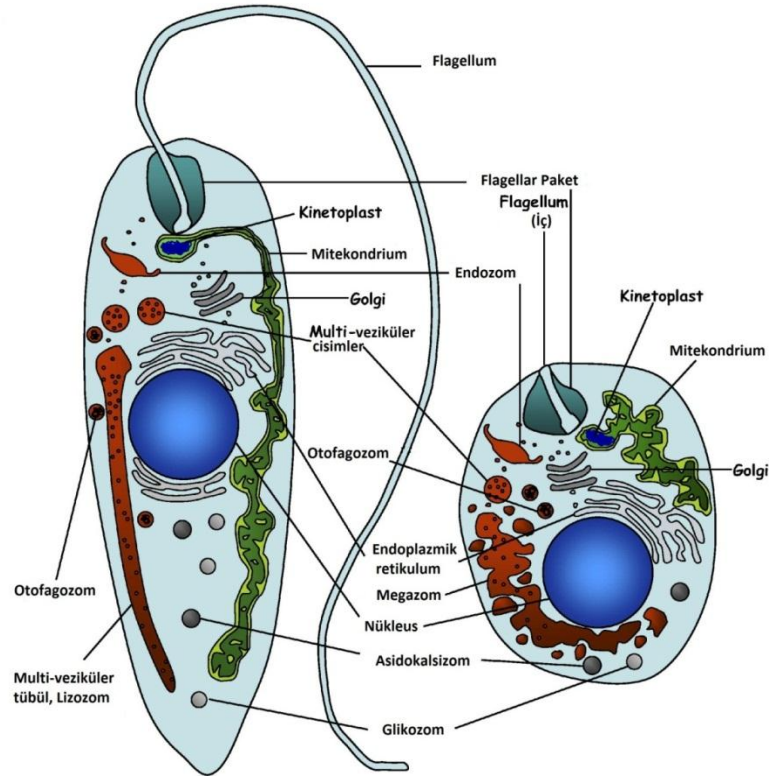
Leishmania türlerinin yaşam döngülerinde omurgalı konakta görülen amastigot form, vektör ve besiyerlerinde görülen promastigot form olmak üzere morfolojik olarak farklı iki form bulunmaktadır.



Şekil 1. *Leishmania* spp. amastigot (A), ve promastigot (B) formlarının görünümü (100x). (Orijinal).

Amastigot form; yaklaşık 2-6 μm büyüklüğünde yuvarlak veya oval şekilli hareketsiz formdur. Polimorf nükleuslu lökositler, endotel hücreleri ve monositler içerisinde boyuna ikiye bölünerek çoğalırlar. Hücre içerisinde tek tek veya gruplar halinde, enfekte makrofajların parçalanması sonucu hücre dışında da görülebilmektedir. Sitoplazmada ön uca yakın büyük bir çekirdek ve çekirdeğin yakınında kinetoplast bulunmaktadır. Sitoplazmada ayrıca vakuoller, blefaroplast, blefaroplasttan çıkıp arka uca sonlanan ve kamçının sitoplazmada kalan kısmı olan aksonem bulunmaktadır. Mitokondrium tektir ve bunun yanı sıra golgi apereyi ve lizozomlar sitoplazma içinde bulunan diğer organellerdir (Şekil 2) [1-3].

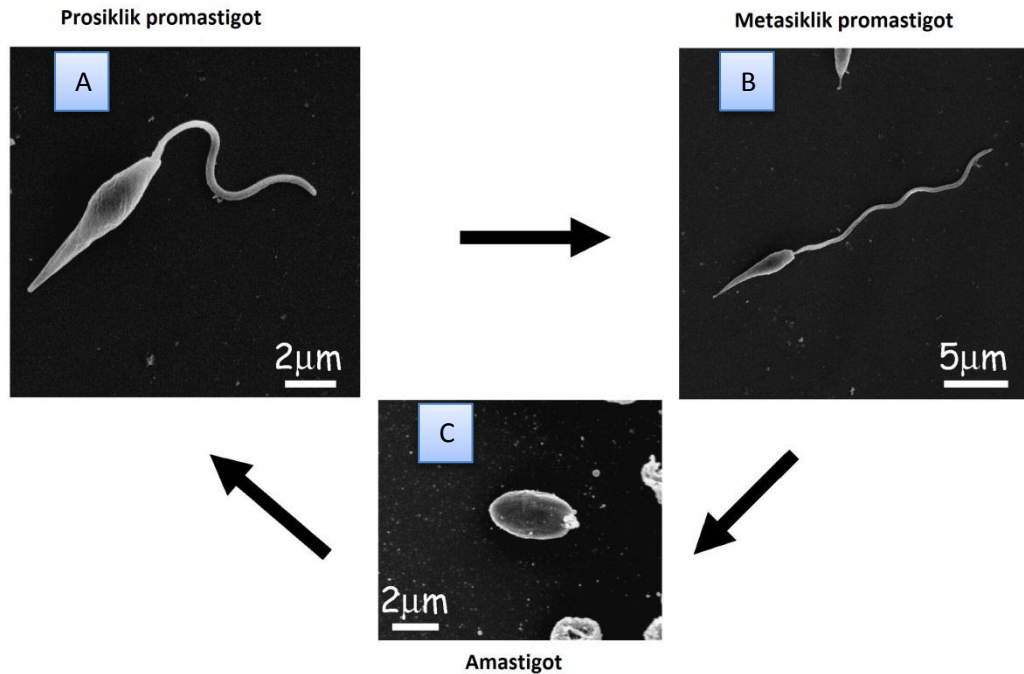
Promastigot form; 15-20 μm boyunda mekik şeklinde olup bir adet kamçısı bulunmaktadır. Vektörü olan kum sineklerinin vücudunda ve besiyerlerinde boyuna ikiye bölünerek çoğalmaktadır. Ön uçtan çıkan 15-20 μm uzunluğunda serbest bir kamçısı ve kamçı kökü yakınında yerleşmiş bir aksonemi bulunmaktadır. Arka uca yuvarlak veya at nalı şeklinde bir kinetoplast, kinetoplastın ön kısmında blefaroplast bulunmaktadır. Merkezi bir çekirdek ve çekirdekçik, çekirdek membranında da porlar bulunmaktadır. Ayrıca sitoplazma içinde golgi aygıtı, endoplazmik retikulum, mitekondrium gibi hücre organelleri bulunmaktadır (Şekil 2) [3, 4].



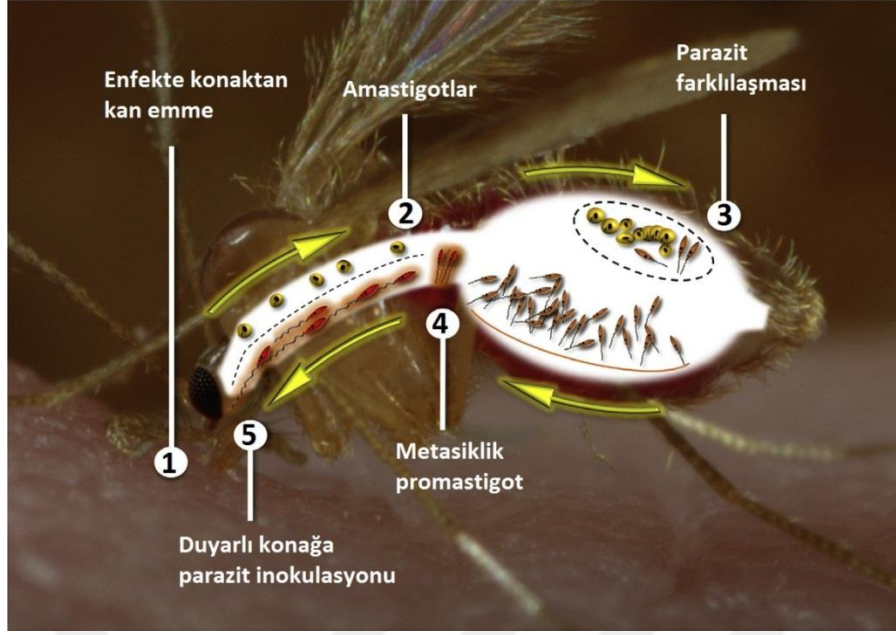
Şekil 2. *Leishmania* spp. promastigot ve amastigot formlarının şematik görünümü [4].

2.3. Yaşam Döngüsü

Leishmania türlerinin vektörü olan kum sinekleri enfekte bir omurgalıdan kan emerken makrofajlar içinde bulunan amastigot formlarını da alırlar. Emilen kan, kum sineğinin orta midesinde peritrofik membran ile sarılır. Amastigotların bir kısmı makrofajların parçalanması sonucu sindirilirken kalanlar “prosiklik promastigot” denilen enfektif olmayan forma dönüşmektedirler. Prosiklik promastigotlar bölünerek çoğalmaya başlamaktadır. Çoğalmalarını sürdüren parazitler salgıladıkları enzimlerle peritrofik membranı eriterek torasik mideye geçerler. Bu bölümdeki parazitler daha uzun ve ince yapıdadır. Bu promastigotlar, “nektomonad” olarak isimlendirilirler. Torasik mideden bağırsağa gelen promastigotlar kamçıları ile bağırsak epitel hücrelerinin mikrovilluslarına tutunurlar ve buradaki form “haptomonad” olarak adlandırılır. İleriki aşamalarda bu promastigotlar midenin ön tarafına doğru göç ederek özefagus ve farinks kıvrımlarına, kamçıları aracılığıyla tutunmakta ve lümeni tıkamaktadırlar. Promastigotlar zaman zaman buradan ayrılarak kum sineğinin ağız parçalarına gelmektedir. Burada bulunan promastigotlar artık bölünmez ve enfektif olan bu form “metasiklik promastigot” olarak adlandırılır (Şekil 3, 4) [1, 3].



Şekil 3. *Leishmania* spp. prosiklik promastigot (A), metasiklik promastigot (B) ve amastigot (C) formlarının elektron mikroskopundaki görünümü [4].

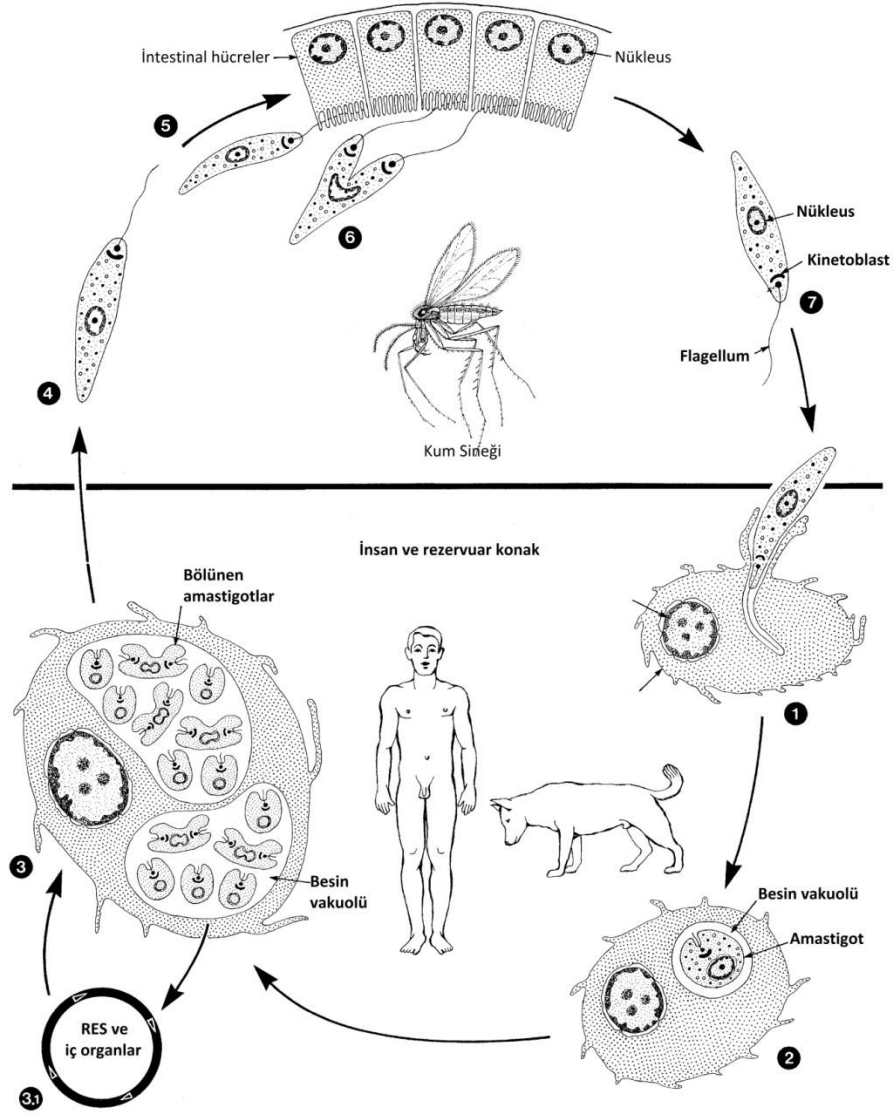


Şekil 4. *Leishmania*'nın kum sineğindeki evrimi ve parazitin konağına transferi [5].

Enfektif metasiklik promastigotları barındıran kum sineği beslenmek amacıyla bir omurgalıdan kan emerken yaklaşık 500 ile 1000 arasındaki metasiklik promastigotu omurgalı konağına inoküle eder. Kan emme sırasında salgılanan salgının antikoagülan etkisinin yanı sıra enfeksiyonun başlayabilmesinde de önemli bir rolü olduğu bilinmektedir [3].

Deriden vücuda giren promastigotlar ilk saatlerde serumdaki kompleman tarafından opsonize edilmekte ve makrofaj, monosit veya langerhans hücreleri tarafından fagosite edilmektedir. Fagosite edilen promastigotlar fagolizozomlar içinde yaklaşık 1-4 saat'te kamçılarını kaybederek amastigot forma dönüşürler ve ikiye bölünerek çoğalırlar. Enfekte makrofaj parazitin çoğalması sonucu parçalanır ve amastigotlar etrafa dağılır. Bu amastigotlar diğer makrofajları enfekte edebilmektedir (Şekil 5) [1, 3].

Enfeksiyon bu aşamadan sonra *Leishmania* türüne göre şekillenmektedir. Enfeksiyon ya deride sınırlı kalıp KL oluşturabilmekte ya da iç organlara yayılıp VL oluşturabilmektedir.



Şekil 5. *Leishmania* türlerinin yaşam döngüsü. 1; Vektörün kan emmesi sırasında konağa verdiği promastigotlar konak makrofajları tarafından tutulur. 2; Makrofajlar içerisinde promastigotların 2-4 µm boyutlarındaki amastigot forma dönüşmeleri için 1-4 saatlik bir süre gereklidir. 3; Amastigot, parazitoforoz vakuol içinde ikiye bölünme ile çoğalır. Makrofajlar yaklaşık 48 saat sonra içleri amastigot ile dolar. Parçalanmış makrofajlardan açığa çıkan amastigotlar, diğer makrofajlar tarafından tutulur ve döngü devam eder. Sonuçta KL şekillenir. 3.1; Amastigotların *Leishmania* türüne göre retikulo endotelial sistem (RES)'de ve çeşitli iç organlarda çoğalması sonucu yaklaşık 6 ay kadar sonra iç organ leişmanyozu şekillenir. 4-7; Kum sineklerinin enfekte konaktan kan emmesi sonucu alınan amastigotlar vektör vücudunda 10-20 µm uzunluğunda promastigot forma dönüşür ve döngü kendini tekrarlar [6].

2.4. *Leishmania* Türlerinin Hayatta Kalma Stratejisi

Leishmania türleri kum sineği ve omurgalı konaktan oluşan diheteroksen bir hayat döngüsüne sahiptir. Makrofajlar içinde bulunan *Leishmania* amastigotları kan emme sırasında kum sineği tarafından kanla birlikte alınır. İlk aşamada, kum sineğinin orta midesinde peritrofik membran denilen bir membran ile sarılmaktadır. Makrofajlardan açığa çıkan amastigotlar promastigota farklılaşırken glikofosfatidilinositolden oluşan kalın bir glikokaliks örtüsü eş zamanlı sentezlenir. Glikoinositolfosfolipidler, glikokaliks tabakasının altında bulunur ve koruyucu bir bariyer gibi işlev görür. Yaklaşık iki gün sonra peritrofik membran ruptüre olur ve promastigotlar kamçılarıyla ve lipofosfoglikan ile spesifik olarak bağırsak duvarına tutunur ve hızla bölünür. Bölünme yaklaşık 4-7 gün sürer, parazit metasiklik promastigot formuna dönüşür ve bu esnada lipofosfoglikanın yapısal değişikliği nedeniyle artık bağırsak duvarına bağlanmaz. Daha sonra konağına inokülasyona hazır bir şekilde özefagus ve farinkse doğru göç eder. Bu aşamada kum sineği tükrüğü promastigotların hayatta kalmasını ve gelişimini sağlayan etkenlerdendir [7].

Leishmania promastigotları yoğun bir yüzey glikokaliks örtüsü ile kaplıdır. Bu örtü glikosilfosfatidilinositol moleküllerinden oluşur. Bu moleküller gp63, proteofosfoglikanlar ve lipofosfoglikanlar gibi parazit yüzey proteinleri içerir. Bu moleküllerden en fazla bulunan, lipofosfoglikan ve gp63 parazit virülansından sorumludur. Lipofosfoglikan makrofaj enfeksiyonu ve parazitin kum sineği vücudunda sağkalımı gibi birçok aşamada gereklidir. Lipofosfoglikanın parazitin amastigot formunda bir rolü yoktur fakat amastigotlar yapısal olarak ilişkili glikokonjugatları oluşturmaya devam etmektedirler. Parazit yüzey proteini olan gp63 bir endoproteinaz ile birlikte immünoglobülinleri, kompleman faktörü ve lizozomal proteinleri parçalama fonksiyonu bulunmaktadır. Bu proteolitik aktivite sayesinde makrofaj fagolizozomlarındaki asidik pH'da amastigotlar hayatta kalabilmektedir [7].

Kum sineği memeli konaktan kan emerken epidermisi parçalar ve dermal kılcak damarlara erişir. Az sayıda parazit (yaklaşık 100 adet) kum sineğinin konakta açtığı yaradan inoküle edilir. Ancak deneysel modellerde enfeksiyon oluşturmak için daha fazla parazite ihtiyaç vardır (>500). Kum sineği tükrüğünün IL4'e bağlı hastalığı teşvik edici çok önemli etkileri vardır. Tükürük inflamasyonu teşvik eder, oksidatif metabolik süreci ve makrofajlarda antijen sunumunu inhibe eder. Protein fosfataz inhibitörü ve vazodilatatör etkili maksadılan adı verilen, tükürük bezlerinden salınan aktif bir madde olarak tanımlanmıştır [8]. Promastigotların büyük bir kısmı vücut savunma sistemi

tarafından öldürülmektedir. Bununla birlikte bazıları kompleman aracılı lizise direnç göstermektedir. Bu parazit yüzeyinden C5b-C9 kompleksinin lipofosfoglikan ile ilişkili olarak ayrılmasıyla alkalıdır. Metasiklik promastigotlar ayrıca C3, C5 ve C9'u fosforilasyon ile inaktive eden bir serin treonin protein kinaza sahiptirler. *Leishmania* aynı zamanda leishmaniolyzin adı da verilen gp63 denilen bir çinko bağımlı proteinazı eksprese ederler ki bu opsonik faktör olan C3b'yi iC3b'ye dönüştürür ve parazitlerin iCR3 (CD11b/CDI8)'e sahip olan konak hücreler tarafından alınmasını sağlar [7].

Hayatta kalan *Leishmania* promastigotları dentritik hücreleri ve langerhans hücreleri de dahil olmak üzere monosit ve makrofajlar tarafından tutulur. Tutunma, mannoz fukoz reseptörü, fibronektin reseptörü ve C-reaktif protein reseptörü gibi birçok reseptör rol oynar. Tutunmadan sonra parazit makrofaj tarafından fagosite edilir. Fagozomlar endositik organellerle birleşir ve hidrolazlar, kathepsinler ve β glukorinidaz içeren parazitoforoz vakuolü oluştururlar. Parazitoforoz vakuol içinde yaklaşık 2 günde promastigotlar hareketsiz form olan amastigot forma dönüşürler. Amastigotlar sadece lipofosfoglikan sentezlemekle kalmaz aynı zamanda proteofosfoglikan, asit fosfataz ve glikoinositolfosfolipidleri de sentezlerler. Asidik pH, konak hücre kökenli H^+ ATPaz ve parazit hücre membranı kökenli P tipi H^+ ATPaz tarafından düzenlenir [7].

2.5. Klinik Görünüm

Klinik bulgularına göre; kutanöz (KL), mukokutanöz (ML) ve visseral (VL) leişmanyoz olmak üzere üç gruba ayrılır. Parazitin türü ve konağın immün yanıtı hastalığın klinik görünümünde belirleyicidir [3, 9]

VL etkeni olan türler *Leishmania* türleri arasında en patojen olanıdır. Halk arasında kara humma, dum dum ateşi gibi isimlerle de anılmaktadır. Parazit asemptomatik bir seyirden ölümcül bir tabloya kadar değişebilen bir klinik görünüm oluşturabilmektedir. Düzensiz ateş, kilo kaybı, hepatosplenomegali, ilerleyici anemi, pansitopeni ve hiperglobülinemi ile karakterizedir. VL'da sekonder fırsatçı enfeksiyonlar da görülebilmektedir. Parazit, makrofajları istila eder ve makrofajlar içerisinde çoğalarak dalak, karaciğer, kemik iliği ve lenf bezleri de dahil olmak üzere hemen hemen bütün retiküloendotelial sistemi etkiler. Şiddetli VL olguları çoğunlukla ölümlü sonlanır. Ölüm genellikle bağışıklık sisteminin yetersizliği ve fırsatçı sekonder enfeksiyonlar sonucu olmaktadır. VL, tipik olarak üç türü içeren *L. donovani* kompleksinden kaynaklanır. Bu türler; *L. donovani donovani*, *L. donovani infantum*, *L. donovani chagasi* dir [7]. Kayıtlı vakaların % 90'ı Bangladeş, Hindistan, Nepal ve

Sudan'da ortaya çıkar. [9]. Dünya çapında her yıl 200.000 ile 400.000 arasında kişi bu enfeksiyona maruz kalmaktadır. Sıtmadan sonra en sık ölümlere sebep olan paraziter hastalıktır [10, 11].

Post Kala Azar Dermal Leyişmanyoz (PKDL); Ülseratif olmayan kutanöz lezyonlarla karakterize olup, genel olarak VL'in bir komplikasyonudur. VL tedavisinden sonra hastaların yaklaşık %10'unda gelişir. Hastalarda eritematöz veya depigmente maküler, makülopapüler ve nodüler döküntülerle karakterize deri lezyonları oluşturur. Bütün vücuda yayılır veya fokal lezyonlar şeklindedir. Burun üzerinde kelebek benzeri bir dağılım sık görülür. Sonraki dönemde lezyonlar nodülleşir [7, 12].

KL; Hastalık etkenlerinden *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* ve *L. infantum* Eski Dünya kutanöz leyişmanyozuna yol açarken, *L. mexicana*, *L. brasiliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. venezuelensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* Yeni Dünya leyişmanyozuna neden olmaktadır [3, 7]. Kayıtlı vakaların % 90'ı Afganistan, Suudi Arabistan, Brezilya, İran, Peru ve Suriye 'de görülmektedir [9].

Bu parazitozda kuluçka süresi 2-8 haftadır. Şark çıbanı, antep çıbanı ve yıl çıbanı gibi isimlerle anılan bu parazitozun köylerde ve şehirlerde görülen şekilleri bazı ayrıcalıklar gösterir. Şehirlerde görülen kuru tip diye adlandırılırken, köylerde görülen yaş tip diye adlandırılır. Kuru tipin kuluçka süresi uzundur ve kronik seyrederek. Lezyonda çok sayıda parazit bulunur. Yaş tipin kuluçka süresi kısadır ve lenf bezlerinde büyümeye neden olur. Bu tip multifokal olmaya meyillidir. Dişi tatarcığın kan emdiği yerde küçük sert ve kaşıntılı bir papül şeklinde başlar ve zamanla çevresi kızarır. Parazit türüne bağlı olarak 1-4 ay içinde etrafı sert ve kabarık, üzeri kabuklu, hafif sızıntılı bir yara şekline dönüşür. Yavaş büyüyen, 2-3 cm çapına gelen yaraya sekonder enfeksiyonlar eklenirse kişilerde ateş, titreme gibi belirtiler görülür. Zaman içinde yara, yerine bir skar dokusu bırakarak iyileşir [2].

Diffüz Kutanöz Leyişmanyoz (DKL); Vücuttaki parazit sayısının fazlalığı ve anerjik kişilerde kronik, ilerleyici, ülseratif olmayan, yaygın deri lezyonlarıyla karakterizedir. Bu lezyonlar lepra ile karıştırılabilmektedir. DKL, Venezuela, Dominik Cumhuriyeti ve Etiyopya'da görülmektedir. DKL'ye *L. aethiopica* ve *L. mexicana* kompleksi türleri sebep olur [7].

