

70550

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**LEISHMANIA ÖRNEKLERİNE AİT TOTAL DNA'LARININ
İZOLASYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE RESTRİKSİYON
ENDONÜKLEAZ PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ**

Bil. Uzm. Fuat DİLMEÇ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Ali MATUR

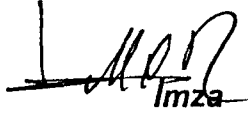
Bu tez Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
SBE 96-4 nolu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-1998

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

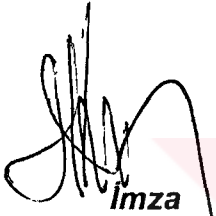
Doktora/~~Yüksek Lisans~~ Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan LEISHMANIA ÖRNEKLERİNE AIT TOTAL DNA'LARININ İZOLASYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/~~Yüksek Lisans~~ tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: ..25/06/1998..


İmza

Ünvanı, Adı ve soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ali Martur


İmza

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

Prof. Dr. Halil Kasapoğlu


İmza

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi

Doc. Dr. Yusuf ÖZBİL

İmza

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi

İmza

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun 3.8.1998....tarih ve 20/15.14..sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Kadri ÖZCAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezimin başından sonuna kadar, her konuda yol ve önderlik göstererek yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ali MATUR'a sonsuz teşekkürlerimi en içten duygularımla arz ederim.

Moskova'dan laboratuvarımıza gelerek leishmania kültürü ve moleküler tekniklerde yardımcı olan ve beraberinde Orta Asya kökenli referans suşlarını getiren Prof. Dr. Margarita V.STRELKOVA ile diğer Avrupa ve Afrika orijinli referans suşları İspanya'dan gönderen Prof. Dr. Jorge ALVAR'a sonsuz şükran ve sağlık dileklerimi sunarım. Kutanöz Leishmania kültüründe bana rehberlik eden değerli hocam Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV'e teşekkür etmekten kıvanç duyarım.

Kutanöz Leishmania örneklerini sağladığı için Tropikal Hastalıkları Araştırma ve Uygulama Merkezi Müd. Sn Prof.Dr.Hamdi R. MEMİŞOĞLU ile çalışan tüm personeline ve laboratuvar olanaklarını sunan Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi Müd. Sn Prof.Dr.Ü.ZORLUDEMİR'e teşekkürü borç bilirim.

Tezimin düzenlenmesinde yardımlarını esirgemeyen başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Halil KASAP, diğer hocalarıma, anabilim dalımız çalışanlarına ve tezimin yazımında yardımcı olan bölümümüz sekreteri Aysel ASLAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince bana her konuda destek veren eşim Ayfer'e ve çocuklarıma da sonsuz sevgilerimi iletiyorum.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Epidemiyoloji	3
2.2. Leishmania Parazit Formları	4
2.3. İzolasyon	5
2.3.1. Deriden Örnek Alımı	5
2.3.2. İlk İzolasyon ve Adaptasyon	6
2.4. Kültür	7
2.5. Kriyoprezervasyon	8
2.6. Hücre Toplama ve Yıkama	9
2.7. Leishmania'ların Karakterizasyonu	9
2.8. Total DNA İzolasyonu	13
2.9. Total DNA'nın Restriksiyonlarla Kesilmesi	14
2.10. Total DNA'nın Elektroforezi	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Besiyeri Standardizasyonu	17
3.2. İzolasyon	18
3.2.1. Deriden Örnek Alımı	18
3.2.2. İlk İzolasyon ve Adaptasyon	19
3.3. Büyük Hacimde Kültür	20
3.4. Üreme Eğrisinin Çıkarılması	20
3.5. Çeşitli Lizatlarla Modifiye Edilen Besiyerlerinde Populasyon Taşıma Kapasiteleri	21
3.6. Mitojen Maddelerin Üremeye Etkisi	21
3.7. Üreme Atmosferine NaHCO ₃ 'ün Etkisi	22
3.8. Kriyoprezervasyon	22
3.9. Hücre Toplama ve Yıkama	23
3.10. Total DNA İzolasyonu	23
3.11. Total DNA İzolasyon Protokolü	24
3.12. Total DNA'nın Spektral Analizi	25
3.13. Ammonyum Asetatla DNA Purifikasyonunun Önemi	26
3.14. DNA'ların Restriksiyon Endonükleazlarla Kesim Hacmi	26
3.15. Takip-Stop Karışımının DNA Bandlarına Etkisi	27
3.16. Agaroz Jel Elektroforezi	28

3.17. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	28
3.18. Poliakrilamid Jelinin EtBr ve Gümüşle Boyanması	29
3.19. Restriksiyon Endonükleazlarla Kesim Programı	30
3.20. DNA Fragmanlarının Fotoğraflanması	32
3.21. DNA Bandlarının Değerlendirilmesi	32
4. BULGULAR	34
4.1. Besiyeri Standardizasyonu	34
4.2. İlk İzolasyon ve Adaptasyon	34
4.3. Amastigot ve Promastigot Formları	35
4.4. Büyük Hacimde Kültür	37
4.5. Üreme Eğrisinin Çıkarılması	37
4.6. Değişik Lizatlarla Modifiye Edilen Besiyerlerinde Populasyon Taşıma Kapasiteleri	39
4.7. Mitojen Maddelerin Üremeye Etkisi	40
4.8. Üreme Atmosferine NaHCO ₃ 'ün Etkisi	40
4.9. Kriyoprezervasyon	41
4.10. Hücre Toplama ve Yıkama	41
4.11. Total DNA İzolasyonunun Optimizasyonu	41
4.12. Total DNA İzolasyonu	42
4.13. Total DNA'nın Spektral Analizi	42
4.14. Takip-Stop Karışımının DNA Bandlarına Etkisi	43
4.15. Ammonyum Asetatla DNA Purifikasyonu	44
4.16. Restriksiyon Endonükleazlarla Kesim	44
4.17. Agaroz Jel Elektroforezi	45
4.18. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	45
4.19. Poliakrilamid Jelinin EtBr ve Gümüşle Boyanması	46
4.20. DNA Bandlarının Değerlendirilmesi	46
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	72
7. KAYNAKLAR	75
EKLER	81
EK-1	81
EK-2	96
ÖZGEÇMİŞ	97

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1:	Amastigot ve Promastigot Hücrelerinin Morfolojileri	36
Şekil 2:	Üreme eğrisi	38
Şekil 3:	Örnek ve Referans Suşların %0.7 Agaroz jelinde Total DNA-EcoRI Restriksiyon Profilleri	47
Şekil 4:	Örnek ve Referans Suşların %0.7 Agaroz Jelinde Total DNA-HindIII Restriksiyon Profilleri	49
Şekil 5:	Örnek ve Referans Suşların %0.7 Agaroz Jelinde Total DNA-HaeIII Restriksiyon Profilleri	51
Şekil 6:	Örnek ve Referans Suşların %0.7 Agaroz Jelinde Total DNA-HinfI Restriksiyon Profilleri	52
Şekil 7:	Örnek ve Referans Suşların %0.7 Agaroz Jelinde Total DNA-AluI Restriksiyon Profilleri	54
Şekil 8:	Örnek ve Referans Suşların %0.7 Agaroz Jelinde Total DNA-RsaI Restriksiyon Profilleri	56



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1:	Besiyeri Standardizasyonu	34
Çizelge 2:	Üreme Eğrisinin Çıkarılması	38
Çizelge 3:	Farklı Kompozisyondaki Besiyerlerinin Populasyon Taşıma Kapasiteleri	40
Çizelge 4:	Mitojen Maddenin (PHA-L) Hücre Üremesine Etkisi	40
Çizelge 5:	NaHCO ₃ 'ün <i>L.tropica</i> 'ya (MHOM/SU/K-27) Etkisi	41
Çizelge 6:	Fenol-Kloroform Karışımı ve Tuzla Ekstre Edilen DNA'nın Spektral Analiz Sonuçları	42
Çizelge 7:	Referans Suş ve İzolat Total DNA'larının Spektral Analiz Sonuçları	43
Çizelge 8:	Ammonyum Asetat'la DNA'nın Purifikasyonu	44
Çizelge 9.A:	Örneklerin Total DNA-EcoRI Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)	48
Çizelge 9.B:	Referans Suşların Total DNA-EcoRI Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)	48
Çizelge 10.A:	Örneklerin Total DNA-HindIII Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)	50
Çizelge 10.B:	Referans Suşların Total DNA-HindIII Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)	50
Çizelge 11.A:	Örneklerin Total DNA-HinfI Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)	53
Çizelge 11.B:	Referans Suşların Total DNA-HinfI Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)	53
Çizelge 12.A:	Örneklerin Total DNA-AluI Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)	55
Çizelge 12.B:	Referans Suşların Total DNA-AluI Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)	55
Çizelge 13.A:	Örneklerin Total DNA-RsaI Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)	57
Çizelge 13.B:	Referans Suşların Total DNA-RsaI Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

NH ₄ OAc	Ammonyum Asetat
β	Beta
BHI-A	Brain Heart Infusion Agar, Brain Heart Infüzyon
Buoyant	Buyon Yoğunluğu
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EtBr	Etidyum Bromid
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EBLB	Evans Blood Lysate Broth, Evans Kan Lizat Sıvısı
FBS	Fotal Bovin Serum
FCS	Fotal Calf Serum
φ x174	Fi x 174 Virüs DNA'sı
FIGE	Field Inversion Gel Electrophoresis, Saha Dönüşümlü Jel Elektroforezi
FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization, Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon
AgNO ₃	Gümüş Nitrat
HEPES	(N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
IFA	Immunofluorescent Antibody, Immuno Floresan Antikor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
CO ₂	Karbon Dioksit
kDNA	Kinetoplast DNA
λ	Lambda
LiCl	Lityum Klorür
μ	Mikron
MEM	Minimal Essential Medium
ng	Nanogram
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
nDNA	Nükleer DNA
OFAGE	Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis, Altılı Alan Değişimli Jel Elektroforezi
PBS	Phosphate Buffered Salin, Fosfat Tamponlu Tuz
PHA-L	Phytohaemagglutinin, Fitohemagglutinin
PAGE	Polyacrylamid Gel Electrophoresis, Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis, Kesikli Alan Jel Elektroforezi
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RAST	Radioallergosorbent Test, Radyoaktif İşaretli Antijen Testi
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphysm, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
SET	Salin-EDTA-Tris

NaHCO_3	Sodyum Bikarbonat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
NaCl	Sodyum Klorür
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
V	Volt



ÖZET

Leishmania Örneklerine Ait Total DNA'larının İzolasyonu, Saflaştırılması ve Restriksiyon Endonükleaz Profillerinin İncelenmesi

Çukurova ve Şanlıurfa bölgelerinde; Sivrisinek ve Flebotomlara karşı mücadelede kullanılan insektisitlere rağmen, kutanöz Leishmaniazis her geçen gün yayılım göstermektedir. Leishmanialarda oluşan direnç sonucu, bu ajanlarla mücadele etmek zorlaşmakta ve yeni ilaçlar gerekmektedir. Mücadele zorlaştığı gibi büyük bir iş kaybı görülmektedir. Her an kutanöz Leishmaniazis ajanlarının viskerotropik enfeksiyon ajanları olabilme tehlikesi vardır.

Bu çalışmada ana amaç; elde edilen izolatlar arasında genotipik olarak farklılık olup olmadığını, örneklerin referans suşlara genotipik olarak benzeyip benzemediğini tesbit etmektir. Çukurova ve Şanlıurfa bölgelerinde kutanöz Leishmaniazisli hasta bireylerden toplam 25 örnek kültüre alındı. Örnek ve referans suşların total DNA'ları izole edildi. Total DNA; EcoRI, HindIII, HinfI, HaeIII, AluI ve RsaI restriksiyon enzimleriyle kesilerek, bunların restriksiyon fragman profilleri çıkarıldı. Örneklerin restriksiyon fragmanları hem kendi aralarında hem de her bölgenin örnekleri kendi içinde değerlendirildi. Ayrıca elimizde bulunan 14 referans suşun total DNA restriksiyon fragmanlarıyla karşılaştırıldı.

Çalışma sonuçlarına göre; Çukurova ve Şanlıurfa izolatları arasında genotipik olarak heterojenite belirlenmesinin yanında, her bölgenin kendi içinde de heterojenite tesbit edildi. Yapılan DNA profil karşılaştırmalarına göre; izolatların kimi DNA fragmanlarının referans suşların fragmanlarına benzediği görüldü. Ancak hiç bir izolat, referans suşlarla bire bir benzerlik göstermedikleri belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Kültür, Leishmania İzolasyonu, Restriksiyon Endonükleazlar, RFLP Analizi, Total DNA

ABSTRACT

In Leishmania Specimens, Total DNA Isolation, Purification and determination of Restriction Endonuclease Profiles

In Çukurova and Şanlıurfa regions, in spite of the insecticides used against to Mosquito and Phlebotomus, cutaneous Leishmaniasis is spreading day after day. As a result of resistance in Leishmania sp. the struggle against these agents has been difficult and new drugs are required. The struggle has not only been difficult but also time consuming. It has always been possible that cutaneous leishmaniasis can transform into viscerotropic.

The goal of this study was the identification of genotypic differences between isolates and try to find out whether there are similarities genotypically with reference strains or not. Samples (25) were collected from patients who were effected by cutaneous Leishmaniasis in Çukurova and Şanlıurfa domains. Total DNAs were isolated from these samples and reference strains, the total DNAs of which were digested with EcoRI, HindIII, AluI, HinfI, HaeIII and RsaI restriction endonucleases. The restriction fragment profiles of isolates were compared with each other and, also, with others of 14 reference strains,

According to the electrophoretic results obtained in this study, genotypic heterogeneities were observed between Çukurova and Şanlıurfa isolates and, also, in each region itself. In the comparison of DNA fragments of reference and isolates it was observed that there may be slight similarities between but never an exact one at all.

Key Words: Culture, Leishmania Isolation, Restriction Endonucleases, RFLP Analysis, Total DNA

1. GİRİŞ

Leishmaniasis, Leishmania cinsine bağlı parazitlerce oluşturulur. Dünya çapında tropikal ve subtropikal bölgeleri içine alan Orta ve Güney Amerika, Avrupa, Afrika ve Asya'da görülmektedir. Akdeniz havzasında endemik ve epidemiktir. Yaklaşık 80 ülkede 350 milyon insan risk altında bulunmaktadır. Leishmania cinsindeki parazitler, insanlarda kutanöz, mukokutanöz ve visseral tipte enfeksiyonlar yaparlar¹. Hastalık etkeni, omurgalılarda hücre içi paraziti olarak, kamçısız ve hareketsiz amastigot şeklinde; vektör vücudunda ve kültür ortamında kamçılı ve hareketli promastigot şeklinde bulunur. Her iki tip hücre de, boyuna ikiye bölünme ile çoğalır². Parazit kaynağı hasta insan, hayvan ve rezervuarlardır. Amastigot hücreleri değişik şekillerde bifazik veya monofazik besiyerlerine alınarak, promastigot formlarına dönüşümleri sağlanır^{2,3}. Kutanöz Leishmaniasis lezyonları bir yıl içinde iz bırakarak düzelebilirler. Bağışıklık gelişebilir. Bağışıklık kazanan bir bireyde tekrar kutanöz çıkması, farklı bir Leishmaniasis ajanının enfeksiyon yaptığı anlamındadır. AIDS'li bireylerde leishmaniasis yayılımının kolay olması immunolojik sistemin zayıflığına bağlanmaktadır^{4,5}. Kutanöz Leishmaniasis etkenleri değişik laboratuvarlarda, çeşitli moleküler tekniklerle idantifiye edilebilmektedir^{6,7}. Parazitlerin enzim profillerine bakılarak zimodem, monoklonal antikorlarla antijen profilleri incelenerek serodem ve kDNA ile total DNA restriksiyon profilleri araştırılarak sırasıyla şizodem ve RFLP analizi gibi moleküler tekniklerle tanınmaları yoluna gidilmektedir^{8,9,10,11}. Son yıllarda DNA kaynaklı teknikler, diğer parazitlerde olduğu gibi Leishmania parazitlerinin saptanmasında ve identifikasyonunda önemli ilerlemelere rağmen tekniklerin hiç biri duyarlılık, özgüllük, iyi teşhis ve epidemiyolojik amaçlar için istenen özellikleri bir arada sağlayamamaktadır^{12,13,14}.

Ülkemizde henüz Leishmania identifikasyonuna ve hele hele moleküler açıdan bir değerlendirilmeye gidilememiştir. Sadece Sağlık Bakanlığına bağlı Hastane ve kimi Sağlık Ocaklarında kurulan birimlere gelen vakaların

Leishmaniazis açısından teşhisleri ve bunların tedavileri yapılmaktadır. Üniversitelerin değişik birimlerinde ise daha ziyade kültür amaçlı çalışmalar yapılmakta olup bazı yerlerde yurtdışı merkezlerle ortaklaşa moleküler PCR teknikleri yavaş yavaş uygulanmaya başlanmıştır.

Bilindiği gibi Çukurova ve Şanlıurfa bölgelerinde kutanöz leishmaniazis endemik ve epidemik olarak seyir göstermektedir. Aynı şekilde bölgemizde de bu hastalık için sadece vaka tesbiti ve tedavisi yapılmaktadır. Tüm vektörleri henüz tanımlanmamıştır. Buna rağmen her geçen gün yeni rezistant vakalar ortaya çıkmakta ve hastalık biraz daha yayılım göstermektedir. Dünya'nın birçok araştırma biriminden gelen bilgilere göre, kutanöz tip enfeksiyondan sorumlu bazı ajanların viskerotropik olduğu ve konuyu daha karmaşık ve önemli hale getirmektedir.

Bizim burada ilk etapta amacımız; bölgemizde bulunan örnekleri kültüre almak, kriyoprezervasyonlarını yapmak ve izole edilen örneklerin total DNA restriksiyon endonükleaz profillerini çıkararak, populasyon içi heterojenitenin olup olmadığını belirlemektir. Ayrıca elde edilen örnek DNA fragmanlarının, elimizde bulunan uluslararası referans suşların profillerine benzeyip benzemediklerini ortaya koymaktır. Daha sonraki amacımız; bölgemizde bulunan izolatları tiplendirmek, rezervuarlarını tesbit etmek, kutanöz ajanların viskerotropik olup olmadıklarını ortaya koymaktır. Bölgemizde, bazı dinamikleri belirliyerek Leishmaniazis mücadelesine katkıda bulunabilmek en büyük ve tek emelimizdir.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Epidemiyoloji

Sağlık Bakanlığı verilerine göre Türkiye genelinde 1995 yılında bildirilen 3850 kutanöz leishmaniazis vakasının 2809'u Şanlıurfa'da görülmüştür. Şanlıurfa Sağlık Müdürlüğü'nün 1996 yılı bildirdiği vaka sayısı 2099'dur¹⁵ Türkiye'de bir kaç bölgeden, 1982 yılına kadar, çoğu çocuk olmak üzere yaklaşık 500 kala-azar vakası rapor edilmiştir. Bunların vektörleri hakkında net bir bilgi bulunmamaktaysa da *Phlebotomus major*, *P. alexandri* ve *P. tobbi* (*Diptera: Psychodidae*) gibi vektörler olduğu tesbit edilmiştir. Parazitolojik ve serolojik çalışmalara göre visseral Leishmaniazis rezervuarının köpekler oldukları belirlenmiştir. Türkiye, Irak ve Suriye'nin komşusu olması nedeniyle, güney doğu bölgesi bu ülkelerde olduğu gibi deri Leishmaniazisi yönünden hiperendemiktir. 1981-1984 yılları arasında bu bölgeden binlerce vaka bildirilmiştir. Ülkenin merkezi kısımlarında sporadik vakalar rapor edilmiştir. *Phlebotomus sergenti* ve *P. papatasi* vektör olarak kabul edilmiştir. Rezervuar ise *Meriones* ve *Microtus*'a ait Rodent'lerdir (kemirgenler). Türkiye'de Leishmaniazis kontrolü sadece vaka tesbitinden ibarettir¹⁶.

Eski dünya'da *Leishmania donovani* ile *L. infantum*, yeni dünya'da *L. chagasi*'nin sebep oldukları enfeksiyonlar arasında epidemiyolojik ve kliniksel farklılıklar tespit edilmiştir. Eski dünya ajanlarının çoğu hasta insan ve hayvanlarla yeni dünya'ya geçmektedir. Böyle bir geçiş şizodem (schizodeme, kDNA restriksiyon profili) analizi ile belirlenmiştir. Brezilya'da yapılan şizodem taramasına göre visseral Leishmaniazis'te köpeklerin rezervuar oldukları belirlenmiştir. Leishmanialar geniş bir popülasyona sahiptirler. Eskiden sadece dış karakterlerine bakılırken, bugün hem dış hem de dahili karakterlerine bakılmaktadır. Farklı bölgelerde farklı klinik tablolar veren *Leishmania* ajanlarının şizodem analizi ile tıpa tıp aynı oldukları saptanmıştır^{6,17}. Orta ve güney Amerika, Güney Avrupa, Afrika, Orta Doğu ve Hindistan'da Leishmaniazisin zoonotik olduğu kesin olarak bilinmektedir. Köpekgiller, kemirgenler ve keseli memeliler rezervuar olarak tesbit edilmiştir. Bu

bölgelerdeki Leishmaniazis ajanları insan ve hayvanlarda visseral, kütan ve subkütan enfeksiyonlarına sebep olmaktadır. Nükleer DNA (nDNA) üzerinde yapılan RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, Restriksiyon fragman uzunluk farkları) analizlerine göre eski dünya'da bulunan *L.d.infantum* ile yeni dünya'da bulunan *L.d.chagasi*'nin benzer değerler verdiği ve *L.d.infantum*'un yeni dünya'ya girişinden sonra buraya adapte olduğu tespit edilmiştir. *L.donovani* kompleksine ait parazitlerin oluşturdukları enfeksiyonların sistemik olduğu; dalak ve kemik iliğini ilgilendirdikleri, diğer parazitlerin lokalize oldukları ve deri ile ilgili oldukları bilinmektedir^{6,7,18}. Dünya'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinde 12-15 milyon insan leishmaniazisli olup, bunlara her yıl 400.000 yeni vaka eklenmektedir^{4,19}. *L.major* rezervuarının *Rhombomys opimus* olduğu ve bu kemirgen'in de insan için tehlike arzettiği varsayılmaktadır. Leishmaniazis Ekvador'da, tropikal ve subtropikal bölgelerde endemiktir, İspanya'da AIDS'li hastalar arasında yayılım daha fazla görülmektedir^{5,20,21}. Irak savaşı sırasında kala-azarlı bir hastanın kemik iliğinden izole edilen suşun *L.tropica*, böylece bu parazitin viskerotropik olduğu belirlenmiştir²².