ML; Espundia olarak ta bilinen ML, *L. braziliensis* etkenli, kısmi veya total nazal, ağız ve boğaz dokularının lezyonları ile karakterizedir. Bu parazitoz kişileri sosyal hayattan ayrı koyan deformiteler oluşturur. Bilinen vakaların % 90 Bolivya, Brezilya ve Peru'da görülmüştür. Belirtileri başlı başına ölümcül değil, ama

komplasyonlar ile ilgili fırsatçı enfeksiyonlar ve beslenme güçlüklerinden dolayı ölümlerle sonuçlanabilmektedir [7, 9].

2.6. Dünya’da KL Dağılımı

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre leyişmanyoz 98 ülkede endemiktir ve 350 milyondan fazla insan risk altındadır. Yılda 2 milyon yeni vakanın görüldüğü bildirilmiş olup bu vakalardan 500 bini VL olgusu iken 1,5 milyonu KL olgusudur [13].

KL, dünyada çok geniş bir alana yayılmıştır. *L. tropica* için Hindistan, Asya ve Afrika’nın kuzeyi, *L. major* için Asya ve Kuzey Afrika, *L. aethiopica* için Doğu Afrika ana odaklar haline gelmiştir. Hastalığın yayılmasında diğer önemli adım birçok ekolojik farklı odaktan gerçekleşmesidir ki bunun sonucu olarak hastalık Arjantin’de Güney Amerika’ya kadar yayılmıştır. KL vakalarının yaklaşık % 90’ı Afganistan, Cezayir, İran, Sudi Arabistan, Suriye, Bolivya, Brezilya, Kolombiya, Nikaragua ve Peru’dan bildirilmiştir. Kolombiya, Nikaragua ve Pakistan son zamanlarda KL insidansında büyük artışlar bildirirken, Etiyopya ve Sudan daha önce hastalığın görülmediği bölgelere hastalığın yayıldığını gösteren vakalar bildirmişlerdir. Son yıllarda pek çok endemik bölgelerde hastalık insidansında dalgalanmalar tespit edilmektedir. Bu durum, iklim değişiklikleri ve göçler gibi bir çok spesifik nedenle bağdaştırılabilir. İklimsel değişikliklerin yanı sıra sosyo-ekonomik değişiklikler ve diğer çevresel değişiklikler vektörlerin ve leyişmanyozun gelecekte farklı bölgelere de yayılabileceğini göstermektedir [13].

2.7. Türkiye’de KL Dağılımı

Bir bölgede KL’in dağılımı vektör yaygınlığı, iklim, sosyokültürel durum ve rezervuarların coğrafik dağılımıyla yakından ilişkilidir. Endemik bölgelerden diğer bölgelere yapılan göçler de hastalığın yayılmasında önemli etkenlerdendir. 1990-2010 yılları arasında ülkemizde toplam 46,003 yeni olgu bildirilmiş ve bu vakalar % 50,47 (n=23219) oranında Şanlıurfa’dan, % 13,57 (n=6241) oranında Adana’dan, %13,24 (n=6092) oranında Osmaniye’den, % 7,93 (n=3650) oranında Hatay’dan, % 5,35 (n=2462) oranında Diyarbakır’dan, %3,43 (n=1578) oranında Mersin’den, % 1,92 (n=883) oranında Kahramanmaraş’tan, % 1,15 (n=531) oranında Antalya’dan, % 0,95 (n=436) oranında Aydın’dan, % 0,62 (n=284) oranında Kayseri’den, % 0,36 (n=165) oranında Niğde’den, % 0,2 (n=90) oranında Muş’tan, % 0,8 (n=372) oranında diğer illerden bildirilmiştir [14].

2010 yılından günümüze kadar olan süreçte diğer etkenlerin yanı sıra özellikle KL için endemik bir bölge olan Suriye'den ülkemize yapılan göçler sonrası KL'in prevalansının önemli derecede etkilendiği, endemik olmayan bölgelerden de KL vakalarının bildirildiği görülmektedir. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi *Leishmania* Tanı ve Tedavi Merkezi'nde yapılan bir araştırmada 2013 ve 2014 yıllarında 635 KL vakası bildirilmiştir. Yapılan çalışmada bu hastaların sadece 67 (%10,6)'si Türkiye uyruklu iken 568 (89,6) hastanın Suriye uyruklu olduğu tespit edilmiştir [15]. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji polikliniğine başvuran 2011-2014 tarihleri arası 110 KL vakası tespit etmişlerdir. Bu hastaların %69'u Suriye vatandaşı iken %31'inin Türkiye vatandaşı olduğunu belirtmişlerdir [16]. Ocak 2014-Haziran 2015 tarihleri arasında Urfa Birecik Toplum Sağlığı Merkezi ve Birecik Devlet Hastanesi'ne başvuran 178 KL vakası tespit etmişler bunun %23,6'sının Türkiye, %76,4'ünün Suriye vatandaşı olduğunu belirtmişlerdir [17]. 2010-2013 tarihleri arasında Nizip Devlet Hastanesi'ne gelen 341'i Suriye mülteci olmak üzere toplam 416 KL vakası tespit edilmiştir [18]. Antalya ilinde 2011-2012 yılları arasında Antalya Halk Sağlığı Müdürlüğü Bulaşıcı Hastalıklar Birimi'ne, il genelinde hizmet veren sağlık kuruluşlarınca toplamda 36 KL olgusu bildirim yapılmıştır [19].

2.8. Vektör

Kum sinekleri olarak ta adlandırılan tatarcıklar *Phlebotomidae* ailesinden olup dişileri insan ve hayvanlardan kan emerek kaşıntılı deri lezyonlarına sebep olmalarının yanı sıra başta leyişmanyoz olmak üzere birçok hastalığın da biyolojik vektörlüğünü yapmaktadırlar. Bu ailenin *Phlebotomus*, *Sergentomyia* ve *Lutzomyia* cinslerinde yaklaşık 600 türü bulunmaktadır. Yurdumuzda *Phlebotomus* ve *Sergentomyia* cinsleri bulunmaktadır [2, 20, 21].

Kum sineklerinin erişkinleri 2-5 mm boyundadır ve tüm vücudu tüylerle kaplı, sarı-kahverengi renktedir. Erişkinlerin başları vücutla 45 derecelik bir açı oluşturmaktadır. Başta gözler, hortum, 16 segmentten oluşan antenler, 5 segmentli palpler bulunmaktadır. Kum sineklerinin göğsünün orta parçası büyük olduğundan kambur gibi görünmektedir. Göğüsten çıkan iki çift kanattan bir çifti halter adı verilen rudimenter uzantılar halindedir. Kanatlar dinlenme esnasında V harfi biçiminde durmaktadır. Göğüs parçasından üç çift bacak çıkmaktadır. Karın bölgesi 10 parçalıdır ve son iki parça genital organları taşımaktadır (Şekil 6). Sindirim sistemleri hortumla başlamakta farinks ve özefagus ile devam etmektedir. Daha sonra mide, kısa bir barsak,

rektum ve anüsle sonlanmaktadır. Tatarcıkların yumurtası, 0,3-0,4 mm boyutunda iğ şeklindedir. Yumurta ilk yumurtlandığında beyazdır ve birkaç saat içinde türe göre kahverengiden siyaha değişen bir renk alırlar. Yumurtadan çıkan larva 12 segmentlidir ve pupaya dönüşmeden önce 4 gömlek değiştirir. Dördüncü dönem larvanın uzunluğu 4-5 mm kadardır. Pupa, torasik bölgede bir şişlik oluşturmaktadır. Vücudunun arkasında son larval dönemden atılan gömlek bulunur [2, 12].

Kum sinekleri tam başkalaşımly canlılar olup yaşam döngülerinde yumurta, larva, pupa, erişkin dönemleri vardır. Dişiler çiftleştikten ve kan emdikten 4-5 gün sonra 20-50 kadar yumurta yumurtlamaktadırlar. Uygun koşullarda 6-10 yumurtanın içinde oluşan larva yumurtadan çıkmaktadır. Yumurtadan çıkan larva çürümüş bitkisel atıklarla beslenmektedir. Larvanın pupa haline geçmesi için dört gömlek değiştirmesi gerekmektedir. Bu süre yaklaşık 1-7 ay arasındadır. Normal koşullarda evrim süresi 1,5-2 ay kadar sürmekte dişi kum sineği yumurtladıktan sonra tekrar kan emerek yumurtlayabilmektedir [12, 22].

Kum sinekleri evlerin ve ahırların içinde, hayvan inlerinde, mağara ve ağaç kovuklarında yaşayabilmektedir. Sıcakkanlı hayvanların yanı sıra soğuk kanlı hayvanlardan da geceleri kan emmektedirler. Uçma yetenekleri az olup kısa aralıklarla uçabilmektedirler.

Erkek kum sinekleri parazit değildirler. Ağız yapılarından dolayı bitki özsuylu ile beslenirler. Erkek kum sinekleri 4 günlük yaşamları boyunca hiç beslenmeyebilirler. Son larval dönemde aldıkları besinlerle yaşamlarını sürdürebilmektedirler [12, 22].



Şekil 6. Kum sineği görünümü [23].

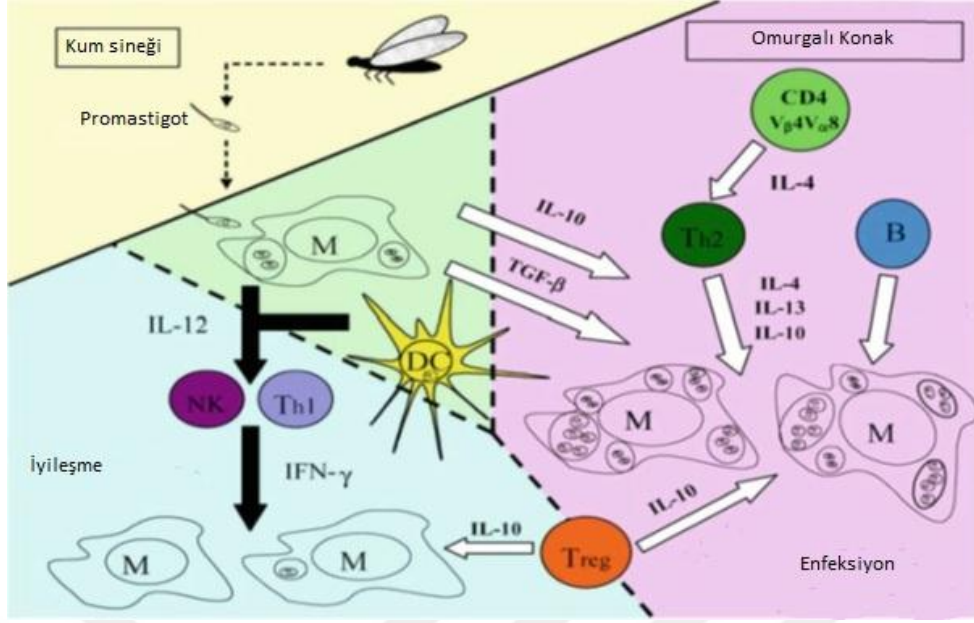
2.9. İmmünolojisi

Leishmania türleri ile enfekte kum sineği kan emme sırasında metasiklik promastigotları omurgalı konağa inoküle eder. Metasiklik promastigotlar makrofajlar ve dentritik hücreler tarafından fagosite edilirler ve amastigot forma dönüşürler. *Leishmania* konak makrofajlarının fagolizozomları içinde gizlenmek suretiyle antikor yanıtından kaçmaktadırlar. Hücre içindeki parazit dolaşımında bulunan antikorlara maruz kalmadığından hastalığın seyri üzerine humoral bağışıklığın bir etkisi yoktur. Bağışıklık, tamamen T hücre aracılı immüniteyle sağlanmaktadır. T hücreleri, yabancı antijenleri ancak antijen sunan hücre (ASH)'ler tarafından sunulduğu zaman tanıyabilmektedir. ASH, T hücresi ile etkileştiğinde T hücreleri sitokin üretmekte, bu da makrofajlar tarafından parazitin öldürülmesini sağlamaktadır [1, 3]. Fagolizozomlarında parazit bulduran enfekte makrofajlardan salınan IL-12, doğal öldürücü hücre (NK) aktivasyonunu ve Th1 (CD4+) farklılaşmasını teşvik eder ve Th1 hücrelerinden IFN- γ salgınır. IFN- γ , makrofajlar içinde indüklenbilir nitrik oksit sentazı ve nitrik oksit ürünlerini stümüle eder. Bu, parazitin öldürülmesini ve iyileşme sürecini başlatır. IL-12 veya alternatif olarak IL-4 ve IL-13 salınımının yetersiz olduğu durumda enfekte makrofajlar içinde düzensiz bir parazit replikasyonu gerçekleşir. Bu durum konakçı Th2

hücrelerinden IL-10 salınımına yol açar. Böyle bir durumda hastalığın ilerlemesinin yanı sıra latent enfeksiyon veya premünisyon bağışıklığı da söz konusu olabilmektedir [7].

KL'da hastalık lokalizedir ve aktif bir enfeksiyon olduğu için lezyonlar kontrol altındadır. Hastalık yaklaşık 1 yıl içerisinde kendiliğinden iyileşmektedir. Kendiliğinden iyileşen KL devamlı bir bağışıklık bırakmaktadır [1-3, 7].

Aktif VL'de hümmoral bağışıklık tepkisi spesifik olmayan antikorların üretilmesi ile karakterizedir. VL'de ilk olarak IgG antikor seviyesinde hızlı bir yükseliş görülmektedir. Fakat antikorlar spesifik olmadığından hastalık üzerinde koruyucu bir rolü bulunmamaktadır. Aktif VL'de B hücrelerinin poliklonal aktivasyonundan ötürü IgG ve daha düşük düzeyde IgM artışı görülmektedir. Üretilen antikorlar parazite spesifik değildir fakat hipergammaglobulinemi diagnostik bir değere sahiptir. Poliklonal B hücre aktivasyonu VL'de hem insanda hem de deneysel modellerde gösterilmiştir fakat B hücre aktivasyonunun ve immünoglobulinlerin VL'deki koruyucu etkisinin olmadığı belirtilmektedir. *Leishmania*, makrofajların fagolizozomları içinde bulunmak suretiyle hümmoral bağışıklıktan korunmaktadırlar. Deneysel çalışmalarda B hücrelerinin yokluğunun ve anti- IgM ile antikorların baskılanmasının hastalık üzerinde her hangi bir etkisinin bulunmaması, yüksek düzeydeki IgG ve daha az olarak IgM düzeylerinin enfeksiyona karşı koruyucu bir etkisinin bulunmaması bağışıklığın tamamen hüccesal bağışıklıktan kaynaklandığını göstermektedir. T hücre etkinleştğinde sitokin üretmekte ve makrofajlar tarafından parazitin öldürülmesi sağlanmaktadır. Th1 hücreler IL-2, IFN- γ ve TNF- β , Th2 hücreleri ise IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 üretmektedir. Ayrıca her iki tip birden IL-3 ve TNF- α üretmektedir (Şekil 7) [3, 7].



Şekil 7: *Leishmania*'da immünolojik yanıt. *Leishmania* sp. ile enfekte kum sineği kan emme sırasında metasiklik promastigotları omurgalı konağa enjekte eder. Metasiklik promastigotlar, makrofajlar (M) ve dentritik hücreler (DC) içinde amastigot forma dönüşür. İnfekte hücrelerden salınan IL-12, Doğal öldürücü (NK) hücre aktivasyonunu, Th1 (CD4+) farklılaşmasını teşvik eder ve Th1 hücrelerinden IFN- γ salınır. IFN- γ makrofajlar içinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)'ı ve nitrik oksit (NO) ürünlerini stümüle eder. Bu parazitin öldürülmesini ve iyileşme sürecini başlatır. IL-12 veya alternatif olarak IL-4 ve IL-13 salınımının yetersiz olduğu durumda enfekte makrofajlar içinde düzensiz bir parazit replikasyonu gerçekleşir. Bu durum konakçı Th2 hücrelerinden IL-10 salınımına yol açar. Böyle bir durumda hastalığın ilerlemesinin yanı sıra latent enfeksiyon veya premünisyon bağışıklığı da söz konusu olabilmektedir. Aktif VL'de B hücrelerinin poliklonal aktivasyonundan ötürü IgG ve daha düşük düzeyde IgM artışı görülmektedir [7].

2.10. Leyişmanyozaya Karşı Aşı Stratejileri

Leyişmaniyasise karşı bir aşının geliştirilmesi beşeri tıpta ve veterinerlikte hem koruma hem de hastalığın kontrol altına alınması açısından uzun vadeli bir hedef olarak görülmüştür. Maalesef aşılarda geliştirilmesi, ciddi boyutlardaki antijenik çeşitlilik ve parazitlerin diheteroksenik bir yaşam döngüsüne sahip olması nedeniyle oldukça zordur. Geçtiğimiz on yılda, birçok alt birim ve DNA antijenleri deney hayvanlarında

potansiyel aşı adayları olarak tanımlanmıştır ancak şimdiye kadar hiçbiri insanlarda kullanım açısından onaylanmamıştır. Ancak leyişmanyozun tedavisinin ardından gözlenen kalıcı bağışıklık, leyişmanyozu önlemeye yönelik aşılanmanın geleneksel bağışıklama yöntemlerinin kapsamına girdiğini göstermektedir [7, 24].

2.10.1. Canlı Aşılar

Promastigotların gelişmesini destekleyebilen kültür şartlarının oluşturulması ile birlikte, 1908'de Nicolle ve Manceau, enfeksiyonları kontrol etmek için canlı organizmalar kullanılmaya başlanmıştır. Leyişmanizasyon, canlı virülan *Leishmania*'nın aşılanması, yüzyılı aşkın bir süredir uygulanmaktadır. Canlı parazitlerin enjeksiyonu büyük olasılıkla kontrollü lezyon meydana getirir ve T-hücre aracılı bağışıklığı indükler. Leyişmanizasyon eski Sovyetler Birliği Cumhuriyeti, İsrail ve İran'da uzun bir süre başarılı bir şekilde kullanılmıştır ancak birçok ülkede çoğunlukla güvenlik sorunları nedeniyle terk edilmiştir. Kontrollü enfeksiyona yönelik intihar genleri ile birlikte ilaçlara duyarlı *Leishmania* mutantlarının dahil edilmesi, lezyonların boyut ve süresini azaltmak için ölü parazitlerin kullanılması veya anti-leyişmaniyal bağışıklığın daha hızlı başlamasını ve lezyonların hızlı iyileşmesini sağlayan adjuvanların kullanılması yoluyla leyişmanizasyon güvenliğini artırmak için çalışılmaktadır. Canlı amastigotların kullanımı hamsterlarda denenmiş olan en eski aşılama stratejileri arasında yer almaktadır, ancak bu *L. donovani* ile mücadeleye karşı korumayı sağlamada başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Farelerde belli düzeyde direnç başlatmış olan bir strateji olan BCG'nin adjuvan olarak kullanılmasına yönelik bir girişim dahi hamsterlarda denendiğinde duyarlılığın artmasına yol açmıştır. Ancak *L. donovani* 'nin UR6 suşunun canlı promastigotlarını kullanan bir yaklaşım, hem dalak hem de karaciğerde önemli ölçüde koruma sağlamıştır [7, 25].

2.10.2. Canlı- Zayıflatılmış Aşılar

Patojenik olmayan parazitlerle aşılama, ölü promastigotlarla birlikte leyişmanizasyon veya aşılama ile karşılaştırıldığında önemli avantajlara sahiptir. Zayıflatılmış parazitler, doğal konakçı hücre tarafından virülan organizmalarla aynı bölüme taşınır ve hastalığa neden olmadan uygun bağışıklık tepkisinin oluşmasına yetecek kadar uzun süre devamlılık gösterirler. Zayıflatılmış *Leishmania* aşıları, gentamisine maruz bırakma, irradiyasyon ve kimyasal mutagenler altında kültürlenme ve son zamanlarda *Leishmania* genomundan genlerin silinmesi yoluyla uzun süreli kültürlerde üretilmiş

parazitlerdir. Dihidrofolat redüktazimidilat sentetazını (DHFR-TS) kodlayan gen gibi memeli konakçıda uzun süreli sağkalım için gerekli genlerden yoksun parazitler, potansiyel aşılarda analiz edilmiştir. Bununla birlikte, DHFR-TS'den yoksun *L. major* ile aşılama, bir primat modelinde koruyucu bağışıklık göstermede başarısız olmuştur [26].

2.10.3. Ölü Aşılarda

Ölü parazit aşılarda, profilaktik ve terapötik aşılarda önerilmiştir. VL'ye karşı zayıflatılmış veya ölü parazitlerin kullanımı da dahil olmak üzere çeşitli stratejiler denenmiştir. Bazı birinci kuşak ölü aşılarda, KL'a karşı aşı çalışmalarında yer almıştır, bu durum ise ümit verici sonuçların ortaya çıkmasına sebep olmuştur. İlk denemeler arasında, ölü promastigotların, CF1 farelerinde enfeksiyona karşı kısmi direnç verebilen deri altından veya damar içinden enjekte edilen bir adjuvan olarak glukoz ile birlikte kullanılması yer almaktadır. Bir aşılama çalışmasında, beş ölü *Leishmania* suşunun promastigotlarının, *Leishmania* deri testi dönüşümü ile ölçülerek güvenli ve immünojenik olduğu gösterilmiş ancak sadece düşük bir koruma düzeyi (%50) kazandırmıştır. Daha sonra *L. amazonensis* IFLA/BR/67/PH8'den Leishvacin olarak bilinen bir aşının üretimi başlatılmıştır. Farelerde ve maymunlarda yapılan aşılama çalışmalarından sonra, Th1 bağışıklık tepkisinin enfeksiyona karşı koruma için gerekli olabileceği, ancak KL'ye karşı koruma için yeterli olmadığı ileri sürülmüştür [7, 27, 28].

2.10.4. Fraksiyonel Alt birim Aşılarda

İnsanlarda yapılan tek bir deneme dışında, *Leishmania* fraksiyonlarını kullanılarak yapılan aşılama hayvan modelleriyle sınırlı kalmıştır. Bu aşılama hayvan modellerinde, leişmanyal antijenlerin ve adjuvanlarının derialtına enjeksiyonu şeklindedir. Aşı geliştirme ile ilgili yapılan ilk çalışmalar, *Leishmania* lipofosfoglikan (LPG) gibi glikolipidlerin mükemmel koruma sağladığına işaret etmiştir [24, 25]. Koruma, lipozomlar veya *Corynebacterium parvum* gibi adjuvanların kullanımına ve molekülün bütünlüğüne bağlı olmuştur. *L. donovani* kökenli LPG ile yapılan çalışmalar, bunun aşı geliştirme için ümit verici bir aday olabileceğini ortaya koymuştur [7].

2.10.5. Çıplak DNA Aşılarda

Çıplak DNA ile bağışıklık kazandırma, bulaşıcı hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde devrim yaratmayı vaat eden yeni bir yaklaşımdır. Aşı adayını kodlayan gen, bir memeli

ekspresyon vektöründe klonlanır ve DNA doğrudan kas veya deri içine enjekte edilir. Şaşırtıcı bir şekilde plazmid DNA hücreler tarafından alınır ve çekirdeğe gönderilir. Burada RNA'ya kopyalanır ve daha sonra sitoplazmaya dönüştürülür. Plazmid DNA'nın alınımlı verimliliği ve ekspresyonu son derece düşük olmalıdır, bununla birlikte T ve B hücrelerinde bağışıklık tepkilerini tetiklemenin yeterli olduğuna dair çok sayıda kanıt bulunmaktadır. Çok sayıda bilgi kaynağı, hem CD4+ hem de CD8+ hücre aracılı yanıtların uyarıldığına bunun ise *Leishmania* aşısı için bir DNA aşısını çekici hale getirdiğine işaret etmektedir. Uygun bağışıklık yanıtlarını uyarabilmenin yanı sıra, DNA aşıları, polipeptitin uygun katlanmasını sağladığı, antijeni uzun süre boyunca ürettiği ve adjuvanlar gerektirmediği için caziptir. Başka bir avantaj ise üretim teknolojisinin çok basit olmasıdır. DNA sabittir, uzun raf ömrüne sahiptir ve dağıtım için sıkı bir soğuk zincir gerektirmez. gp63, LACK ve PSA-2, sistein proteaz tip I (Cpb) ve tip II (Cpa) kodlayan DNA ile yapılan aşılama, genetik olarak dirençli ve duyarlı farelerin tümünü *L. major* enfeksiyonuna karşı korumuştur [29].