2.2. Leishmania Parazit Formları

Leishmaniaların yaşam sikluslarında iki farklı form görülmüştür. Omurgalı konaklarında makrofaj veya makrofaj benzeri hücrelerin içinde intrasellüler amastigot şeklinde, vektörlerin sindirim sistemlerinde ve *in vitro* kültürde ekstrasellüler flagelalı promastigot şeklinde görünürler. Sıcaklık 35°C ve üzerine çıkınca amastigotların makrofajları enfekte edemedikleri, aynı şekilde *in vitro*'da sıcaklık 32°C'nin üzerine çıkınca promastigot formlarının bozulduğu belirlenmiştir. Böylece parazitlerin form değiştirmesinde sıcaklığın büyük rolü bulunmuştur. Amastigotlar 2-4 µm büyüklükte iğ veya yuvarlak olarak, monosit, polimorf çekirdekli lökosit ve endotel hücreleri içinde tek veya küme şeklinde bulunurlar. Giemsa ile boyandıkları zaman; sitoplazmanın soluk mavi, nükleusun pembe veya koyu kırmızı, kinetoplastın parlak koyu kırmızı veya menekşe renginde oldukları görülür. Çoğalmaları boyuna ikiye bölünme şeklindedir. Önce parabasal cisim (kinetoplast) bölünür, bunları çekirdek ve

sitoplazma izler^{1,23,24,25}. Nukleusta bulunan kromozom sayısı ve moleküler ağırlığı, PFGE (Pulsed field Gel electrophoresis: Kesikli alan jel elektroforezi) ile araştırılmış; bu canlılarda kromozom sayısının 36 ve moleküler ağırlığının da 0.35-3.0 Mb (mega baz) olduğu tesbit edilmiştir⁴. Leishmania hücresinde bir adet mitokondri bulunduğ, buna da kinetoplast dendiğı bilinmektedir. Kinetoplast içinde bulunan DNA'ya kinetoplast DNA (kDNA) denmektedir. Bu DNA hücre DNA'sının %10-20'sini oluşturur. kDNA, büyük halka kDNA (Maxicircle) ve küçük halka kDNA'lardan (minicircle) oluşur. Bunlar birbirine eklenerek ağ (network) oluştururlar. Küçük halka kDNA, kinetoplastta $5 \times 10^3 - 10^4$ adet ve her biri 800-2500 bç (baz çifti); büyük halka kDNA ise 5-20 adet $2 \times 10^4 - 4 \times 10^4$ bç büyüklüktedir. Küçük halka kDNA türe özgü, büyük halka kDNA ise cinse özgüdür. Küçük halka kDNA'nın görevi bilinmemekle beraber, büyük halka kDNA'sının diğr ökaryotlardaki mitokondrial DNA (mtDNA) ile aynı görevi paylaştığı tesbit edilmiştir^{26,27,28}.

2.3. İzolasyon

2.3.1. Deriden Örnek Alımı

Deriye ait Leishmania ajanlarının kültürünü yapabilmek için amastigot içeren örneklerin steril olarak alınması gerekir. Lezyon önce sabunlu su ile yıkanır ve alkolle dezenfekte edilir. İçinde antibiyotikli izotonik solüsyon bulunan enjektörle lezyona girilir, aspirasyon yapılarak amastigotlar alınır. Sonra aspirat besiyerine aseptik koşullara uyularak verilir. Aspirasyon için enjektöre alınan izotonik solusyondaki kontaminantları baskılamak için, kültürde kullanılacak antibiyotik konstrasyonundan 5-10 kat daha fazla kullanılır. Antibiyotik olarak penisillin+streptomisin (veya gentamisin), antimikotik olarak ta 5-fluoritozin katılır. Enjektör iğnesi intradermal olarak sokulur, içerde çevrilerek epidermis ve az da dermis dokusu alınır. Aspirasyon sıvısında kan olmaması önemlidir. Çünkü kan serumu içindeki antikor proteinleri leishmaniaların üremesini etkileyebilir. Lezyon dezenfeksiyonunda da iyotlu bileşikler kullanılmaz. Aspirat lezyon kenarından ve merkezinden alınır. Altı aya kadar olan lezyonlardan alınan aspiratlardaki Leishmania'ların kültürü çok başarılı olmaktadır. Alınan

aspirat Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) içinde 4-8°C' ta 2-24 saat bekletilebilir^{2,29,30,31}.

2.3.2. İlk İzolasyon ve Adaptasyon

İğne aspiratı Schneider's Drosophila mediumuna aşılır. Bu besiyerine ısı ile inaktive edilen Fetal Calf Serum (FCS) veya aynı oranlarda inaktive edilen Fetal Bovin Serum (FBS) katılır. Kontaminantların baskılanması amacıyla penisillin+streptomisin veya sadece gentamisin katılır. Üç dört hafta boyunca belli aralıklarla, kültür kabı inverted mikroskopta veya smear alınarak promastigot varlığı incelenir. Bu besiyerinde çoğu örnekler 6.güne kadar promastigot formuna dönüştüğü için bu besiyerinin ilk izolasyonda en sensitif besiyeri olduğu belirlenmiştir^{2,29,32}. Deriden alınan ve amastigot taşıyan iğne aspiratları ile biyopsi materyalleri, doku kültürü besiyeri olan ve ısı ile inaktive edilmiş serum içeren RPMI-1640 besiyerine aktarılır. Bu besiyerinde başarı NNN besiyeriyle benzerdir³³. Bifazik besiyerleri olarak en eski ve en sık kullanılanı defibrine tavşan kanı içeren klasik NNN'dir. Ancak pek hassas değildir. Promastigota dönüşüm ancak 11.güne kadar tamamlanabilmektedir. Bu besiyeri, doku kültürü tüplerine yatık olarak dökülür ve içerdiği agar nedeniyle katıdır. Üremenin sağlandığı kısım, agarın üzerinde kendiliğinden oluşmuş yoğun kültür sıvısı veya sonradan eklenen steril bidistile su, izotonik tuz solüsyonu, Locke's solüsyonu, Hank's solüsyonu gibi örtü sıvılarıdır. Bifazik besiyeri sadece izolatif amaçlı kullanılmaktadır^{2,29,34,35}. Klasik NNN besiyerinin sensitivitesini artırmak amacıyla bileşimine yüksek oranda Pepton, Beef Ekstrakt, Brain İnfüzyon Sıvısı, Kan Bazlı Agar katılarak modifikasyonlar yapılmıştır. Bifazik besiyerleri terminolojik olarak sırasıyla, klasik NNN^{22,29}, Nutrient Agarlı bifazik besiyeri³³, Brain Heart infüzyon Agarlı bifazik besiyeri^{6,37}, Bacto-Blood Agar Bazlı bifazik besiyeri^{2,29,38}, prolinli ve at kanlı bifazik besiyeri olarak bilinirler^{2,31,39}. Bileşimi farklı bir başka besiyeri Senekjie's bifazik besiyeridir^{24,40}. Ayrıca bifazik besiyerlerinin örtü sıvısına zaman zaman Hemoglobin, Hemin, Brain Heart İnfüzyon, Schneider's Drosophila veya RPMI-1640 besiyeri gibi çeşitli madde ve besiyerleri katılarak laboratuvarlar tarafından

modifikasyonlar yapılmaktadır^{2,6,21,37}. Monofazik besiyerlerinin ilk izolasyon verimlerini arttırmak amacıyla bunlara; tam kan veya tam kan lizatı katılmış ve üstün başarılar elde edilmiştir. Genel olarak eski ve yeni dünya suşlarının izolasyonunda en hassas besiyeri olarak Schneider's Drosophila Besiyeri ve onun modifikasyonları görülür. Bunun yanında yeni dünya örneklerinin ilk izolasyonu için Brain Heart İnfüzyon Agarlı bifazik besiyeri, eski dünya örneklerinde ise Evans'ın modifiye ettiği bifazik besiyeri önerilmektedir. Ancak tüm suşlara bire bir cevap verebilen bir besiyeri önerilememektedir. Tüm besiyerlerinde promastigot kültürü için 22-27°C sıcaklık uygulanmaktadır^{41,42,43}. Yapılan kontrollerde promastigotlar görüldüğünde adaptasyon amacıyla aynı besiyerine pasaj yapılır. Adaptasyon sağlandıktan sonra büyük hacme geçilir. Sıvı besiyerleri moleküler analizlere uygundur, kan kaynaklı bifazik besiyerleri serodem (Antijen-antikor analizi) ve zimodem (enzim profili) analizine uygun değildir^{2,12,33}.

2.4. Kültür

Senekjie's bifazik besiyerinde ilk izole edilen izolatlar 8-10 gün arayla aynı besiyerine pasajlanarak adaptasyonları sağlanır. Ardından her örnek, tabanında katı Senekjie besiyeri ve üzerinde tuzlu su örtüsü bulunan büyük kültür şişesine pasajlanır. Bir iki hafta sonra aynı şişeye antibiyotiksiz tuzlu solusyon eklenir ve çalkalanarak inkübe edilir. Daha sonra hücreler yıkanarak hücre lizatı hazırlanır. Bu lizat zimodem analizi için uygundur. Ancak Senekjie besiyerinin bileşiminde bulunan kandan Leishmania dışı antijenlerin bulaş yaptığı ve bunların yalancı pozitiflik verdiği saptanmıştır⁴⁴.

Zimodem ve serodem'de saf parazitlerle çalışmak amacıyla doku kültürü besiyerleri başarı ile kullanılır. Doku kültürü besiyeri çalışmaları her ne kadar CO₂'li ortamlarda yürütülürse de aynı başarı CO₂ kontrolü bulunmayan etüvlerde CO₂ yerine düşük konsantrasyonda NaHCO₃ ilavesi ile elde edilebilir⁴⁵. FCS içeren diğer bir besiyeri olan Medium-199'da da üretilen hücreler, enzim çalışmalarında kullanılır⁴⁶. Daha sonraları aynı besiyeri HEPES, L-glutamin gibi bileşenlerle modifiye edilerek daha kullanışlı hale getirilebilir.

Ayrıca bu besiyerine insan tam kan lizatı, FBS ve HEPES katılarak üreme eğrisi zaman olarak kısaltılabilir, böylece popülasyonun taşıma kapasitesine hızla gelmesi sağlanır^{12,47}. RPMI-1640 besiyerine, FBS/FCS, L-Glutamin, Kazein Hidrolizat, HEPES vb katkı maddeleri eklenerek yoğun şekilde biyokütle (yaklaşık $2-5 \times 10^7$ hücre/ml) elde edilir. Hücreler geniş hacimli sıvı besiyerlerine birden bire alınmaz; pasaj önce küçük hacme yapılır ve üzerine kademe kademe besiyeri eklenerek istenen hacme erişilir. RPMI-1640 besiyerinde düşük FCS konsantrasyonunda kültür yapılırken herhangi bir asidifikasyon işlemi olmaksızın hücreler 3 ay boyunca korunabilmektedir^{34,35,48}.

Moleküler çalışmalarda kullanılacak promastigotların kültürü FBS veya FCS içeren Schneider's Drosophila Besiyerinde başarılı bir şekilde yapılmaktadır. Bu besiyerinde, ml'de $5-8 \times 10^7$ hücre elde edilmiştir^{9,49,50}. Bunun yanında değişik laboratuvarlarda FCS ile beraber EBLB (Evans Blood Lysate Broth), Triptoz, Kazein Hidrolizat, Karaciğer Ekstresi, L-Prolin gibi maddelerden biri ve tampon içeren MEM (Minimal Essential Medium) besiyerinde temiz biyokütle elde edilir. Burada lizatın ve L-Prolinin önemli olduğu rapor edilmiştir². Difco-Brain Heart Infusion besiyerine FCS ve hemin katılarak başarılı kültür çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca RPMI-1640, Medium-199 ve FCS içerildiği karışık besiyerlerinde daha iyi üreme elde edilmiştir^{3,51}.

2.5. Kriyoprezervasyon

Leishmania promastigotları, kriyo tüplerinde FCS+gliserol içeren 1x RPMI-1640 içine karıştırıldıktan sonra sıvı azota alınırlar. Bu şekilde hücreler inaktive edilirler¹⁷. Eski dünya izolatları gliserol içeren besiyerlerinde ilk izolasyondan hemen sonra kriyoya alınırlar^{20,42}. Yeni Dünya izolatları ise önce çalışılan besiyerlerinde 2-3 kez pasajları yapılır. Daha sonra FBS+gliserol içeren Schneider's Drosophila besiyerine alınır ve aşamalı bir soğutma ile sıvı azota verilir^{52,53,54}. Gerektiğinde hücreler kriyodan alındıktan sonra 37°C'de hızla çözülüp, 1x RPMI-1640'a aktarılır. Kriyoprotektan olarak gliserol yerine DMSO (dimetil sulfoksit) kullanılabilmektedir⁵⁵.

2.6. Hücre Toplama ve Yıkama

Moleküler çalışmalarda kullanılacak hücreler genellikle geç log fazında santrifugasyonla toplanırlar. Üç defa PBS ile yıkanılırlar. Son hücre pelleti -20 veya -70°C'ta saklanır^{17,37,56}. Gerektiği hallerde NaCl-EDTA-Tris (SET, pH 8.0) tamponunda yıkanabilirler^{9,34,49}.

2.7. Leishmaniaların Karakterizasyonu

Kuten enfeksiyon tanısında, lezyondan alınan materyal lam üzerine ince bir şekilde yayılması, kurutulması, fikse edilmesi ve Giemsa, Wright's veya hematoksilen-eosinli boyalarla boyandıktan sonra amastigot yönünden ışık mikroskobu taraması yapılır. Alınan materyal iğne aspiratı ve biopsi materyali olabilir. Bu teknik leishmania tiplendirmeden ziyade sadece hasta teşhisinde kullanılır^{24,16,32}. Ancak, teşhis açısından da bu yöntemin yetersizliği görülünce, serolojik tanıya ve deri testlerine gidilmektedir^{1,39,54}. Teşhisin güvenilirliğini arttırmak amacıyla, insan lezyonlarından alınan iğne aspirat ve biopsilerindeki amastigotları tesbit etmek için cinse özgü monoklonal antikorların kullanıldığı IFA (Immuno floresan antikor) testleri uygulamaya dahil edilmiştir. IFA ile yapılan taramalarda hasta serumunda antikor titresi 1/85-1/128 olunca kişi bu parazit yönünden hasta kabul edilir³⁹. Ayrıca RAST (Radioallergosorbent Test) ve ELİZA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) testleri kullanılmış, ancak *Plasmodium sp.*, *Brucella sp.* ve *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonu geçirenlerde yalancı çapraz reaksiyonlarının olduğu belirlenmiştir^{22,48,57}.

Teşhiste hassasiyeti daha fazla olan sitogenetik ve moleküler tekniklerden de yararlanılmaktadır. Non-radyoaktif DNA problemleri kullanılarak amastigotlar *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniğiyle belirlenmiştir. Kullanılan DNA problemleri kDNA'ya yönelik olmuştur⁵⁸. Daha sonraları, *Leishmania donovani* küçük halka kDNA'sı izole edildikten sonra sekans analizi yapılmıştır. Buradan seçilen özgün fragmana göre primer sentezlenir. Bu yol ile kala-azarlı hastalardan alınan kan örneği içinde çok hızlı ve sensitif bir şekilde PCR (Polymerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu) uygulaması

yapılmış ve *L.donovani* tesbit edilmiştir^{13,59}. Diğer yandan deri örneklerinden elde edilen primerler ile *L.braziliensis* teşhisi yapılmıştır. Bu tekniğin uygulanması halinde 50-100 adet amastigot bulunması yeterli görülmüştür⁵⁴. PCR ve rekombinant DNA teknolojisi alanında gösterilen gelişmelere paralel olarak, eski dünya örneklerinde çalışmalar kDNA'dan genomik DNA'ya kaydırılmıştır^{14,60}.

Mikroskobik olarak leishmania amastigot ve promastigotlarının tiplendirilmesi mümkün değildir. Bu nedenle moleküler tekniklere geçilmiştir. Bu teknikler temelde ikiye ayrılır; (1) hücre fenotipine dayalı olan ve bunun içinde kinetoplast yapısı (elektron mikroskobik), zimodem analizi, serodem analizi, aglütinasyon reaksiyonları (değişik lektinlerle), protein tipleme (disk elektroforezi ile), yüzey proteinlerinin analizi (¹³⁵I-etiketli) ve besin ihtiyaçlarının belirlendiği tekniklerdir, (2) hücre genotipine dayalı olanlar; nDNA ile kDNA buoyant dansitesi, kDNA'nın restriksiyon profili (Şizodem analizi), nDNA restriksiyon profili (RFLP analizi), Kesikli Alan Jel elektroforezi (PFGE) ile karyotip analizi gibi çok hassas teknikler sayılabilir^{10,61,62}.

Leishmania karakterizasyonunda genotip analizi; tür içi ve türler arası ilişkileri hassas bir şekilde açığa çıkarabilmektedir^{61,63,64}. Selüloz asetat elektroforezi ile hücre fenotipine dayalı enzim profilleri yardımıyla, izolatlar arası farklar açık bir şekilde gösterilmiştir. Enzim farklılığı gen farklılığının bir ölçüsüdür. Zimodem analizi ile belirlenen izolatların benzer epidemiyoloji ile coğrafik özellik taşımaları önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Ancak güvenilirlik, elektroforezde gösterilebilen enzim sayısı ile doğru orantılıdır^{44,46}. Leishmania hücrelerinin karakterizasyonu için taksonomik, biyokimyasal ve epidemiyolojik çeşitliliğe bakılır. İki yüz izolatta şizodem analizi yapılmış ve buradan elde edilen sonuçlar fenotipik birer teknik olarak kabul edilen serodem ve zimodem sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Burada amaç izolatların doğru identifikasyonu, rezervuarların tesbiti, visseral ve kütan ajanlarının belirlenmesidir. kDNA, hücre total DNA'sının %10-20'unu teşkil etmektedir. Fenotipik tekniklerden elde edilen sonuçların genotipik sonuçlarla uyum içinde olması, uygulanan enzim sayısı ile doğru orantılı olarak artar⁶⁵. Ancak ne olursa olsun moleküler çalışma yapmak için *in vitro* kültür şarttır². Eski dünya'da insan,

rezervuar ve kum sineklerinden izole edilen 135 *L.major* izolatında zimodem analizi yapılmıştır. Burada genlerin transkripsiyon ürünleri arasında benzer veya polimorfik olanlar tesbit edilmiştir. Böylece insanlarda hastalık yapan ajanların rezervuarı, vektörü ve coğrafik nitelikleri belirlenmiştir. Aynı coğrafik alanda, insanda hastalık yapan *L.major* ile kemiricilerdekiler arasında benzerlik bulunmuştur. Böylece hastalık akışının kontrol altına alınması kolaylaştırılmıştır⁴². En güvenilir karakterizasyon, tür veya populasyon farklarını ortaya koyan serodem, şizodem ve zimodem'in beraberce uygulanmasıdır^{40,66}.

Yeni ve Eski Dünya kuten ile visceral olgularında *Leishmania* tür veya populasyon içi farklar, kDNA restriksiyon profili ile bulunmuştur. *Leishmania* hücrelerinde küçük halka kDNA, tür ve suşlarda heterojen bir yapı göstermektedir. Monoklonal antikorların kullanıldığı serodem analiz sonuçları, şizodem analiz sonuçları kadar güvenilir bulunmamıştır. DNA buoyant dansite ölçüleri identifikasyon için yeterli bulunmuştur. Bunun yanında Brezilya'da *L.braziliensis* suşları arasında şizodem ve zimodem sonuçları benzerlik göstermiştir^{6,17}. kDNA restriksiyon profili, tür içi farklılıkları açığa çıkartmada yetersiz kalmaktadır. Bundan dolayı nDNA'ya (nükleer DNA) kayılmıştır. *Leishmania* populasyonunda DNA restriksiyon profili var olan polimorfizmi gösterebilir. Populasyon içindeki DNA benzerliği suşlar arası akrabalığı yansıtır. Farklılıklar ise, populasyondaki çeşitliliği verir. Bu amaçla nDNA, kDNA'dan daha geniş amaçlı kullanılabilir (örn., suş tanımlanması). Profillerin istenen fragman yönünden taranmasında kullanılan proplar genomik ve cDNA kütüphanelerinden elde edilir. DNA'ya dayalı teknikler Southern blotlamadan *in situ* hibridizasyona (FISH) kadar yayılım gösterir⁵². nDNA'nın hibridizasyonunda tübülün geni (mikrotübül yapımında kullanılan tübülün proteini yapımından sorumlu gen) ile ısı şok genleri (hücreyi ısı değişiminden koruyan proteinlerin yapımından sorumlu) prob olarak kullanılırlar. Çok küçük değişimleri net olarak verirler. Yapılan araştırmada eski dünya leishmaniaları ile hibridize olan proplar, yeni dünya'nın *L.chagasi* suşlarıyla hibridize olmadıkları saptanmıştır⁵⁴.