2.10.6. Rekombinant ve Sentetik Aşılar

İncelenmekte olan daha yeni aşılar ise rekombinant DNA kökenli antijenleri ve peptidleri kapsar. Hedef antijenlerden bazıları canlı türleri ve yaşam döngüsü aşamasına özgüdür, buna karşılık diğerleri ise promastigotlar ve amastigotlar tarafından paylaşılır. Bazıları *Leishmania* türleri arasında korunurken, bazıları korunmamaktadır. T hücrelerinin, MHC sınıf I kanalında bağlanmış sitozolik proteinlerden türemiş peptidleri veya antijen sunucu hücre yüzeyi üzerindeki MHC sınıf II kanalında bağlanmış lizozomal bölmeden türemiş peptidleri tanınmasından dolayı herhangi bir parazit proteini, parazitteki konumu ne olursa olsun, bir antijen olarak işlev görebilir. Rekombinant antijenler saflaştırılmış proteinler, bunları kodlayan çıplak DNA veya tabii vaziyetinde proteinleri üreten bakteriler olarak taşınabilir. Manipülasyonlar, antijenin spesifik lokasyonlara veya primer T hücre yanıtlarının başlatılması için gerekli olduğu düşünülen, dendritik hücreler veya langerhans hücreleri gibi belirli antijen sunucu hücrelere hedeflenmesine izin verir. Bakterilerin enjeksiyonu veya çıplak DNA, bu antijen sunucu hücrelerin "etkinleştirilmesi" veya "yetkilendirilmesi" gibi destekleyici etki sağlayacak ek bir avantaja sahip olabilir [7].

2.10.7. Aşı olarak Anti-tatarcık Tükürüğü Bileşenleri

Leishmania parazitleri, tatarcık tükürüğündeki bir süspansiyon olarak tatarcık ısırığı sırasında bir konakçıdan diğerine taşınır. Bu nedenle, tükürük bileşenlerine karşı bağışıklık tepkilerinin tetiklenmesi anti-leyişmanyal bağışıklığı dolaylı olarak artırabilir. Yapılan ilk çalışmalar, tatarcık tükürüğündeki moleküllerin enfeksiyon oluşumunu kolaylaştırarak hastalık gelişimini şiddetlendirdiğini ortaya koymuştur. Diğer taraftan, farelerin enfekte olmamış tatarcıkların ısırıklarına daha önceden maruz kalmasının *L. major* enfeksiyonuna karşı koruma sağladığı görülmüştür. Koruma, parazit enjeksiyonu bölgesindeki bir gecikmiş tip hipersensitivite yanıtı ile ilişkilendirilmiştir [30]. Maxidilan [8] veya bir 15 kDa proteini, SP15 [31] gibi tükürükte bulunan moleküller ile bağışıklık kazandırma da KL'ye karşı korumayı başlatmıştır. Tükürük moleküllerinin doğal enfeksiyon sürecindeki rolü anlaşılmamaktadır, bağışıklığın bunlara karşı tepki vermesini sağlayan hiçbir mekanizma korumayı başlatmamaktadır. Koruyucu bağışıklık, tükürükteki bağışıklığı düzenleyicilere yöneltilebilir, bu da enfeksiyonu kolaylaştırma yeteneklerini etkisiz hale getirir. Alternatif olarak, tüm çalışmalarda gözlemlenen gecikmiş tip hipersensitivite yanıtı, enjeksiyon yerindeki ortamı değiştirebilir ve *Leishmania* açısından bunu rahatsız edici hale getirebilir (Belkaid yanıtı). Bu amaçla, IL12 salgılamak için retroviral enfeksiyonla tasarlanmış dendritik hücrelerin adoptif transferi, *L. donovani* antijeniyle atılan dendritik hücrelerle aşılamanın etkisini arttırmak için kullanılmıştır. Bazı bakteriyel DNA dizilerinin immunostimülator etkilere sahip oldukları görülmektedir. Metillenmemiş dinükleotitler (CpG motifleri) içeren spesifik DNA dizileri, B hücreleri ve dendritik hücreleri aktive eder ve makrofajlar aracılığıyla sitokin üretimini başlatır. CpG motiflerinin, polarize bir Th1 yanıtına yol açan IL-12 ve TNF- α üretimini başlatma yeteneği, *Leishmania* aşılara yönelik adjuvanlar olarak bunları ilgi çekici hale getirir. CpG içeren DNA'nın aşılama da immünostimülator etkileri vardır [7].

2.10.8. Adjuvanların Dağıtımı

Latince kelime anlamı olarak "yardımcı olmak" anlamına gelen adjuvanlar, 1920'lerin başından itibaren aşının tesirini arttırmak için kullanılmıştır. Adjuvanların sayısı ve türleri artmış olmasına rağmen etki mekanizmaları büyük ölçüde gizemini korumakta ve ampirik niteliktedir. Son zamanlarda birçok laboratuarda çalışmalar, bağışıklık tepkilerini başlatan hücreler ve moleküllere ilişkin düşüncelerimizi değiştirmiştir. Günümüzdeki anlayışa göre uzman "profesyonel" antijen sunucu hücrelerin, primer T

hücre yanıtlarını başlatması gerekmektedir. Bu hücreler dendritik hücreler veya deride bulunan langerhans hücreleridir. Dendritik hücreler, reseptör aracılı endositoz veya sıvı fazlı pinositoz yoluyla antijeni alırlar. Daha sonra dokudan, toplanarak antijenin peptidlere işlendiği ve peptidlerin MHC sınıf II moleküllerini karşıladığı drenaj lenf düğümlerine taşınırlar. MHC sınıf II'ye sahip peptid kompleksi, hücre yüzeyine taşınır ve T hücreleri tarafından tanınması için gösterilir. Antijen sunucu hücreler aynı zamanda CD4+T hücrelerini alana çeken sitokinleri salgırlar, böylece peptid MHC sınıf II kompleksi için aynı türden reseptörleri olan T hücreleri klonal genişleme geçirirler. Th1/Th2 değişiminin bu noktada ortaya çıkması ve böylelikle bağışıklık tepkisinin seyrini ve sonucunu belirlemesi olasıdır. Bu düzeyde, adjuvanların bağışıklık tepkisinin şiddetine ve kalitesine katkıda bulunduğu düşünülür [7, 32].

2.11. Leyişmanyozda Deneysel Hayvan Modelleri

Herhangi bir araştırmanın başarısı uygun bir model oluşturulabilmesine ve güvenilir tekniklerin kullanılmasına bağlıdır. Yeni geliştirilen aşuların, immünoterapötik ajanların leyişmanyozu karşı etkinliği hakkında yapılan çalışmalarda bu tür model hayvanlar tercih edilir. Yapılan çalışmalar için hayvan modellerinde hastalığın insanda oluşan tepkileri vermesi arzu edilen bir özelliktir. Günümüze kadar herbiri farklı özelliklere sahip birçok deneysel model geliştirilmiştir. Ancak leyişmanyozda insanda oluşan immünolojik, patolojik ve fiziksel tepkileri doğru bir şekilde yansıtan hayvan modelleri arasında BALB/c ırkı fareler ve hamsterler önemli bir yer tutmaktadır [7].

2.11.1 Fare

BALB/c fare türlerinin *L. major* ile enfeksiyonu, hücre içi bir patojene verilen hücre aracılı yanıt sırasında oluşan immüno-regülasyon için en iyi modeli sunar. Duyarlı BALB/c farelerinde, KL enfeksiyonu parazite özgül Th2 tipi hücrelerin drene olduğu lenf düğümlerinde, IL-4'ü salgılayan CD4+ efektör T-hücrelerinin görünümüyle ilişkili, visceral yayılım ile ilerleyen bir hastalığa neden olur. Bunun aksine aynı soydan gelen diğer türlerin (örneğin, CBA, C3H, veya C57BL/6) çoğu kolaylıkla enfeksiyonu kontrol altına alabilir ve IFN- γ 'yı serbest bırakan ancak IL-4'salmayan Th1 tipi CD4+ efektör hücreleri ile ilişkili sağlam bir tepki geliştirirler ve bu fagosit bağımlı immünitenin aktivasyonunu sağlamaktadır [33].

Hastalığın duyarlılığı veya direnci Th2 veya Th1 hücrelerinden salınan sitokinlerin üretimi ile yakından ilişkilidir. O halde sorulması gereken soru Th1 veya

Th2 bağlantısının nasıl belirlendiğidir. IL-4 (daha az oranda IL-10) ve IL-12'nin sırasıyla Th2 ve Th1 gelişimine aracılık etmede önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. IL-12, IFN- γ 'yı aktive ederken IL-4 transkripsiyonunu baskılar. Enfeksiyonun uzun süreli kontrolünü sürdürmek için Th1 yanıtı ve IL-12'nin kalıcılığı gereklidir [34].

BALB/c farelerinin *L. major*'e genetik yatkınlığı, büyük olasılıkla *Leishmania* antijen epitoplarının CD4+T hücreleri tarafından anormal bir şekilde tanınmasından kaynaklanır. Öyle ki IL-4 üretimi fazlasıyla artarlar IL-12 aşırı bir şekilde baskılanır. Farklı *Leishmania* türleri klinik olarak farklı hastalıklara neden olur ve herhangi bir parazitin neden olduğu hastalığın ciddiyeti, bireysel olarak belirgin bir şekilde değişebilir. *Leishmania* enfeksiyonunun, konakçısı üzerindeki dirençliliği ve duyarlılığı konusunda tartışmalar devam etmektedir. Bu konu leişmanyozda kullanılan hayvan modellerine kadar uzanır. Ancak bilinen bir gerçek vardır ki C57BL/6 fareleri her zaman dirençlidir, BALB/c ise daima duyarlıdır [7].

Th1 bağışıklık tepkisinin *Leishmania* enfeksiyonunu önlemedeki en önemli olaydır. Uyarılmış Th1 hücreleri, makrofajları aktive eden ve parazitleri öldüren IFN- γ 'yı indükler. C57BL/6 fareleri erken Th1 bağışıklık yanıtı başlatır ve enfeksiyonun yayılmasını önler, iyileşme sürecini başlatır. Buna karşılık BALB/c türü fareler ise erken Th2 yanıtını başlatır ve iyileşmeyen lezyona ve hastalığın ilerlemesine yol açar [7].

2.11.2. Hamster

Farelerde doğuştan, rekombinant ya da deneysel olarak mutasyon geçiren suşların kullanımı ile karakterize bir genetik yapı söz konusu iken, hamsterlar aşırı duyarlı bir konak için mükemmel bir model oluşturmaktadır. Bu nedenle, *Leishmania* enfeksiyonuna karşı hamsterlar, histopatolojik çalışmalar, ilaç etkinliği çalışmaları ve aşı çalışmaları için sıklıkla kullanılırlar [7].

2.11.3. Kobay

Kobaylar, gecikmiş tip hipersensitivite çalışmaları için geleneksel bir modeldir. Bunlar *L. enriettii*'nin doğal konakçılarıdır ve *Leishmania*'nın diğer türleriyle deneysel olarak enfekte edilmişlerdir. *Leishmania* için tanı testlerinde kullanılmak üzere potansiyel antijenleri taramak için cilt testi modeli olarak kullanılmışlardır [7].

2.11.4. Köpek

Diğer hayvan modellerindeki deneysel veriler ile karşılaştırıldığında, köpeklerde *Leishmania*'ya karşı bağışıklık tepkisinde yer alan mekanizmalar ile ilgili bilgiler günümüzde de oldukça sınırlıdır. Bu, temelde köpek bağışıklık hücresi popülasyonlarının ve kemokinlerinin karakterizasyonu için standartlaştırılmış ticari ürünlerin olmamasından kaynaklanmaktadır. Köpeklerin *Leishmania* enfeksiyonuna karşı doğal ve deneysel klinik direnci uzun zamandır bilinmektedir. Klinik olarak, enfekte asemptomatik köpeklerin üç kategorisi tanımlanabilir. Bunlar; belirgin hastalık tablosu oluşturanlar, uzun süre semptomsuz kalanlar ve kendiliğinden iyileşenler. Son iki grubun köpeklerinin, klinik hastalığa yatkın ve duyarlı olarak tanımlanan hayvanların aksine genellikle dirençli oldukları kabul edilir. Köpek genetiğinin, klinik leyişmanyozla karşı direncin belirlenmesinde etkisi olduğu bilinmektedir. Örneğin, İbizian av köpekleri arasında hastalık vakalarının sıklığı diğer cinslere göre çok daha düşüktür. Bu durum önemli immün hücre reaktivitesiyle ilişkilendirilmiştir. Deneysel ve doğal olarak enfekte olmuş hayvanlardan, farklı derecelerde klinik semptom gösteren hayvanlar, *Leishmania* antijenine karşı oluşturulan lenfoproliferatif yanıtları ve IFN- γ veya IL-4 içermeyen bazı sitokinlerin üretimi açısından incelenmiştir. Genel olarak, dirençli köpeklerden alınan lenfositler antijene daha şiddetli tepki göstermiş ve enfekte olmamış veya semptomatik köpeklerden gelen hücrelere kıyasla daha yüksek IL-2 ve TNF- β seviyeleri üretmiştir [7].

2.12. Leyişmanyozda En Son Tedavi Yöntemleri

2.12.1 Güncel İlaçlar

Son yıllara kadar antiparazitik ilaçlara gerek ilaç endüstrileri gerekse hükümetler tarafından yeterince önem verilmemiştir. 2000 li yıllara gelindiğinde yeni antiparazitik ilaçlara yapılan yatırım küresel yatırımın yalnızca % 0,1'i kadardır [35]. Buna ilaveten leyişmanyoz hastalığına karşı insanlara yönelik etkili bir aşı geliştirilmediğinden kemoterapötiklerle sağaltım bu hastalık için birinci öncelik olma özelliğini korumaktadır. Leyişmanyoz için kullanılan yeni kemoterapötiklerin olmasına rağmen, bunların birçoğu eski kemoterapötiklerden türetilenlerdir. VL ve KL için kullanılan güncel ilaçlar stibogluconate of sodium (Pentostam®), *N*-methylglucantime (Glucantime®), pentamidine (Pentacarinato®), ve amphotericin B (Fungizone®) şeklinde sıralanabilir. Bu ilaçlar paranteral kullanıma uygun olup uzun süreli bir tedavi

süreci gerektirmektedir. Bunun yanı sıra, bu ilaçlar çok pahalı olup yüksek toksisiteye sahiptir ve yan etkileri göz ardı edilemeyecek kadar çoktur. Bu faktörler bir bütün olarak ele alındığında tam bir tedavi mümkün olamamaktadır. Bunun yanı sıra tedavinin yetersizliği *Leishmania* türlerinin var olan kemoterapötiklere büyük oranda direnç geliştirmesine de sebep olmaktadır. Fakat, liposomal amphotericin B (AmBisome®), paramomycin, and miltefosin gibi yeni kemoterapötikler ile leişmanyoz tedavisinde olumlu sonuçlar alınabilmektedir. Birçok ülkede liposomal amphotericin B (AmBisome®), VL'da ilk tercih edilen ilaç konumundadır. Bununla birlikte, bu yeni ilaçların yan etkileri diğerleri kadar fazla değildir. Ancak leişmanyozu karşı yeni ilaç ve tedavi yöntemi arayışı, güncelliğini daima korumaktadır [36].

2.12.2. Leişmanyozu Karşı Kullanılan Doğal Ürünler

İnsanlar tarih boyunca hastalıkların tedavisi için atalarından öğrendikleri bilgiler doğrultusunda doğal kaynaklardan ve özellikle bitkilerden yararlanarak birçok yöntem kullanmışlardır. Son yıllarda tıp ne kadar gelişirse gelişsin gerek kolay ulaşım gerekse ekonomik sebepler yüzünden bu gelenek özellikle gelişmekte olan toplumlarda hala devam etmektedir. Günümüzde de bitkisel tedavilerin yeri göz ardı edilemeyecek kadar büyüktür. Hal bu olunca birçok araştırmacı ve laboratuvar bitkisel kökenli yeni molekül arayışına girmişlerdir. Bitkiler, anti-*Leishmania* aktivitesine sahip molekülleri içeren önemli bir kaynaktır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda anti-*Leishmania* aktivitesine sahip bitkisel kaynaklara oldukça sık rastlanmaktadır. Yapılan çalışmalara göre dünyadaki ve ülkemizdeki bazı bitkisel kaynaklar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Anti-leyişmanyal aktiviteye sahip bazı bitkisel droglar.

Tür	Halk ismi	Coğrafik Bölge	Bitkinin kullanılan kısmı	Kaynak
<i>Andrographis paniculata</i>	Hint ekinezyası	Hindistan	Yaprak	[37]
<i>Camptotheca acuminata</i>	Mutluluk ağacı	Çin	Kabuk, Kök	[38]
<i>Curcuma longa</i>	Zerdeçal	Hindistan	Kök	[39]
<i>Mimusops elangii</i>	İspanyol kirazı	Hindistan	Tohum	[40]
<i>Peganum harmala</i>	Üzerlik	Hindistan	Tohum	[41]
<i>Piper nigrum</i>	Karabiber	Hindistan	Tohum	[42]
<i>Taxus baccata</i>	Yaygın porsuk	Yunanistan	Dal	[43]
<i>Yucca filamentosa</i>	Avize çiçeği	Almanya	Tüm bitki	[44]
<i>Annona glauca</i>	Gül elması	Senegal	Tohum	[45]
<i>Annona muricata</i>	Tarçın elması	Kolombiya	Meyve	[46]
<i>Allium sativum</i>	Sarımsak	İran	Soğan	[47]
<i>Posidonia oceanica</i>	Deniz eriştəsi	Türkiye	Tüm bitki	[48]
<i>Ulva lactuca</i>	Deniz marulu	Türkiye	Tüm bitki	[48]
<i>Salvia cilicica</i>	Adaçayı	Türkiye	Kök	[49]

2.13. Anti-Leyişmanyal İlaç İçin Potansiyel Hedefler

Parazit direnci, maliyeti, yan etkileri, toksisitesi ve diğer tedavi sorunları leyişmanyoz tedavisi için yeni ilaçlar ve alternatif hedefler belirlemek ve geliştirmek ihtiyacı doğurmuştur.

Anti-protozoer etki için glikolitik yolak, poliamin biyosentezi, glioksalaz yolağı, fosfolipidlerin ve sfingolipidlerin alımı ve döngüsü, mikrotübül biyosentezi gibi metabolik yollar ve folat metabolizması hedeflenmiştir. Parazit enzimleri gibi yeni hedeflere yönelik ilaçların geliştirilmesi, yeni anti-leyişmanyal ilaçların araştırılmasına da öncülük etmiştir. Arjinaz, leyişmanyoz tedavisinde yakın zamanda tanımlanmış bir hedefdir. Enzim, *Leishmania* gibi bazı tripanosomatidlerde bulunan bir subselüler organel olan glikozomda lokalizedir. Arginaz yolağının engellenmesi, poliamin biyosentetik yolağının engellenmesine ve anti-leyişmanyal aktiviteye neden olur [50].

Anti-leyişmanyal ilaç eylemi için potansiyel hedef olarak araştırılan diğer enzim sistemleri, nitrik oksit sentaz, DNA topoizomeraz, trypanothione reduktaz, süperoksit dismutaz enzimleri ve hipoksantin-guanin fosforibosiltransferazı içerir. *L. major* genomunda serin, sistein, aspartik, treonin ve metalopeptidazları da içeren 154 peptidaz saptanmıştır. Sistein peptidaz-spesifik inhibitörü K11777, bu peptidazların parazit büyümesi için gerekli olduğunu göstermiştir. Buna göre geliştirilen bazı inhibitörlerin

paraziti öldürmediği görülmesine rağmen peptidazların bu konuda umut verici hedefler olduğu düşünülmektedir. Karbonik anhidrazlar, *Leishmania* için araştırılmaya başlanan yeni bir hedeflerdir. Karbonik anhidrazlar, CO₂ hidrasyonunu bikarbonat ve protonlara katalize eden metalloenzimlerdir ve beş karbonik anhidraz sınıfı belirlenmiştir (α , β , γ , δ ve ζ). Karbonik anhidrazlar tarafından katalize edilen reaksiyon, organizmalardaki asit-baz dengesinin düzenlenmesinde gereklidir [50].

2.14. Leyişmanyoz Tedavisi İçin Yeni Bir Tedavi Yöntemi, Nanopartikül Teknolojisi

Son yıllarda nanobilimdeki gelişmeler terapötik kullanım amaçlı nanomateryallerin geliştirilmesini sağladı. Geliştirilen nanomateryaller özellikle son on yılda tedavi aracı olarak kullanılmaya başlamıştır. Bunlardan büyük bir kısmı da tıbbi bitkilerden elde edilen bileşiklerle hazırlanan nanoformülasyonlardır. Saponinler (lipozom) ve alkaloidler (nanopartikül) nanoformülasyonu hazırlanan başlıca bitki bileşenleridir [50]. Bu nanoformülasyonlardan bazıları Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. Nanoformülasyonu hazırlanan başlıca bitki bileşenleri.

Formülasyon	Aktif içerik	Kaynak
Mannoz kaplı lipozom	Piperine	[51]
Nanopartikül	2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone	[52]
Mikroküre, Nanopartikül	Quercetin	[53]
Mikroküre, Nanopartikül	bacopasaponin C	[54]
Mikroküre	14-deoxi-11-oxoandrographolide	[55]
Lipid Nanopartikül	Piperine	[42]
Nanopartikül, Mikroemülsiyon	bassic acid	[40]
Nanojel, Nanopartikül	arjunglucoside I	[56]
Nanopartikül	andrographolide	[57]
Nanopartikül	β -aescin	[58]
Altın Nanopartikül	quercetin	[59]

2.15. *Leishmania* Enfeksiyonu Sırasında Konak Hücre miRNA Ekspresyonunun Modülasyonu ve Yeni Terapötik Bir Molekül olarak miRNA'nın ortaya çıkışı

Leyişmanyozda, kinetoplastid protozoon olan *Leishmania* amastigotları doku makrofajlarının içinde bulunmaktadır. *Leishmania*, enfekte makrofaj hücrelerindeki özel hücre içi yapılar olan parazitoforöz vakuollerde bulunmakla birlikte enfekte olmuş ve henüz enfekte olmamış komşu

hücrelerdeki gen ekspresyonunu da etkilemektedir. Ökaryotik hücrelerin mikro düzenleyici RNA'sı olan miRNA'ların ekspresyonu, hem *Leishmania* ile enfekte makrofajlarda hem de enfekte fare karaciğeri hepatositlerinde değişim geçirmektedir. Karaciğerde serum kolesterolünü düzenleyen ve *Leishmania* enfeksiyonu ile azalmış bir hepatik miRNA olan miR-122'nin restorasyonu, serum kolesterol düzeyindeki artış ve karaciğer parazit yükünün azaltılması ile ilişkili olduğu bilinmektedir [60].

İç ya da dış ortamdaki değişikliklere karşılık olarak metabolik süreçlerin hızlarını kontrol etme yeteneği tüm canlı hücreler için olmazsa olmazdır. Metabolik kontrol ve homeostazın korunması için gerekli olan mekanizmalar, özellikle tüm yüksek metazoal hayvanlarda meydana gelen gen ekspresyonunun transkripsiyonel, translasyonel, post-translasyonel ve allosterik düzenlenmesini içeren kompleks süreçlerdir. Dokuya özgü bir miRNA olan miR-122'nin karaciğerde kolesterol ve lipid homeostazını düzenlediği ortaya konmuştur. miR-122, insan ve kemirgen hayvanların karaciğerinde bol miktarda eksprese edilmektedir ve inhibisyonunun karaciğer kolesterol düzeyini azalttığı araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir. Krützfeldt ve ark. [61], miRNA inhibitörlerinin yeni bir sınıfı olan antagomirleri kullanarak miR-122'nin farelerdeki kolesterol metabolizması üzerine etkisini incelemiştir. Antagomir-122'nin karaciğerdeki miR-122'yi azalttığı ve antagomir tedavisinin 4 gün sonrasında bile plazma kolesterol düzeylerinde belirgin bir düşüşe neden olduğu görülmüştür [61]. Gosh ve ark.; miR-122'nin koruyucu rolünü daha iyi belirtmek amacıyla miR-122 ekspresyonu, enfeksiyonun başlangıç oluşumunun ardından karaciğerde artırılmıştır. Yalnızca üç dozluk miR-122 ekspresyon plazmid enjeksiyonundan sonra, miR-122 seviyesinde bir artış ile birlikte kolesterol düzeyinde de bir yükselme görülmüştür. Daha da önemlisi, daha önce olduğu gibi hepatik parazit yükünün azaldığını ve burdan yola çıkarak araştırmacılar, miR-122'nin koruyucu etkisinin olduğunu göstermişlerdir [62].

KL'de miRNA düzeylerindeki değişimleri gösteren çalışmalar sınırlı sayıdadır. *L. major* etkenli KL ile ilgili yapılan bir araştırmada enfeksiyon sonrası 3, 6, 12 ve 24. saatlerde 365 miRNA'lık bir dizi profillenmiş *L. major* enfeksiyonunda insan miRNA'larının yaklaşık %20'sinin ekspresyonunu değiştirdiği tespit edilmiştir. Enfeksiyondan 3 saat sonra, 31 miRNA miktarında artış tespit edilmiş ancak üçünün ekspresyonunda bir azalma olduğu görülmüştür. Buna karşılık, enfeksiyondan 6 saat sonra sadece beş miRNA ekspresyonu artmış ve yedi miRNA ekspresyonunda ise azalma olduğu görülmüştür. Daha uzun enfeksiyon süresi sekiz ve yedi miRNA'nın sırasıyla 12 ve 24 saatte ekspresyonunu artırırken, üç ve onbir miRNA ekspresyonu bu zaman noktalarında azalmıştır. Son olarak, 64 miRNA arasında 4 miRNA (miR-28,

miR-331, miR-486 ve miR-502), en az iki farklı enfeksiyon zamanında farklı şekilde düzenlenmiştir [63].

2.16. Leyişmanyozda Serum Kolestrol Seviyesi Değişimleri ve Terapötik Ajan Olarak Kolesterol

VL'da kolesterolün önemi çok iyi şekilde tespit edilmiştir. Serum kolesterol içeriğinin, hastalığın ilerlemesi ile birlikte VL hastalarında tehlike arz edecek şekilde azaldığı tespit edilmiştir ve ilginçtir ki bu, parazit yükü ile ters korelasyona sahiptir. [64]. Bu durum, kolesterolün lipozomal olarak verilmesi ile düzeltilebilir [65]. VL'nin deneysel hamster modellerinde, lipozomal kolesterol uygulaması enfekte hayvanları organ paraziti yükünden kurtardığı Banarjee ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada gösterilmiştir [66]. Hiperkolesterolemik farelerde yapılan daha ileri düzeyde çalışmalar, kolesterol seviyesinin doğrudan hastalığın şiddeti ve ilerlemesiyle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [67]. Kolesterol uygulaması ile birlikte yapılan tedavi, doğrudan veya ilaca dayalı temel bir tedaviye yardımcı olarak klinik ortamda kullanılmaktadır. *L. donovani*, hücre içi yaşam döngüsü boyunca membran akışkanlığını artırarak enfekte makrofajların membran raflarını bozar. Bu durum, kolesterol bakımından zengin lipozomların leyişmanyoz tedavisinde terapötik bir role sahip olabileceği fikrini desteklemiştir. Enfekte makrofajın faz geçiş sıcaklığından daha düşük bir sıcaklığa maruz bırakılmasıyla veya aşırı kolesterolün lipozomal olarak verilmesiyle düzeltilen membran akışkanlığı, enfekte olmuş makrofajdaki antijen sunum probleminin düzeltilmesini sağlamıştır [65]. Bu ve kolesterolün *Leishmania* enfeksiyonuna karşı potansiyel bir terapötik ajan olarak işlev görebileceği yönündeki diğer bulgular, araştırmaların *L. donovani* ile enfekte hamsterlarda kolesterol bakımından zengin lipozomların terapötik etkinliğine odaklanmalarını sağlamıştır [60].

2.17. Leyişmanyoz Karşı Terapötik Bir Ajan Olarak miRNA'nın Geleceği

Terapötik ajanlar olarak küçük düzenleyici RNA'ların potansiyeli henüz araştırılmamıştır. miR-122'nin, aşırı ekspresyonun enfekte hayvan karaciğerinden parazitin temizlenmesini sağlayabilecek önemli bir molekül olduğu keşfedilmiştir. Bu miRNA'nın, farklı memeli konakçılarda ilaca dirençli parazitler tarafından enfeksiyona karşı etkinliğinin test edilmesi ile olumlu sonuçlar elde edilebilir. Bunun, enfekte dokuda esasen kolesterolün artırılması yoluyla anti-leyişmanyal faktör gibi davrandığı görülmektedir ancak miRNA ekspresyonunun parazit sayısını doğrudan etkileyip etkilemediği bilinmemektedir. İlk

bulgular umut verici olmakla birlikte gelecekte miR-122, *L. donovani* ile enfekte bireylerde anti-leyişmanyal gen olarak faydalı olabilir [60].

Görüldüğü gibi *Leishmania* enfeksiyonu sırasında miRNA ekspresyonlarında belirgin değişiklikler hem KL'da hem de VL'da yapılan araştırmalar sonucu tespit edilmiştir. miRNA'lar birçok hastalığın düzenlenmesinde görev alan yeni tedavi yaklaşımlarıdır. Belirli bir miRNA dizisini inhibe eden, o diziye spesifik olan antagomirler yeni bir ilaç grubu olma yönünde ilerlemektedir. miRNA'ların kontrolü ile yakın gelecekte birçok hastalığın tedavisinin mümkün olacağı düşünülmektedir [60].

2.18. Nanoteknoloji ve Nanotıp

Son zamanlarda teknolojinin birçok alanında olduğu gibi tıp alanında da adından sıkça söz ettiren bilim dalı Nanoteknoloji'dir. Yunanca'da cüce anlamına gelen "Nano" bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri olup, bir nanometre yaklaşık 2-3 atomun yan yana dizilmesiyle elde edilen uzunluktur. 1 ile 100 nanometre boyutları arasında olan nanopartiküllerin geliştirilmesiyle nanoteknoloji, tıp alanında da tanı ve tedavi amaçlı kullanılmaya başlamıştır. Özellikle çeşitli patojenik ve genetik hastalıkların teşhisinde, tümör hücrelerinin erken tespitinde bu nanopartiküllerin optik, floresan ve manyetik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Nanopartiküllerin tedavi amaçlı kullanımıyla ilgili çalışmalar henüz çok yeni olmakla beraber son yıllarda bu tür çalışmalara rastlamaktayız.

Grafen, bu nanopartiküllerden sadece biridir. Bal peteği kristal yapısında olan grafen ancak 2004 yılında sentezlenebilmiştir. İngilizce'de "Graphite" ve "ene" kelimelerinden türetilen "graphene" terimi türkçede grafen olarak karşılık bulmuştur. 2010 Nobel Fizik Ödülü, "iki-boyutlu grafen malzemesine ilişkin çığır açan deneyleri için" Andre Geim ve Konstantin Novoselov'a verilmiştir [68]. Grafen Oksit (GO), mekanik, fiziksel ve optik özelliklerinden dolayı medikal alanda da birçok akademik çalışmaya konu olmuştur [69-71]. Bu çalışmalar, GO'e bağlanan taşıyıcı maddeler vasıtasıyla grafenin özellikle kanserli dokularda yoğunlaşması ve erken evrede kanserli hücrelerin teşhisini amaçlamıştır. Bilindiği gibi kanser tedavisindeki en büyük sorunlardan biri ilaçların kanser hücrelerine etki ederken diğer sağlıklı hücrelere de zarar vermesidir. Sadece kanser hücrelerine etki edecek tedaviler nanoteknoloji ile mümkün olmaktadır. Jung ve ark. [71] tarafından yapılan çalışmada GO'e bağlanan hyaluronik asit vasıtasıyla grafen, bir deri kanseri olan melanom dokusunda yoğunlaştırılmış ve yakın infrared ışına yardımıyla uygulanan fototermal terapi

sonucunda kanserli dokuda belirgin bir iyileşme tespit etmişlerdir. Nanoteknolojinin özellikle medikal alanda yakın gelecekte birçok tanı ve tedavi amaçlı kullanılan bir yöntem olacağı düşünülmektedir.



3. MATERYAL ve METOD

3.1. Deney Hayvanları ve Deney Grupları:

Çalışmada, dişi BALB/c (4-8 haftalık, 20±5 gr ağırlığında) ırkı fareler kullanıldı. Fareler çalışma süresince Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarı'nda 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda barındırıldı. Çalışmada kullanılan fareler Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden satın alındı. Araştırma, Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun 25.03.2016 tarih ve 52 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan deney grupları ve hayvan sayıları

Deney Grubu	Hayvan Sayısı
GO+FTU 15 sn	8
GO+ FTU30 sn	8
GO+MSA FTU 15 sn	8
GO+MSA FTU 30 sn	8
FTU 15 sn	8
FTU 30 sn	8
K (Miltefosin)	8
PK	8
NK	4
TOPLAM	68

GO: Grafen oksit, FTU: Fototermal uygulama, MSA: Makrofaj spesifik antikor, K: Kontrol, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol.

FTU gruplara 30 sn ve 15 sn süre ile uygulandı. Deney grupları sadece GO'in etkisini, GO+MSA modifikasyonunun etkisini ve sadece FTU'nın etkisini ölçmek amacıyla oluşturuldu, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı. Kontrol grubunun ilki miltefosin ile tedavi edildi. Pozitif kontrol grubuna herhangi bir tedavi uygulanmazken negatif kontrol grubudaki hayvanlar KL oluşturulmayan tamamen sağlıklı hayvanlardan oluştu.

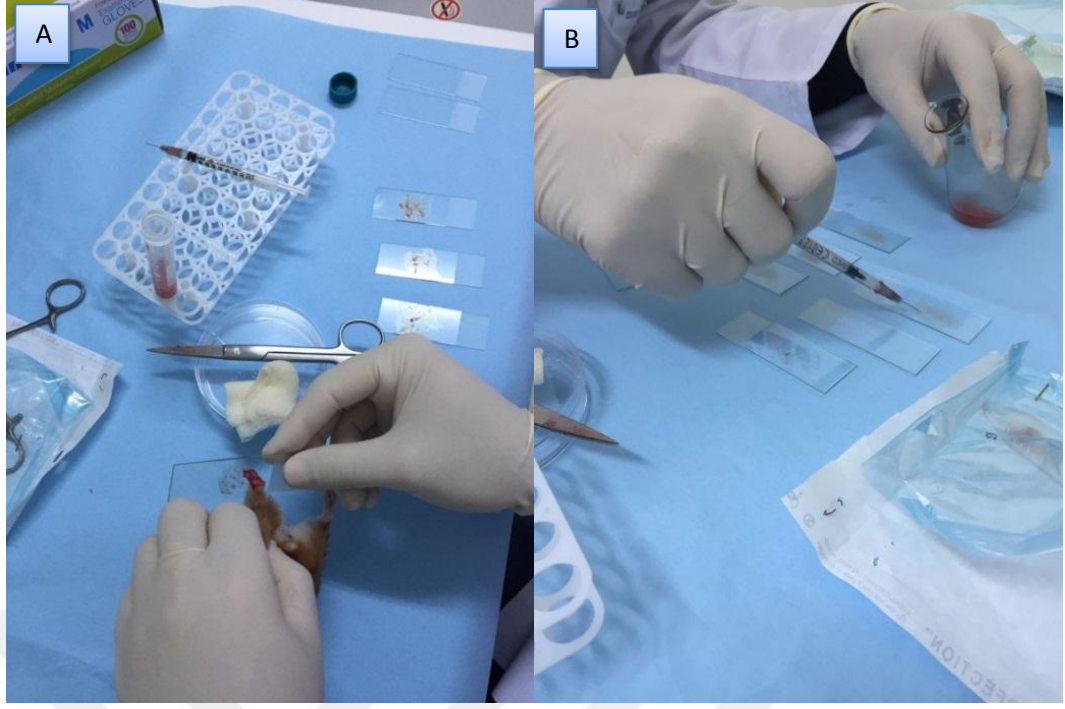
3.2. Parazit İnokülasyonu

Çalışmamızda kullanılan *L. major* MHOM/TR/2013/MANİSAPB145 suşu Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'ndan temin edildi. Parazit, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda 10 adet BALB/c ırkı farenin ayak tabanlarına amastigot formda inoküle edilerek pasaj yapıldı. Yaklaşık 3 hafta sonra farelerde KL şekillendi. Pasajlar hayvandan hayvana yapılarak suşun devamlılığı sağlandı.

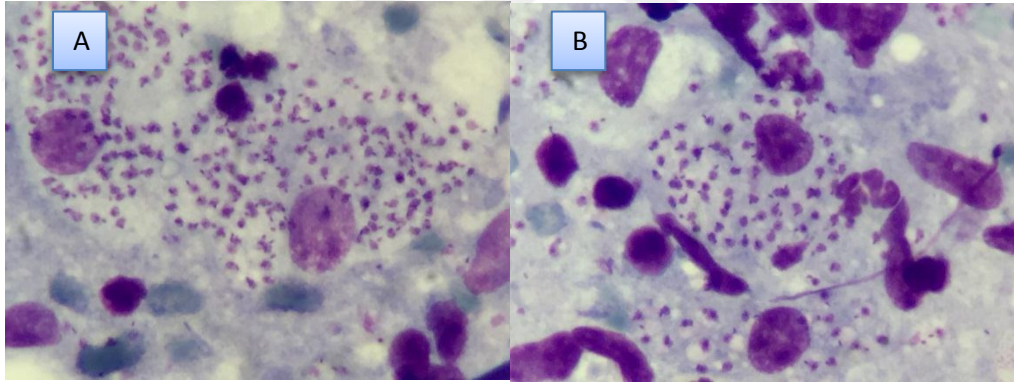
3.3. Deneysel KL Modelinin Oluşturulması

Deneysel leyişmanyoz modeli oluşturma aşamaları aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

1. Enfeksiyon işleminden önce negatif kontrol grubundaki fareler dışında bütün fareler genel anesteziye alındı. Anestezi işlemi % 10'luk ketaminden (Ketalar, Pfizer) 60 µL intraperitoneal yolla verilerek gerçekleştirildi.
2. Daha önceden KL oluşturulmuş farenin ayak tabanı etil alkol (Merck, 100983) ile silinerek bölgenin asepsisi sağlandı. Lezyonlu bölge steril bir makas yardımıyla dikkatlice kesildi ve steril bir erlene alındı. Hayvanlara inokülasyon yapmadan önce amastigot yoğunluğunu değerlendirmek amacı ile kesilen bölgeden değdirme şeklinde (Şekil 8A) ve hazırlanan inokülasyon sıvısından (Şekil 8B) preparatlar hazırlanıp Giemsa (Merck, 109204) ile boyandıktan sonra mikroskopta incelendi (Şekil 9). Daha sonra işlem yapılan fare kurbanı edildi.

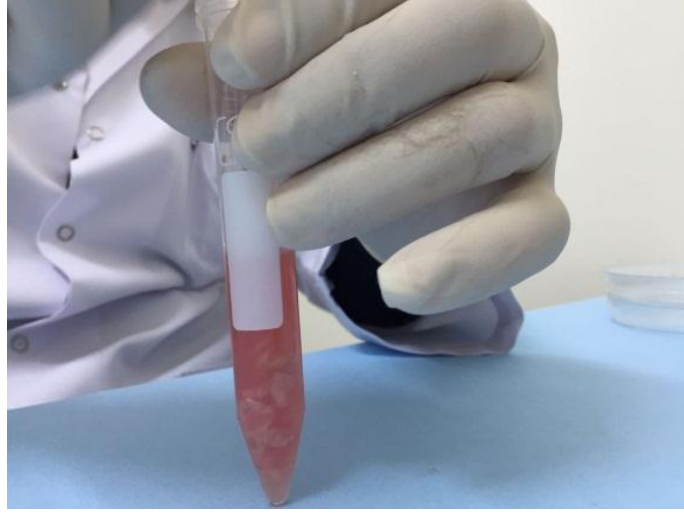


Şekil 8. KL oluşturulan fareden değdirme (A) ve inokülasyon sıvısından (B) preparat hazırlama.



Şekil 9. Amastigotların değdirme preparat (A) ve inokülasyon sıvısı (B)'ndaki görünümü.

3. Kesilen parçalar bir deney tüpüne konularak üzerine %10 at serumu (Sigma, H0146) içeren RPMI-1640 (Sigma, R8758) besiyerinden 5 mL eklendi ve steril bir cam baget yardımıyla homojenizasyonu sağlandı (Şekil 10).



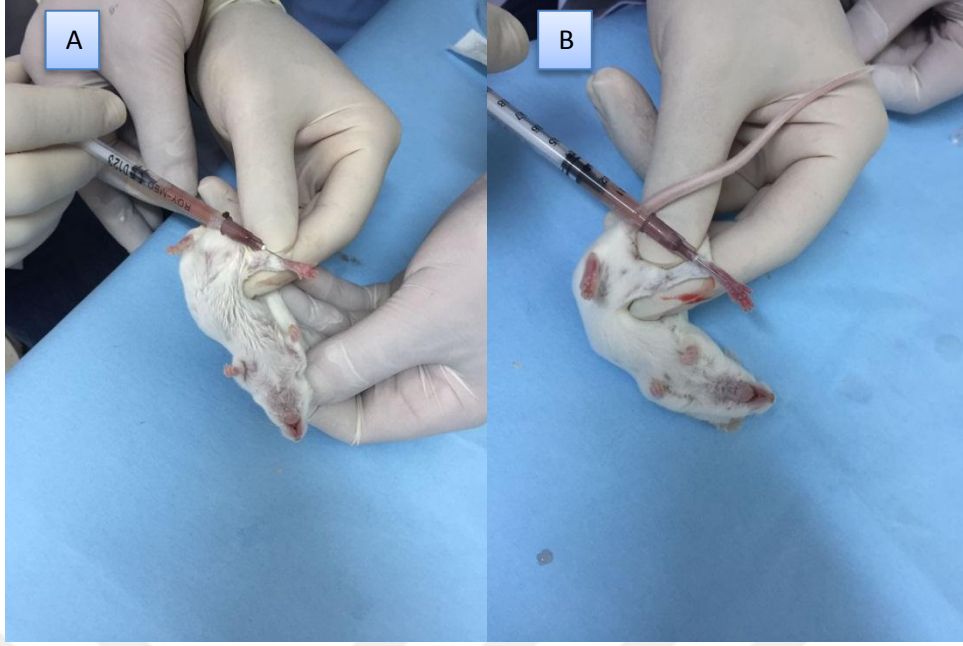
Şekil 10. İnokülasyon sıvısının homojenizasyonu.

4. Homojenizasyonu yapılan inokülasyon sıvısı steril gazlı bez vasıtasıyla süzüldü (Şekil 11).



Şekil 11. İnokülasyon sıvısının süzülmesi.

5. Süzülen inokülasyon sıvısı steril bir deney tüpünde toplanarak deneye alınacak farelerin ayak tabanlarına deri altı yolla ve insülin enjektörü aracılığıyla 50 μ L enjekte edildi (Şekil 12).



Şekil 12. İnokülasyon sıvısının fare ayak tabanına deri altı enjeksiyonu. Deri altına giriş (A), inokülasyonun tamamlanması (B).

3.4. Makrofaj Spesifik Antikor bağlı Grafen Oksit Nanopartiküllerin Hazırlanması

GO (Sigma, 794341) nanopartikülleri 1 mg/mL'lik konsantrasyonda, makrofaj spesifik antikor (MSA, Abnova, MAB5180) ticari olarak satın alındı. GO-MSA konjugasyonu işleminde EDC/NHS amiditasyon protokolü kullanıldı [69]. (EDC;N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, Sigma, 161462, NHS;N-Hydroxysuccinimide, Sigma, 130672) Buna göre:

1. 400 mM EDC ve 100 mM NHS karışımından 1 mL alınarak üzerine 1 mL 1 mg/mL konsantrasyonda GO ve 1 mL pH: 5,2 MES buffer (Sigma, M8250, 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate) eklenerek 30 dk oda sıcaklığında aktive edildi.
2. Karışım 13000 rpm de 5 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
3. MES buffer ile tekrar yıkanarak santrifüj edildi. EDC ve NHS'nin kalan kısımları reaksiyon karışımından uzaklaştırıldı.
4. Fonksiyonel karışımın üzerine 1 mL pH:7,4 PBS eklenerek 5 dk homojenize edildi.
5. Üzerine 100 µL MSA (5µg/mL) eklendi.
6. Süspansiyon homojenize edilerek 1 gece +4°C'de bekletildi.

7. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımı PBS ile yıkayıp 13000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant kısım atıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
8. Son yıkamadan sonra kalıntı üzerine 1 mL %1 SSA (Sığır Serum Albümini, Sigma, A2058) içeren pH:7,4 PBS eklenerek homojenize edildi.
9. Solüsyon +4°C'de 3 hafta içinde kullanılmak üzere saklandı.

3.5. GO+MSA Sentezinin Doğrulanması

GO+MSA modifikasyonunun başarılı olup olmadığı fourier dönüşümlü infrared spektrofotometre (FT-IR) analizi ve elementel analiz ile doğrulandı. Analizler, Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

3.5.1. FT-IR Analizi

GO ve modifiye edilen GO+MSA nanopartikülleri ayrı ayrı 13000 rpm'de satrifüj edildi. Supernatan kısım atıldı. 2 mL deiyonize saf su ile homojenize edildi. Yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı. Yıkama sonrası elde edilen maddeler liyofilizasyon cihazında (Christ Freeze Dryer Alpha 1-2 LD, Almanya) 24 saat liyofilize edildi. Spektrumlar, KBr tabletleri hazırlanan maddelerin FT-IR spektrometresinde (Perkin Elmer, Spektrum 100, Amerika) 4000-400 cm⁻¹ aralığında analiz edilmesiyle elde edildi.

3.5.2. Elementel Analiz

Maddelerin elementel analizleri mikro elementel analiz cihazı (Leco TruSpec, Amerika) kullanılarak yapıldı.

3.6. GO+MSA Nanopartikülünün KL Farelerde Doku İçinde Makrofajlara Bağlanabildiğinin Doğrulanması

Sentezlenen GO+MSA nanopartiküllerinin makrofajlara bağlandığını doğrulamak amacıyla dokular immünfloresan boyama ile değerlendirildi. Bunun için, KL oluşturulmuş farelerden 2'sine lezyonlu bölge yakınına 20 µL GO+MSA derialtı yolla enjekte edildi. 24 saat sonra madde 3.3'de belirtildiği gibi genel anesteziye alınan fareler sakrifiye edildi. Taze dokudan alınan örnekler cryotome (Leica, Almanya) cihazında -22 derecede donduruldu. Dondurulan dokudan alınan kesit örnekleri 1 gece aynı cihazda bekletildi. Bir sonraki gün PBS solüsyonuna alınan preparatlardaki dokuların kenarları doku sınırlayıcı kalem ile belirginleştirildi. Dokuların üzerine 1/15 oranında hazırlanan monoklonal antikor (anti-MSA, ab177226) damlatılarak 1.5 saat

inkübe edildi. İnkübasyonun ardından PBS'e alınan preparatlar 5 dk bekleddikten sonra 1/1 oranında hazırlanan gliserin/PBS kapama solüsyonu ile kapatma işlemi yapıldı ve mikroskopik olarak değerlendirildi.

3.7. Tedavisi

BALB/c farelerde oluşturulan KL olgularında oluşan deri lezyonları kumpas ile ölçülerek birbirlerine yakın büyüklükteki lezyonlar çalışmaya alındı. Çalışmada 6 deney grubu, 3 kontrol grubu oluşturuldu ve her gruba 8'er adet fare alınırken negatif kontrol grubuna 4 adet fare alındı. Kontrol gruplarından pozitif kontrol grubuna herhangi bir tedavi uygulanmazken diğer kontrol grubuna leyişmanyoz tedavisinde kullanılan miltefosin ilk beş gün 50 mg/kg/gün, son beş gün ise 25 mg/kg/gün dozunda oral yolla uygulandı (Şekil 13). Negatif kontrol grubunda bulunan farelerde KL oluşturulmadı ve hiçbir uygulama yapılmadı. Fototermal uygulama (FTU), PL-E Pro 808 nm İnfrared Lazer (Jet, Çin) cihazı ile yakın infrared ışımaya şeklinde 15 sn/gün ve 30 sn/gün dozunda uygulandı (Şekil 14). Deney grupları Tablo 3'te belirtildiği gibi GO+FTU 15 sn, GO+FTU 30 sn, GO+MSA+FTU 15 sn, GO+MSA+FTU 30 sn, FTU 15 sn ve FTU 30 sn şeklinde düzenlendi. GO ve GO+MSA nanopartikülleri yara bölgesi yakınına derialtı yolla 20 µL enjekte edildi ve 24 saat sonra tedavi prosedürü uygulandı. Tedavinin 5'inci ve 10'uncu gününde fareler fiziksel görünüm ve klinik olarak, 10'uncu gününde ise histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. 10 günlük tedavi süreci sonunda hayvanlar genel anestezi sonrası sakrifiye edildi. Çalışmalar araştırmacının güvenliği açısından nanopartiküllerin inhale edilmesini engellemek amacıyla biyogüvenlik kabininde gerçekleştirildi, araştırmacı laboratuvar gözlüğü, kimyasal maske ve eldiven kullandı.



Şekil 13. Oral yolla miltefosin uygulaması.



Şekil 14. PL-E Pro 808 nm infrared lazer ile FTU.

3.8. Tedavinin Etkisinin Belirlenmesi

1. Fiziksel görünüm: Hayvanlar çalışmanın başlangıcında ve sonunda tartılarak genel bir ağırlık artışı veya azalması olup olmadığı takip edildi.
2. Klinik görünüm: Çalışmanın 5'inci ve 10'uncu gününde hayvanlarda oluşturulan KL lezyonlarında eritem ve ödem varlığı ve iyileşme durumu derecelendirildi (0: eritem ve ödem yok, tam iyileşme 1: kısmi bir eritem ve ödem var, kısmi iyileşme 2: ileri derece eritem ve ödem var, iyileşme yok).
3. Tedavinin 10'uncu gününde, deney ve kontrol grubundan alınan doku örnekleri histopatolojik (hematoksilen & eosin boyama) ve immünohistokimyasal (TNF- α , IL-1, IL-6 ve IFN- γ) olarak değerlendirildi. Hematoksilen & eosin boyamada dokulardaki yangısal reaksiyon 0: yok, 1: orta dereceli, 2: şiddetli şeklinde derecelendirilirken immünohistokimyasal boyamada TNF- α , IL-1, IL-6 ve IFN- γ yoğunluğu 1: hafif sitokin var, 2: orta dereceli sitokin var, 3: yoğun sitokin var şeklinde derecelendirildi. Gruplardaki amastigot miktarını belirlemek amacıyla mikroskop altında 40X büyütmede preparatlardaki en yoğun amastigot bölgesi tespit edilerek bir mikroskop alanındaki amastigotlar sayıldı. Bu işlem gruptaki her hayvan için ayrı ayrı yapılarak amastigot ortalaması tespit edildi.