Seçilen bazı proplar (PDK10, PDK20), *L.aethiopica*, *L.major*, *L.tropica* ve *L.donovani* kompleksi ile hibridize olurlar. Bu türler farklı coğrafya'da bulunurlar, ancak DNA'larının benzer fragman verdiği görülür. Bu farklılıklar kDNA analizi

ile belirlenemediği ifade edilmiştir. Total DNA izole edilerek, DNA nükleazlarla kesilir ve elektroforez sonrası blotlanarak hassas problemlerle analiz edilir. Bu durum tanımlamada, büyük başarı elde edilmiştir^{8,18}.

Peru'lu hastalardan izole edilen örneklerin genomik DNA'ları alınarak değişik restriksiyon endonükleazlarla kesilmiş ve β -tübülün geni ile major yüzey antijen geninden hazırlanan gp63 problemleriyle taranmıştır. *L.b.brasiliensis*, *L.b.guyanensis* ve *L.b.panamensis* referans suşlarının β -tübülün geni fragmanlarıyla karşılaştırılmışlardır. Bu parazitlerin β -tübülün geni yönünden heterojenite gösterdikleri belirlenmiştir. Bu çalışma ile Peru izolatlarının *L.b.guyanensis* referans suşuna benzedikleri tesbit edilmiştir. Oysa aynı izolatlar üzerinde yapılan serodem ve şizodem sonuçlarına göre, *L.braziliensis*'e benzedikleri gösterilebilmiştir. Bu iki teknikle bu suşların hepsinin homojen olduğu da belirlenmiştir. Böylece nDNA sonuçları daha sensitif bulunmuştur⁶⁷.

Değişik moleküler tekniklerle, aralarında ilişki kurulamayan *L.major*, *L.tropica*, *L.aethiopica*, *L.donovani* ve *L.gerberi*'nin total DNA'sının PstI fragmanlarının, 7.059 baz çift'lik bir proba (*L.infantum*'un cDNA'sından seçilen rekombinant DNA probu) taranması sonucu akraba oldukları tesbit edilmiştir²⁰. *Trypanosoma cruzi*, total DNA'sı kullanılarak moleküler çalışma yapılmış ve total DNA Hinfl'le kesilerek DNA profili çıkarılmıştır. İzolatlar arasındaki heterojenite bu şekilde hassas olarak ortaya konmuştur. Aynı şekilde kDNA'ları izole edilip aynı enzimle kesildiğinde her iki çalışmanın profil sonuçları benzer bulunmuştur. Böylece izolasyonu zor, pahalı ve zaman alıcı kDNA'dan vazgeçilerek total DNA'ya dönülmüştür. Total DNA profili için 5 ml kültür yeterli bulunmuştur⁵³. Körfez savaşı sırasında; Suudi Arabistan, Güney Irak, Kenya ve Kuveyt'te konuşlandırılan Amerikan askerlerinde kütan leishmaniasis ve özellikle Kenya'daki askerlerde *L.tropica*'nın viskerotropik olduğu zimodem analizi ile belirlenmiştir⁶⁸. Ekvador'da kütan leishmaniasis ajanı olarak izole edilen *L.major* benzeri örneklerde PFGE ve Southern blot hibridizasyonu ile moleküler karyotipleme yapılmıştır. Bunlar arasındaki farklar açık bir şekilde belirlenmiştir. En küçük kromozomun 240 kb olduğu da belirlenmiştir. Bu analiz tür ve suşlar arası karyotip ilişkilerini açığa çıkarılabilmektedir. Bu yöntem özellikle epidemiyolojik çalışmalarda yararlı bulunmuştur. Altmış-seksen saniye

aralıklarla verilen akım kromozomların 900 kb büyüklüğünde olduğunu gösterirken, 100 saniyelik aralıklarla verilen akım ise kromozomların 240-1100 kb arasında serpiştiğini göstermiştir. Aynı teknikler farklı coğrafyalarda kromozomlar arası değişiklikleri göstermiştir. Bununla beraber bu yöntem karmaşık ve pahalı ekipman gerektirmektedir^{8,62}. Moleküler tekniklerde problem kültüredir. Hatta bazı suşlarda tamamen mümkün değildir. DNA'ya dayalı teknikler, fenotipe dayalı tekniklerden daha hassastır. Ancak virulans ve patojenite'nin belirlenmesinde zimodem analizi kullanılmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda DNA analizine dayalı Southern blotlama kullanımı çok verimli bulunmuştur. Bu yöntemle örneğin *L.major* ile *L.arabica* türleri gibi populasyon içi farklılıklar açığa çıkarılır. Eski dünya kuten suşları arasındaki farklılıklar *L.major*'den elde edilen pDK10 probu ile taranmaktadır (Bu prob *L.major* genomik DNA'sı (MHOM/SN/00/DK1) PstI'le kesilir, %0.7 agarozla separe edilir ve fragman pUC18 plazmidine klonlanır. pDK10 ile *L.major*, *L.tropica*, *L.infantum* ve *L.aethiopica* arası farklar çıkarılabilmektedir^{7,35,69}. *In situ* hibridizasyon yönteminde kullanılan non-radyoaktif total DNA problemleri ile 4-6 saatte leishmania klasifikasyonu yapılabilmektedir⁵⁸. nDNA problemlerinin en büyük yararı, türler arasında akrabalık ilişkilerini moleküler olarak ortaya koymasındır. Jelde profilleri çıkan parazitlerin birbirleriyle ve referanslarla karşılaştırılarak tür, suş ve populasyon seviyesinde heterojenite ve homojenite'ye bakılır^{18,38,70}. Son zamanlarda Leishmania parazitlerinin identifikasyonu için RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA-PCR) tekniği kullanılmaktadır. Rastgele primer kullanıldığından DNA'nın bir çok fragmanı çoğaltılarak, bunları karşılaştırılma olanağı doğmaktadır^{69,71-73}.

2.8. Total DNA İzolasyonu ve Purifikasyonu

Parazit hücrelerinden DNA'nın izolasyonu için önce hücre parçalanır. Bu işlem için; 1. Mekanik parçalama (sonifikasyon) veya 2. Enzimik (bir deterjan yanında proteinaz-K veya pronaz) parçalama teknikleri uygulanır. Sonraki aşama deproteinizasyondur. Bunun için DNA süspansiyonları fenol-kloroform işlemine tabi tutulur ve ardından diyaliz ile saflaştırılıp DNA'lar etanolle presipite

edilir^{8,74,75}. *Trypanosoma cruzi* total DNA'sı 5×10^9 epimastigotun Morel et al⁶¹ prosedürüne göre lizis tamponunda sarkozil-proteinaz-K ile parçalanması esasına dayanır. Pankreatik RNaz ile RNA giderildikten sonra fenol-kloroformla purifiye edilir ve LiCl varlığında etanolle presipite edilir. Etanol içinde, kullanıma kadar -20°C 'de saklanabilir⁵³. Promastigotlar lizis tamponunda karıştırıldıktan sonra SDS-pronaz katılır. Fenol-kloroform ile deproteinize edilir. Etanolle presipite edilir ve TE tamponda eritilerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanır^{12,35}. İnsan tam kanından eritrosit hücreleri giderildikten sonra, nükleuslu hücreler lizis tamponu içinde SDS-pronaz veya proteinaz-K varlığında parçalanır. Proteinler, NaCl varlığında protein-SDS-NaCl çökeleği şeklinde santrifüjle ayrılır. Burada fenol kullanılmaz. Bu yöntemle elde edilen DNA restriksiyona ve hibridizasyona oldukça elverişlidir⁷⁶. Elde edilen DNA, hangi yöntemle olursa olsun istenmeyen SDS, tuz, protein vb. ajanlar içerebilir. Bu maddeler sezyum klorür gradienti, diyaliz veya filtrasyon ya da fenolle giderilemez ve restriksiyon kesimini inhibe edebilirler. Tam restriksiyon kesimi için DNA'nın ammonyum asetat ve etanolle presipite edilmesi gerekir. Bu işlem 3 defa tekrar edildiğinde, kesimde kullanılacak restriksiyon endonükleazdan tasarruf edilmiş olur^{77,78}.

2.9. Total DNA'nın Restriksiyonlarla Kesilmesi

Leishmania genomik DNA'sı PstI, PstI+PvuI, PvuI ve Aval gibi nükleazlarla kesilmiş ve özgün problarla taranmıştır⁷⁹. Total DNA; BamHI, EcoRI, HindIII ve HpaI ile 3U enzim/ μg DNA olacak şekilde 4 saat süreyle kesimi tamamlanır⁵⁸. Total DNA; Sall, KpnI, SacI, HindIII, PstI ve SphI'le kesilmiş özgün problarla taramalar yapılarak tür, suş veya populasyonlar arası farklar/benzerlikler belirlenmiştir¹⁸. Total DNA ($10 \mu\text{g}$) 4 saat boyunca 5U/ μg DNA enzimle kesilmiş ve bu kesim 50 μl reaksiyon hacminde yapılmıştır⁸. Peru'dan izole edilen izolatların genomik DNA'ları Smal, ApaI, MluI, Sall, HinfI, XhoI ve PvuII ile kesilmiştir. Daha sonra elde edilen fragmanlar, *L. major*'dan alınıp pBS10Rb-1 plazmidine klonlanan 2.2 kb'lık EcoRI-gp63 fragmanı ile *L. major* cDNA'sından alınıp pP121/3 plazmidine klonlanan 0.85 kb'lık EcoRI- β -tübülün fragmanı tarafından taranmıştır. Referans suşlar olarak *L.b.brasiliensis*,

L.b.guyanensis ve *L.b.panamensis* kullanılmıştır⁶⁷. Rusya'da total DNA PstI'le kesilmiştir^{11,20}. *Trypanosoma crusi* total DNA'sı (3µg) HinfI ile 20 µl'lik reaksiyon hacminde kesilmiştir⁵³. *L.infantum* total DNA'sı PstI ile kesilmiş ve 4.3 kb'lık tekrar fragmanı, Bluescript II SK plazmidine (pACYC184, Stratagene-USA tarafından üretilmiştir) klonlanmış ve daha sonra bu vektör E.coli JM101 bakterisine transforme edilmiştir. Bakteride amplifiye edilen bu fragman, PstI'le çıkarılmış ve ³²P ile rastgele oligonükleotid primer kullanılarak DNA etiketleme (random oligonucleotid priming DNA işaretleme) yöntemi ile işaretlenmiştir. HaeIII, RsaI, Sau3A ve PstI'le kesilen fragmanlar Southern blotlandıktan sonra, nitroselüloz membran üzerinde 4.3 kb'lık proba taranmıştır. Ayrıca 140 bp'lik fragman veya değişik boyutlarda DNA fragmanları total DNA üzerinden PCR'la doğrudan çoğaltılabilmektedir^{13,60}. Total DNA, 8 µg, 50 µl'lik reaksiyon hacminde, her µg DNA başına 5'er Unite PstI ve PvuII verilerek 4 saat boyunca kesilmiştir^{12,35,80}.

2.10. Total DNA'nın Elektroforezi

L.major kromozomları, %1.5 agaroz jelinde kesikli alan jel elektroforezi (PFGE) ile fraksiyonlarına ayrıştırılır. Total DNA'nın PstI'le kesildiğinde 1.5-7.8 kb'lık fragmanlara ayrıldığı görülmüştür⁷⁹. BamHI, EcoRI, HindIII ve HpaII restriksiyonlarıyla kesilen total DNA, %0.7 Na-asetat agaroz jeli ile sabit akım altında bir gece boyunca koşturulmuştur. Burada kullanılan tampon sürekli sirküle edilmiştir. Southern blotlamanın ardından prob hibridizasyonu uygulanmıştır⁵⁸. OFAGE (Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis, altılı alan değişimli jel elektroforezi), FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis, ters alan jel elektroforezi) ve PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis, kesikli alan jel elektroforezi) teknikleri kullanılarak DNA ayrıştırılır. Elektroferez %1-1.5 agaroz jelinde yaklaşık 10°C'de 180 V'luk potansiyelde 60-100 saniye aralıklı olarak 35-38 saat kadar koşturulur. *Sacharomyces cerevisae* DNA'sı standart olarak kullanılır^{51,62}. Genomik DNA beş değişik restriksiyonla kesildikten sonra agaroz jelinde 2-3 saat koşturulur⁶⁷. Başka bir çalışmada total DNA, EcoRI'le kesildikten sonra, %0.7-1 agarozda yürütülür (referans DNA molekülü olarak

izole pBR322 plazmid DNA'sı kullanılmıştır)^{20,52} *T. cruzi* DNA'sı HinfI ile kesilmiş ve %0.8 agarozda koşturulmuştur⁵³. Visseral Leishmania ajanlarının nDNA'ları HindIII+BamHI ve PstI ile kesildikten sonra %0.7 agaroz jelinde koşturulmuş ve daha sonra blotlanmıştır. DNA'nın jelde 0.6-23 kb olarak fraksiyonlandığı görülmüştür^{7,8,35,81}. Ayrıca total DNA restriksiyon bandları jel üzerinde artefaktli olarak görülebilmektedir³⁶.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Besiyeri Standardizasyonu

Bu çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar hakkında bilgiler EK.1 ve EK.2'de bulunabilir.

Çalışmamızda izolatif ve kültür amaçlı kullanılacak besiyerlerini tespit etmek amacıyla Prof. Dr. Jorge ALVAR (Madrid, İspanya) ve Prof. Dr. Margarita V. STRELKOVA (Martinovski Enst., Moskova, Rusya)'dan sağlanan;

L.infantum (MHOM/DZ/82/LIPA-59,LEM-417), *L.tropica* (MHOM/SU/74/K-27), *L.donovani* (MHOM/IN/80/DD-8), *L.major* (MHOM/SU/73/5-ASKH), *L.infantum* (MHOM/FR/78/LEM-75), *L.infantum* (MHOM/ES/90/LEM-2205), *L.turanica* (MRHO/SU/83/KD-51), *L.turanica* (PHCAY/CN/95/PH-40), *L.turanica* (MRHO/SU/Clone-3720), *L.gerbilli* (MRHO/CN/60/gerbilli), *L.turanica* (MRHO/SU/86/TSH-III), *L.arabica* (MPSM/SA/84/JISH-220), *L.major+L.turanica* (MRHO/SU/95/9537), *L.major* (MRHO/SU/59/Nealp) referans suşları kullanıldı.

Defibrine tavşan kan kaynaklı 4 değişik bifazik besiyeri ve 1x RPMI-1640 monofazik besiyerleri hazırlandı. 10x RPMI-1640'ı, 1xRPMI-1640'a dönüştürmek için 24 mM NaHCO₃ (EK.1.8), 2mM L-glutamin (EK.1.6), %10 FBS (fetal bovine serum) (EK.1.5) ve 100 µg/ml gentamisin katıldı (EK.1.9). Kullanılan inkübatör karbondioksit kontrollü olmadığından bu besiyerinin 2-3 gün içinde pH'sının arttığı ve bu yüzden üremenin olumsuz etkilendiği görüldü. Bundan sonra besiyeri 25 mM HEPES (pH 8.2) (EK.1.7), 4.76 mM NaHCO₃, 2mM L-glutamin, %10 FBS (Fetal Bovin Serum) ve 100 µg/ml gentamisin katılarak hazırlandı (EK.1.10). Besiyerinin pH'sı yaklaşık 7.0 oldu.

Bifazik besiyerleri; %7.5 defibrine tavşan kanlı klasik NNN (EK.1.1), %15 defibrine tavşan kanlı Senekjle besiyerinin McConell tarafından modifiye edilen Nutrient agarlı bifazik besiyeri (EK.1.2), %10 defibrine tavşan kanlı Evans tarafından modifiye edilen bifazik besiyeri (EK.1.4), %15 defibrine tavşan kanlı %1.2 ve %4.7 Brain Heart İnfüzyon agarlı bifazik besiyerleri (EK.1.3) hazırlandı. Tüm besiyerleri için 10 ml'lik konik tabanlı plastik kültür tüpleri kullanıldı.

Monofazik besiyeri ile bifazik besiyerlerinin pH'ları yaklaşık 7.0 olarak ayarlandı. Bifazik besiyerleri 2'şer ml şeklinde kültür tüplerine dağıtıldı. Tüpler 45°lik açı ile yatırılarak bir kaç saat katılaşmaları sağlandıktan sonra +4°C'deki buzdolabına alındı. Böylece tüplerin yatık agarları üzerinde 50-100 µl yoğun kültür sıvısı oluştu. 1x RPMI-1640 besiyeri ise 2'şer ml şeklinde kültür tüplerine eklendi. Bifazik besiyerlerine örtü sıvısı olarak 0.5 ml %0.9'luk NaCl solüsyonu katıldı. Ekim öncesi, her bir referans kültüründen 100 µl hücre süspansiyonu alınıp 1.9 ml %0.9 NaCl solüsyonu ile seyreltildi. Bu seyreltmeler ayrı ayrı Thoma lamı ile sayılarak başlangıç hücre yoğunlukları belirlendi (EK.1.15). Sayım sırasında promastigotların hareketini durdurmak için %2 formalinli PBS, pH7.2 (EK.1.11) kullanıldı. Her bir besiyerine belli sayıda hücre ekildi. Karışım sağlandıktan sonra 24°C'de inkübe edilerek 6.günde tüm kültür tüplerinin hücre sayımı yapıldı. Bu çalışmaya ait sonuçlar Çizelge 1' de görülmektedir.

3.2. İzolasyon

3.2.1. Deriden Örnek Alımı

Deri leishmaniazisi belirtileri ile ÇÜ Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi (GEM) ile ÇÜ Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalına gelen hastalardan, iğne aspirasyonu tekniği ile amastigot içeren örnekler alındı. Söz konusu teknik laboratuvarımızı ziyaret eden Prof. Dr. MV STRELKOVA ile çalışıldığı şekilde geliştirildi. Aseptik şartlara uyularak kapalı lezyon %70 alkolle tamamen silindi ve kuruması için kısa bir süre beklendi. Açık lezyonda ise, sadece çevresi dezenfekte edildi. 26 nolu iğnesi olan 1 ml'lik tuberkülin şırıngasına 1000 µg/ml gentamisin içeren 100 µl'lik PBS, pH 7.2, çekildi. İğne ucu, lezyonun papül ile sağlam deri arasına yüzeysel olarak sokuldu. İğne deri içinde çevrilerek deri dokusundan parçalar ayırması sağlandıktan sonra, şırıngadan lezyon içine yavaşça PBS verildi, aspirasyon sağlandı. İğne haznesine bulanık veya hafif kanlı bir sıvı gelene kadar aspirasyona devam edildi. İğne yeri değiştirilerek işlem bir kaç kez tekrar edildi.

3.2.2. İlk İzolasyon ve Adaptasyon

Deri lezyonlarından alınan 100 µl aspirat, daha önceden hazırlanan Modifiye Evans bifazik yatık agar besiyerine (EK.1.4) aseptik şartlara uyularak bakteriyolojik kabin içinde yoğun kültür sıvısına inoküle edildi. Yatık agarda örtü sıvısı olarak, ya besiyerinin yoğun kültür sıvısı veya bidistile su kullanıldı. Yoğun kültür sıvısı az ise, buraya 100 µl kadar steril bidistile su verildi. İyice karıştırılıp amastigot taşıyan tüpler 24°C sıcaklıktaki karbondioksit kontrolü olmayan etüve kaldırıldı.

İğne aspirasyonu sonrası, iğne giriş yerinden dışarı sızan kandan ince yayma yapıldı. Immersiyon objektifi altında amastigot taraması yapıldı. Bu tarama kültür takibi için önem arz etmektedir. Kültür tüpleri 21 gün süreyle 24°C'de tutuldu. Promastigot kontrolü, 7.günde alınan 25 µl kültür sıvısının mikroskopta (10x/40x objektif) incelenmesine dayanmaktadır. Promastigotlar tesbit edildikten sonra, hücre aktivitesine bağlı olarak örtü sıvısına 5 mM olacak şekilde glukoz ilave edildi. Zaman zaman laboratuvarımızda hazırladığımız tavşan kan lizatından %0.5 kadar ekleme yapılarak, promastigotların hızlı üremeleri sağlandı.

Aspirat sonrası alınan kan yaymasında bulunan amastigotlar boyandı ve mikrometrik lam ile boyutları ölçüldü. Ayrıca yoğun kültür sıvısında tespit edilen promastigotlardan preparat hazırlanarak, boyamaları yapıldı (EK.1.16). Bunların da boyutları ölçüldü (Şekil 1).

Ciddi gayret sarfedilen bu aşamada parazitler adapte olmadıkça pasaja alınmadı. Üremede gelişme görüldüğünde (9-14 gün sonra) hem aynı modifiye Evans bifazik besiyerine hem de %15 tavşan kan lizatı içeren 1x RPMI-1640'a hücre konsantrasyonuna göre 100 µl kadar kültür sıvısı pasajlandı. Her dört günde bir defa subkültür kontrolü yapılarak hücre yoğunluğuna bakıldı. Yoğunluk beklenen düzeye geldiğinde, promastigotlar 25 ml'lik 1x RPMI-1640'a alındı. Subkültür (1.pasaj) hem kriyo hem de biyokütle için başlangıç amaçlı kullanıldı.