3.9. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Tedavi süreci tamamlandıktan sonra, genel anestezi altında sakrifiye edilen farelerin lezyonlu ayakları kesilerek, %10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarında işleme alındı.

3.9.1. Doku takibi ve Dokuların Boyama İçin Hazırlanması

Dokular, %10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde 12 saat tespit edildi. Makroskobik işleme alınan doku örnekleri, doku takip cihazına (Shandon Excelsior, Almanya) konularak, doku takip işlemi (8 saat % 99,9'luk etanol, 4 saat ksilen, 4 saat parafin) yapıldı. Daha sonrasında, bloklanan dokulardan, mikrotom (Leica, Almanya) ile 3 mikron kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon işlemi 1,5 saat 65°C'lik etüvde, 20 dk ksilende, % 99,9'luk, % 90'luk, % 80'lik etanolde 10'ar dk bekletilerek gerçekleştirildi.

3.9.2. Hematoksilen & Eosin Boyama

Boyama işleminden önce preparatlar çeşme suyunda yıkandı ve hematoksilen (Facepath) boyasında 2,5 dk boyandı. Boyanan preparatlar çeşme suyunda yıkandıktan sonra % 1'lik asit alkole bir defa hızlıca batırıldı ve tekrar çeşme suyunda yıkandı. % 1'lik amonyaklı suya üç defa batırılarak mavileştirme işlemi yapıldı. Ardından preparatlar çeşme suyunda 1 dk yıkandı. Eosin (Facepath) boyası ile 1,5 dk boyanan preparatlar çeşme suyunda yıkanarak alkol serisine üç defa batırılıp çıkarıldı ve preparatların kurumması için etüve alındı. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılıp mikroskopik olarak değerlendirildi.

3.9.3. İmmünohistokimyasal Boyama

İmmünohistokimyasal boyama, 3.8.1 maddesinde belirtilen prosedürü takiben hazırlanan preparatlar otomatik immünohistokimyasal boyama cihazında (Roche Ventana Benchmark XT, Arizona) boyamaya alındı. TNF- α , IL-1, IL-6 ve IFN- γ (Biorbyt) antikorlar 1/100 oranında sulandırılarak cihaza konuldu. 4 saat süren boyama işleminin ardından preparatlar etüvde kurutuldu. Entellan ile kapatılarak mikroskopik olarak değerlendirildi.

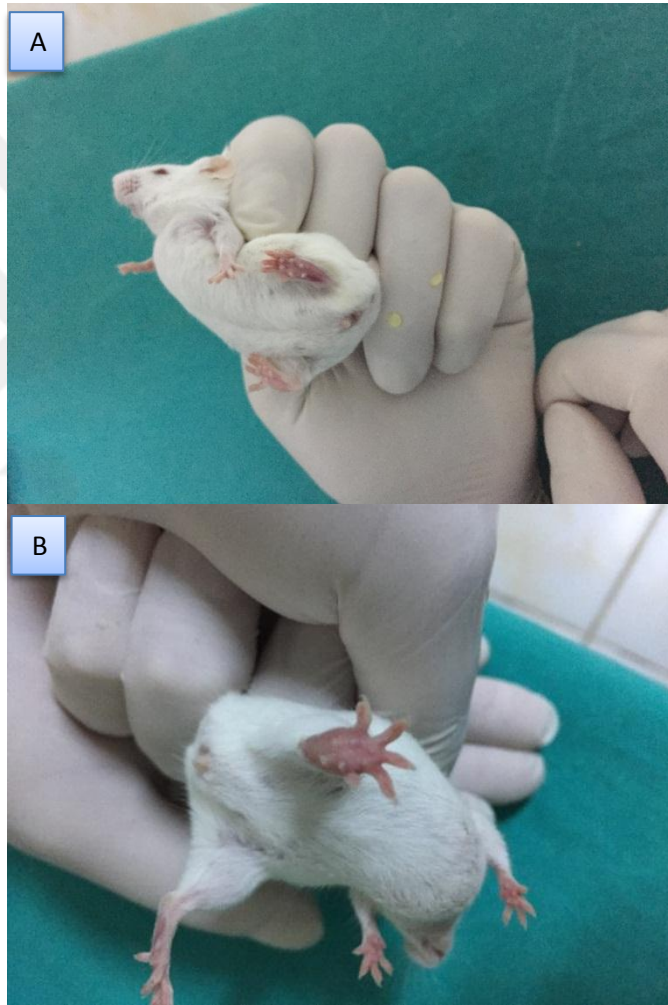
3.10. İstatistiksel Yöntem

Çalışmamızdan elde edilen eritem ve ödem bulguları ile histopatolojik ve immünohistokimyasal veriler SPSS (Ver:22, IBM, Amerika) programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde Man Whitney U testi kullanıldı ve yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Deneysel KL Modeli

BALB/c ırkı 4-8 haftalık dişi deney farelerinin ayak tabanlarına yapılan amastigot inokulasyonundan 5 gün sonra ayak tabanında çok belirgin olmayan bir eritem tespit edildi. Lezyon 10'uncu günde 1'inci derece eritem ve ödem ile kendini gösterirken (Şekil15A) 21 gün sonra 2'inci derece eritem ve ödem gelişti (Şekil 15B). 21 gün sonra KL lezyonu ülserleşmeden tedavi süreci başlatıldı.



Şekil 15. BALB/c farelerin ayak tabanında oluşturulan KL, hastalık oluşturulduktan 10 gün sonraki görünüm (A), 21 gün sonraki görünüm (B).

4.2. GO+MSA Sentezinin Doğrulanması

GO+MSA sentezinin başarılı olup olmadığı FT-IR analizi ve elementel analiz ile doğrulandı. Analiz sonuçları aşağıda gösterilmiştir.

4.2.1. FT-IR Test Sonucu

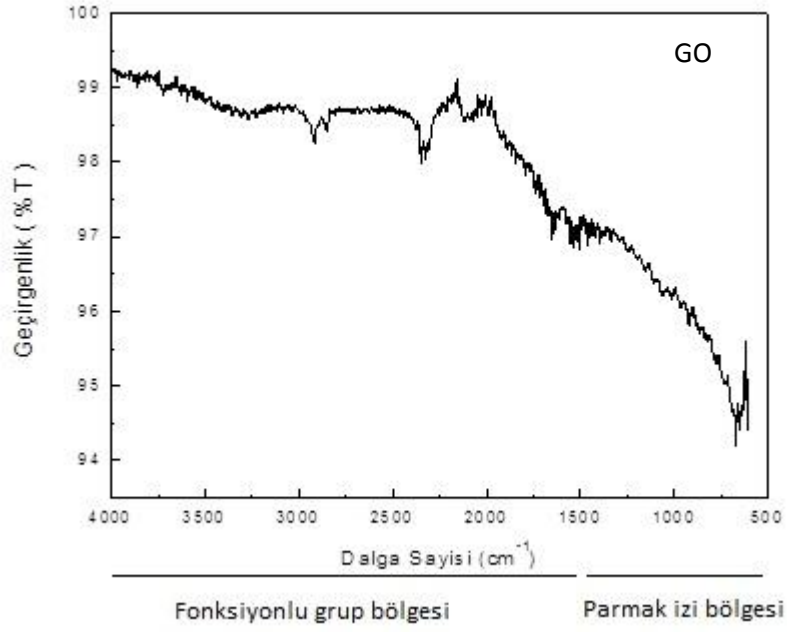
FT-IR analizi esnasında cihaz tarafından moleküle verilen infrared ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Işıma şiddeti zamanın bir fonksiyonu olarak alınır ve her dalga boyundan yüksek çözünürlükte spektrumlar elde edilebilir. Bu yöntem ile moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı belirlenebilir. Bu sebeplerden dolayı GO nanopartiküllerine MSA bağlanma işleminin doğrulanması amacı ile FT-IR analizi yapıldı. FT-IR analiz sonuçlarına göre;

GO iki temel kimyasal yapı içermektedir. Bunlar; 10 adet tüm molekül iskeletini çevreleyen karboksilik asit (-COOH) grupları ve molekülün ortasında bulunan aromatik benzen halkalarından oluşan yapıdır. O halde FTIR spektrumlarına bakılarak şu yorum yapılabilir;

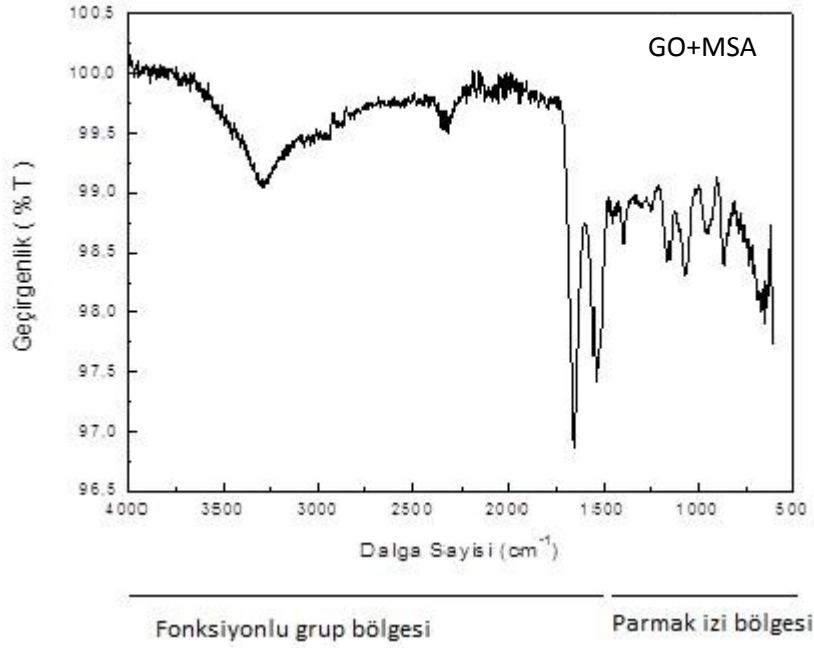
GO spektrumunda -COOH grubu $3300-2500\text{ cm}^{-1}$ olan fonksiyonel grup bölgesinde spektrumda işaretli olan $\sim 2800\text{ cm}^{-1}$ ve $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ olmak üzere iki pik şeklinde görülmüştür. Molekülün ortasında yer alan aromatik halkalar ki burada monosüstitüe benzen halkası $770-730\text{ cm}^{-1}$ ve $710-690\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmesi gerekirken çok fazla karboksil grubu ile bağlı olduğundan maskelenmiştir ve net bir pik vermemiştir. Ancak $1600-1400\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde aromatik yapılara ait C=C ikili bağları ve aynı zamanda $1000-670\text{ cm}^{-1}$ 'de yani yaklaşık 670 cm^{-1} 'de aromatik yapılara ait C-H pikleri gözlenmektedir (Şekil 16).

GO+MSA spektrumunda; bağlanmadan sonra molekülün en dıştaki -COOH grupları önce karboksilat anyonuna ($-\text{COO}^-$) ve sonra da amid (-COONH) yapısına dönüşmelidir. Bu iki bağlanmada 1515 cm^{-1} 'de amid bağı ve yine 1625 cm^{-1} 'de amid bağı gözlenmiştir (Şekil 17).

Sonuç olarak FT-IR spektrumunda GO'te mevcut bulunan -COOH gruplarının antikor bağlandıktan sonra yerini -COONH bağlarına bırakması bağlanmanın/konjugasyonun tam olarak başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin kanıtıdır.



Şekil 16. GO FT-IR diyagramı (Fonksiyonlu grup bölgesi; 4000-1500 cm^{-1} , Parmak izi bölgesi; 1500-400 cm^{-1}).



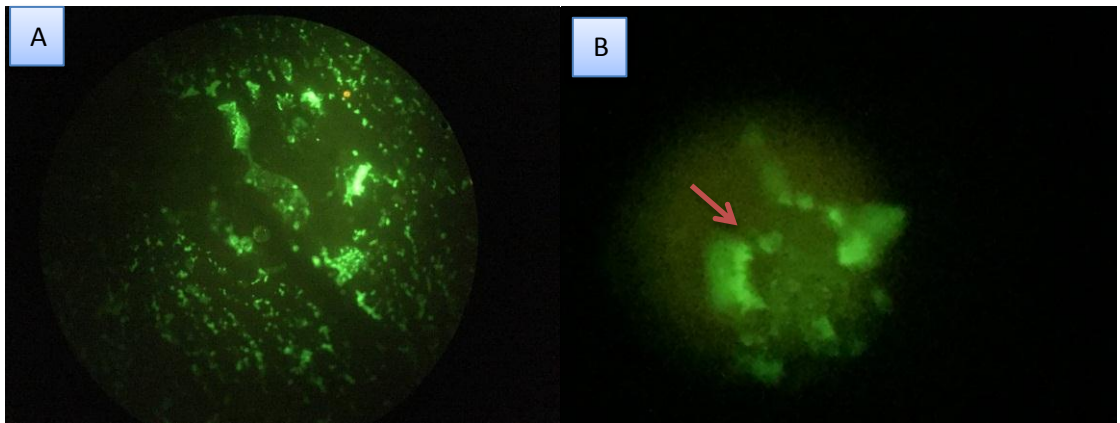
Şekil 17. GO+MSA FT-IR diyagramı (Fonksiyonlu grup bölgesi; 4000-1500 cm^{-1} , Parmak izi bölgesi; 1500-400 cm^{-1}).

4.2.2. Elementel Analiz Test Sonucu

Modifikasyon sonucu yapıda elementel analiz sonucuyla desteklenen % element analizi sonuçlarına göre, sentezlenen GO+MSA yapısında azot %7,1109, karbon %25,196, hidrojen %3,6028, kükürt %3,8936 oranlarında bulundu. GO yapısında bulunmayan azot ve kükürtün, sentezlenen GO+MSA yapısında bulunması GO yapısına MSA'un bağlandığını doğrulamaktadır.

4.3. İmmü floresan Boyama

Sentezlenen GO+MSA'un KL'lı farelere derialtı enjeksiyonundan 24 saat sonra antikorun hedef makrofaja vücut içinde bağlandığı immü floresan antikor boyama ile doğrulandı. Yeşil floresan ışığın yoğunluğu, dokudaki MSA ve MSA'a bağlı olan GO yoğunluğunu göstermektedir (Şekil 18).



Şekil 18. GO+MSA'un dokuda hedef makrofajlara bağlandığını gösteren İmmü floresan boyama sonuçları (A, B), A:Genel görünüm (10X), B: (ok) Makrofaj (100X).

4.4. Tedavi Etkisinin Belirlenmesi

Uygulanan tedavinin 5'inci ve 10'uncu gününde fareler fiziksel ve klinik görünüşleri açısından değerlendirilirken, 10'uncu günde sakrifiye edilen fareler yangısal reaksiyonun tespiti amacı ile histopatolojik (hematoksilen & eosin boyama) ve iyileşme düzeyinin belirlenmesi amacı ile immünohistokimyasal (TNF- α , IL-1, IL-6 ve IFN- γ) olarak değerlendirildi.

4.4.1. Fiziksel Görünüm

Tedaviye başladıktan 5 gün sonunda deney ve kontrol gruplarında her farede ortalama 1 gr bir ağırlık artışı tespit edilmiş olup başka bir fiziksel değişim saptanmadı. 10'uncu gün fiziksel görünümünler incelendiğinde miltefosin verilen gruptaki farelerin ağırlık ortalamasında herhangi bir değişim saptanmazken diğer gruplarda her farede ortalama 1,25 gr'lık bir ağırlık artışı tespit edildi. Onuncu gün sonunda gruplarda başka bir fiziksel değişim saptanmadı.

4.4.2. Klinik Görünüm

4.4.2.1. Tedavinin 5'inci Günü Bulguları

Tedavinin 5'inci gününde deney ve kontrol gruplarının klinik görünümünleri lezyonlardaki eritem ve ödem durumuna göre 0-2 arasında puanlanarak derecelendirildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. GO+FTU 15 sn grubu incelendiğinde 8 hayvandan 2 (% 25)'sinde tam bir iyileşme (eritem:0, ödem:0), 2 (% 25)'sinde kısmi bir iyileşme (eritem:1, ödem:1) tespit edilirken 4 (% 50)'ünde iyileşme saptanmadı (eritem:2, ödem:2). Gruptaki farelerin lezyonlu bölgeleri incelendiğinde 8 farede de ayak tabanlarında yüzeysel yanık yaraları oluştuğu gözlemlendi (Şekil 19).



Şekil 19. 5 günlük tedavi sonrası GO+FTU 15 sn grubunda oluşan yüzeysel yanık görünümü.

GO+MSA+FTU 15 sn grubunda 8 farenin 4 (% 50)'ünde tam bir iyileşme kaydedildi. Bunun yanısıra bu grupta 2 (% 25) farede kısmi bir iyileşme tespit edilirken 2 (% 25)'sinde iyileşme saptanmadı. Gruptaki farelerde tedavi sürecinde herhangi bir komplikasyona rastlanmadı. FTU 15 sn grubu incelendiğinde 8 hayvandan 2 (% 25)'sinde tam bir iyileşme, 2 (% 25)'sinde kısmi bir iyileşme tespit edilirken 4 (% 50)'ünde iyileşme saptanmadı. Bu grupta da tedavi sürecinde herhangi bir komplikasyon şekillenmedi. Miltefosin uygulanan grupta 8 fareden 2 (% 25)'sinde lezyonlarda tam bir iyileşme tespit edilirken, 2 (% 25)'sinde kısmi bir iyileşme gözlemlendi. Bunun yanı sıra bu guruptaki farelerden 4 (% 50)'ünde herhangi bir iyileşme kaydedilmedi. Pozitif kontrol grubundaki 8 hayvanda herhangi bir iyileşme belirtisi görülmedi (Şekil 20, Tablo 4).

Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde GO+FTU 15 sn grubu ve sadece FTU 15 sn grubunun pozitif kontrole göre farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p>0,05$), GO+MSA+FTU 15 sn grubunun pozitif kontrole göre farkı önemli bulundu ($p<0,05$). Aynı gruplar negatif kontrol ile karşılaştırıldığında GO+MSA+FTU 15 sn grubu ile arasındaki farkın önemsiz olduğu belirlendi ($p>0,05$).

Tablo 4. Tedavinin 5'inci gününde gruplardaki klinik değerlendirme verileri.

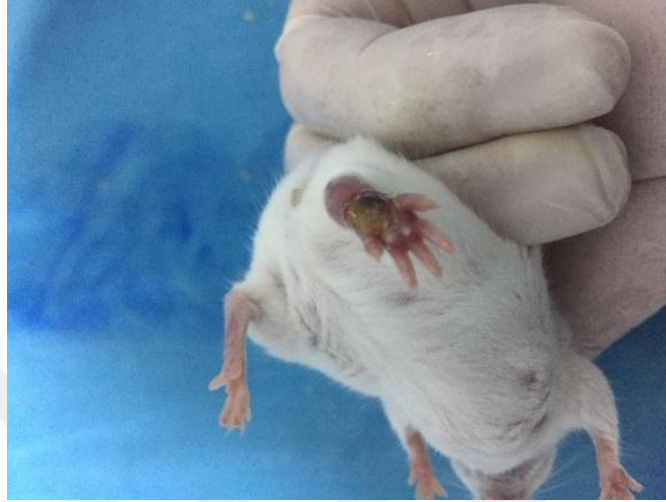
Gruplar	Tam İyileşme (eritem:0, ödem:0)	Kısmi İyileşme (eritem:1, ödem:1)	İyileşme Yok (eritem:2, ödem:2)
GO+FTU 15 sn	2 (%25)	2 (%25)	4 (%50)
GO+MSA FTU 15 sn	4 (%50)	2 (%25)	2 (%25)
FTU 15 sn	2 (%25)	2 (%25)	4 (%50)
Miltefosin	2 (%25)	2 (%25)	4 (%50)
PK	0	0	8 (%100)

GO: Grafen oksit, FTU: Fototermal uygulama, MSA: Makrofaj spesifik antikor, PK: Pozitif kontrol.



Şekil 20. 5 günlük tedavi sonrası lezyonların ve klinik derecelendirmenin görünümü GO+MSA FTU 15 sn (eritem:0, ödem:0) (A), miltefosin uygulaması (eritem:1, ödem:1) (B), pozitif kontrol (eritem:2, ödem:2) (C).

Yapılan gözlemler doğrultusunda 30 sn süre ile FTU gruplarının hemen hemen tamamında ileri derece yanık komplikasyonu geliştiği gözlemlendi. Yanık yaralarının durumundan dolayı 30 sn FTU grupları uygulamanın 5'inci gününde tedavi süreci sonlandırılarak bu gruplar deney grubundan çıkarıldı (Şekil 21).



Şekil 21. FTU 30 sn gruplarında oluşan yanık yaraları.

Miltefosin uygulanan grupta tedavinin 6'ncı gününde iyileşme belirtisi görülmeyen farelerden 1'i, 7'inci gününde ise yine iyileşme belirtisi görülmeyen farelerden 1'i ölmüştür. Bundan dolayı ilk ölümün gerçekleştiği 6'ncı gün itibariyle tedavi dozu yarıya indirilmiştir.

4.4.2.2. Tedavinin 10'uncu Günü Bulguları

GO+ FTU 15 sn grubu incelendiğinde 8 hayvandan 4 (% 50)'ünde tam bir iyileşme, 3 (% 37,5)'ünde kısmi bir iyileşme tespit edilirken 1 (% 12,5)'inde iyileşme saptanmadı. Gruptaki farelerin lezyonlu bölgeleri incelendiğinde 8 farede de ayak tabanlarında oluşan yüzeysel yanık yaralarının devam ettiği gözlemlendi. GO+MSA+ FTU 15 sn grubundaki 8 farenin 6 (% 75)'sında tam bir iyileşme kaydedildi. Bunun yanısıra bu grupta 2 (% 25) farede kısmi bir iyileşme tespit edildi (Şekil 22). Gruptaki farelerde 10 günlük tedavi sürecinde herhangi bir komplikasyona rastlanmadı. FTU 15 sn grubunun durumları incelendiğinde 8 hayvandan 4 (% 50)'ünde tam bir iyileşme, 3 (% 37,5)'ünde kısmi bir iyileşme tespit edilirken 1 (% 12,5)'inde iyileşme saptanmadı. Bu grupta da 10 günlük tedavi sürecinde herhangi bir komplikasyon şekillenmedi. Miltefosin uygulanan grupta 6 fareden 3 (% 50)'ünde lezyonlarda tam bir iyileşme tespit edilirken, 1 (%

16,6)'inde kısmi bir iyileşme gözlemlendi. Bunun yanı sıra bu gruptaki farelerden 2 (% 33,4)'sinde herhangi bir iyileşme kaydedilmedi. Pozitif kontrol grubundaki 8 hayvanda herhangi bir iyileşme belirtisi görülmedi (Şekil 22, Tablo 5).

Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde çalışmaya alınan bütün grupların pozitif kontrol ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0,05$). Gruplar arası farklar karşılaştırıldığında GO+MSA FTU 15 sn grubu ile diğer deney grupları arasındaki farkın 10 günlük tedavi sonrasında da önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

Tablo 5. Tedavinin 10'uncu gününde gruplardaki klinik değerlendirme verileri.

Gruplar	Tam İyileşme (eritem:0, ödem:0)	Kısmi İyileşme (eritem:1, ödem:1)	İyileşme Yok (eritem:2, ödem:2)
GO+FTU 15 sn	4 (%50)	3 (%37,5)	1 (%12,5)
GO+MSA FTU 15 sn	6 (%75)	2 (%25)	0
FTU 15 sn	4 (%50)	3 (%37,5)	1 (%12,5)
Miltefosin	3 (%50)	1 (%16,6)	2 (%33,4)
PK	0	0	8 (%100)

GO: Grafen oksit, FTU: Fototermal uygulama, MSA: Makrofaj spesifik antikor, PK: Pozitif kontrol.

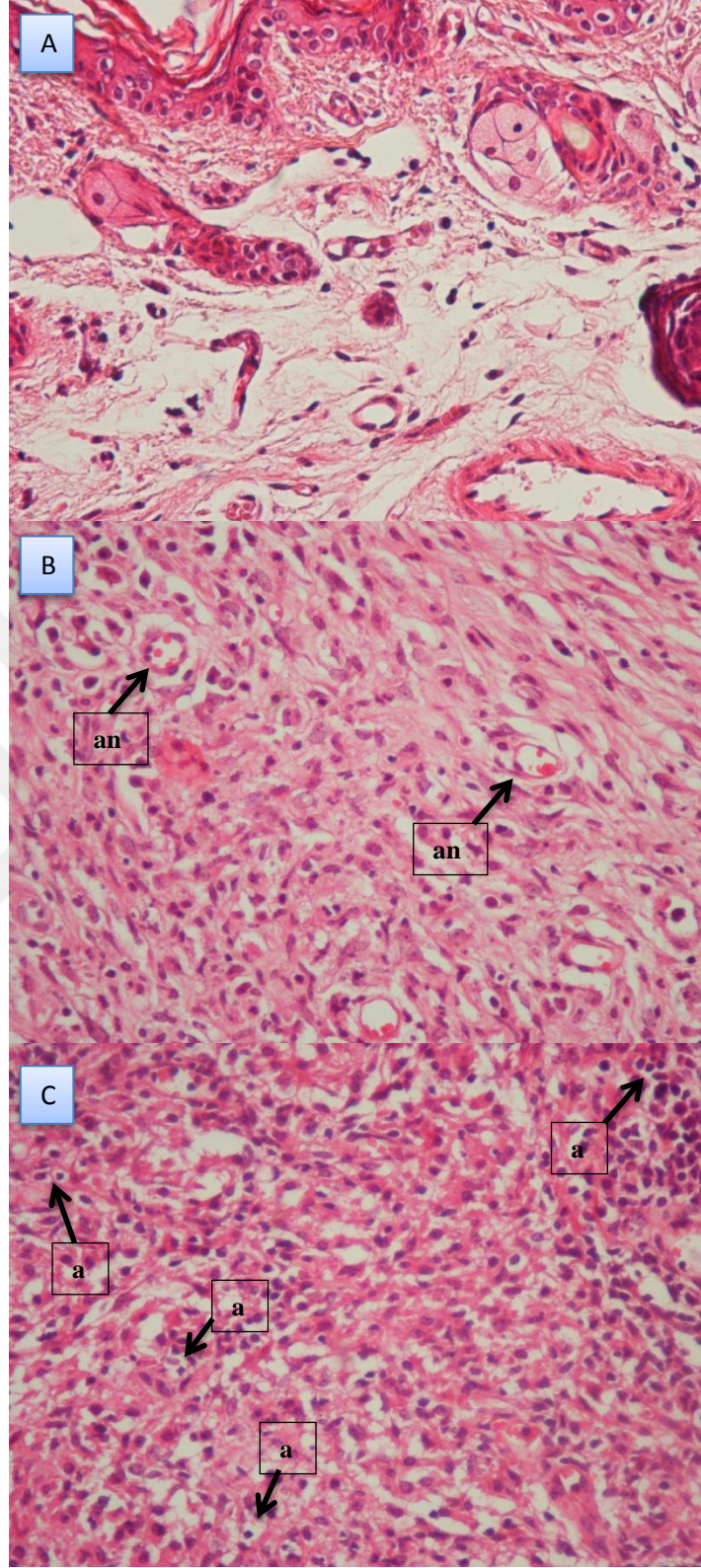


Şekil 22. 10 Günlük tedavi sonrası klinik görünüm A; GO+FTU 15 sn (kısmi iyileşme), B; GO+MSA FTU 15 sn (tam iyileşme), C; miltefosin grubu (iyileşme yok), D; pozitif kontrol (iyileşme yok).

4.4.2.2.1. Tedavinin 10'uncu Günü Bulguları Histopatolojik Değerlendirme

Yapılan histopatolojik değerlendirmede, hematoksilen & eosin boyama sonucunda preparatlarda enfeksiyonun şiddeti (0; yangı yok, 1: orta derecede yangı var, 2: şiddetli yangı var) derecelendirildi. Şekil 23.A.'da negatif kontrolde görülen histopatolojik görüntü, Şekil 23.B.'de GO+MSA FTU 15 sn grubundaki orta dereceli yangı tablosu ve anjiyogenezis, Şekil 23.C.'de ise pozitif kontrolde görülen şiddetli enfeksiyon tablosu gösterilmiştir.

Histopatolojik değerlendirme sonucunda GO+FTU 15 sn grubu incelendiğinde, şiddetli derecede (2'inci derece) enfeksiyon varlığı tespit edildi. Yoğun lenfosit infiltrasyonuna ek olarak polimorf nükleuslu lökositlerin bölgede yoğun olduğu tespit edildi. 40X büyütmede preparatın en yoğun amastigot miktarı sayıldığında amastigot ortalaması 2 olarak tespit edildi. GO+MSA+FTU 15 sn grup verileri incelendiğinde, bölgede 1'inci derece yangı ile beraber yoğun bir polimorf nükleuslu lökosit infiltrasyonu tespit edildi. Yer yer görülen myofibroblastik hücreler ve anjiyogenezis yara iyileşmesinin başladığını ve devam ettiğini göstermektedir. Yapılan incelemede inflamatuvar reaksiyon devam ederken diğer taraftan yara iyileşmesi sürecinin de devam ettiği görüldü. 40X büyütmede preparatlarda amastigot tespit edilmedi. FTU 15 sn grubunda epitelioid histiyositlerin yoğun olduğu granülatöz bir enfeksiyon tespit edildi. Yoğun lenfosit infiltrasyonuna ek olarak polimorf nükleuslu lökositlerin bölgede oldukça fazla olduğu tespit edildi. 40X büyütmede preparatın en yoğun amastigot miktarı sayıldığında amastigot ortalaması 5 bulundu. Pozitif kontrolde şiddetli derecede (2'inci derece) enfeksiyon varlığı belirlendi. Lenfositlere ek olarak polimorf nükleuslu lökositlerin bölgede yoğun olduğu tespit edildi. Bu durum kronik enfeksiyon ile beraber aynı zamanda akut enfeksiyonun da devam ettiğinin bir göstergesi olarak kabul edildi. 40X büyütmede preparatın en yoğun amastigot miktarı sayıldığında amastigot ortalamasının >20 olduğu tespit edildi. Miltefosin uygulanan grupta pozitif kontrole benzer bir şekilde herhangi bir iyileşme belirtisine rastlanmadı. Dokuda orta derecede bir mikro apse formasyonu ve ileri derecede granülatöz enfeksiyon tespit edildi. 40X büyütmede preparatın en yoğun amastigot miktarı sayıldığında amastigot ortalamasının >20 olduğu görüldü (Tablo 6).



Şekil 23. Hematoksilen & eosin boyama A: negatif kontrol (enfeksiyon yok), B: GO+MSA FTU 15 sn (orta dereceli yangı), C: pozitif kontrol (şiddetli enfeksiyon) a: amastigot, an: anjiyogenezis (40X).

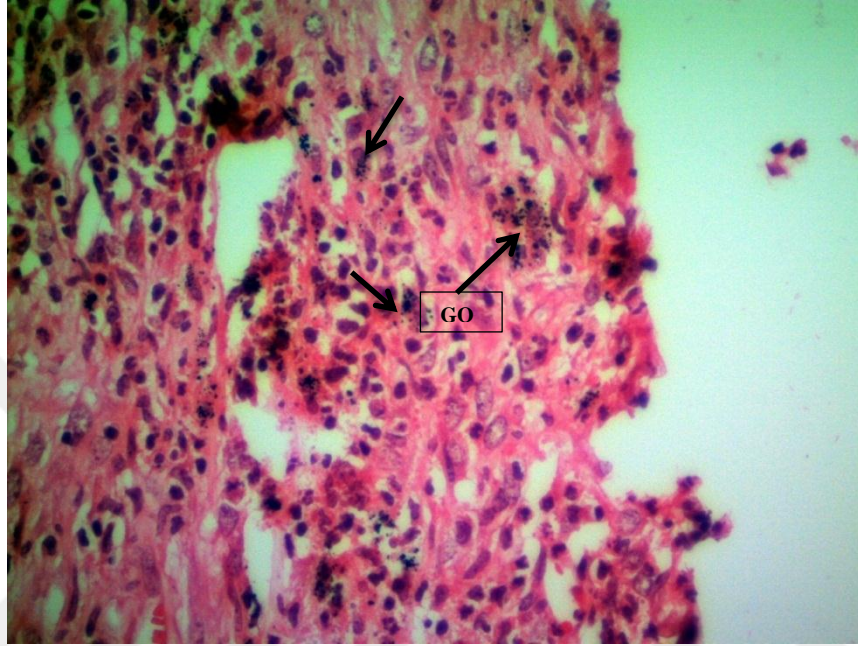
Enfeksiyon derecesi açısından veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde GO+MSA+FTU 15 sn grubu ile pozitif kontrol arasındaki fark önemli iken ($p<0,05$), pozitif kontrol ile negatif kontrol grubu dışındaki diğer deney grupları arasındaki fark önemsiz bulundu ($p>0,05$). Gruplar arası farklar karşılaştırıldığında GO+MSA+FTU 15 sn grubu ile diğer deney grupları arasındaki farkın 10 günlük tedavi sonrasında da önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Amastigot sayıları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde miltefosin ile pozitif kontrol arasındaki fark önemsiz iken ($p>0,05$), diğer deney gruplarının pozitif ve miltefosin uygulanan gruba göre aralarındaki farkın önemli olduğu görüldü ($p<0,05$). Gruplar arası veriler incelendiğinde GO+FTU 15 sn, GO+MSA+FTU 15 sn, FTU 15 sn deney grupları hem kendi aralarında hemde pozitif kontrol ve miltefosin uygulanan grup ile farklı bulundu ($p<0,05$).

Tablo 6. Histopatolojik değerlendirmede gruplardaki enfeksiyonun/yangının derecesi ve ortalama amastigot sayıları

Gruplar	Enfeksiyon/Yangi derecesi	Ortalama amastigot sayısı
GO+FTU 15 sn	2	2
GO+MSA+FTU 15 sn	1	0
FTU 15 sn	2	5
Miltefosin	2	>20
PK	2	>20

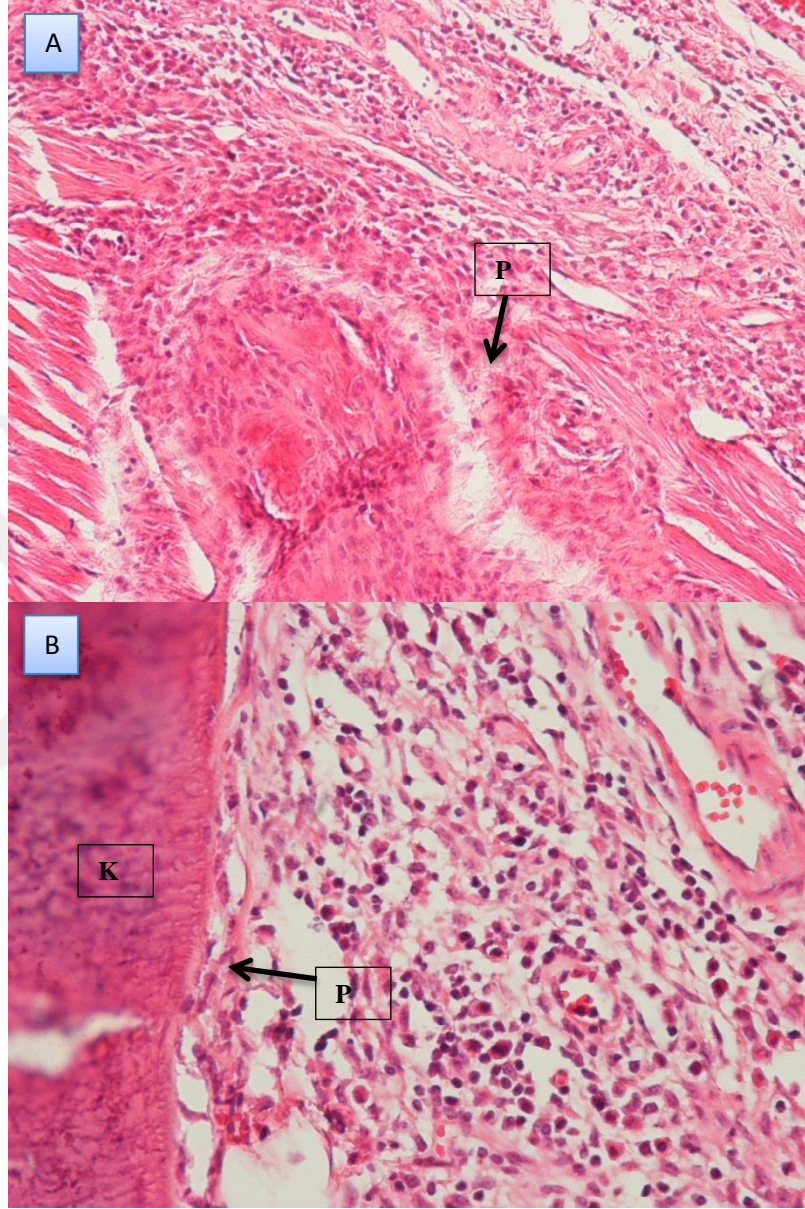
GO: Grafen oksit, FTU: Fototermal uygulama, MSA: Makrofaj spesifik antikor, PK: Pozitif kontrol.

Yapılan histopatolojik değerlendirme sonucu sadece GO+MSA+ FTU 15 sn grubunda GO nanopartiküllerine rastlanmıştır. Yapılan incelemede GO nanopartiküllerinin MSA sayesinde makrofajlara taşınmakla kalmayıp büyük bir kısmının makrofajlar tarafından fagosite edildikleri ve hücre sitoplazmasında da yoğunlaştığı tespit edilmiştir (şekil 24).



şekil 24. Histopatolojik değerlendirmede GO+MSA FTU 15 sn grubunda makrofajlar yakınında ve içinde görülen GO nanopartikülleri (40X).

Yapılan histopatolojik incelemelerde GO+15sn FTU, GO+MSA+FTU 15 sn, FTU 15 sn gruplarında ve miltefosin uygulanan grupta yukarıdaki bulgulara ek olarak ilginç bir şekilde periostitis tablosu tespit edildi (Şekil 26).



Şekil 26. Histopatolojik değerlendirmede GO+MSA FTU 15 sn grubunda tespit edilen periostitis tablosu , K: kemik dokusu, P: periost A:10X, B:40X.

4.4.2.2.2. Tedavinin 10'uncu Günü Bulguları İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ ile boyama sonucunda preparatlarda sitokin varlığı (+; hafif sitokin var, ++: orta derecede sitokin var, +++: yoğun sitokin var) derecelendirildi. Şekil 27.A.'da GO+MSA FTU 15 sn grubundaki hafif TNF- α varlığı, Şekil 27.B.'de GO+MSA FTU 15 sn grubundaki orta dereceli IL-6 varlığı, Şekil 27.C.'de ise pozitif kontrolde görülen yoğun sitokin varlığı gösterilmiştir. Derecelendirme, hücre sitoplazmasındaki boyanın şiddetine göre yapılmıştır (Şekil 27).

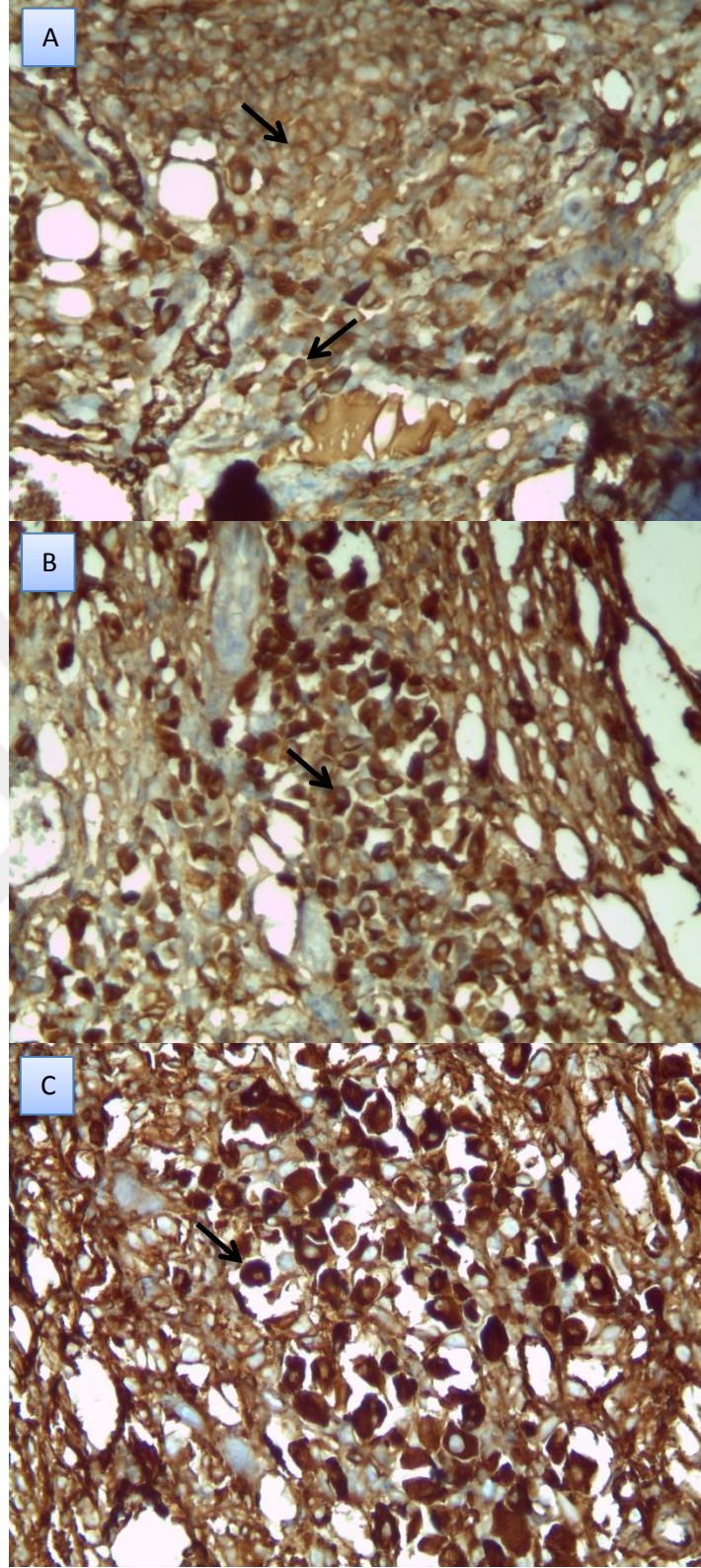
İmmünohistokimyasal değerlendirme sonucunda pozitif kontrol ve miltefosin uygulanan grupta TNF- α ve IFN- γ 'nın yoğun, IL-1 ve IL-6'nın orta şiddette olduğu tespit edildi. Diğer gruplar incelendiğinde GO+FTU 15 sn grubunda yoğun bir TNF- α ve IL-1 tespit edilirken, orta dereceli bir IL-6 ve IFN- γ varlığı tespit edildi. GO+MSA FTU 15 sn grup verileri incelendiğinde TNF- α , IL-1, IL-6 varlığının hafif, IFN- γ varlığının ise orta derecede olduğu görüldü. FTU 15 sn grubunda yoğun bir TNF- α , orta dereceli IL-1 ve IL-6, ve hafif bir IFN- γ varlığı tespit edildi (Tablo 4).

Tablo 7. İmmünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre sitokinlerin durumu.

Gruplar	TNF- α	IL-1	IL-6	IFN- γ
GO+FTU 15 sn	+++	+++	++	++
GO+MSA FTU15sn	+	+	+	++
FT+FTU 15 sn	+++	++	++	+
Miltefosin	+++	++	++	+++
Pozitif kontrol	+++	++	++	+++

+: hafif sitokin varlığı, ++: orta derece sitokin varlığı, +++: yoğun sitokin varlığı

İmmünohistokimyasal veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde GO+MSA+FTU 15 sn grubu ile pozitif kontrol arasındaki fark önemli iken ($p<0,05$), pozitif kontrol ile diğer deney grupları arasındaki fark önemsiz bulundu ($p>0,05$). Gruplar arası farklar karşılaştırıldığında GO+MSA+FTU 15 sn grubu ile diğer deney grupları arasındaki farkın 10 günlük tedavi sonrasında da önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$).



Şekil 27. İmmünohistokimyasal derecelendirme. A: GO+MSA FTU 15 sn grubundaki hafif derecede TNF- α varlığı (+), B: GO+MSA FTU 15 sn orta dereceli IL-6 varlığı (++) , C: pozitif kontrol yoğun IFN- γ varlığı (+++).

5. TARTIŞMA SONUÇ

Leyişmanyoz, *Leishmania* cinsine ait protozoon parazitlerin neden olduğu vektör aracılı bir hastalıktır. DSÖ'nün raporlarına göre, leyişmanyoz 98 ülkede endemiktir ve her yıl 350 milyondan fazla insan risk altındadır [13]. Ülkemizde son yıllarda özellikle KL vakalarının sayısında önemli bir artış görülmüştür. İnsanların endemik bölgelere seyahatlerinin çoğalması ve Suriye'den gelen göçmen sayısının artmasıyla ülkemizde endemik olmayan bölgelerde de KL görülmeye başlamıştır. Bu yönüyle leyişmanyoz artık endemik olmayan bölgeler için de önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır [15-19]. *Leishmania* parazitlerinin ilacına ve kum sineklerinin vektör kontrolünde kullanılan insektisitlere direnç geliştirmesi hastalığın tedavi şansını oldukça azaltmakta, birçok omurgalı hayvanın hastalık için rezervuar konak olması, iklim değişiklikleri endemik bölgelere seyahat ve göçler gibi nedenler ise hastalığın yaygınlığını artırmaktadır. Bu durumlar göz önüne alındığında araştırmacıların özellikle son yıllarda leyişmanyoz için yeni tedavi yaklaşımlarına ve aşı çalışmalarına yoğunlaştığı görülmektedir [7].