3.3. Büyük Hacimde Kültür

Biyokütle için 25 mM HEPES (pH 8.2), 4.76 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamin, %10 FBS ve 100 µg/ml gentamisin içeren 1x RPMI-1640 (yaklaşık pH 7.0) kullanıldı (EK.1.10). İlk izole edilen Leishmania izolatu, 9-14 gün sonra 2 ml'lik %15 tavşan kan lizatu içeren RPMI-1640'a pasajlandı. Yedinci günde kontrol edilerek beklenen sayıya gelindiği ve hücre aktivitesinin iyi olduğu anlaşıldığında, 10⁴ hücre/ml olacak şekilde içinde 5 ml %15 tavşan tam kan lizatu içeren 50 ml'lik plastik kültür tüpüne pasajlandı. Üçüncü günde bu besiyerine yukarıda formülü verilen sade 10 ml 1x RPMI-1640 ilave edilip karıştırıldı (EK.1.10). Altıncı günde ise 10 ml daha 1x RPMI-1640 ilave edilerek hacim 25 ml'ye tamamlandı. Total DNA için üremenin geç log fazındaki hücreler kullanıldı.

3.4. Üreme Eğrisinin Çıkarılması

Moleküler çalışma için gerekli hücreler, üremenin geç log fazında iken en yüksek sayıda bulunmaktadırlar. Oysaki kriyoprezervasyon için genç hücreler gerekmektedir. Bunlar da ancak log fazından elde edilir. Üreme eğrisinin çıkarılması için, referans suşlardan *L.tropica* (MHOM/SU/74/K-27) ve *L.infantum* (MHOM/TN/80/IPT-1) kullanıldı. Eğri, sade 1x RPMI-1640 (monofazik, EK.1.10) ve klasik NNN'de (bifazik, EK.1.1) çıkarıldı. Her besiyeri için 3'er adet 2'şer ml'lik besiyeri içeren kültür tüpleri kullanıldı. Her iki suş için %0.9 NaCl içinde stok hazırlandı. Stoktaki promastigot sayısı Thoma lamı ile tesbit edildi. Daha sonra *L.tropica* (MHOM/SU/74/K-27) suşundan, klasik NNN ve 1x RPMI-1640'a 6.24x10⁴ hücre/ml olacak şekilde aşılama yapıldı. *L.infantum* (MHOM/TN/80/IPT-1) suşundan ise aynı besiyerlerine 6.048x10⁴ hücre/ml olacak şekilde inoküle edildi. Hergün eş zamanlı kültür tüplerinden 25 µl alınıp, içinde 175 µl %2 formalinli PBS (EK.1.12) içeren Eppendorf tüplerine konarak karışım sağlandı. Sulandırılan (1/8) ve hareketleri durdurulan promastigotlar Thoma lamına alınarak sayımları yapıldı (EK.1.15), değerler

kaydedildi. Takip, 21 gün boyunca sürdürülerek; log, stasyonere ve iniş fazları belirlendi. Bu çalışma ile ilgili sonuç Çizelge 2 ve Şekil 2'de verildi.

3.5. Çeşitli Lizatlarla Modifiye Edilen Besiyerlerinde Populasyon Taşıma Kapasiteleri

Bir ml kültür başına düşen hücre sayısını arttırmak ve üreme eğrisinin periyot sürelerini kısaltmanın amaçlandığı çalışmalarda 1x RPMI-1640 monofazik besiyeri baz olarak alındı (EK.1.10). Modifiye Evans Bifazik besiyeri; kullanıldı (EK.1.4). Ayrıca insan ve tavşan tam kan lizatları (Pseudo-EBLB, Evans Blood Lysate Broth, Yalancı Evans Kan Lizatı; EK.1.13), hazırlanan 1x RPMI-1640'a eklenip modifiye besiyerleri elde edildi. Kontrol olarak sade 1x RPMI-1640; %15 inaktif tavşan tam kanlı 1x RPMI-1640; %15 tavşan-EBLB lizatlı 1x RPMI-1640; %15 insan-EBLB lizatlı 1x RPMI-1640 besiyerleri hazırlandı. Tüm kültür tüplerine 2'şer ml besiyeri ve her seri için 3'er tüp kullanıldı. *L.tropica* (MHOM/SU/74/K-27) ve *L.donovani* (MHOM/IN/80/DD-8) referans suşları kullanılarak bunların başlangıç hücre sayıları tesbit edildi. Bifazik besiyerine *L.tropica*'dan (MHOM/SU/74/K-27) 4×10^5 hücre/ml, *L.donovani*'den (MHOM/IN/80/DD-8) 4.8×10^5 hücre/ml şeklinde ekim yapıldı. Takip eden günlerde (4., 6., 7., 8., 10., 12., 14. ve 16.) 25'er µl alınıp Thoma lamı ile sayıldı ve sonuçlar kaydedilerek karşılaştırmaya geçildi. İlgili sonuçlar Çizelge 3'te görülmektedir.

3.6. Mitojen Maddenin Üremeye Etkisi

Mitotik stimülatör olarak bilinen PHA-L'nin (Phytohaemagglutinin-L, EK.1.14) leishmania promastigotlarının üremelerini hızlandırıp hızlandırmadığı incelendi. Bu amaçla 1x RPMI-1640 (EK.1.10) besiyeri ve *L.major* (MHOM/SU/73/5-ASKH) promastigotları kullanıldı. Stok hücremiz 7×10^5 hücre/ml'dir. Kontrol 1x RPMI-1640'a mitojen (PHA-L) katılmadı. Tüm besiyerleri 1'er ml olarak 10 ml'lik tüplere dağıtıldı. Her konsantrasyon için 3 adet tüp hazırlandı. Stok PHA-L'den, 1.gruba 1 µg/ml, 2.gruba 3 µg/ml, 3.gruba

5 µg/ml, 4.gruba 8 µg/ml, 5.gruba 15 µg/ml PHA-L katıldı. Her bir tüpe yaklaşık 7×10^4 hücre verildi. İnkübasyon sırasında her iki günde bir Thoma lamı ile sayım yapılarak hücre sayıları karşılaştırıldı. Sonuçlar Çizelge 4'te verilmiştir.

3.7. Üreme Atmosferine NaHCO_3 'ın Etkisi

Beş adet 10 ml konik tabanlı plastik kültür tüpüne 2'şer ml NaHCO_3 taşımayan 1x RPMI-1640 (EK.1.10), 5 ayrı tüpe 4.76 mM NaHCO_3 içeren 1x RPMI-1640 ve 5 ayrı tüpe 24 mM NaHCO_3 içeren 1x RPMI-1640 katıldı. Her tüpe 10^5 hücre/ml olacak şekilde *L.tropica* (MHOM//SU/74/K-27) promastigotu aşılandı. İnkübasyona (24°C) bırakıldı. Yedinci ve 12. günlük kültürden 25'şer µl alınıp 175'şer µl %2 formalinli PBS içinde karıştırıldı ve Thoma lamı ile sayımlar yapılarak ilgili sonuçlar alındı. Bu çalışmanın Sonuçları Çizelge 5'te verilmiştir.

3.8. Kriyoprezervasyon

Üreme eğrisini belirledikten sonra, log fazına gelen leishmania örneklerinden 460 µl hücre süspansiyonu alınarak 1.8 ml'lik kriyo tüplerine transfer edildi. Bunların üzerine steril 40 µl %87'lik gliserol (EK.1.17) eklendi ve köpürmeye meydan vermeden yavaşça karıştırıldı. Burada son gliserol konsantrasyonu %7.5 oldu. Kriyoprotektanlı ve etiketlenmiş tüpler +4°C'ye alınarak yaklaşık 30 dakika bekletildi. Sonra -20°C'de yaklaşık 30 dakika, -70°C'de bir gece bekletmenin ardından -196°C'lik sıvı azota alındı. Böylece aşamalı soğutma uygulanmış oldu. Bu şekilde elde edilen örneklerden, başta Adana il merkezi olmak üzere Kozan, Düziçi, Karaisalı gibi yöre kaynaklı olanlar, bundan böyle "Çukurova izolatları/örnekleri", Şanlıurfa ve yöresi kaynaklı olanlar ise "Şanlıurfa izolatları/örnekleri" adı altında anıldı (EK.1.38). Kriyodaki hücrelerle çalışılacağı zaman, kriyo tüpü sıvı azottan çıkarılınca bekletilmeden 37°C'lik su banyosuna alındı ve hızlı çözünmesi sağlandı. Ardından çözünen hücre süspansiyonundaki gliserolün veya DMSO'nun (dimetil sülfoksit) etkisini azaltmak amacıyla, hücreler 10 ml'lik taze 1x RPMI-1640'ta yıkandı. Hücre pelleti 0.5 ml 1x RPMI-1640 içinde yeniden süspanse edilerek,

buradan hem modifiye Evans bifazik besiyerine hem de 1x RPMI-1640 besiyerine pasajlandı, üremesi için kültüre bırakıldı.

3.9. Hücre Toplama ve Yıkama

Moleküler çalışmalarda kullanılacak hücreler, eğrinin geç log fazında, üreme eğrisinin yaklaşık 14. gününde 4.000 rpm ve 10 dakika süre ile toplandı. Hücre pelleti, iki defa %0.9 NaCl solüsyonu ve son olarak SET tamponunda (EK.1.23) yıkandıktan sonra, santrifüj edildi. Pelet halinde kullanılabilece kadar - 20°C'de tutuldu. Laboratuvar koşullarımıza göre stasyoner fazda $3-4 \times 10^7$ hücre/ml'e ulaşılabilmektedir. Büyük kültür hacmi 25 ml'de olduğuna göre $7.5 \times 10^8-10^9$ hücre elde edilebilmektedir.

3.10. Total DNA İzolasyonu

Total DNA'nın izolasyonu için çok değişik yöntemler bulunmaktadır. Bunlardan biri olan ve çalışmamızda kullanılan Gomez-Eichelmann et al⁵¹ yönteminde, 10^9 promastigot peletine 728 l SET lizis tamponu (EK.1.23) katılarak süspanse edildi. 40 l %10 SDS (EK.1.22), 32 l pronaz (EK.1.24) katılıp karışım sağlandı. İki saat süre ile 37°C'de tutularak hücre lizati elde edildi. Lizat, 400 l olacak şekilde iki adet 1.5 ml'lik Eppendorf tüpüne bölündü. Bu iki tüpe, iki ayrı metod uygulandı.

Tüplerden birine Gomez-Eichelmann et al⁵¹'a ait "fenol-kloroform (EK.1.21) ekstraksiyonu" protokolü uygulanarak elde edilen DNA, 100 l TE tamponunda (EK.1.25) zld. İkinci tüpe Miller et al⁷⁶ "tuz ekstraksiyonu" protokolü uygulandı ve elde edilen DNA 100 l TE'de üzüldü. Her iki yöntemle elde edilen DNA'ların spektral analizi ile DNA verimleri ve saflıkları belirlendi. Elde edilen değerler karşılaştırıldı. Sonuç izelge 6'da verilmiştir.

3.11. Total DNA İzolasyon Protokolü

Fenol ve tuz ekstraksiyon protokollerinin kombinasyonu ile elde ettiğimiz, kendi koşullarımıza en uygun olduğunu belirlediğimiz modifiye yöntemle göre uygulanan DNA izolasyon ve purifikasyon protokolü:

- a) -20°C'de tutulmakta olan hücre peletine (yaklaşık 10^9 hücre) 300 µl SET tamponu eklenerek pipetaj yapıldı.
- b) Hücre süspansiyonuna 17 µl %10 SDS (son konsantrasyon %0.5), 17µl 10 mg/ml pronaz (son konsantrasyon 500 µg/ml) ilave edildi. Böylece lizis reaksiyon hacmi pelletle beraber 340 µl oldu.
- c) Karışım 60°C'de 3 saat tutuldu. Ara sıra karıştırıldı.
- d) Hücre lizatı önce +4°C'de 5 dakika tutulduktan sonra oda sıcaklığına gelmesi için bırakıldı.
- e) Lizat, 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre kalıntıları ve partikülleri çöktürüldü.
- f) Üst DNA fazı alınarak üzerine 6M NaCl (EK.1.20) çözeltisinden 85 µl eklendi (son konsantrasyon 1.2 M NaCl). Vorteks üzerinde 15 saniye karıştırıldı.
- g) Tuzlu DNA solusyonu +4°C'de 5 dakika tutuldu.
- h) 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek protein ve diğer hücre kalıntıları SDS-NaCl-protein presipitatu olarak uzaklaştırıldı. Bu aşama iki kez tekrarlandı. Ancak çöktürme öncesi DNA solüsyonu buzda 5-10 dakika tutuldu
- j) Alınan süpernatant üzerine 2 hacim % 95 etanol eklendi. Yavaş yavaş tüp alt üst edilerek DNA presipitatu elde edildi.
- k) Presipitasyonun tamamlanması amacıyla -20°C'de bir gece tutuldu.
- l) 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- m) DNA peleti kurutularak üzerine 200 µl TE eklenip çözüldü. DNA'nın tamamen çözünmesi için oda sıcaklığında yaklaşık 2 saat bekletildi.
- n) 200 µl DNA solüsyonuna 100 µl 7.5M NH₄OAc (son derişimi 2.5M) eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dak inkübe edildi.
- o) Üzerine 2 hacim %95 etanol eklenerek, alt üst edildi ve -20°C'de 1

- saat tutuldu.
- p) 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü.
Supernatan atıldı.
- r) DNA peleti kurutulup üzerine 200 µl TE tamponu (pH 8.0) eklendi. Bu hali ile oda sıcaklığında 2 saat tutuldu.
- s) Süre bitiminde 2.kez 100 µl 7.5 M NH₄OAc eklendi. Karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Üzerine 2 hacim %95 etanol eklenerek, alt.üst edildi.
- t) -20°C'de 1 saat tutuldu.
- u) 12.000 rpm'de 15 dakika santrifuj edilerek DNA çöktürüldü.
- v) DNA, %70 etanolle yıkandıktan sonra 12.000 rpm'de 10 dak santrifüj edildi. Üst faz atıldı. DNA peleti kurutuldu.
- y) Kuruyan DNA, 110 µl TE tamponunda eritildi. Birkaç gün sonra 260 ve 280 nm dalga boylarında spektral analizleri yapıldı.

3.12. Total DNA'nın Spektral Analizi

Toplam 1 ml'lik 4 kuars küvetle çalışıldı. Önce hepsine birer ml, DNA'nın daha önceden içinde eritildiği tampon solüsyonu (TE) eklendi. Spektrofotometreye dört kuars küvet yerleştirildi. Körün 260 ve 280 nm'de sıfır değerine karşı, örnek küvetlerin farkları alındı. Köre karşı sıfırın altında okunan değerler, DNA için okunan değerlere eklendi. Köre göre sıfırın üzerinde okunan değerler, DNA için okunan değerlerden çıkarıldı. DNA'mız çift iplikli olduğu için 50 ile çarpıldı (1 cm'lik ışık yolunda çift iplikli DNA için 260 nm'de 1 absorbans ünitesi için konsantrasyon 50 µg/ml'dir. Böylece katsayı 50'dir)^{75,77}. Örnek küvetlerinden 10'ar µl TE tamponu alınıp atıldı. Yerine hücre DNA'larına ait DNA solüsyonlarından 10'ar µl konuldu. Pipetaj yapıldı ve DNA solüsyonunun su ile tam olarak karışması için 5 dakika beklendi. Sulandırım 1/100 oranında yapılmış oldu. 260 ve 280 nm'deki absorbansları alındı. Konsantrasyon için birim hacme düşen DNA miktarı; aşağıdaki formüllere göre belirlendi.

$$1\mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260} \times [\text{seyreltme katsayısı}] \times \text{absorbans unitesix } 10^{-3}$$

$$1\mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260} \times \text{seyreltme katsayısı}/20 = A_{260} \times 100/20 = 5 \times A_{260}$$

$$\text{DNA saflığı} = A_{260}/A_{280}$$

Saf DNA 1.8-2.0 arası çıkmaktadır. Örnek süspansiyonu 1.8'den küçükse proteince zengin, 2.0'dan fazla ise RNA'ca zengin olduğu anlamındadır⁷⁷. Spektral analiz sonuçları Çizelge 7'de verilmiştir.

3.13. Ammonyum Asetatla DNA Purifikasyonunun Önemi

Total DNA izolasyon işlemleri sırasında kurutulan DNA peleti 200 μl TE'de çözüldü. Bu arada, eğer bir DNaz aktivitesinden şüphelenilirse DNA solüsyonu 65°C'de 10 dakika inkübe edildi. Tamamen çözününce üzerine 100 μl 7.5 M NH_4OAc (EK.1.26) katılarak (son konsantrasyon 2.5 M) 5 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Üzerine 2 hacim % 95 etanol eklendi ve tüp yavaşça alt üst edildi. DNA'nın presipite olması için -20°C'de 1 saat tutulduktan sonra 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Presipite DNA kurutulduktan sonra, işlem ikinci kez tekrarlandı. Presipite DNA %70 etanolle yıkandıktan sonra kurutuldu ve 110 μl TE tamponunda çözüldü. Yaklaşık 48 saat sonra spektral analize alındı. Bu çalışmanın sonuçları Çizelge 8'de görülmektedir.

3.14. DNA'ların Restriksiyon Endonukleazlarla Kesim Hacmi

DNA'nın kesilmesinde, DNA miktarına karşı enzimin ünite cinsinden miktarı önemlidir. Genelde "1 μg λ DNA'sını 50 μl reaksiyon hacminde 37°C'de 1 saat süre ile kesen enzim miktarı 1 ünite"dir^{75,77}. Eğer DNA solüsyonunda fenol, kloroform, eter, tuz, SDS, protein gibi komponentler varsa, restriksiyon endonukleazlar inhibe olur. Tam saf DNA, proteolitik enzimler ile proteinlerin parçalanmasının ardından, DNA'nın jel filtrasyonundan geçirilmesi ile elde edilir. Ancak bu çalışmada, DNA'yı proteolitik enzimlerle işleme tabi tuttuktan sonra,

reaksiyon ortamını fazla sarırmamak için saflığı bozan maddelerin eliminasyonu amonyum asetatla yapıldı.

Optimum reaksiyon hacminin belirlenmesi çalışmalarında *L.tropica* (MHOM/SU/74/K-27) referans suşundan elde edilen total DNA solüsyonu (0.6-0.7 µg/µl) başlangıç materyali olarak kullanıldı. İlk olarak, her kesim için 5 µg DNA ve her bir µg DNA başına 5 U enzim kullanıldı. Bu değerler sabit tutularak 20, 30 ve 40 µl'lik reaksiyon hacimleri hazırlandı. Enzim olarak EcoRI kullanıldı. Buna göre 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerine, aşağıdaki gibi eklemeler yapıldı;

	<u>A(20 µl)</u>	<u>B(30 µl)</u>	<u>C(40 µl)</u>
DNA	8 µl (5 µg)	8 µl (5 µg)	8 µl (5 µg)
Bidistile su	9 µl	18 µl	27 µl
10x buffer	2 µl	3 µl	4 µl
Enzim (25 U/µl)	1 µl	1 µl	1 µl

Tüpler nazıkçe karıştırıldı, 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapılarak tüp duvarında kalan içerikler dibe çöktürüldü ve 37°C'de, 4 saat İnkübe edildi. Reaksiyonlar 5x takip-stop karışımı (EK.1.27) ile durduruldu. Daha önceden hazırlanan %1 agaroz jelinde (EK.1.30) her bir kuyuya her bir reaksiyon karışımından yaklaşık 1 µg DNA applike edildi.

Laboratuar koşullarımız için en optimum ve ekonomik kesim işleminin 1 µg DNA başına 3 U enzim olduğu saptandı. Bu değerlerin uygunluğu sağlam ve saf λ DNA'sı EcoRI enzimi ile kesilip elektroforezde koşturulduktan sonra onaylandı. Her enzim kesimi için toplam 2 µg total DNA'nın yeterli olduğu belirlendi.

3.15. Takip-Stop Karışımının DNA Bandlarına Etkisi

DNA moleküllerini daha küçük hacimde toplamak ve jelde daha yoğun ve koyu görüntü elde etmek için sukroz, gliserol veya fikor içeren solüsyonlardan yararlanılır. Ayrıca mevcut proteinlerin (restriksiyon endonükleazlar ve

muhtemel diğerleri) inaktivasyonu için karışımda EDTA ve SDS bulunmaktadır. Migrasyon takibi için Bromofenol Mavis (Bromofenol Blue) ve Ksilen Siyanol (Xylene Cyanol F) kullanılır. Bu karışım çalışma boyunca "takip-stop karışımı" şeklinde anıldı. Yoğunluğu arttırmak amacıyla sukroz veya gliserol yerine Fikol kullanıldı (EK.1.27).

3.16. Agaroz Jel Elektroforezi

Moleküler çalışmalarımızı yürütmek üzere hem agaroz hem de poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) teknikleri kullanıldı. Agaroz elektroforezi için yatay elektroforez tank sistemi kullanıldı. TBE (0.5x) tamponu (EK.1.29) ile hazırlanan agaroz jeli (EK.1.30) 20x15 cm boyutlarında, jel döküm tablasına 0.4 cm kalınlığında döküldü. Hemen ardından tarak yerleştirildi. Belli bir süre (yaklaşık 45 dakika) katılaşması için beklendi. Kuyuların bozulmamasına dikkat edilerek tarak yavaşça yerinden çıkarıldı ve içinde 0.5x TBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Tamponun, jelin biraz üstünde (yaklaşık 1 mm) olmasına dikkat edildi. Örnek DNA'lar kuyulara apliedi. Laboratuvar koşulları göz önünde tutularak elektroforez değişkenlerinin standardizasyonu için agaroz konsantrasyonu, jel kalınlığı, DNA miktar ve hacmi, voltaj ve elektroforez süresi gibi parametreler çalışıldı. Bu çalışmalarımızda örnek olarak *L.tropica* (K-27) referans suşu total DNA'sı ve ϕ x174 virüs DNA-Hae III markeri (EK.1.36) kullanıldı.

3.17. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Küçük DNA bandları acaba daha net görülebilir mi? veya daha küçük band var mı? varsa yakalanabilir mi? ve ayrıca tespit işleminde EtBr (EK.1.28) ile Gümüş boyama (EK.1.33,34) teknikleri arasında fark bulunuyor mu? amaçlarıyla Poliakrilamid Jel Elektroforezi yapıldı. Poliakrilamid Jeli (PAG); %30T, %5C formülasyonuna göre hazırlandı (EK.1.31). λ DNA (2 μ g), *L.tropica* (MHOM/SU/74/K-27) total DNA (5 μ g) ile İnsan genomik DNA'sı (3.4 μ g) 30 μ l reaksiyon hacminde 37°C ve 4 saat süre ile kesildi (EcoRI ile). Aynı anda 2

adet dikey (vertikal) PAG ve bir adet yatay (horizontal) %1 agaroz jeli hazırlanarak aşağıda belirtildiği sıraya göre DNA'lar aplike edildi.

1.kuyu: λ DNA	(100 ng),
2.kuyu: λ DNA	(10 ng),
3.kuyu: K-27 tot. DNA	(500 ng),
4.kuyu: K-27 tot. DNA	(100 ng),
5.kuyu: K-27 tot. DNA	(50 ng),
6.kuyu: K-27 tot. DNA	(25 ng),
7.kuyu: K-27 tot. DNA	(10 ng),
8.kuyu: İnsan genomik DNA	(500 ng),
9.kuyu: İnsan genomik DNA	(100 ng),
10.kuyu: İnsan genomik DNA	(10 ng).

10 μ 'lik aplikasyon hacimleri, içlerinde sıralamanın sağında verilen miktarlarda örnek içerir şekliyle kuyulara yerleştirildi. İki vertikal Poliakrilamid ve karşılaştırma yapabilmek için bir adet horizontal agaroz jeli, aynı güç kaynağına birlikte bağlanarak 5 V/cm akım verildi. PAG'lerinden biri ve agaroz jeli 0.5 μ g/ml EtBr'de, diğer PAG Gümüşle boyandı.

Ayrıca Çukurova örneklerinin HinfI ve HaeIII total DNA fragmanları agaroz jelinde silik band verdikleri görüldü. Bunun üzerine %7 PAG'de koşturularak agarozdan farklı bandlaşmanın olup olmayacağına bakıldı.

3.18. Poliakrilamid Jelinin EtBr ve Gümüşle Boyanması

Daha önce hazırlanmış olan poliakrilamid jeline yukarıda açıklandığı gibi elde edilen kesilmiş DNA'lar aplike edildi. Elektroforez sonrası jellerden biri 1x TBE (EK.1.29) tamponunda hazırlanan EtBr içinde yaklaşık 30 dakika süre ile boyandı. Aynı DNA örneklerini içeren ikinci jel, gümüş boya (EK.1.33) ile boyandı. Gümüş ve EtBr ile boyanan jeller, DNA bandları yönünden karşılaştırıldı.

3.19. Restriksiyon Endonükleazlarla Kesim Programı

Çukurova ve Şanlıurfa bölgesinden izole edilen örneklerin yörelere göre dağılımları ile referans suşların tam listesi EK.1.38'de verilmiştir. Kesim optimizasyonu çalışmalarına uyularak, işlemler 1.5 ml'lik Eppendorf tüpünde ve 30 µl'lik reaksiyon hacminde yapıldı. DNA örneği (2µg) 37°C'lik etüvde, 4 saat kesildi. Tüm kesim aşamalarında çalışandan kaynaklanan DNaz aktivitesini yok etmek amacıyla eldiven kullanıldı. Kesimde kullanılacak enzim ve çalışma tamponu üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda -20°C'den alınıp buz kabına kondu. Her 1 µg total DNA başına 3U enzim gelecek şekilde gerekli hesaplamalar yapıldı. Örnek ve referans sayısı 39 idi (EK.1.38) ve bunların tamamı çalışılan enzimle aynı koşullar altında kesildi. Yine bu çalışma içinde kontrol ve takip amaçlı olarak ticari marker λ DNA-EcoRI (EK.1.35) ile sağlam λ DNA (EK.1.34) ilgili enzimle kesilerek kullanıldı. Olabilecek kayıplar gözönünde tutularak toplam 41 örnek üzerinden hesaplama yapıldı. Her bir örnek için 1.5 ml'lik Eppendorfa sırasıyla su, total DNA ve 8 µl enzim karışımı eklendi. 30 µl'lik reaksiyon hacmine 2 µg total DNA konulduğu için, verilen enzim miktarı 6U ve reaksiyon tamponu (10x) 3'er µl olmuş oldu. Örnek, referans ve λ DNA kesim programı aşağıdaki çizelgede yazıldığı gibi uygulandı.

<u>Kesim Örneği:</u>		<u>EcoRI Karışımı (25U/µl)</u>
Rest. endonükl. enzimi	x µl	10 µl
10xReaksiyon tamponu	123 µl	123 µl
Steril deiyonize su	<u>x µl</u>	<u>195 µl</u>
TOTAL	328 µl	328 µl

Örnek No'su	Kons. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Tot.DNA ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)	2 μg Tot.DNA için hacim(μl)	Su hacmi (μl)	Enzim karışımı (μl)
1	0.590	59.0	4.0	18.0	8.0
2	0.750	75.0	3.5	18.5	8.0
3	0.620	62.0	3.5	18.5	8.0
4	0.900	90.0	3.0	19.0	8.0
5	0.645	64.5	3.5	18.5	8.0
6	0.285	28.5	8.0	14.0	8.0
7	0.440	44.0	5.0	17.0	8.0
8	0.405	40.5	5.5	16.5	8.0
9	0.240	24.0	9.0	13.0	8.0
10	0.270	27.0	8.0	14.0	8.0
11	0.600	60.0	3.5	18.5	8.0
12	0.700	70.0	3.0	19.0	8.0
13	0.780	78.0	3.0	19.0	8.0
14	0.330	33.0	6.5	15.5	8.0
15	0.420	42.0	5.0	17.0	8.0
16	0.530	53.0	4.0	18.0	8.0
17	0.305	30.5	7.0	15.0	8.0
18	0.545	54.5	4.0	18.0	8.0
19	0.260	26.0	8.5	13.5	8.0
20	0.190	19.0	11.5	10.5	8.0
21	0.195	19.5	11.0	11.0	8.0
22	0.210	21.0	10.0	12.0	8.0
23	0.325	32.5	6.5	15.5	8.0
24	0.335	33.5	6.5	15.5	8.0
25	0.200	20.0	10.5	11.5	8.0
26	1.345	134.5	2.0	20.0	8.0
27	0.470	47.0	4.5	17.5	8.0
28	1.465	146.5	2.0	20.0	8.0
29	0.230	23.0	9.0	13.0	8.0
30	0.485	48.5	6.0	16.0	8.0
31	0.680	68.0	3.5	18.5	8.0
32	0.200	20.0	10.5	11.5	8.0
33	0.420	42.0	5.0	17.0	8.0
34	0.165	16.5	13.0	9.0	8.0
35	0.195	19.5	11.0	11.0	8.0
36	0.185	18.5	11.5	10.5	8.0
37	0.465	46.5	4.5	17.5	8.0
38	0.180	18.0	11.5	10.5	8.0
39	0.755	75.5	3.0	19.0	8.0
λ DNA	0.500	x	4.0	18.0	8.0

Yukarıdaki programa göre hazırlanan tüm reaksiyon içerikleri parmakla tıklanarak karıştırıldı. Tüp çeperine sıçramış olan solüsyon zerrecikleri, tüplerin 10.000xg'de 15 saniye santrifuj edilmesiyle çöktürüldü. Bu haliyle tüpler 37°C'lik etüve kaldırılarak 4 saat süreyle inkübe edildi. Süre bitiminde reaksiyonu durdurmak amacıyla 30 μl reaksiyon hacmine 8 μl 5x takip-stop karışımı katıldı. Karışım sağlandıktan sonra, elektroforeze kadar -20°C'ye alındı. EcoRI, HindIII, HaeIII, HinfI, AluI ve RsaI enzimlerinin (EK.1.37) kesim çalışmalarında

yukarıdaki program izlendi. Tek fark her bir enzim karışımının farklı olmasıydı. Enzim karışımında, enzim konsantrasyonuna bağlı olarak su ve enzim hacimleri değiştirildi. Reaksiyon tampon hacmi sabit tutuldu. Kesim sonrası DNA fragmanlarını ana jelde koşturmadan önce kontrol amacıyla, tüm kesimler minijelde koşturuldu. Elektroforez süresinin belirlenmesi için yapılan ön çalışmalarda, DNA bandları bromofenol mavisi ile yürüyorsa yaklaşık 2 saat, ksilen siyanol F ile yürüyorsa yaklaşık 4 saatlik bir koşmanın yeterli olacağı tesbit edildi.

3.20. DNA Fragmanlarının Fotoğraflanması

Agaroz jelinin hazırlanması sırasında jel tablasına dökülmeden önce, içine EtBr katılmıştı. Elektroforez tamamlanınca, jelin dinlendirilmesi amacıyla, yaklaşık 30 dakika süre ile EtBr içermeyen 0.5x TBE (pH8.3) tamponunda bekletildi. Hemen ardından Transillüminatör üzerine yerleştirilerek, polaroid filmle fotoğraflandı. Fotoğraf görüntüleri Bilgisayar'a aktarıldı.

3.21. Jelde DNA Bandlarının Değerlendirilmesi

%0.7 ve 20x15x0.4 cm boyutlarında 30 kuyulu agaroz jeli hazırlandı. Soldan ilk 1-2 kuyu marker kesimleri, son bir kuyu kesilmemiş total DNA için ayrıldıktan sonra aradakilere EK.1.38'daki sıralamaya bağlı kalarak örnek veya referans suşlarının kesilmiş total DNA solüsyonları 15 µl (~1µg) hacimde aplike edildi. EK.1.38'daki sıralama bundan sonraki tüm denemelerimizde aynen uygulandı. Her jele, ilk iki kuyuya referans amaçla ticari olarak EcoRI'le kesilmiş λ marker DNA'sı (EK.1.35) ve bizim kestiğimiz λ DNA (EK.1.34) 15 µl (~400 ng) hacimlerde tatbik edildi. Yine aynı amaçla, her jelin son kuyusuna *Leishmania donovani* (DD-8) sağlam total DNA'sı konuldu. DNA bandları hem örneklerin kendi içinde hem de referans suşların DNA bandlarıyla karşılaştırılarak Çukurova ile Şanlıurfa bölgesinden izole edilen örnekler arasındaki farklar ve bu örneklerin referanslarla benzerlikleri tesbit edildi. Karşılaştırmalar, milimetrik ölçümlerle elde edilen değerlere göre yapıldı. Film ve jel boyutları arasındaki

oran ($1/2.86$) sabit faktör olarak kabül edilip resim üzerinde her bir bandın aldığı yol (cm) bu faktörle çarpıldı. Jel, fotoğraf üzerinde $1/2.86$ oranında küçültüldü.



4. BULGULAR

4.1. Besiyeri Standardizasyonu

Çalışmada, ilk olarak, tüm örneklerle yanıt verebilen izolatif ve biyokütle amaçlı besiyeri hazırlanması hedeflendi. Dr.ALVAR ve Dr.STRELKOVA'dan temin edilen referans suşlardan gelişti güzel seçilen 7 tanesi ile en uygun besiyerinin belirlenmesi amacıyla denemeler yapıldı. Birbirinden farklı beş bifazik besiyeri ve bir adet monofazik besiyerine önceden belirlenen sayıda promastigot aşılandı. Kültürasyon (24°C'de 6 gün) sonunda yeniden sayım yapıldı.

Elde edilen sonuçlar, Çizelge 1'den de izlendiği gibi tüm suşlara yanıt verebilen ortak bir besiyerinin olmadığı gösterdi. Ancak, hücrelerin en aktif olduğu besiyerinin Modifiye Evans bifazik besiyeri olduğu tespit edildi.

Çizelge 1: Besiyeri Standardizasyonu

Suş	RPMI 1640	Klasik NNN	Nut.agar. NNN	Mod. Evans	%1.2 BHI Agar	%4.7 BHI Agar
L.infantum LEM-417	1×10^7	3.6×10^7	1.3×10^7	1.9×10^7	2×10^8	1.1×10^7
L.major 5-ASKH	2.1×10^7	4.8×10^6	1.2×10^6	1.7×10^7	1.6×10^7	9.9×10^6
L.donovani DD8	2.2×10^6	4.7×10^6	1.3×10^6	3.7×10^7	9×10^6	1.6×10^6
L.tropica K-27	6.2×10^7	3×10^6	1.2×10^7	1.7×10^7	1.5×10^7	8.6×10^6
L.infantum LEM-75	1.9×10^7	3.2×10^6	1.5×10^6	6.1×10^6	8.3×10^6	1.5×10^6
L.infantum IPT-I	3.5×10^6	3.9×10^6	2.9×10^6	7.6×10^6	9.4×10^6	1×10^6
L.infantum LEM-2205	9.2×10^6	1.8×10^7	9.7×10^6	5.6×10^6	1×10^7	3.6×10^6

4.2. İlk İzolasyon ve Adaptasyon

Başta Adana il merkezi olmak üzere, Kadirli, Kozan, Düziçi ve Karaisalı gibi yöreleri içine alan Çukurova bölgesinden gelen çok sayıda kuten lezyonlarında çalışıldı. Aseptik şartlara uyularak, lezyonun öncelikle alkolle dezenfekte edilmesi sonucu, alınan aspiratların kültürde kontamine olmaksızın

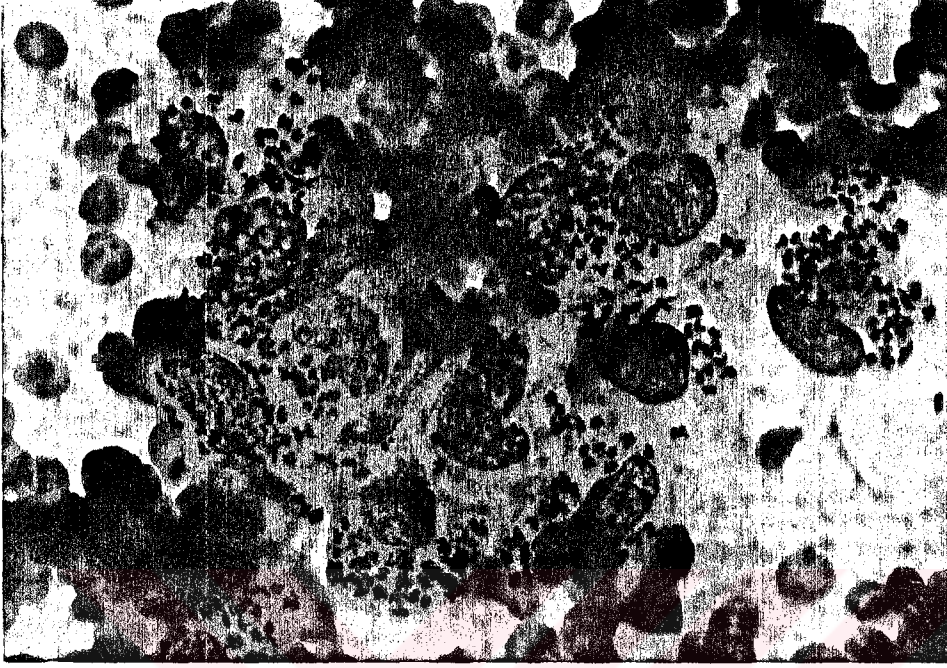
ürediği izlendi. Prof. STRELKOVA'nın önermiş olduğu iğne aspirasyon tekniğinin iyi sonuç verdiği, her çalışma sonunda uygulanan Giemsa boyama ile onandı. Aspirasyon işlemi, her lezyonun hem kenarından hem de merkezinden tekrar edildi. Ancak Çukurova bölgesinden gelen lezyonların çoğunun çok küçük olması nedeniyle aspirasyonda bazen güçlüklerle karşılaşıldı. Çalışılan lezyonların bir çoğunda, hastaların önceden kendilerince bir takım muameleler, zaman zaman antibiyotik, antimikotik ve hatta paramedikal uygulamalar yapmış oldukları tesbit edildi. Ayrıca Çukurova izolatlarının hazırlanan besiyerlerine, adaptasyon problemlerinin olduğu hatta herbirinin ayrı ayrı farklılıklar gösterdikleri belirlendi. Kontrol sırasında promastigot tesbit edilen örneklerde, hücreler pasif ise (az hareketli) pasajları hangi besiyerine yapılırsa yapılsın olumlu sonuç alınamadı. Şanlıurfa izolatlarının ise, besiyerlerine daha kolay adaptasyon sağladıkları ve Çukurova izolatlarına kıyasla daha kolay izole edildikleri gözlemlendi. Şanlıurfa kaynaklı lezyonların aşağı yukarı 5-8 kat daha büyük olmaları nedeniyle aspirasyon daha kolay idi. Ancak kültürasyon yönünden bunlar arasında da bazen farklılıklar görüldü.

İzolasyon için yapılan çalışmalarda modifiye Evans bifazik besiyeri ve klasik NNN besiyeri kullanıldı. Klasik NNN besiyeri ile yapılan denemelerde 4.-5.günlerden itibaren ortaya çıkan aglütinasyon değişik alternatiflerin ve Dr.STRELKOVA'nın tavşan kaba kan lizati ilavesi önerisine rağmen devam ettiği görüldü. Modifiye Evans bifazik besiyerinin kullanılması halinde ise, aglütinasyon ile karşılaşılmadı. Bu besiyerlerine ilk kontrol sırasında (5.gün), 100 µl glukozlu bidistile su eklendi³⁶. Dokuzuncu günden itibaren kültürasyonun gelişmekte olduğu, buradan hem modifiye Evans bifazik besiyerine hem de 1x RPMI-1640 besiyerine yapılan pasajın olumlu sonuç verdiği izlendi. Bu kültürler "1.pasaj kültürü" veya "subkültür" şeklinde işleme tabi tutuldu.

4.3. Amastigot ve Promastigot Formları

Kutanöz leishmaniasis amastigot şekli, izolasyondan hemen sonra hasta lezyonlarından alınan aspiratın lama yayılması ve boyanmasından elde edildi.

Buna göre yapılan incelemede amastigotların elips veya oval biçimde oldukları tesbit edildi. İzolat (örnek) amastigot boyutlarının 1.5-3.1 µm olduğu belirlendi.



Şekil 1: Amastigot ve promastigot hücrelerinin morfolojileri. (Nikon UFX-DX mikroskop, Nikon NFX-35 kamera ataçmanlı, 100X)

Promastigot şekilleri, kültürden alınan hücre süspansiyonun PBS ile yıkanıp lama yayılması ve boyanması ile elde edildi. Buna göre 1.95-11.8 µm (en-boy) boyutlarında tesbit edilen promastigotların kamçıları 12 µm ve oval şekilli nükleusları 0.9-2.0 µm olarak belirlendi. Giemsa boyasının musluk suyu ile hazırlanması ve metanolle fiksasyon sonrası boyama yapmadan önce, lamaların musluk suyundan geçirilmesi temiz preparat hazırlanmasını sağladı. Ölçümler için mikrometrik okülerden yararlanıldı (Şekil 1).

4.4. Büyük Hacimde Kültür

1x RPMI-1640 besiyerinde subkültürlere alınan izolatlar 7. günde yapılan kontrolde hücre sayısı ve aktivite iyi ise, 25 ml 1x RPMI-1640 içeren büyük hacimli besiyerine aşılandı. Bu besiyerinin hacmi sabit tutularak, 7. ve takip eden günlerde yapılan kontrollerde tüpten tüpe farklı sonuçlar elde edildi. Bu farklılığı ortadan kaldırmak ve hücre üremesini hızlandırmak amacıyla 25 ml'lik besiyerine tavşan kan lizati eklenmesine rağmen bu problem aşılamadı.