Leyişmanyozla karşı insanlara yönelik her hangi bir aşı geliştirilmediğinden kemoterapötikler ile sağaltım bu hastalık için birinci öncelik olma özelliğini korumaktadır. Leyişmanyoz için kullanılan yeni kemoterapötiklerin olmasına rağmen bunların birçoğu eski kemoterapötiklerden türetilenlerdir. Bunun yanı sıra intralezyonel ve sistemik antimon bileşikleri tedavide altın standart olma özelliğini korumaktadır [7]. DSÖ, KL için paramomisin pomat, intralezyonal pentavalan antimon uygulamaları, sistemik uygulanan antimon bileşikleri, miltefosin ve ketakanazol gibi kimyasalları tedavi amaçlı önermiştir. Günde iki kez 20 gün boyunca devam eden Paramomisinin topikal uygulamalarından intralezyonel uygulanan pentavalan antimon bileşikleri kadar iyi sonuçlar alındığını, *L. major* etkenli KL olgularında %15 paramomisin ve %0,5 gentamisinin kombine uygulamalarından yine plaseboya göre etkili sonuçlar alındığını belirtmiştir. İntralezyonal pentavalan antimon uygulamalarında lezyon büyüklüğüne göre günlük 0,5-5 mL, yaklaşık 1 ile 8 uygulama lezyonun kenarından ilacın infiltrasyonu önerilmiştir. Sistemik uygulanan antimon bileşikleri yan etkilerinden dolayı sadece kompleks ve çok merkezli lezyonlarda önerilmektedir. Kalp, karaciğer, pankreas, böbrek ve hematolojik hastalığı olanlarda, ileri yaşlarda toksisitesinden dolayı antimon bileşiklerinin sistemik kullanımları önerilmemektedir. Antimon bileşiklerinin sistemik uygulaması intravenöz veya intramuskuler yolla 20mg/kg/gün dozunda

uygulanabilir. Oral yolla uygulanan miltefosin ve flukanazolün *L. major* etkenli KL olgularında plaseboya göre olumlu etkilerinden bahsedilmiştir [13]. Literatürde KL ile ilgili birçok olgu sunumu ve deneysel araştırma bulunmaktadır. 375 KL vakası üzerine yapılan bir çalışmada tedavi amacıyla birinci gruba %15 lik paromomisin ve %0,5 lik gentamisin uygulanırken diğer gruba sadece %15'lik paromomisin pomat şeklinde lezyonlu bölgelere haricen uygulanmıştır. Tedaviye 20 gün devam edilmiş, hazırlanan pomatlar günde bir kez uygulanmış ve iyileşme süreci 42 gün sonra lezyonun büyüklüğü, 98 gün sonra reepitelizasyon, 168 gün sonra nükslerin varlığı şeklinde değerlendirilmiştir. Çalışmada gentamisin içeren ve gentamisin içermeyen %15'lik paromomisinin *L. major* kaynaklı KL üzerinde etkili bir kemoterapötik ajan olduğu ve tedavi amaçlı kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [72]. Amfoterisin B ile tedavi edilen iki farklı olgu sunumunun ilkinde 35 yaşında sol baldırında KL bulunan hastaya dermatoloji polikliniğinde intralezyonel meglümin antimonat tedavisine başlanmış hastada görülen aşırı reaksiyon sonucu sistemik olarak tedaviye devam edilmiştir. Bu uygulama da hasta şikayetleri ve ilacın yan etkileri dolayısıyla kesilmiştir. Bunun üzerine sistemik lipozomal amfoterisin B, 20 mg/kg/gün dozunda 20 gün süre ile hastaya uygulanmış ve 15 gün sonra yaranın hafif hiperpigmentasyon bırakarak iyileştiği görülmüştür [73]. İkinci olguda ise yedi yaşındaki erkek hastanın ağız bölgesinde KL tanısı konulmuş ve lipozomal amfoterisin B intravenöz olarak uygulanmıştır. Amfoterisin B hastaya beş gün süre ile gün aşırı uygulanmış 1'inci gün 3 mg/kg, 2'inci ve 3'üncü günler 4 mg/kg, 4'üncü ve 5'inci günler ise 5 mg/kg dozda toplamda 21 mg/kg dozda amfoterisin B uygulanmıştır. Yaklaşık altı ay sonra yara bölgesinde hafif bir skar dokusu bırakarak iyileşme kaydedilmiştir [74]. Vücudunda 143 adet mukozal tutulumlu KL olgusu bulunan 75 yaşındaki bir hastaya tedavi amaçlı meglümin antimonat ve miltefosin kombine bir şekilde sistemik olarak kullanılmış ancak tedavi sürecinde renal toksisite geliştirdiği gözlenmiş ve tedavi kesilerek pentamidin ile tedaviye devam edilmiştir. Pentamidin tedavisi sonucunda lezyonlar sistemik toksisite olmaksızın tamamen iyileştiği bildirilmiştir [75]. Aerts ve ark. nın 2015 yılında yayınlamış olduğu bir olguda yüzünde 2,5 cm çapında KL bulunan 6 yaşındaki kız çocuğunu antifungal etkisiyle bilinen flukanazol ile günde 3 mg/kg dozluk bir uygulama sonucu tedavi etmeyi başarmışlar ve yaklaşık 12 hafta sonra tamamen iyileştiğini gözlemlemişlerdir [76]. Flukanazolün KL üzerine etkisini ölçmeyi amaçlayan bir çalışmada 106 KL hastasına oral yolla 6 hafta boyunca günde 200 mg/kg dozunda flukanazol verilmiş ve etkisi plasebo verilen 103 KL hastası ile karşılaştırılmıştır. 3 ay

sonra flukanazol verilen grupta %79 oranında tam bir iyileşme tespit edilirken plasebo verilen grupta %34 oranında bir iyileşme tespit edilmiş ve 6 hafta oral flukanazolün *L. major* etkenli KL olgularında tedavi amaçlı kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [77]. Başka bir çalışmada ise miltefosinin topikal uygulama ile *L. major* etkenli KL üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırmada deneysel olarak BALB/c farelerde oluşturulan KL modelinde lezyon üzerine %6'lık miltefosin topikal olarak uygulanmış ve miltefosinin topikal uygulamaya elverişli olmadığı sonucuna varılmıştır [78]. BALB/c farelerde oluşturulan KL modeline östrojen modülatörü olarak bilinen ve meme kanseri olgularında sıklıkla kullanılan tamoksifen uygulanmıştır. Deney grupları %1'lik tamoksifen ve %1'lik tamoksifen +40 mg/kg pentavalan antimon şeklinde oluşturulmuştur. Tamoksifen yara bölgesine haricen uygulanırken pentavalan antimon bileşiği sistemik olarak uygulanmıştır. 20 gün uygulanan tedavi sonucunda tamoksifen ve pentavalan antimon bileşiğinin sinerjistik bir etki oluşturduğu, tamoksifenin pentavalan antimon bileşiğinin etkisini artırdığı sonucuna varılmıştır [79]. Diğer bir çalışmada yine topikal olarak kullanılan % 10 pentamidin isotiyonat ve % 10 usnik asit içeren pomat 50 mg/kg dozda ve deneysel olarak KL oluşturulmuş hamsterlara 10 gün süreyle uygulanmış ve hamsterlar 20 gün gözlem altında tutulmuştur. Çalışma sonucunda, hazırlanan pomatın KL iyileşmesinde önemli derecede etkili olduğu sonucuna varılmıştır [80].

Araştırmalardan anlaşılacağı üzere birçok araştırma ve olgu DSÖ önerilerine paralel olarak yapılmış çeşitli kimyasallar gerek kombine olarak gerekse yalın halde sistemik yada lokal olarak kullanılmış ve yara iyileşmesinde olumlu sonuçlar alınmıştır. Ancak çalışma verileri ayrıntılı olarak incelendiğinde birkaç olgu dışında tam bir iyileşme sağlanamamış hastalarda ya yara yerinde bir skar dokusu ya da sistemik bir toksisite ile tedavi son bulmuştur. Tedavi sürelerine dikkat çekilecek olur ise 20 gün ile 6 ay arasında değişen birbirinden çok farklı gözlem sürelerinin varlığı dikkati çekecektir.

Bizim çalışmamızda ise sistemik olarak herhangi bir kimyasal kullanılmamıştır. GO+MSA+15 sn yakın infrared uygulama ile 5 günlük bir tedavi sonucunda deney grubunun yarısında (%50) neredeyse tam bir iyileşme kaydedilmiştir. Klinik bulgular histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak ta desteklenmiştir.

KL tedavisinde kullanılan kimyasalların yan etkilerinin ve toksisitelerinin fazla oluşu bilinen bir gerçektir. Oral kullanılan miltefosin ve parenteral meglümin antimonatın karaciğer ve böbrek toksisitesi geliştirdiği görülmüştür [75]. KL tedavisinde kullanılan kimyasalların yan etkilerinin yanısıra edinilebilirliklerindeki güçlükler ve

maliyetlerinin yüksek oluşu araştırmacıları farklı tedavi yöntemlerini bulma çabasına itmiştir. Bu konuda ilk akla gelen gerek güvenilirlikleri gerekse kolay ulaşım ve düşük maliyetlerinden dolayı doğal kaynaklar olmuştur. Günümüzde anti-leyişmanyal aktivitesi araştırılmış birçok bitki ve onlardan izole edilen etken maddeler KL tedavisinde *in vitro* ve *in vivo* olarak denenmiştir. Konuyla ilgili literatürde birçok araştırma yer almaktadır. *Salvia cilicica* (adaçayı)'nın *L. major* üzerine etkisini araştıran bir çalışmada adaçayı kök ekstraktları içerisinde spektrometrik analizler sonucu bulunan triterpeneik asitlerin *L. major* promastigotlarına orta dereceli etki gösterirken amastigot formlarına güçlü anti-leyişmanyal etki gösterdiği *in vitro* olarak tespit edilmiştir [49]. *Carissa edulis* kök ekstraktlarının *L. major* promastigot ve amastigot formları üzerinde anti-leyişmanyal etkisi *in vitro* olarak test edildiği bir çalışmada. *C. edulis*'in eter ekstraktının *L. major*'ün her iki formu üzerine de güçlü bir anti-leyişmanyal aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Ekstraktın minimum inhibisyon konsantrasyonu 625 µg/ml olarak bulunmuştur [81]. Pakistanda yapılan başka bir araştırmada *Phyllanthus amarus* yaprak ve *P.muellerianus* kök metanol ekstraktlarının *L. major* promastigotları üzerine anti-leyişmanyal aktivitesi *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucu incelendiğinde *P. amarus* yaprak metanol ektratlarının anti-leyişmanyal etkisi tespit edilirken (İK₅₀;78,27 µg/ml) *P. muellerianus* kök metanol ekstraktlarının *L. major* promastigotları üzerinde herhangi bir etkisi görülmemiştir [82].

BALB/c farelerde oluşturulan *L. major* etkenli KL olguları üzerinde *Allium sativum* L. (sarımsak) ekstraktının etkisini ölçmeyi amaçlayan bir çalışmada farelerde KL oluşturulduktan 30 gün sonra tedavi denenmiş deney gruplarından ilkinde 20 mg/kg dozda sarımsak ekstraktı intraperitoneal verilmiş, ikinci deney grubuna 60 mg/kg dozda derialtı yolla glukantim uygulanmış, üçüncü deney grubuna ise bahsedilen dozlarda sarımsak ekstraktı ve glukantim kombine olarak uygulanmış ve kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda, sarımsak ekstraktının glukantim ile kombinasyonundan olumlu sonuçlar alınmış ve sarımsağın immünomodülatör özelliğinden dolayı glukantim tedavisini desteklediği düşünülmüştür [47]. *In vivo* bir çalışmada *Physalis angulata* L. (fener otu) ekstraktı BALB/c farelerin kulağında oluşturulan *L. amazonensis* etkenli KL olgularında pomat şeklinde uygulanmış ve tedavi etkisi amfoterisin B ile karşılaştırılmıştır. Tedaviye 5 hafta devam edilmiş tedavi sonunda lezyonlar klinik görünüm ve histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Aynı çalışmada *P. angulata*'nın *L. major* üzerine etkisi *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda *P. Angulata*'nın KL üzerinde güçlü bir tedavi edici etkisinin olduğu

ve bu bitkiden yararlanılarak KL için alternatif kemoterapötikler bulunabileceği yazarlar tarafından belirtilmiştir [83]. Bu çalışmalara ek olarak *Kalanchoe pinnata*, *Plumbago scandens*, *Piper aduncum*, *Peschiera australis*, *Phyllanthus amarus* ve son zamanlarda sıtma tedavisindeki etkisinden dolayı oldukça sık bahsedilen *Artemisia annua* bitkilerinin KL ve VL üzerine anti-leyişmanyal etkisi yapılan birçok çalışma ile ortaya konmuştur [84].

Son zamanlarda teknolojinin birçok alanında olduğu gibi tıp alanında da adından sıkça söz ettiren bilim dalı “Nanoteknoloji” dir. Özellikle çeşitli patojenik ve genetik hastalıkların teşhis ve tanısında, tümör hücrelerinin erken tespitinde nanopartiküllerin optik, floresan ve manyetik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Terapötik kullanım amaçlı nanomateryallerin geliştirilmesi özellikle son on yılda tedavi aracı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Leyişmanyoz tedavisi için de yeni bir tedavi yaklaşımı olarak karşımıza çıkan nanoformülasyonların sayısı da gün geçtikçe artmaktadır. Tedavi amaçlı kullanılan nanoformülasyonların büyük bir kısmı tıbbi bitkilerden elde edilen bileşiklerdir ve genellikle VL etkenleri ile çalışılmıştır.

Yapılan bir çalışmada 20 nm büyüklükteki ZnO nanopartiküllerinin RPMI 1640 besiyerinde üretilen *L. major* promastigotları üzerindeki etkileri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Çalışmada *L. major* promastigotları ZnO nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve çalışma 24, 48 ve 72’inci saatlerde değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda etkinin doza ve süreye bağlı olarak değiştiği 30 µg/ml lik konsantrasyonda ve 24 saat sonunda minimum, 30 µg/ml lik konsantrasyonda ve 72 saat sonra maksimum ölüm oranını gösterdiği yazarlar tarafından belirtilmiştir. *L. major* amastigot formları ile yapılan analizde enfekte makrofaj kültürü kullanılmış ve amastigot sayılarının promastigotlarla yapılan analize benzer bir şekilde kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Çalışma verileri değerlendirildiğinde ZnO nanopartiküllerinin *L. major* amastigot ve promastigot formlarında apoptozu indükleyebileceği, ZnO nanopartikülün etki mekanizmasının araştırılması gerektiği vurgulanmıştır [85]. Başka bir çalışmada meglümin antimonat ile yüklenmiş polimerik nanopartiküller deneysel olarak KL ve VL modeli oluşturulan hayvanlara uygulanmıştır. Çalışmanın temel amacı, meglümin antimonat ile yüklenmiş polimerik nanopartiküllerin enfekte dokuda yoğunlaşmasını ve bu sayede meglümin antimonatın tedavi dozunu azaltmak olarak belirlenmiştir. Meglümin antimonat ile yüklenen, ortalama 150 nm büyüklükteki polimerik nanopartiküller sistemik olarak leyişmanyozlu farelere verilmiştir. Anestezi altında sakrifiye edilen farelerin

organlarındaki nanopartikül miktarları araştırılmıştır. Deney sonucunda VL'li hayvanların dalak ve karaciğer dokularındaki nanopartikül oranlarının diğer gruplara göre oldukça yüksek bulunmasına rağmen KL hayvanlarda önemli bir veriye rastlanmadığı yazarlar tarafından bildirilmiştir. Yazarlar ayrıca bu formülasyonun KL için topikal olarak geliştirilmesi gerektiğinden bahsetmişlerdir [86]. *L. tropica* amastigot ve promastigot formları üzerine 2016 yılında yapılan bir diğer çalışmada titanyum dioksit ve gümüş nanopartikülleri (TiAgNPs, 90 nm) ile *Nigella sativa* (çörekotu) yağı kombinasyonunun *in vitro* anti-leyişmanyal etkileri araştırılmıştır. Araştırmada kullanılan dozlar için toksisite testi yapılarak toksik olmayan dozlar kullanılmıştır. Araştırma sonucu TiAgNPs ile *Nigella sativa* yağının kombine kullanımı, maddelerin tek başına kullanılmalarının aksine toksisitelerini en düşük seviyeye indirgeyerek anti-leyişmanyal aktivitelerini artırdıklarını göstermiştir. Yazarlar ayrıca araştırma bulgularının *in vivo* olarak desteklenmesi gerektiğini vurgulamış ve araştırmacıları konuyla ilgili çalışmalara yönlendirmiştir [87]. Titanyum dioksit (TiO₂NPs, 10-25 nm), çinko oksit (ZnONPs, 10-30 nm), magnezyum oksit (MgONPs, 30-40 nm), gümüş (AgNPs, 20-30 nm), altın (AuNPs, 20-30 nm) nanopartiküllerinin *in vitro* olarak *L. major* üzerindeki anti-leyişmanyal etkilerini araştırmayı amaçlayan bir çalışmada adı geçen nanopartiküllerin etkileri *L. major* amastigot ve promastigot formları üzerinde incelenmiştir. Araştırmada nanopartiküllerin promastigotlar üzerinde güçlü bir toksisiteye sahip oldukları ancak aynı toksisitenin makrofajlara karşı da olduğu yazarlar tarafından belirtilmiştir. Nanopartiküllerin farklı toksisite mekanizmalarına dayanarak tüm nanopartiküllerin promastigotların yanı sıra makrofaj membranı, çeşitli enzimler, hücre nükleik asitleri gibi birçok yapıya zarar verdikleri tartışılmıştır. Bu veriler nanopartiküllerin spesifik bir hedefi olmadığı anlamına gelmektedir. Bu nanopartiküllerin *L. major* üzerinde yüksek anti-leyişmanyal aktiviteye sahip olmalarına, hücrelerin çoğalması ve enfeksiyon indeksini düşürme gibi özelliklere sahip olmalarına rağmen yüksek toksisitelerinden dolayı sistemik tedavilerde kullanılmaması gerektiği vurgulanmıştır. Bu nanopartiküllerin sistemik ya da lokal olarak kullanılabilmesi için mutlaka nanopartikülü spesifik hedeflere taşıyacak lektin veya antikor gibi taşıyıcı bir molekül bağlanması gerektiği önerilmiştir [88].

Bizim tedavi protokolümüzde MSA ile modifiye edilen GO nanopartikülleri lokal olarak kullanılmış, sistemik olarak herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. Yapılan literatür taramalarında 5 gün gibi kısa bir sürede KL'e yanıt verebilen herhangi bir tedavi metoduna rastlanmamıştır. KL lezyonlarının 5 gün gibi kısa bir sürede

gerilemesinin MSA ile modifiye edilen GO nanopartiküllerinin hedef hücrelere taşınmasından ve uygulanan fototermal terapinin direk makrofaj ve içindeki amastigotlara etkili olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Tedavi metodumuzda, sentezlenen GO+MSA intralezyonel olarak tek bir enjeksiyonu yeterli olmuş ve tedavi yakın infrared ışına şeklinde fototermal terapi ile desteklenmiştir. Bu yöntem diğer tedavi yöntemlerine göre uygulaması kolay ve ekonomik bir tedavi şeklidir.

Çalışmamızda, nanopartiküllerin toksik etkilerinin parazite özgü olmadığı, vücuttaki diğer hücre, enzim ve nükleik asitleri de etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu sebeptendir ki çalışmamızda kullanılan GO nanopartiküllerine MSA bağlanarak nanopartikülün hedefinde yoğunlaşması sağlanmıştır. Yapılan literatür taramalarında GO nanopartikülleri ile KL tedavisi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda GO kullanmamız tamamıyla GO'in yapısal ve fonksiyonel özellikleriyle alakalıdır. Bu özelliklerden bazılarına değinilecek olursak:

- ✓ Yapısında fonksiyonel oksijen grupları bulunmasıyla GO hidrofiliktir ve su içerisinde dağılıbilir.
- ✓ GO tabakalarının boyutları birkaç nm den mm ye kadar değişebilir. GO'in kimyasal kompozisyonu ve boyutlarının değişebilir olması bu malzemeyi biyoloji ve tıp alanlarında da kullanılabilir kılmıştır.
- ✓ GO yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupların çokluğu bu bölgelere çeşitli moleküller ve nanopartiküllerin bağlanabilmesine olanak sağlar.
- ✓ GO hücre zarından geçebilecek kadar küçük olduğundan ve hidrofilik yapısından dolayı hücre zarında tutunamaz. Dolayısıyla hücre içerisine girip fonksiyonel gruplarla reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturur. Hücre içine giren GO, ROS miktarında artışa o da sitotoksitenin artmasına neden olur.
- ✓ GO yüksek sıcaklık direncine sahiptir -75 ile +200 °C'de yapısal bir değişiklik gözlenmemektedir.
- ✓ Yüksek ısı iletkenliğine sahiptir (5000 W/Mk) şu anda bilinen en iyi ısı iletkenidir. Fototerapi yakın infrared ışığı dalga boyları ile sınırlı bir şekilde özellikle kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Yakın infrared ışık dokuların derinliklerine kadar girebilir. Televizyon uzaktan kumandası gibi pek çok cihazda kullanılabilir ve zararsızdır. GO, infrared ışımaya maruz kaldığında aniden ısı enerjisine dönüşür.

- ✓ GO güçlü bir antibakteriyeldir. Lu ve ark. nın 2012 yılında yapmış oldukları araştırmada hücre kültürleri kullanılarak GO'in yalnızca bakteriyel hücrelere etkili olduğunu ökaryotik hücrelere zarar vermediğini göstermişlerdir. Bunun sebebi olarak GO'in elektron iletim gücü gösterilmiştir. Prokaryotik hücreler de GO'in yarı geçirgen olan hücre zarı boyunca elektronları iletmeye, elektronların hücre DNA'sına erişerek onu yok etmesi antibakteriyel etki mekanizması olarak gösterilirken ökaryotik hücrelerin daha az geçirgen olan nükleus membranı sayesinde korunmakta olduğu belirtilmiştir [89].

Bu özelliklerinden dolayı çalışmamızda nanopartikül olarak GO tercih edilmiştir. Bunun yanı sıra GO moleküllerine MSA bağlanarak GO'in hedef hücrelerde lokalizasyonu sağlanmış, hücre içine girişi ve dolayısıyla sitotoksitesi en az seviyeye indirgenmiştir.

DSÖ raporunda termoterapiden, KL için bir tedavi yaklaşımı olarak söz edilmektedir. Lezyon bölgesinin lokal olarak günde bir veya iki kere 30 sn süre ile 50°C'ye kadar ısıtılması intralezyonel antimon bileşikleri kadar etkili olduğu belirtilmektedir. Bu uygulamada ikinci derece yanıkların oluşabileceği ve uygulamanın anestezi altında olabileceği komplikasyon ve dezavantaj olarak sunulmuştur [13]. Literatürde KL üzerine termoterapinin etkisinin incelendiği birçok *in vivo* çalışma bulunmaktadır. *L. tropica*'ya bağlı KL olguları üzerine termoterapinin etkinliğinin test edildiği çalışmaya, tek bir KL lezyonu bulunan 259 hasta dahil edilmiştir. Rastgele seçilen hastalardan 93 hasta intralezyonel sodyum stiboglukonat, 58 hasta intramuskuler sodyum stiboglukonat ve 108 hasta termoterapi uygulanmak üzere gruplanmıştır. Termoterapi bir kez 50°C ısıda ve 30 sn uygulanmıştır. Diğer gruplara ise intralezyonal sodyum stiboglukonat lezyon büyüklüğüne göre toplamda 5 enjeksiyon, 2-5 ml, 5-7 günde bir ve intramuskuler olarak günde 20 mg/kg 21 gün süre ile uygulanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre termoterapi alan grupta 100 gün sonra 108 hastanın 75(%69,4)'i reepitelizasyonu takiben tamamen iyileştiği kaydedilmiştir. İntralezyonel sodyum stiboglukonat uygulanan grupta 93 hastadan 70 (%75,3)'i ve intramuskuler sodyum stiboglukonat verilen gruptaki 58 hastadan 26 (%44,8)'sında iyileşme tespit edilmiştir. İntralezyonel sodyum stiboglukonat uygulanan grup ile termoterapi uygulanan grup arası istatistiksel olarak karşılaştırıldığında farkın önemsiz bulunduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucunda termoterapinin KL için etkili, iyi tolere edilebilir ve hızlı bir tedavi yöntemi olduğu ve antimon tedavisine alternatif bir tedavi olabileceği

yazarlar tarafından bildirilmiştir [90]. Yapılan bir diğer çalışmada 54 adet *L. major* etkenli KL olgusu üzerinde termoterapinin etkisi intravenöz 20 mg/kg/gün dozunda sodyum stiboglukonat etkisiyle karşılaştırılmıştır. Termoterapi 50°C ısıda ve 30 sn uygulanmış ve hastalar 12 ay süresince takip edilmiştir. İki aylık bir sürede sodyum stiboglukonat uygulanan grupta %54 oranında, termoterapi uygulanan grupta ise %48 oranında bir iyileşme kaydedilmiştir. Araştırma sonucunda tedavi komplikasyonları olarak geri döndürülebilir karın ağrısı, pankreatit, artralji, miyalji, baş ağrısı, yorgunluk, hafif sitopenialar ve artmış transaminazlar sodyum stiboglukonat ile tedavi edilen hasta gruplarında daha sık görülürken, kabarcıklanma, sızıntı ve eritem gibi lokal komplikasyonlar termoterapi alan hasta grubunda tespit edilmiştir. İyileşme oranının termoterapi alan hastalarla, sodyum stiboglukonat alan hastalar arasında anlamlı bir farkın olmadığı ve bunun yanı sıra, sistemik toksisitenin sodyum stiboglukonat alan hastalarda daha fazla olması sebebiyle termoterapinin tercih sebebi olabileceği yazarlar tarafından bildirilmiştir [91]. Kolombiya’da yapılan bir çalışmada termoterapi ile kas içi uygulanan meglümin antimonatın etkisi karşılaştırılmıştır. Termoterapi 50°C ısıda ve 30 sn/gün dozunda uygulanırken, meglümin antimonat 20 mg/kg/gün dozunda uygulanmış ve tedaviye 20 gün devam edilmiştir. Araştırma bulgularına göre, termoterapi alan grubun tedavi oranı 149 hastadan 86 (%58) iken meglümin antimonat verilen grupta tedavi oranı 143 hastada 103 (%72) olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, meglümin antimonatın tedavi oranı termoterapiden daha yüksek bulunmasına rağmen yan etkilerinin çok fazla olduğu belirtilmiştir. Artan maliyetler, tedaviye uyum sorunu ve toksisiteleri hesaba katıldığında termoterapinin KL için akla gelmesi gereken ilk tedavi yöntemi olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir [92]. Yapılan başka bir çalışmaya Darul Aman’da bulunan Ulusal Malarya ve *Leishmania* Kontrol Merkezi *Leishmania* kliniğine gelen tek lezyonlu 388 hasta alınmıştır. Hastalar iki gruba ayrılmıştır. Birinci gruba 2-7 mL intralezyonel glukantim enjeksiyonu, 5 gün süreyle uygulanırken ikinci gruba bir kez olmak üzere termoterapi 50°C ısıda ve 30 sn uygulanmıştır. İki tedavi grubu da 6 ay süre ile takip edilmiştir. Çalışma bulguları termoterapi alan grubun iyileşme oranının %82,5, intralezyonel glukantim tedavisi alan grubun iyileşme oranının %74 olduğunu göstermektedir. Çalışma sonucunda, termoterapinin intralezyonel glukantim uygulamasına göre daha ekonomik, tedavi süresinin daha kısa ve daha az yan etkili bir tedavi şekli olduğu ve yukarıda belirtilen diğer çalışmalara paralel olarak termoterapinin KL tedavisinde tercih edilmesi gerektiği yazarlar tarafından belirtilmiştir [93].