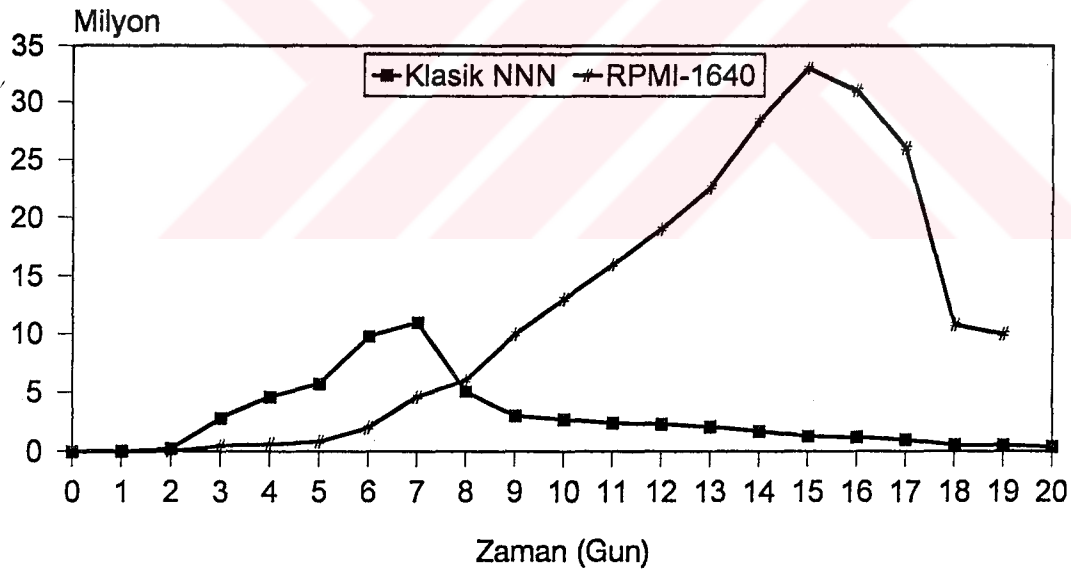
Buna karşılık kültürasyon işlemi sırasında kültür hacminin aşamalı^{29,36} olarak 25 ml'ye yükseltilmesi halinde oldukça başarılı sonuçlar alındı. İleriki çalışmalara temel oluşturacak düzeyde hücre miktarı elde edildi. Aşamalı hacim yükseltilmesi, 7.gündeki subkültürden %15 tavşan tam kan lizati içeren 5 ml'lik 1x RPMI-1640'a aşılama ile başladı. Bu besiyerine 3.günde 10, 6.günde 10 ml lizatsız taze 1x RPMI-1640 eklendi. Ondördüncü günde yapılan sayımlarda yaklaşık $2-4 \times 10^7$ hücre/ml verim elde edildi (Şekil 2).

4.5. Üreme Eğrisinin Çıkarılması

Total DNA izole etmek amacıyla fazla miktarda hücreye ihtiyaç bulunmaktadır. Bunun için *L.tropica* (MHOM/SU/74/K-27) referans suşunun, kütleli üretilmesi için geç log fazı, kriyoprezervasyon ve pasaj işlemleri için ise log fazı hücrelerinden yararlanıldı. Üreme eğrisinin çıkarılması için stok promastigot

Çizelge 2: Üreme eğrisinin çıkarılması

Zaman (Gün)	Klasik NNN (hücre/ml)	RPMI-1640 (hücre/ml)
0	10^4	10^4
1	2.0×10^4	3.0×10^4
2	2.4×10^5	3.6×10^4
3	2.8×10^6	4.8×10^5
4	4.6×10^6	6.0×10^5
5	5.7×10^6	8.0×10^5
6	9.8×10^6	2.0×10^6
7	10.0×10^6	4.6×10^6
8	5.0×10^6	6.0×10^6
9	3.0×10^6	10.0×10^6
10	2.7×10^6	10.3×10^6
11	2.4×10^6	10.6×10^6
12	2.3×10^6	10.9×10^6
13	2.0×10^6	22.6×10^6
14	1.7×10^6	28.4×10^6
15	1.2×10^6	33.0×10^6
16	1.2×10^6	31.1×10^6
17	9.7×10^5	26.0×10^6
18	5.4×10^5	10.8×10^6
19	5.7×10^5	10.0×10^7
20	4.7×10^5	



Şekil 2: Üreme eğrisi

sayısı belirlendikten sonra hem klasik NNN'e hem de 1x RPMI-1640'a aşılama yapıldı. Belli zaman aralıkları ile hücre sayımı tesbit edildi (Çizelge 2).

Sonuçta, *L.tropica* (K-27) kültürü, klasik NNN'de 7.günde; 1x RPMI-1640'ta 15. günde en yüksek seviyeye ulaştığı saptandı.

4.6. Değişik Lizatlarla Modifiye Edilen Besiyerlerinde Populasyon Taşıma Kapasiteleri

Literatür bilgilerine göre bifazik besiyerinde (klasik NNN) mililitre başına en fazla $1.5-2.5 \times 10^7$ hücre³⁶, RPMI-1640 besiyerinde $2-4 \times 10^7$ hücre¹⁷ alındığı görülmektedir. Mililitre başına düşen en yüksek hücre sayısının en azından klasik değerlere ulaşabilmesi ve bu değerlere ulaşma sürelerinin kısaltılabilmesi amacıyla laboratuvar koşullarımızda aşağıdaki besiyerleri denendi. (Gereç ve Yöntem/3.5 sıralamasına bağlı kalarak)

- Modifiye Evans bifazik besiyeri (1),
- 1x RPMI-1640 (2),
- %15 tavşan tam kanı içeren 1x RPMI-1640 (3),
- %15 tavşan tam kan lizati içeren 1x RPMI-1640 (4) ve
- %15 insan tam kan lizati içeren 1x RPMI-1640 (5).

Muhtemel kontaminasyonların önüne geçmek, besiyerinin taşıma kapasitesine kısa zamanda erişmesi ile mümkündür. Çalışmada *L.tropica* (K-27) ve *L.donovani* (DD-8) referans hücreleri kullanıldı. Her iki hücrede, modifiye Evans bifazik besiyerinde (1) 14.günde ve İnsan tam kan lizati içeren (%15) 1x RPMI-1640 besiyerinde (5) 4.günde, en yüksek hücre sayısına erişildi. Diğer yandan, kan ürünü içermeyen besiyerlerinde 1x RPMI-1640 (2), en yüksek hücre sayısına *L.tropica* (K-27) ve *L.donovani* (DD-8) için 12.günde ulaşabildiler.

Çizelge sonuçlarına bakıldığında, birim hacme düşen en yüksek hücre sayısının (klasik değer) aşılamadığı, ancak kan ve kan ürünleri katılan besiyerlerinde diğer bir söyleyişle 1x RPMI-1640 besiyerlerinde en yüksek hücre sayısına erişme zamanının kısaldığı görüldü. Kan ve kan ürünlerinin bu etkisi, biyokütle elde edilmesi sırasında aşamalı olarak besiyeri hacmin artırılması işleminin, 5 ml'lik ilk aşamasına tatbik edildi. Sonuçlar Çizelge 3'te görülmektedir.

Çizelge 3: Farklı Kompozisyondaki Besiyerlerinin Populasyon Taşıma Kapasiteleri

	L.tropica (K-27) (hücre/ml)x10⁶					L.donovani (DD-8) (hücre/ml)x10⁶				
	(1) Mod. Evans	(2) RPMI 1640	(3) RPMI 1640	(4) RPMI 1640	(5) RPMI 1640	(1) Mod. Evans	(2) RPMI 1640	(3) RPMI 1640	(4) RPMI 1640	(5) RPMI 1640
Gün										
0	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.48	0.24	0.24	0.24	0.24
4	13.5	7.5	12	19.6	29.25	13.7	3.4	9.6	12.15	28.4
6	16.25	15.15	19.5	31.1	23.5	21.5	10.65	15.7	24.55	15.9
7	22.75	18.05	24.1	24.85	18.85	27.35	13.2	20.45	26.1	14.5
8	27.75	22.1	29.7	19.7	14.9	32.7	18.75	25.55	18.05	12.1
10	38.5	28.3	25.1	9.15	7.55	40.7	25.65	21.25	13.05	9.0
12	42.05	29.3				45.05	28.15			
14	43.6	17.55				46.55	16.0			
16	22.75					27.85				

4.7. Mitojen Maddenin Üremeye Etkisi

Kültürasyon süresinin, mitotik indeks değerini yükselttiği bilinen PHA-L (Fitohemaglutinin) ile daha da geliştirilebileceği düşüncesinden hareketle, bu ajan 1x RPMI-1640 besiyerinde eklenerek etkisi denendi. Yükselen PHA-L değerlerine karşı elde edilen "hücre sayısı" Çizelge 4'te görülmektedir.

Çizelge 4 sonuçlarına bakıldığında PHA-L ajanının, populasyon taşıma kapasitesi üzerine herhangi bir etkisi olmadığı tespit edildi.

Çizelge 4: Mitojen Maddenin (PHA-L) Hücre Üremesine Etkisi

Gün	PHA-L (0 µg/ml)	PHA-L (1 µg/ml)	PHA-L (3 µg/ml)	PHA-L (5 µg/ml)	PHA-L (8 µg/ml)	PHA-L (15 µg/ml)
0	7x10 ⁴	7x10 ⁴	7x10 ⁴	7x10 ⁴	7x10 ⁴	7x10 ⁴
2	6x10 ⁵	6.67x10 ⁵	6.67x10 ⁵	8x67x10 ⁵	6.67x10 ⁵	8x67x10 ⁵
4	4.8x10 ⁶	2.07x10 ⁶	2.7x10 ⁶	1.73x10 ⁶	1.67x10 ⁶	3x10 ⁶
6	1.28x10 ⁷	1.27x10 ⁷	1.5x10 ⁷	1.38x10 ⁷	1.35x10 ⁷	1.34x10 ⁷
8	2.46x10 ⁷	2.46x10 ⁷	2.29x10 ⁷	2.38x10 ⁷	2.04x10 ⁷	2.3x10 ⁷
10	2.67x10 ⁷	2.92x10 ⁷	2.59x10 ⁷	2.67x10 ⁷	2.22x10 ⁷	2.83x10 ⁷
12	2.87x10 ⁷	3.17x10 ⁷	2.93x10 ⁷	2.9x10 ⁷	2.9x10 ⁷	3.23x10 ⁷
14	3.08x10 ⁷	3.3x10 ⁷	3.17x10 ⁷	3.12x10 ⁷	3.13x10 ⁷	3.2x10 ⁷
16	1.26x10 ⁷	1.06x10 ⁷	1.1x10 ⁷	1.05x10 ⁷	1.06x10 ⁷	1.07x10 ⁷

4.8. Üreme Atmosferine NaHCO₃'ün Etkisi

Üzerinde CO₂ kontrol sistemi bulunmayan etüvlerle yapılan çalışmalarda NaHCO₃ kullanımının, üreme için gerekli nötral pH'yı bozmadan, sorunun çözümüne ne derece yaklaşım gösterdiğini belirlemek amacıyla yaptığımız

denemede, Çizelge 5'de görüldüğü gibi, artan NaHCO_3 konsantrasyonlarının üremeyi negatif yönde etkilediği saptandı.

Çizelge 5: NaHCO_3 'ün *L. tropica* (MHOM/SU/74/K-27)'ya Etkisi.

Zaman (Gün)	RPMI-1640 0 mM NaHCO_3	RPMI-1640 4.76 mM NaHCO_3	RPMI-1640 24 mM NaHCO_3
0	10^5	10^5	10^5
7	1.56×10^7	1.4×10^7	3.93×10^6
12	1.1×10^7	1.1×10^7	8.17×10^6

4.9. Kriyoprezervasyon

Kriyoprezervasyon için kriyoprotektan olarak Gliserol (son konsantrasyonu %7.5) veya DMSO (dimetil sulfoksit, son konsantrasyonu %6.72) kullanıldı. Her iki protektanla da kademeli dondurma ve hızlı çözme işlemi uyguladığında kriyo işleminin başarılı olduğu tespit edildi. Ancak, çalışmalarımızda, toksik olmaması nedeni ile gliserol tercih edildi.

4.10. Hücre Toplama ve Yıkama

Promastigotlardan total DNA izole etmek amacıyla hücreler geç log fazda, yani 14. günde toplandı. Elektroforez jelinde, artefakların oluşumlarını engellemek için toplanan hücrelerin dikkatli yıkanmalarına önem verildi. İşlemler sırasında hücre süspansiyonlarını önemli bir tehlike beklemektedir. Bu da hücrelerin kendi lizisleri sonucu ortaya çıkan ve aynı zamanda çalışandan gelen DNaz'dır. DNaz eliminasyonu için sürekli olarak tek kullanımlık eldiven giyilmesi yanında, hücreleri iki defa izotonik solüsyonda ve ardından 150 mM EDTA içeren SET (pH 8.0) lizis tamponunda yıkanmalarına özen gösterildi.

4.11. Total DNA İzolasyonunun Optimizasyonu

Total DNA izolasyonunda bir çok yöntem kullanılmaktadır. Laboratuvarımız olanaklarına göre fenol-kloroform ve tuz ekstraksiyon yöntemleri karşılaştırmalı olarak uygulandı. Her iki yöntemle elde edilen ürünler; verim, saflık ve elektroforetik görünürlükleri açısından değerlendirildi.

Sonuçta, tuz ekstraksiyon yönteminin daha verimli, aynı zamanda daha ekonomik olduğu tesbit edildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 6: Fenol-Kloroform ve Tuzla Ekstre Edilen DNA'nın Spektral Analiz Sonuçları

<u>Fenol-Kloroform ekstraksiyonu</u>		<u>Tuz ekstraksiyonu</u>	
<u>Safılık</u>	<u>Verim($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)</u>	<u>Safılık</u>	<u>Verim($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)</u>
1.565	0.18	1.857	0.195

4.12. Total DNA İzolasyonu

Laboratuvar koşullarının uygun olması nedeniyle, Gomez-Eichelmann et al⁵¹ sunduğu lizis tamponu (SET, EK 1.23) ve şartları kullanıldı. Proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla Miller et al⁷⁶ tuz ekstraksiyon yöntemi ile devam edildi. Deterjan olarak Na-sarkosinat kullanıldığında elektroforezde DNA'nın daha parlak bir görüntü verdiği gözlemlendi. Ancak tuz ekstraksiyon yönteminde, SDS-NaCl-protein kompleksi, Na-sarkosinat'a kıyasla daha yüksek miktarda protein presipite ettirdiği ve buna bağlı DNA miktarında ve saflığında artışa neden olduğu görüldü. Pürifiye edilen total DNA, TE tamponunda çözülerek -20°C'ta saklandı.

4.13. Total DNA'nın Spektral Analizi

İzole edilip purifiye edilen total DNA, 110 μl TE tamponunda çözüldü. Elde edilen total DNA'nın konsantrasyon ve saflığını belirlemek üzere 260 ve 280 nm'de absorbans değerlerine bakıldı. Kullanılan sıralama, referans ve örnekler için kimlik bilgilerinin verildiği çizelgedeki (EK.1.38) gibidir.

Çizelge 7: Çukurova ile Şanlıurfa İzolatları ve Referans Suşların Total DNA'larının Spektral Ölçüm Değerleri*.

Örnek No	260 nm Absorbans	280 nm Absorbans	260/280 Safılık	Kons. µg/µl
1	0.118	0.065	1.82	0.590
2	0.150	0.088	1.70	0.750
3	0.124	0.066	1.88	0.620
4	0.180	0.098	1.80	0.900
5	0.129	0.076	1.70	0.645
6	0.057	0.033	1.70	0.285
7	0.088	0.049	1.80	0.440
8	0.081	0.048	1.70	0.405
9	0.048	0.027	1.80	0.240
10	0.054	0.028	1.93	0.270
11	0.120	0.069	1.74	0.600
12	0.140	0.082	1.70	0.700
13	0.156	0.091	1.71	0.780
14	0.066	0.036	1.80	0.330
15	0.084	0.048	1.75	0.420
16	0.106	0.059	1.80	0.530
17	0.061	0.033	1.85	0.305
18	0.109	0.059	1.85	0.545
19	0.052	0.030	1.70	0.260
20	0.038	0.021	1.81	0.190
21	0.039	0.022	1.77	0.195
22	0.042	0.023	1.83	0.210
23	0.065	0.037	1.76	0.325
24	0.067	0.039	1.72	0.335
25	0.040	0.023	1.74	0.200
26	0.269	0.141	1.90	1.345
27	0.094	0.052	1.80	0.470
28	0.293	0.172	1.70	1.465
29	0.046	0.025	1.84	0.230
30	0.097	0.055	1.76	0.485
31	0.136	0.080	1.70	0.680
32	0.040	0.021	1.90	0.200
33	0.084	0.047	1.79	0.420
34	0.033	0.019	1.74	0.165
35	0.039	0.022	1.77	0.195
36	0.037	0.021	1.76	0.185
37	0.093	0.054	1.70	0.465
38	0.036	0.021	1.70	0.180
39	0.151	0.080	1.89	0.755

*Çukurova (1-18), Şanlıurfa (19-25) izolatları ve Referans suşları (26-39)

4.14. Takip-Stop Karışımının DNA Bandlarına Etkisi

Elektroforezde dansite artırıcı madde olarak gliserol, sukroz veya fikor; DNA bandlarının elektroforez sırasında izlenmesi amacıyla da bromofenol mavisi ve ksilen siyanol kullanıldı. Son derişimi %5 olacak şekilde fikor kullanıldığında, elde edilen DNA bandlarının düzgün olduğu, sükroz veya

gliserolde ise pürüzlü bir görünüm verdiği tesbit edildi. Nükleaz enzimleri, 10 mM EDTA ile inaktif hale getirilebilmektedir. Bu amaçla takip boyasına enzim inaktivasyonu için EDTA ve yapışkan DNA uçlarının jelde silik band vermesini önlemek için de %0.1 SDS katıldı. Elektroforez öncesinde kesilmiş DNA, 65°C'de 10 dakika tutulduğunda hem DNaz'ın inaktive olduğu hem de DNA bandlarının daha düzgün görüldüğü tesbit edildi.

4.15. Ammonyum Asetatla DNA Purifikasyonu

Etanolle presipitasyon aşamasında ortama son derişimi 2.5 M olacak şekilde NH₄OAc eklendiğinde, DNA saflığının iyileştiği belirlendi. Muhtemel protein ve diğer artıkların tamamen eliminasyonu için NH₄OAc presipitasyonu tekniği kullanıldı. Hatta presipitasyon birkaç kez tekrarlanarak saf ürün elde edilip edilemeyeceği araştırıldı. Sonuçta, belirlemelerimiz bağlamında, üç defa üst üste etanol presipitasyonu ile beraber ammonyum asetat pürifikasyonu uygulandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 8'de verilmiştir.

Çizelge 8: Ammonyum Asetat'ın DNA Purikasyonuna Etkisi

Purifikasyon Sayısı	260 nm (Absorbans)	280 nm (Absorbans)	260/280 (Saflık)	Konst (µg/µl)
1.purifikasyon	0.131	0.086	1.52	0.655
2.purifikasyon	0.129	0.080	1.61	0.645
3.purifikasyon	0.127	0.074	1.72	0.635

4.16. Restriksiyon Endonükleazlarla Kesim

Restriksiyon endonükleazlar pahalı olduklarından, tam kesim için ünite miktarı, reaksiyon hacmi ve kesim süresinin optimizasyonu amacıyla ön çalışmalar yapıldı. Buna göre 1.5 ml'lik steril Eppendorf tüpünde, 30 µl reaksiyon hacminde 2 µg total DNA ve 3 U/µg DNA restriksiyon enzimi kullanılarak 37°C'de 4 saat boyunca tam kesim elde edildi. Her enzimle, λ DNA'sı da aynı şartlarda kesildi. Süre bitiminde tüm reaksiyonlar 5x takip-stop karışımı ile durduruldu.

4.17. Agaroz Jel Elektroforezi

Tekniğin standardizasyonu için yaptığımız ön çalışmalarda; (1) agaroz konsantrasyonu %0.3 ile %3 arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlandı ve en iyi DNA band görüntüsü veren jel konsantrasyonu araştırıldı. En iyi konsantrasyonun %0.7 olduğu tesbit edildi. (2) Jel kalınlığı önce 0.3 cm olarak hazırlandı. Ancak elimizdeki tarak dişlerine göre gerekli hacim oluşturamadı, 0.4 cm'lik kalınlığın ise, ihtiyaca uygun olduğu belirlendi. (3) DNA miktar ve hacmi için yapılan ön çalışmalarda, kesilmiş DNA, her kuyuya 10 ng'dan 1000 ng'a kadar değişen miktarlarda verilerek, en iyi DNA bandlarının 1 µg DNA ile görüntülediği belirlendi. Hazırlanan jel kalınlığında (0.4 cm) her kuyunun maksimum 15 µl DNA solüsyonu alabildiği görüldü, (4) Elektroforezde uygulanacak voltajı belirlemek için cm'ye 2V-10V arası değişen akımlar verildi. Voltaj artırılınca, elektroforez süresinin kısaldığı görüldü. Agaroz jelinde (20x15x0.4 cm), orta (600 bp gibi) ve daha büyük fragmanların tesbiti için cm'ye 8V verilmesinin uygun olduğu tesbit edildi. (5) DNA bandlarının jel dışına çıkmadan görüntülenebilmesi için yapılan ön testlerde, takip için kullanılan boyalar izlendi. İzleme, devam etmekte olan elektroforezin aralıklarla durdurularak transillüminatörde incelenmesi ile yapıldı. Buradaki görüntüde band hangi boya ile özdeşleşmiş ise elektroforez sırasında o boyanın hareketi, süreyi belirleyici faktör oldu.

Bu arada restriksiyon enziminin çalışıp çalışmadığı, çalışıyorsa band verip vermediği, veya DNA örneklerinin saf olup olmadığı, kontaminasyon olup olmadığı, kesim reaksiyonu sonucu oluşan DNA fragmanlarının büyüklükleri hakkında yaklaşık fikir edinmek için minijeller (8x4 cm) kullanıldı. Buradan elde edilen bilgilerle ana elektroforez işlemleri yönlendirildi.

4.18. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Enzimlerin bir kısmı görünebilir DNA bandları yerine silik band oluşturdukları, görüntülenemiyen bu DNA bandlarının, por çapı oldukça küçük olan akrilamid jelinde de görüntülenip görüntülenemeyeceğine bakıldı. Çalışma sonuçlarına göre yapılabilecek en büyük por çaplı akrilamid hazırlanmasına

rağmen, agaroz jelinde görüntülenen DNA bandlarından farklı DNA bandları gözlenemedi. Aynı zamanda DNA fragmanlarının, hazırlanan en büyük por çaplı akrilamid jelinden geçememesi nedeniyle bu porların da kesik total DNA fragmanlarına göre çok küçük olduğu tespit edildi. Yani DNA fragman büyüklükleri arasındaki muhtemel fark, bu jel ile elde edilemedi.

4.19. Poliakrilamid jelinin EtBr ve Gümüşle Boyanması

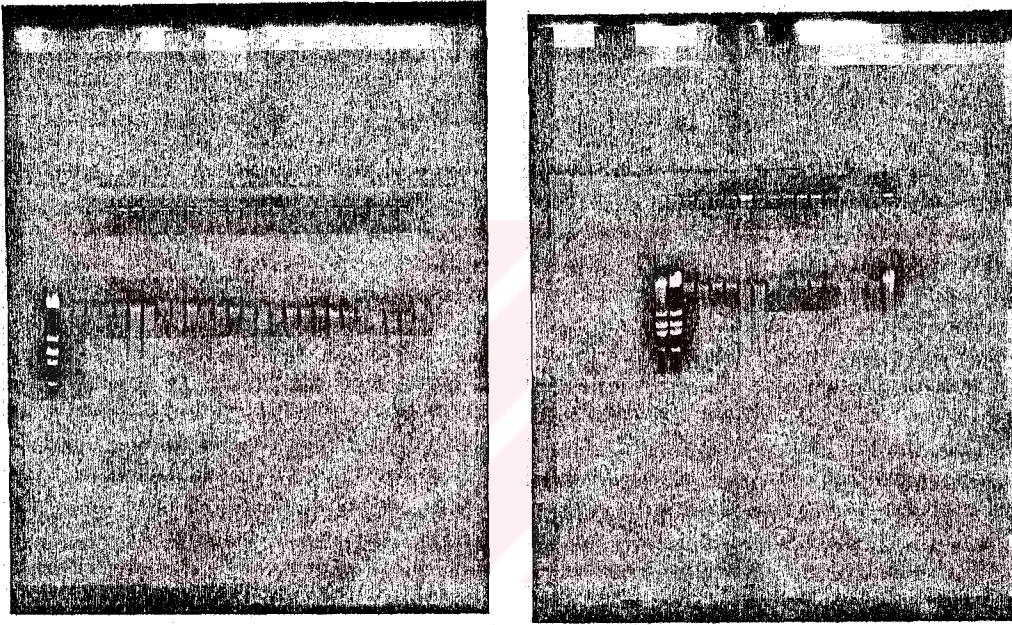
Akrilamid jelinde EtBr'in de yeterince hassas olamayacağı küçüklükte DNA bandlarının olabileceğini düşünerek, aynı şekilde hazırlanmış iki akrilamid jeli ile çalışıldı. Bu jellerden biri EtBr ile, diğeri daha hassas olduğu kabul edilen Gümüşle boyanarak karşılaştırıldı. Bu çalışma ile iki jelde bandlar arasında fark görülmedi, yani EtBr'in görüntüleyemediği herhangi bir DNA bandına rastlanamadı. Ancak gümüşle boyamanın kalıcı ve UV ışığı gerektirmemesi yönünden daha elverişli olduğu görüldüyse de, normalde elde olunan DNA fragmanlarının büyük olması nedeniyle kullanımından vazgeçildi.

4.20. DNA Bandlarının Değerlendirilmesi

Leishmania Total DNA'ları restriksiyon endonükleazlarla kesildiğinde, DNA zincirlerinde bulunan enzim tanıma bölgelerine göre değişik büyüklüklerde fragmanlar elde edildi. Bilgisayara aktarılan fotoğraflarda; oluşan band sayısı ve aplikasyon noktasından itibaren alınan yola göre farklar ve benzerlikler belirlendi. Kimi izolatlarda görünebilir DNA bandları oluşurken, kimisinde silik DNA bandları oluştu. Silik DNA bandı, alanda çok sayıda küçük DNA fragmanlarının bulunduğu bir göstergesidir. Ancak ölçümlere uygun olmadığından analiz dışı bırakıldılar. Genotipik olarak heterojen oldukları bilinen Rusya ve İspanya suşlarının DNA'ları elimizdeki enzimlerle kesildi ve aradaki farklılıklar tesbit edildi. Elimizdeki enzimlerin aktivitelerini kontrol etmek amacıyla ticari olarak satılmakta olan λ DNA'sı bu enzimlerle tek tek kesildi. Literatür bilgilere göre λ DNA; EcoRI'le 6, HindIII'le 8, HaeIII'le 150, HinfI'le 149, AluI'le 144 ve RsaI enzimiyle 114 DNA bandı verdiği belirtilmektedir.

Çukurova (1-18) ile Urfa (19-25) izolatları arasındaki farklar HaeIII enzimi tarafından silik band oluşması nedeniyle tam olarak görüntülenemedi. Bunların dışında kalan tüm enzimlerin ise fark verdikleri tesbit edildi. Çukurova ve Şanlıurfa izolatlarının genotipleri arasında bölgesel farkların yanında bu bölgelerden izole edilen izolatların kendi aralarında da farklılıklar gösterdiği görüldü.

EcoRI enzimi örnekler arasında 5, referans suşlar arasında 3 farklı DNA fragmanı verdi (Şekil 3).



Şekil 3: Örnek ve Referans suşların %0.7 agaroz jelinde total DNA-EcoRI Restriksiyon profilleri: (sol) ilk kuyu ticari λ DNA-EcoRI marker, 1-18 Çukurova, 19-25 Şanlıurfa örnekleri total DNA-EcoRI ve son kuyu *L.donovani* (DD-8) suşu sağlam total DNA'sı. (sağ) ilk iki kuyu sırayla ticari λ DNA-EcoRI marker ve λ DNA-EcoRI kendi kesimimiz, 26-39 referans total DNA-EcoRI ve son kuyu 2 no'lu örnek sağlam total DNA'sı.

EcoRI enzimi, örnekler arasında toplam 5 farklı DNA fragmanı olduğunu gösterdi. Örneklerden 2,4,5,8,10 no'lu örnekleri grup olarak benzer DNA bandı verirken, 1,3,6,7,9,11-14 ve 19 no'lu örneklerden oluşan grup bir başka fragman verdiği gözlemlendi. 15-18,20 ve 21 grubu; 23, 25 no'lu örnekler grubu ile 22,24 örnekler grubu farklı fragman verdiler. DNA fragman profilleri Şekil 3'te sol tarafta ve DNA bandlarının jelde aldıkları yol Çizelge 9.A'da gösterildi.

Çizelge 9.A: Örneklerin total DNA-EcoRI Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)

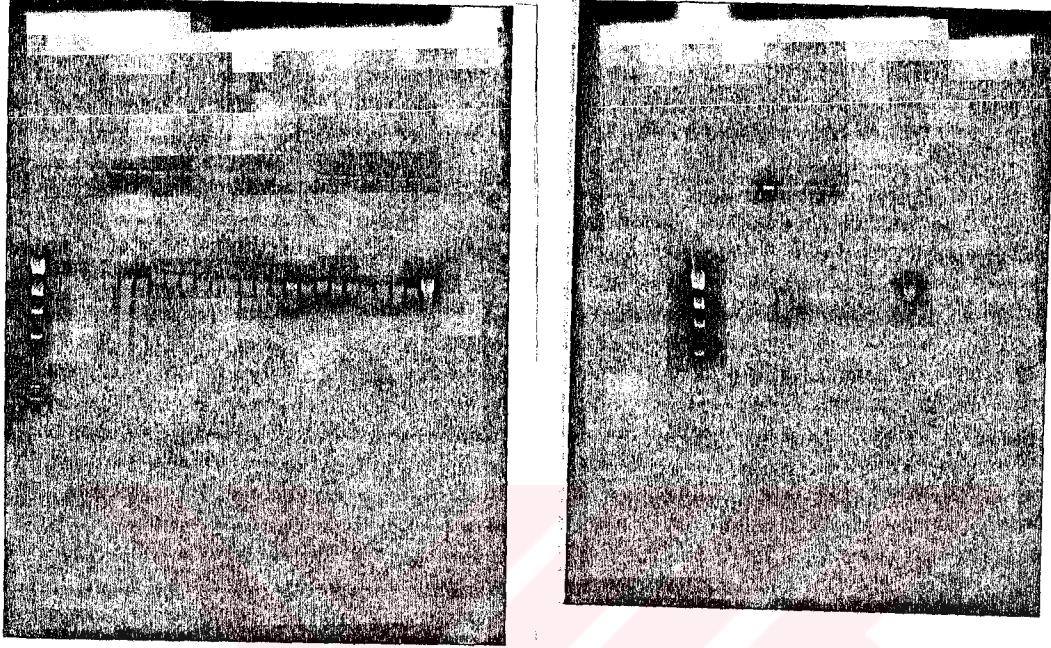
<u>4.147 cm</u>	<u>4.290 cm</u>	<u>4.433 cm</u>	<u>4.576 cm</u>	<u>4.719 cm</u>
(2) Karaisalı	(1) Düziçi	(15) Düziçi	(23) Şanlıurfa	(22) Şanlıurfa
(4) Düziçi	(3) Karaisalı	(16) Adana	(25) Şanlıurfa	(24) Şanlıurfa
(5) Kozan	(6) Adana	(17) Adana		
(8) Karaisalı	(7) Karaisalı	(18) Düziçi		
(10) Düziçi	(9) Karaisalı	(20) Şanlıurfa		
	(11) Adana	(21) Şanlıurfa		
	(12) Karaisalı			
	(13) Karaisalı			
	(14) Düziçi			
	(19) Şanlıurfa			

Çizelge 9.B: Referans Suşların Total DNA-EcoRI Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm):

<u>3.575 cm</u>	<u>3.718 cm</u>	<u>3.861 cm</u>
L. infantum (LEM-417)	L. major (5-ASKH)	L. infantum (LEM-75)
L. donovani (DD-8)	L. infantum (LEM-2205)	
L. tropica (K-27)	L. arabica (JISH-220)	
L. turanica (KD-51)	L. major+turanica (9537)	
L. turanica (PH -40)		
L. turanica (Clone-3720)		
L. gerbilli (gerbilli)		
L. turanica (TSH-III)		
L. major (Nealp)		

L.infantum (LEM-417), *L.donovani* (DD-8), *L.tropica* (K-27), *L.turanica* (KD-51), *L.turanica* (PH-40), *L.turanica* (Clone-3720), *L.gerbilli* (gerbilli), *L.turanica* (TSH-III) ve *L.major* (Nealp)'de grup olarak ortak bir fragman verdiği gözlemlendi. *L.major* (5-ASKH), *L.infantum* (LEM-2205), *L.arabica* (JISH-220) ve *L.major* +*L.turanica*=mixture (9537) grubunda benzer DNA fragmanı görüldü. Bu iki farklı fragman grubundan ayrı olarak *L.infantum*'da (LEM-75) farklı bir fragman daha verdiği gözlemlendi. Referans suşların total DNA-EcoRI profilleri Şekil 3'ün sağ tarafında ve DNA bandlarının jelde aldıkları yol Çizelge 9.B'da görülmektedir.

HindIII enzimi profilleri incelendiğinde; örnekler arasında 4, referans suşlar arasında 5 farklı fragman verdiği tesbit edildi (Şekil 4).



Şekil 4: Örnek ve Referans suşların %0.7 agaroz jelinde total DNA-HindIII Restriksiyon profilleri: (sol) ilk kuyu λ DNA-HindIII kendi kesimimiz, 1-18 Çukurova, 19-25 Şanlıurfa örnekleri total DNA-HindIII ve son kuyu *L.donovani* (DD-8) suşu sağlam total DNA'sı. (sağ) ilk kuyu λ DNA-HindIII kendi kesimimiz, 26-39 referans total DNA-HindIII ve son kuyu *L.donovani* (DD-8) suşu sağlam total DNA'sı.

Çukurova ve Şanlıurfa izolatları arasında dört farklı HindIII fragmanı görüldü. 1,2,5,7,10-12,14-17 ve 19-24 no'lu izolatların grubu benzer bir fragman, 3, 4, 18 ve 25 no'lu izolat grubu farklı bir fragman, 6, 9 ve 13 izolat grubu bir başka farklı fragman verdi. Sekizinci izolat diğer tüm izolatlardan farklı olarak bir DNA bandı verdiği tesbit edildi. Sonuçlar Şekil 4'te sol tarafta ve DNA bandlarının jelde aldıkları yol Çizelge 10.A'da görülmektedir.

Çizelge 10.A: Örneklerin Total DNA-HindIII Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)

<u>4.147 cm</u>	<u>4.290 cm</u>	<u>4.433 cm</u>	<u>4.576 cm</u>
(8) Karaisalı	(6) Adana (9) Karaisalı (13) Karaisalı	(1) Düziçi (2) Karaisalı (5) Kozan (7) Karaisalı (10) Düziçi (11) Adana (12) Karaisalı (14) Düziçi (15) Düziçi (16) Adana (17) Adana (19) Şanlıurfa (20) Şanlıurfa (21) Şanlıurfa (22) Şanlıurfa (23) Şanlıurfa (24) Şanlıurfa	(3) Karaisalı (4) Düziçi (18) Düziçi (25) Şanlıurfa

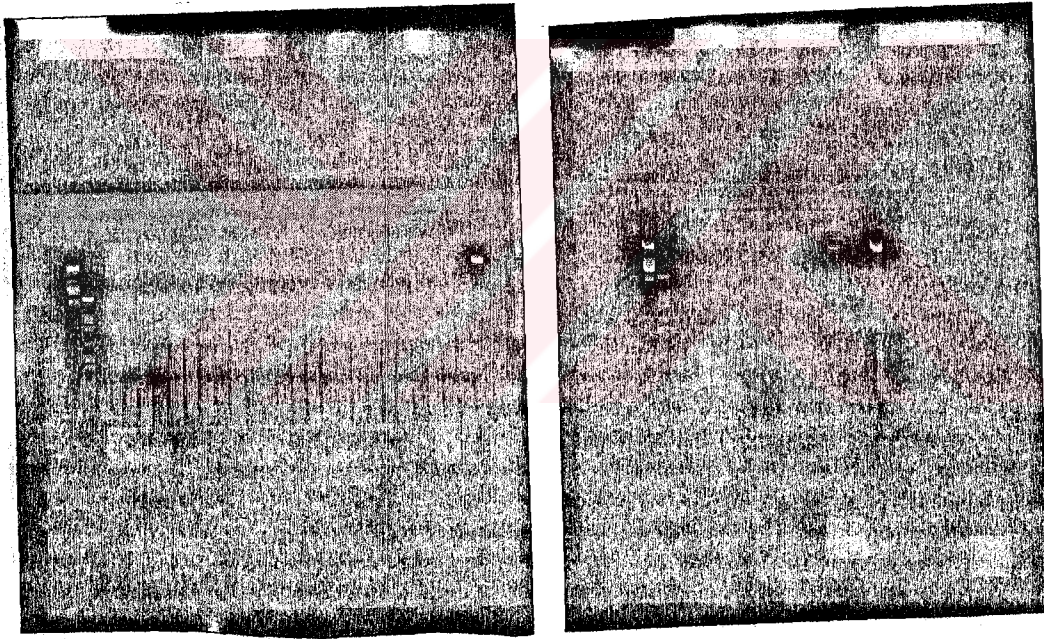
HindIII fragmanlarına göre; *L.infantum*'un (LEM-417) diğer 13 referans suş'undan farklı bir DNA bandı verdiği gözlemlendi. *L.donovani* (DD-8), *L.tropica* (K-27), *L.turanica* (KD-51), *L.turanica* (PH-40), *L.turanica* (Clone-3720) ve *L.gerbilli* (gerbilli) suş'ları grup olarak benzer bir fragman alındı. *L.major* (5-ASKH) ve *L.infantum* (LEM-2205) suş'larında benzer bir DNA fragmanı görüldü. *L.infantum* (LEM-75), *L.arabica* (JISH-220), *L.major+L.turanica=mixture* (9537) ve *L.major* (Nealp) suş'ları arasında da benzer bir fragman belirlendi. Ayrıca *L.turanica* (TSH-III) suş'unda diğer suş'lardan farklı olarak bir adet fragman belirlendi.

Çizelge 10.B: Referans Suşların Total DNA-HindIII Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)

<u>4.290 cm</u>	<u>4.433 cm</u>	<u>4.576 cm</u>	<u>4.719 cm</u>	<u>4.862 cm</u>
<i>L.infantum</i> (LEM-417)	<i>L. donovani</i> (DD-8) <i>L.tropica</i> (K-27) <i>L. turanica</i> (KD-51) <i>L. turanica</i> (PH-40) <i>L. turanica</i> (Clone-3720) <i>L. gerbilli</i> (gerbilli)	<i>L. turanica</i> (TSH-III)	<i>L. major</i> (5-ASKH) <i>L. infantum</i> (LEM-2205)	<i>L. infantum</i> (LEM-75) <i>L. arabica</i> (JISH-220) <i>L. major+L. Turanica</i> (9537) <i>L. major</i> (Nealp)

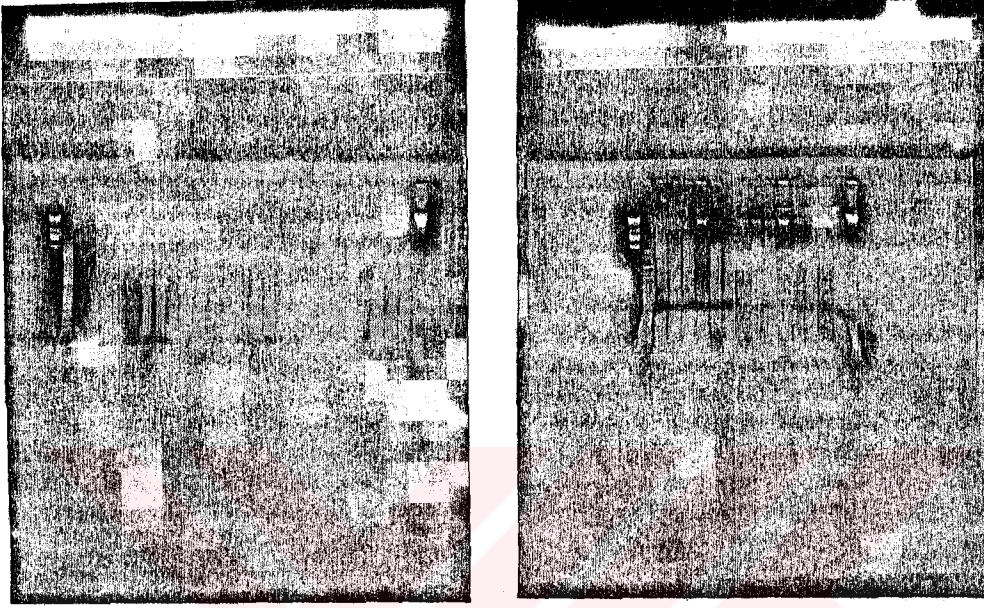
Referans suşlara ait total DNA HindIII restriksiyon profilleri Şekil 4'te sağ tarafta ve DNA bandlarının jelde aldıkları yol (cm) Çizelge 10.B'de görülmektedir.

Örnek ve referansların total DNA'ları HaeIII enzimiyle kesildiğinde sadece referans suşlardan *L.arabica*'da (JISH-220) okunabilir bir band tesbit edildi. Diğer referans suş ve izolatların tamamında çok sayıda kesim noktası bulunduğu için silik bandlar elde edildi. Ancak bu enzimden elde edilen DNA profilleri Şekil 5'te sağda referans suşların DNA profilleri, solda Örnek DNA profilleri incelendiğinde referans ve izolatların genotipleri arasında farklar olduğu görülmektedir.



Şekil 5: Örnek ve Referans suşların %0.7 agaroz jelinde total DNA-HaeIII Restriksiyon profilleri: (sol) ilk iki kuyu sırayla ticari λ DNA-EcoRI marker ve λ DNA-HaeIII kendi kesimimiz, 1-18 Çukurova, 19-25 Şanlıurfa örnekleri total DNA-HaeIII ve son kuyu *L.donovani* (DD-8) suşu sağlam total DNA'sı. (sağ) ilk iki kuyu sırayla ticari λ DNA-EcoRI ve λ DNA-HaeIII kendi kesimimiz, 26-39 referans total DNA-HaeIII ve son kuyu *L.donovani* (DD-8) suşu sağlam total DNA'sı.

Hinfl restriksiyon profiline göre örneklerde 5, referans suşlarda, 3 farklı DNA fragmanı elde edildi (Şekil 6).



Şekil 6: Örnek ve Referans suşların %0.7 agaroz jelinde total DNA-Hinfi Restriksiyon profilleri: (sol) ilk iki kuyu sırayla ticari λ DNA-EcoRI marker ve λ DNA-Hinfi kendi kesimimiz, 1-18 Çukurova, 19-25 Şanlıurfa örnekleri total DNA-Hinfi ve son kuyu 2 no'lu örnek sağlam total DNA'sı. (sağ) ilk iki kuyu sırayla ticari λ DNA-EcoRI ve λ DNA-Hinfi kendi kesimimiz, 26-39 referans total DNA-Hinfi ve son kuyu 2 no'lu örnek sağlam total DNA'sı.