Yapılan çalışmamızda 4-8 haftalık BALB/c ırkı farelerin ayak tabanlarında oluşturulan *L. major* etkenli KL üzerine MSA bağlı GO nanopartikülleri ile fototermaal terapinin etkisini ölçmek amaçlanmıştır. Fototerapi yakın infrared ışına şeklinde ve 808 nm dalga boyunda 15 sn ve 30 sn süre ile gerçekleştirilmiştir. Araştırma bulgularında 30 sn fototermaal terapi uygulanan gruplarda yanık yaraları olduğundan tedavi 5'inci gün sonunda durdurulmuştur. Benzer komplikasyon yüzeysel yanık yaraları şeklinde olmak üzere GO+FTU 15 sn grubunda da gözlenmiştir. Bunun yanı sıra GO+MSA FTU 15 sn grubunda klinik olarak herhangi bir komplikasyona rastlanmamış tedavinin 10'uncu gününde gruptaki bütün hayvanlarda ileri düzeyde bir iyileşme klinik olarak tespit edilmiştir. Deney grupları histopatolojik olarak değerlendirildiğinde GO+MSA FTU 15 sn grubunda 1'inci derece yangı ile beraber yoğun bir polimorf nükleuslu lökosit infiltrasyonu tespit edilirken, incelenen preparatlarda amastigot tespit edilememiştir. Ayrıca yer yer görülen myofibroblastik hücreler ve anjiyogenezis yara iyileşmesinin başladığını ve devam ettiğini göstermektedir. İmmünohistokimyasal değerlendirmede ise aynı grupta preinflamatuvar sitokinlerden olan TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ 'nın diğer gruplara göre önemli derecede azalması, iyileşme sürecini destekler niteliktedir. Histopatolojik kesitlerde GO+FTU 15sn, GO+MSA FTU 15 sn, FTU 15 sn gruplarında ve miltefosin uygulanan grupta yukarıdaki bulgulara ek olarak ilginç bir şekilde periostitis tablosu tespit edilmiştir. Diğer grupların histopatolojik kesitlerinde kemik dokusuna rastlanmadığından periostitis tablosu değerlendirilememiştir. KL'de periostitis tablosu sık karşılaşılan bir bulgu değildir ve bu enfeksiyonun sonraki adımı osteomyelitistir. Bu durumun *Leishmania* suşunun patojenitesiyle alakalı olduğu düşünülmektedir. Dünya'da KL'in osteomyelit tablosu oluşturabildiği konusunda bu güne kadar bildirilmiş sadece birkaç çalışma vardır. Bu çalışmalarda *L. amazonensis* elkenli KL olgularında osteomyelit tablosu radyografi, sintigrafi ve histopatolojik olarak gösterilmiştir [94, 95].

GO'in ileri derecede ısı iletimi dolayısıyla yanık yaralarının oluştuğu bilinmektedir. Bizim çalışmamızda GO nanopartikülüne MSA bağlayarak sentezlediğimiz molekülün antikorlar aracılığıyla derialtında yoğunlaşmayıp GO'in hedefine taşınmasını sağlanmıştır. GO'in MSA sayesinde hedef hücreye taşınmasının yanı sıra GO+MSA'un aynı zamanda makrofajlar tarafından fagosite edildiğini histopatolojik kesitlerde tespit edilmiştir. Bu durumda hedef hücrelerin direkt olarak GO nanopartikülleri sayesinde ısıtılmasını ve makrofajın içindeki amastigotlarla birlikte öldürülmesi gerçekleştirilmiştir. Oysaki MSA bağlanmayan grupta taşıyıcı bir molekül

olmadığından GO enjeksiyon bölgesinde yoğunlaşmış ve fototermal terapinin etkisiyle yüzeysel yanıklar oluşmuştur. Bu çalışma, GO'te MSA bağlanarak nanopartikülün makrofaj yüzeyine tutunmasını ve fototerapi ile enfekte makrofajların ve içlerindeki amastigotların öldürülmesini sağlayan ve 5 gün gibi kısa sürede tedaviye yanıt alınabilen dünya literatüründeki ilk çalışmadır. Çalışmamızda uyguladığımız KL tedavi protokolü etkili, kısa süreli ve kolay uygulanabilir bir tedavi yöntemidir.



6. KAYNAKLAR

- [1]. Garcia, L.S. (2006). Diagnostic Medical Parasitology. (5. Edition). American Society for Microbiology Press. Washington DC. 191-205.
- [2]. Saygı, G. (1998). Temel Tıbbi Parazitoloji. (2. Baskı). Dizgi Baskı. Sivas. 58-67
- [3]. Özbel, Y., Özensoy, T.S. (2007). Tıbbi Parazit Hastalıkları. Meta Basım Matbaacılık, İzmir. 197-240
- [4]. Besteiro, S., Williams, R.A.M., Coombs, G.H., Mottram, J.C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*. 37:1063-75.
- [5]. Mondragon-Shem, K., Acosta-Serrano, A. (2016). Cutaneous leishmaniasis: the truth about the ‘flesh-eating disease’ in Syria. *Trends in Parasitology*. 32:432-5.
- [6]. Mehlhorn, H. (2008). Encyclopedia of parasitology. (3. Edition) AM: Springer Science & Business Media. 698.
- [7]. Kumar, A. (2013). *Leishmania* and Leishmaniasis. (1. Edition). Springer. 29-33
- [8]. Lerner, E., Ribeiro, J., Nelson, R.J., Lerner, M. (1991). Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Biological Chemistry*. 266:11234-6.
- [9]. de Carvalho, P.B., Ferreira, E.I. (2001). Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia*. 72:599-618.
- [10]. Desjeux, P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 95:239-43.
- [11]. WHO. (2017). Leishmaniasis. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
- [12]. Daldal, N. (2007). Tıbbi Parazit Hastalıkları: Meta Basım Matbaacılık, İzmir; 817-9
- [13]. WHO. (2010). Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series. 949:xii.
- [14]. Gürel, M.S., Yeşilova, Y., Ölgen, M.K., Özbel, Y. (2012). Türkiye’de kutanöz leishmaniasisin durumu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 36:121-9.
- [15]. Korkmaz, S., Özgöztaşı, O., Kayıran, N. (2015). Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi leishmaniasis tanı ve tedavi merkezine başvuran kutanöz leishmaniasis olgularının değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 39:13-16.

- [16]. İnci, R., Öztürk, P., Mülayim, M.K., Özyurt, K., Alataş, E.T., İnci, M.F. (2015). Effect of the Syrian civil war on prevalence of cutaneous leishmaniasis in southeastern Anatolia, Turkey. *Medical science monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 21:2100-5
- [17]. Demirkan, S., Özlü, E., Yıldırım, M. (2015) An endemic region for cutaneous leishmaniasis: Birecik. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*. 6:510-3
- [18]. Salman, I., Vural, A., Unver, A., Saçar, S. (2014). Suriye iç savaşı sonrası Nizip'te kutanöz leishmanyoz olguları. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 48:106-113.
- [19]. Ser, Ö., Çetin, H. (2013). Kutanöz Leishmaniasis ve Antalya ilindeki durumu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 37:84-91.
- [20]. Atakan, E., Akbaba, M., Sütölk, Z., Alptekin, D., Demirhindi, H., Uludağ, S.K. (2010). Hocallı ve Turunçlu (Adana) köylerinde phlebotomus (Diptera; Psychodidae; Phlebotomine) türlerinin populasyon yoğunluğu ve kutanöz leishmaniasis ile ilişkisi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 34:106-111.
- [21]. Değer, S., Yaman, M. (2005). Van yöresi *Phlebotominae* (Diptera: Psychodidae) Türleri. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*. 16:55-9.
- [22]. Unat, E.K., Yücel, A., Altaş, K., Samastı, M. (1995). Unat'ın Tıp Parazitolojisi. *Baskı Cerr Tıp Fak Vakfi Yay*. 15:206-208.
- [23]. Wikipedia (2017). Lutzomyia. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Lutzomyia>.
- [24]. Handman, E., Jarvis, H. (1985). Nitrocellulose-based assays for the detection of glycolipids and other antigens: mechanism of binding to nitrocellulose. *Journal of Immunological Methods*. 83:113-23.
- [25]. Russell, D.G., Alexander, J. (1988). Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *The Journal of Immunology*. 140:1274-9.
- [26]. Amaral, V.F., Teva, A., Oliveira-Neto, M.P., Silva, A., Pereira, M.S., Cupolillo, E., Porrozzı, R., Coutinho, S.G., Pirmez, C., Beverley, S.M. (2002). Study of the safety, immunogenicity and efficacy of attenuated and killed *Leishmania major* vaccines in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of the human disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97:1041-8.
- [27]. Gicheru, M.M., Olobo, J.O., Anjili, C.O., Orag, o A.S., Modabber, F., Scott, P. (2001). Vervet monkeys vaccinated with killed *Leishmania major* parasites and

- interleukin-12 develop a type 1 immune response but are not protected against challenge infection. *Infection and Immunity*. 69:245-51.
- [28]. Garg, R., Dube, A. (2006). Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*. 123:439-42.
- [29]. Fragaki, K., Suffia, I., Ferrua, B., Rousseau, D., Le Fichoux, Y., Kubar, J. (2001). Immunisation with DNA encoding *Leishmania infantum* protein papLe22 decreases the frequency of parasitemic episodes in infected hamsters. *Vaccine*. 19:1701-9.
- [30]. Kamhawi, S. (2000). The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes and Infection*. 2:1765-73.
- [31]. Valenzuela, J.G., Belkaid, Y., Garfield, M.K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E.D., Sacks, D.L., Ribeiro, J.M. (2001). Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens. *Journal of Experimental Medicine*. 194:331-42.
- [32]. Yan, S., Li, F., Ding, K., Sun, H. (2003). Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony (III) and trypanothione. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 8:689-97.
- [33]. Handman, E., Ceredig, R., Mitchell, G.F. (1979). Murine cutaneous leishmaniasis: disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. *Immunology and Cell Biology*. 57:9-29.
- [34]. Scott, P. (2003). Development and regulation of cell-mediated immunity in experimental leishmaniasis. *Immunologic Research*. 27:489-98.
- [35]. Ehrenberg, J.P., Ault, S.K. (2005). Neglected diseases of neglected populations: thinking to reshape the determinants of health in Latin America and the Caribbean. *BMC Public Health*. 5:1-5.
- [36]. van Griensven, J., Diro, E. (2012). Visceral leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 26:309-22.
- [37]. Sinha, J., Mukhopadhyay, S., Das, N., Basu, M.K. (2000). Targeting of liposomal andrographolide to *L. donovani* infected macrophages in vivo. *Drug Delivery*. 7:209-13.

- [38]. Proulx, M.E., Désormeaux, A., Marquis, J.F., Olivier, M., Bergeron, M.G. (2001). Treatment of visceral leishmaniasis with sterically stabilized liposomes containing camptothecin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45:2623-7.
- [39]. Luz, P.P., Magalhães, L.G., Pereira, A.C., Cunha, W.R., Rodrigues, V., Silva, M.L.A. (2012). Curcumin-loaded into PLGA nanoparticles. *Parasitology Research*. 110:593-8.
- [40]. Lala, S., Gupta, S., Sahu, N.P., Mandal, D., Mondal, N.B., Moulik, S.P., Basu, M.K. (2006). Critical evaluation of the therapeutic potential of basic acid incorporated in oil-in-water microemulsions and poly-D, L-lactide nanoparticles against experimental leishmaniasis. *Journal of Drug Targeting*. 14:171-9.
- [41]. Lala, S., Pramanick, S., Mukhopadhyay, S., Bandyopadhyay, S., Basu, M.K. (2004). Harmine: evaluation of its antileishmanial properties in various vesicular delivery systems. *Journal of Drug Targeting*. 12:165-75.
- [42]. Veerareddy, P., Vobalaboina, V., Nahid, A. (2004). Formulation and evaluation of oil-in-water emulsions of piperine in visceral leishmaniasis. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 59:194-7.
- [43]. Georgopoulou, K., Smirlis, D., Bisti, S., Xingi, E., Skaltsounis, L., Soteriadou, K. (2007). In vitro activity of 10-deacetylbaocatin III against *Leishmania donovani* promastigotes and intracellular amastigotes. *Planta Medica*. 73:1081-8.
- [44]. Plock, A., Sokolowska-Köhler, W., Presber, W. (2001). Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania* Spp. *Experimental Parasitology*. 97:141-53.
- [45]. Hocquemiller, A.C., Fournet, A. (1998). Leishmanicidal and trypanocidal activities of acetogenins isolated from *Annona glauca*. *Phytotherapy Research*. 12:541-4.
- [46]. Jaramillo, M., Arango, G., Gonzalez, M., Robledo, S., Velez, I.D. (2000). Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*. 71:183-6.
- [47]. Ghazanfari, T., Hassan, Z., Ebtekar, M., Ahmadiani, A., Naderi, G., Azar, A. (2000). Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania major* infected BALB/c mice. *Scandinavian Journal of Immunology*. 52:491-5.
- [48]. Orhan, I., Sener, B., Atıcı, T., Brun, R., Perozzo, R., Tasdemir, D. (2006). Turkish freshwater and marine macrophyte extracts show *in vitro* antiprotozoal

- activity and inhibit FabI, a key enzyme of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis. *Phytomedicine*. 13:388-93.
- [49]. Tan, N., Kaloga, M., Radtke, O.A., Kiderlen, A.F., Öksüz, S., Ulubelen, A., Kolodziej, H. (2002). Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia cilicica* and their anti-leishmanial activities. *Phytochemistry*. 61:881-4.
- [50]. Vermelho, A.B., Supuran, C.T., Cardoso, V., Menezes, D., de Andrade Silva, J.R., Ferreira, J.L.P., Amaral, A.C.F., Rodrigues, I.A. (2014). Leishmaniasis: possible new strategies for treatment. In *Leishmaniasis Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*, D Claborn. 351-87.
- [51]. Raay, B., Medda, S., Mukhopadhyay, S., Basu, M.K. (1999). Targeting of piperine intercalated in mannose-coated liposomes in experimental leishmaniasis. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 36:248-51.
- [52]. Torres-Santos, E.C., Rodrigues, J.M., Moreira, D.L., Kaplan, M.A.C., Rossi-Bergmann, B. (1999). Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly (d, l-lactide) nanoparticles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43:1776-8.
- [53]. Sarkar, S., Mandal, S., Sinha, J., Mukhopadhyay, S., Das, N., Basu, M. (2002). Quercetin: critical evaluation as an anti-leishmanial agent in vivo in hamsters using different vesicular delivery modes. *Journal of Drug Targeting*. 10:573-8.
- [54]. Sinha, J., Raay, B., Das, N., Medda, S., Garai, S., Mahato, S., Basu, M. (2002). Bacopasaponin C: critical evaluation of anti-leishmanial properties in various delivery modes. *Drug Delivery*. 9:55-62.
- [55]. Lala, S., Nandy, A., Mahato, S., Basu, M. (2003). Delivery in vivo of 14-deoxy-11-oxoandrographolide, an antileishmanial agent, by different drug carriers. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 40:169-74.
- [56]. Tyagi, R., Lala, S., Verma, A.K., Nandy, A., Mahato, S.B., Maitra, A., Basu, M.K. (2005). Targeted delivery of arjunglucoside I using surface hydrophilic and hydrophobic nanocarriers to combat experimental leishmaniasis. *Journal of Drug Targeting*. 13:161-71.
- [57]. Roy, P., Das, S., Bera, T., Mondol, S., Mukherjee, A. (2010). Andrographolide nanoparticles in leishmaniasis: characterization and in vitro evaluations. *International Journal of Nanomedicine*. 5:1113-21.
- [58]. Van de Ven, H., Vermeersch, M., Matheussen, A., Vandervoort, J., Weyenberg, W., Apers, S., Cos, P., Maes, L., Ludwig, A. (2011). PLGA

- nanoparticles loaded with the antileishmanial saponin β -aescin: Factor influence study and in vitro efficacy evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 420:122-32.
- [59]. Das, S., Roy, P., Mondal, S., Bera, T., Mukherjee, A. (2013). One pot synthesis of gold nanoparticles and application in chemotherapy of wild and resistant type visceral leishmaniasis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 107:27-34.
- [60]. Adak, S., Datta, R. (2014). *Leishmania*. Current Biology and Control. (1. Edition) Caister Academic Press. 1-17.
- [61]. Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature*. 438:685-9.
- [62]. Ghosh, J., Bose, M., Roy, S., Bhattacharyya, S.N. (2013). *Leishmania donovani* targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. *Cell Host & Microbe*. 13:277-88.
- [63]. Lemaire, J., Mkannez, G., Guerfali, F.Z., Gustin, C., Attia, H., Sghaier, R.M., Dellagi, K., Laouini, D., Renard, P. (2013). Sysco-Consortium. miRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 7:2478-82.
- [64]. Ghosh, J., Lal, C., Pandey, K., Das, V., Das, P., Roychoudhury, K., Roy, S. (2011). Human visceral leishmaniasis: decrease in serum cholesterol as a function of splenic parasite load. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 105:267-71.
- [65]. Chakraborty, D., Banerjee, S., Sen, A., Banerjee, K.K., Das, P., Roy, S. (2005). *Leishmania donovani* affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. *The Journal of Immunology*. 175:3214-24.
- [66]. Banerjee, S., Ghosh, J., Sen, S., Guha, R., Dhar, R., Ghosh, M., Datta, S., Raychaudhury, B., Naskar, K., Haldar, A.K. (2009). Designing therapies against experimental visceral leishmaniasis by modulating the membrane fluidity of antigen-presenting cells. *Infection and Immunity*. 77:2330-42.
- [67]. Ghosh, J., Das, S., Guha, R., Ghosh, D., Naskar, K., Das, A., Roy, S. (2012). Hyperlipidemia offers protection against *Leishmania donovani* infection: role of membrane cholesterol. *Journal of Lipid Research*. 53:2560-72.

- [68]. Geim, A., Novoselov, K., Yazyev, O.V., Louie, S.G., Ghosh, S., Bao, W., Nika, D.L., Subrina, S., Pokatilov, E.P., Lau, C.N. (2007). Nobel Prize for graphene. *Nature Materials*. 6:183-92.
- [69]. Du, D., Wang, L., Shao, Y., Wang, J., Engelhard, M.H., Lin, Y. (2011). Functionalized graphene oxide as a nanocarrier in a multienzyme labeling amplification strategy for ultrasensitive electrochemical immunoassay of phosphorylated p53 (S392). *Analytical Chemistry*. 83:746-52.
- [70]. Hong, H., Yang, K., Zhang, Y., Engle, J.W., Feng, L., Yang, Y., Nayak, T.R., Goel, S., Bean, J., Theuer, C.P. (2012). In vivo targeting and imaging of tumor vasculature with radiolabeled, antibody-conjugated nanographene. *ACS Nano*. 6:2361-70.
- [71]. Jung, H.S., Kong, W.H., Sung, D.K., Lee, M.Y., Beack, S.E., Keum do, H., Kim, K.S., Yun, S.H., Hahn, S.K. (2014). Nanographene oxide-hyaluronic acid conjugate for photothermal ablation therapy of skin cancer. *ACS Nano*. 8:260-8.
- [72]. Ben Salah, A., Ben Messaoud, N., Guedri, E., Zaatour, A., Ben Alaya, N., Bettaieb, J., Gharbi, A., Belhadj Hamida, N., Boukthir, A., Chlif, S. (2013). Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*. 368:524-32.
- [73]. Yeşilova, Y., Turan, E., Altın, S. H., Aksoy, M., Özbilgin, A. (2015). Sistemik lipozomal amfoterisin B tedavisine cevap veren kutanöz leishmaniasis olgusu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 39:63-65.
- [74]. Islam, S. (2017). Rapidly progressing facial leishmaniasis: effective treatment with liposomal amphotericin B and a review of the management of Old World cutaneous leishmaniasis. *Paediatrics and International Child Health*.1-4.
- [75]. Velez, I. (2016). Meglumine-antimonate/miltefosine. *Reactions*. 1594:131-26.
- [76]. Aerts, O., Duchateau, N., Willemse, P., Lambert, J. (2015). Cutaneous Leishmaniasis: Treatment with low-dose oral fluconazole with an excellent cosmetic result. *Pediatric Dermatology*. 32:154-5.
- [77]. Alrajhi, A.A., Ibrahim, E.A., De Vol, E.B., Khairat, M., Faris, R.M., Maguire, J.H. (2002). Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *New England Journal of Medicine*. 346:891-5.
- [78]. Van Bocxlaer, K., Yardley, V., Murdan, S., Croft, S.L. (2016). Topical formulations of miltefosine for cutaneous leishmaniasis in a BALB/c mouse model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 68:862-72.

- [79]. Trinconi, C.T., Reimão, J.Q., Bonano, V.I., Espada, C.R., Miguel, D.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K., Uliana, S.R. (2017). Topical tamoxifen in the therapy of cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*. 1-7.
- [80]. Comandolli-Wyrepkowski, C.D., Grafova, I., Naiff, M.F., Avella, M., Gentile, G., Grafov, A., Franco, A.M.R. (2017). Topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) with formulations containing pentamidine. *Acta Amazonica*. 47:39-46.
- [81]. Njau, V.N., Maina, E.N., Anjili, C.O., Ingonga, J.M., Koech, J.C., Kariuki, H.W., Ngure, P.K. (2016). In vitro anti-leishmanial activity and phytochemical analysis of *Carissa edulis* against *Leishmania major*. *African Journal of Pharmacology and Therapeutics*. 5:253-62.
- [82]. Onocha, P., Ali, M. (2010). Anti-leishmaniasis, phytotoxicity and cytotoxicity of Nigerian Euphorbiaceous Plants 2: *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus muellerianus* extracts. *African Scientist*. 11:79-83.
- [83]. Guimarães, E.T., Lima, M.S., Santos, L.A., Ribeiro, I.M., Tomassini, T.B., dos Santos, R.R., dos Santos, W.L., Soares, M.B. (2009). Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 64:84-7.
- [84]. de Oliveira, L.F.G., Pereira, B.A.S., Gilbert, B., Corrêa, A.L., Rocha, L., Alves, C.R. (2017). Natural products and phytotherapy: an innovative perspective in leishmaniasis treatment. *Phytochemistry Reviews*. 16:219-33
- [85]. Delavari, M., Dalimi, A., Ghaffarifar, F., Sadraei, J. (2014). In vitro study on cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on promastigote and amastigote forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). *Iranian Journal of Parasitology*. 9:6-10.
- [86]. de Jesus Sousa-Batista, A., Cerqueira-Coutinho, C., do Carmo, F.S., de Souza Albernaz, M., Santos-Oliveira, R. (2017). Polycaprolactone antimony nanoparticles as drug delivery system for leishmaniasis. *American Journal of Therapeutics*.
- [87]. Abamor, E.S., Allahverdiyev, A.M. (2016). A nanotechnology based new approach for chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: TiO_2Ag nanoparticles *Nigella sativa* oil combinations. *Experimental Parasitology*. 166:150-63.
- [88]. Jebali, A., Kazemi, B. (2013). Nano-based anti-leishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. *Toxicology in Vitro*. 27:1896-904.

- [89]. Lu, B., Li, T., Zhao, H., Li, X., Gao, C., Zhang, S., Xie, E. (2012). Graphene-based composite materials beneficial to wound healing. *Nanoscale*. 4:2978-82.
- [90]. Reithinger, R., Mohsen, M., Wahid, M., Bismullah, M., Quinnell, R., Davies, C., Kolaczinski, J., David, J. (2005). Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan: a randomized, controlled trial. *Clinical Infectious Diseases*. 40:1148-55.
- [91]. Aronson, N.E., Wortmann, G.W., Byrne, W.R., Howard, R.S., Bernstein, W.B., Marovich, M.A., Polhemus, M.E., Yoon, I.K., Hummer, K.A., Gasser, J.R.A. (2010). A randomized controlled trial of local heat therapy versus intravenous sodium stibogluconate for the treatment of cutaneous *Leishmania major* infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 4:e628.
- [92]. López, L., Robayo, M., Vargas, M., Vélez, I.D. (2012). Thermotherapy. An alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Trials*. 13:58-62.
- [93]. Safi, N., Davis, G.D., Nadir, M., Hamid, H., Leon, R. (2012). Evaluation of thermotherapy for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: a randomized controlled trial. *Military Medicine*. 177:345-347.
- [94]. Costa, A.A.U.M.L., Saldanha, A.C.R., Leite, B.M.C., Ramos, B., Junior, I.A., Noronha, A.L.L., Báfica, A., Barral, A., Corbett, C.E.P., Costa, J.M.L. (2005). Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). *Acta Tropica*. 96:9-15.
- [95]. Saldanha, A., Malheiros, T., Rodrigues, C.C., Balby, I., Costa, J. (1995). Bone alterations observed in diffuse cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 28:55-58.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel bilgiler

Adı-Soyadı : Necati ÖZPINAR
Doğum Tarihi : 20.08.1975
Cinsiyeti : Bay
E-posta : necatiozpinar@gmail.com

Eğitim ve Öğretim

Lisans

Tarihler : 1994-2001
Kazanılan Yeterliliğin Adı : Veteriner Hekim
Eğitim Veren Kurumun Adı ve Türü : Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Yüksek Lisans

Tarihler : 2008-2011
Kazanılan Yeterliliğin Adı : Mikrobiyoloji Bilim Uzmanı
Eğitim Veren Kurumun Adı ve Türü : Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı

İş Denevimi

Tarihler : 2007- 2015
Meslek ve Konum : Uzm.Vet. Hekim Tahlil Uzmanı
İş Yerinin Adı ve Adresi : 3'üncü Ordu Gıda Kontrol Müfreze
Komutanlığı / Erzincan

Tarihler : 2015- Devam
Meslek ve Konum : Veteriner Hekim
İş Yerinin Adı ve Adresi : Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner
Fakültesi / Sivas