Çukurova ve Şanlıurfa izolatları arasında Hinfi'le 5 farklı DNA fragmanı belirlendi. 1-5, 8-18 ve 20-25 izolatlarında grup olarak farklı bir DNA bandı gözlemlendi. 6. ve 7. izolat grubunda birbirinin aynı, ancak diğer örneklerde olmayan üçer DNA bandı verdikleri belirlendi. 19. izolat diğer izolatlarda bulunan bir DNA bandı ile beraber, onlardan farklı bir DNA bandı daha verdiği tesbit edildi. Bu enzimle Çukurova ve Şanlıurfa izolatları arasında sadece 19. izolat yönünden bir farklılık gözlemlendi. Sonuçlar Şekil 6'da sol tarafta ve DNA bandlarının jelde aldıkları yol Çizelge 11.A'de verildi.

Hinfi'le referanslar arasında 3 farklı fragman görüldü. *L.tropica*'nın (K-27) diğer suşlardan farklı bir DNA bandı verdiği gözlemlendi. *L.turanica* (KD-51), *L.turanica* (PH-40), *L.turanica* (Clone-3720), *L.gerbilli* (gerbilli) ve *L. turanica*

(TSH-III) grup olarak benzer bir DNA fragmanı verdikleri görüldü. Bunun yanında *L.infantum* (LEM-75), *L.infantum* (LEM-2205), ve *L.arabica* (JISH-220) suşları grup olarak ortak bir fragman verdiler.

Çizelge 11.A: Örneklerin Total DNA-Hinfl Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)

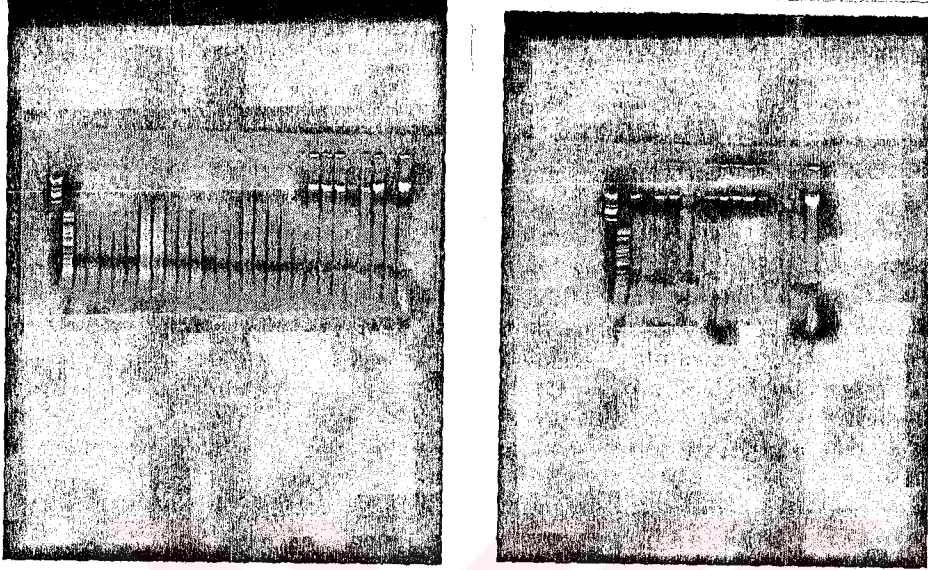
<u>1.859 cm</u>	<u>3.432 cm</u>	<u>3.861 cm</u>	<u>5.577 cm</u>	<u>5.720 cm</u>
19.Şanlıurfa	6. Adana	6. Adana	1.Düziçi	6.Adana
	7.Karaisalı	7. Karaisalı	2.Karaisalı	7.Karaisalı
			3.Karaisalı	
			4.Düziçi	
			5.Kozan	
			8.Karaisalı	
			9.Karaisalı	
			10. Düziçi	
			11.Adana	
			12.Karaisalı	
			13.Karaisalı	
			14.Düziçi	
			15.Düziçi	
			16.Adana	
			17.Adana	
			18.Düziçi	
			19.Şanlıurfa	
			20.Şanlıurfa	
			21. Şanlıurfa	
			22. Şanlıurfa	
			23. Şanlıurfa	
			24. Şanlıurfa	
			25. Şanlıurfa	

Referans suşlara ait total DNA-Hinfl restriksiyon profilleri Şekil 6'da sağ tarafta ve DNA bandlarının jelde aldıkları yol Çizelge 11.B'de verildi.

Çizelge 11.B: Referans Suşların Total DNA-Hinfl Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)

<u>1.573 cm</u>	<u>1.716 cm</u>	<u>5.005 cm</u>
L. turanica (KD-51)	L. tropica (K-27)	L.infantum (LEM-75)
L. turanica (PH-40)		L. infantum (LEM-2205)
L. turanica (CI.-3720)		L. arabica (JISH-220)
L. gerbilli (gerbilli)		
L. turanica (TSH-III)		

Örnek ve referans suşların total DNA'ları Alul restriksiyon profilleri incelendiğinde, 5'er farklı DNA bandı görülmektedir (Şekil 7).



Şekil 7: Örnek ve Referans suşların %0.7 agaroz jelinde total DNA-Alul Restriksiyon profilleri: (sol) ilk iki kuyu sırayla ticari λ DNA-EcoRI marker ve λ DNA-Alul kendi kesimimiz, 1-18 Çukurova, 19-25 Şanlıurfa örnekleri total DNA-Alul ve son kuyu *L.infantum* (LEM-2205) suşu sağlam total DNA'sı. (sağ) ilk iki kuyu sırayla ticari λ DNA-EcoRI ve λ DNA-Alul kendi kesimimiz, 26-39 referans total DNA-Alul ve son kuyu *L.infantum* (LEM-2205) suşu sağlam total DNA'sı.

Çukurova ve Şanlıurfa izolatlarının Alul fragmanları incelendiğinde, bu iki bölge izolatlarının birbirinden farklı olduğu görülmektedir. Örneklerde 5 farklı fragman oluştu. 2, 9, 15, 16 ve 25 no'lu izolatlara ait grubunda farklı bir fragman elde edildi. 1 no'lu izolat diğerlerinden farklı bir fragman verdi. Diğer bir örnek olan 24 no'lu örnek, tüm örneklerden farklı bir band verdi. 19-23 no'lu izolatlarda bir başka benzer fragman görüldü. İzolatlarda görülen beşinci fark, 3-5, 8, ve 18 no'lu örneklerin oluşturduğu grupta belirlendi. Ayrıca 6. fark ise 6, 7, 10-14 ve 17. izolatlarda olup bunlarda silik bandlar oluştuğu tesbit edildi. İlgili sonuçlar Şekil 7'de sol tarafta ve DNA bandlarının jelde aldıkları yol Çizelge 12.A'da gösterildi.

Çizelge 12.A: Örneklerin Total DNA-Alul Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)

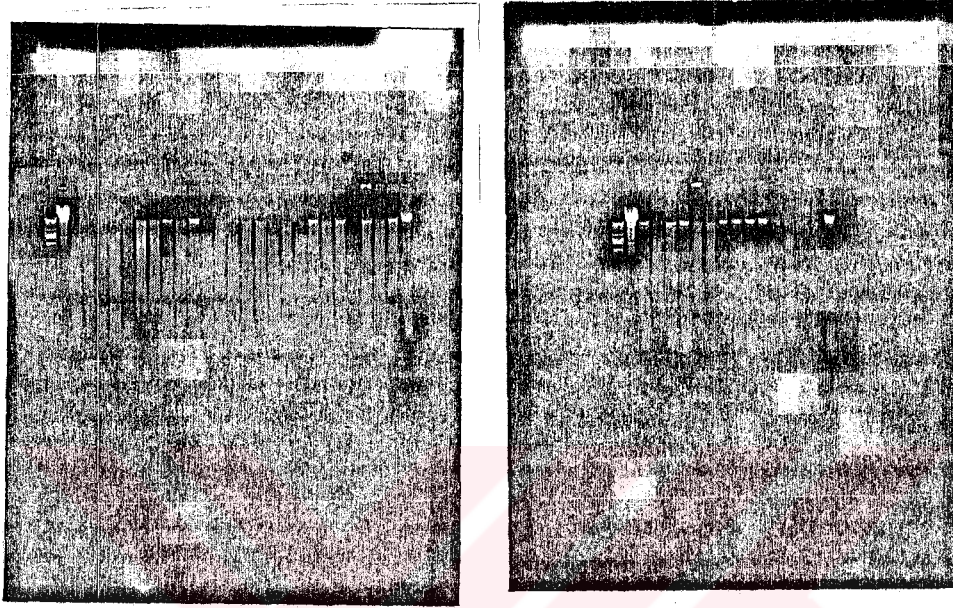
<u>1.287 cm</u>	<u>1.573 cm</u>	<u>4.719 cm</u>	<u>4.862 cm</u>	<u>5.434 cm</u>
24.Şanlıurfa	19.Şanlıurfa	3.Karaisalı	2.Karaisalı	1.Düziçi
	20.Şanlıurfa	4.Düziçi	9.Karaisalı	
	21.Şanlıurfa	5.Kozan	15.Düziçi	
	22.Şanlıurfa	8.Karaisalı	16.Adana	
	23.Şanlıurfa	18.Düziçi	25.Şanlıurfa	

Alul enzimi, referans suşlar arasında 5 farklı DNA fragmanı verdiği belirlendi. *L.infantum* (LEM-417), *L.donovani* (DD-8), *L.tropica* (K-27), *L.turanica* (KD-51), *L.turanica* (PH-40), *L.turanica* (Clone-3720), *L.turanica* (TSH-III), *L.major*+ *L.turanica*=mixture (9537) ve *L.major* (Nealp) suşları grup olarak farklı bir DNA fragmanı verdi. *L.infantum* (LEM-417), *L.donovani* (DD-8), *L.infantum* (LEM-75) ve *L.infantum* (LEM-2205) suşları bir ortak band daha verdikleri gözlemlendi. Bu band *L.infantum* (LEM-417) ve *L.donovani* (DD-8)'nin ikinci bandı olmaktadır. *L.major* (5-ASKH) ve *L.arabica* (JISH-220) suşlarında diğer suşlardan farklı bir DNA bandı gözlemlendi. *L.infantum* (LEM-75) (ilk bandı) ve *L.gerberilli*'de (gerbilli) birbirinden ve diğer suşlardan farklı olarak birer DNA bandı daha görüldü. Referans suşlara ait total DNA-Alul restriksiyon profilleri Şekil 7'de sağ tarafta ve DNA bandlarının jelde aldıkları yol Çizelge 12.B'de gösterildi.

Çizelge 12.B: Referans Suşların Total DNA-Alul Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)

<u>1.43 cm</u>	<u>1.573 cm</u>	<u>1.716 cm</u>	<u>5.005 cm</u>	<u>5.720cm</u>
L.gerberilli (gerbilli)	L.infantum (LEM-417)	L.infantum (LEM-75)	L.infantum (LEM-417)	L.major (5-ASKH)
	L.donovani (DD-8)		L.donovani (DD-8)	L.arabica (JISH-220)
	L.tropica (K-27)		L.infantum (LEM-75)	
	L.turanica (KD-51)		L.infantum (LEM-2205)	
	L.turanica (PH-40)			
	L.turanica (Clone-3720)			
	L.turanica (TSH-III)			
	L.major+turanica (9537)			
	L.major (Nealp)			

Kullanılan bir başka enzim olan RsaI ile elde edilen total DNA fragmanları karşılaştırıldığında, örnekler arasında 3, referans suşlar arasında 4 fark gözlenmektedir (Şekil 8).



Şekil 8: Örnek ve Referans suşların %0.7 agaroz jelinde total DNA-RsaI Restriksiyon profilleri: (sol) ilk iki kuyu sırayla ticari λ DNA-EcoRI marker ve λ DNA-RsaI kendi kesimimiz, 1-18 Çukurova, 19-25 Şanlıurfa örnekleri total DNA-RsaI ve son kuyu 2 no'lu örnek sağlam total DNA'sı. (sağ) ilk iki kuyu sırayla ticari λ DNA-EcoRI ve λ DNA-RsaI kendi kesimimiz, 26-39 referans total DNA-RsaI ve son kuyu 2 no'lu örnek sağlam total DNA'sı.

RsaI enzimi Çukurova ve Şanlıurfa izolatları arasında üç fark olduğunu gösterdi. 1-5 ve 13 no'lu izolatlarda benzer bir DNA bandı belirlendi. 3-7, 9, 11,12-18, 20 ve 24 no'lu izolatlarda ortak bir band olduğu görüldü. Üçüncü fark ise; 8, 10, 19, 21-23 ve 25 no'lu örnekler arasında tesbit edildi. Sonuçlar Şekil 8'de sol tarafta ve DNA bandlarının jelde aldıkları yol Çizelge 13.A'da görülmektedir.

RsaI'le referans suşlar arasında 4 farklı DNA fragmanı belirlendi. *L.infantum* (LEM-417), *L.donovani* (DD-8), *L.tropica* (K-27), *L.turanica* (KD-51), *L.turanica* (PH-40), *L.turanica* (Clone-3720) ve *L.gerbilli* (gerbilli) suşlarında ortak bir DNA fragmanı görüldü. *L.major* (5-ASKH) suşunda diğerlerinden farklı bir band tesbit edildi.

Çizelge 13.A: Örneklerin Total DNA-Rsal Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)

<u>1.43 cm</u>	<u>1.573 cm</u>	<u>4.719 cm</u>
8.Karaisalı	3.Karaisalı	1.Düziçi
10.Düziçi	4.Düziçi	2.Karaisalı
19.Şanlıurfa	5.Kozan	3.Karaisalı
21.Şanlıurfa	6.Adana	4.Düziçi
22.Şanlıurfa	7.Karaisalı	5.Kozan
23.Şanlıurfa	9.Karaisalı	13.Karaisalı
25.Şanlıurfa	11.Adana	
	12.Karaisalı	
	14.Düziçi	
	15.Düziçi	
	16.Adana	
	17.Adana	
	18.Düziçi	
	20.Şanlıurfa	
	24.Şanlıurfa	

L.infantum (LEM-75), *L.infantum* (LEM-2205), *L.turanica* (TSH-III), *L.major*+*L.turanica*=mixture (9537) ve *L.major* (Nealp) suşlarında ortak bir DNA bandı gözlemlendi. Suşlar arasında görülen dördüncü bir fark *L.arabica*'da (JISH-220) tesbit edildi. Referans suşlara ait total DNA-Rsal restriksiyon profilleri Şekil 8'de sağ tarafta ve DNA bandlarının jelde aldıkları yol Çizelge 13.B'de verildi.

Çizelge 13.B: Referans Suşların Total DNA-Rsal Bandlarının Jelde Aldıkları Yol (cm)

<u>1.716 cm</u>	<u>1.859 cm</u>	<u>2.002 cm</u>	<u>5.146 cm</u>
<i>L.infantum</i> (LEM-417)	<i>L.infantum</i> (LEM-75)	<i>L.arabica</i> (JISH-220)	<i>L.major</i> (5-ASKH)
<i>L.donovani</i> (DD-8)	<i>L.infantum</i> (LEM-2205)		
<i>L.tropica</i> (K-27)	<i>L.turanica</i> (TSH-III)		
<i>L.turanica</i> (KD-51)	<i>L.major</i> + <i>L.turanica</i> (9537)		
<i>L.turanica</i> (PH-40)	<i>L.major</i> (Nealp)		
<i>L.turanica</i> (Clone-3720)			
<i>L.gerbilli</i> (gerbilli)			

5. TARTIŞMA

Leishmaniazis tropikal ve subtropikal bölgelerde oldukça yaygındır. Ülkemizin başta güney doğu bölgesi olmak üzere diğer bazı bölgelerinde endemik ve iç kısımlarda sporadik olarak yayılım göstermektedir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre kutanöz leishmaniazis vakalarının büyük bölümü Şanlıurfa'da kendini göstermektedir. Ülkemizde leishmania parazitlerinin tiplendirilmesi yapılmamış olup, çalışmalar çoğunlukla vaka tespiti ve tedavisinden ibarettir^{15,16}.

Çalışmamızda, bu açığı kapamak amacıyla en azından bölgemizde kutanöz leishmaniazis yapan ajanların arasında farklılıklar var mı yok mu onu öğrenmek oldu. Bunun için moleküler tekniklerden total DNA restriksiyon fragman polimorfizmi (RFLP) çalışıldı. Bu çalışmadan başlayarak ileride parazit rezervuarı ve vektörlerini belirliyerek hastalıkla mücadeleye katkıda bulunmak amaçlandı. Moleküler tiplendirme ile aynı zamanda vizkerotropik ve dirençli ajanların tesbiti de mümkündür.

Kutanöz leishmania parazitlerinde restriksiyon profili çıkarmanın yolu; parazit izolasyonu, adaptasyonu ve biyokütle elde edilmesinden geçer. Bu amaçla laboratuvar koşullarını kullanarak, izolasyon sırasında amastigotta promastigota dönüşüm için bir çok besiyeri kullanıldı. Ancak tüm vakaların ajanlarına bire bir yanıt verebilen ortak bir besiyeri tesbit edilemedi (Çizelge 1). Bununla beraber birçok vaka ajanına yanıt verebilen %10 defibrine tavşan tam kanı içeren modifiye Evans bifazik besiyeri oldu. Bu besiyerine izolasyon sırasında önceleri harici herhangi bir sıvı katılmadı. Sadece kendi yoğun kültür sıvısının yeterli olduğu, promastigotların aktif olmadığı durumlarda zaman zaman glukoz veya tavşan tam kan lizati eklendi. Dünya'nın değişik laboratuvarlarında bu konuda yapılmış bir çok çalışma bulunmaktadır, ancak izolasyon amaçlı standart bir besiyeri önerilememiştir^{4,6,17,19}. Çoğu çalışmada 1x RPMI-1640 besiyeri izolatif amaçlı kullanılmış ve başarısı klasik NNN'le benzer bulunmuştur⁸. Bütün vakaların ajanlarına yanıt verebilen standart bir besiyerinin önerilemeyişi, parazitler arası fenotipik farklılıkların bulunduğu ve bu fenotipik farkların da genotipik farklılıklardan ileri geldiği söylenebilir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarla kutanöz leishmaniazis ajanlarının vektörleri *Phlebotomus sergenti* ve *P.papatasi* olarak tesbit edilmiştir. Rezervuar olarak Merinos ve Microtus'a ait kemirgenler kabul edilmektedir¹⁶. Dünya çapında yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre, eski dünya'da bulunan visseral ajanı *L.d.infantum*'un hasta insan ve rezervuar hayvanlarla yeni dünya'ya geçerek orada adapte olduktan sonra şimdiki *L.chagasi*'ye evrimleştiği, iki canlı arasında nükleer DNA'ya dayalı moleküler tekniklerden RFLP analizi ile belirlenmiştir. Ancak kökeni aynı olan bu iki canlının her iki bölgede hastalarda farklı kliniksel ve epidemiyolojik bulgu verdiği tesbit edilmiştir. Ayrıca rezervuar olarak köpekgiller, kemirgenler ve keseli memeliler kabul edilmiştir^{6,7,17}. Yapılan istatistiki araştırmalara göre dünya üzerinde 12-15 milyon insan leishmaniazisli olup bunlara her yıl 400 bin vaka eklenmektedir. Irak savaşı sırasında, kala-azarlı bir hastanın kemik iliğinden izole edilen suşun *L.tropica* (K-27) olduğu belirlenmiştir. Bunun kutanöz ajanı olduğu bilinmekle beraber viskerotropik bir yapı arzettiği tesbit edilmiştir^{10,45,81}. Daha ileri çalışmalarda, moleküler tekniklerle böyle geçiş formlarını tesbit etmek, leishmaniazisin kontrol altına alınmasında önem taşıyacaktır.

Leishmania parazitlerinin evriminde iki ayrı form görülmektedir. Bunlardan biri, omurgalıların makrofaj hücrelerinde oval şekilli, hareketsiz ve hücre içi paraziti olan amastigot, diğeri ise vektör vücudunda ve kültürde amastigottan daha büyük, kamçısıyla hareketli olan promastigot formları şeklindedir. Parazitin form değiştirmesinde sıcaklığın rolü büyüktür. Omurgalı epidermisinde sıcaklık 35°C'yi geçtiği zaman, amastigotun yeni bir makrofaj hücrelerini enfekte edemediği belirlenmiştir. Aynı şekilde ister kültürde ister vektör vücudunda sıcaklık 32°C'yi geçince promastigotların biçimleri bozulmaktadır^{1,23,56}. Çalışmamızda aspirasyon ile alınan aspirat, lama ince olarak yayıldı ve fiksasyon sonrası Giemsa ile boyandı. Işık mikroskobu altında, oval veya elipsoid şekilli amastigotlar makrofaj içinde ve bunların patlaması sonucu hücreler arasında serbest olarak tesbit edildi. Sitoplazmanın soluk mavi, nükleusun pembe veya koyu kırmızı ve kinetoplastın koyu kırmızı veya menekşe renginde oldukları tesbit edilerek fotoğrafları çekildi. Vakalardan elde edilen amastigot şekil ve boyutlarına bakarak bunlar arasında farkları

belirlemek mümkün değildir. Çünkü yapılan ölçümlere göre amastigot boyutları 1.5-3.1 μm olduğu bulundu. Laboratuvar şartlarımıza göre 24°C'de yapılan kültürden alınan promastigotlar lama fikze edilip, Giemsa ile boyandıktan ve bunların morfolojileri incelendikten sonra fotoğrafları çekildi. İzolatların promastigot boyutları 1.95-11.8 μm olarak ölçüldü (Şekil 1). Ayrıca kamçı boyları ortalama 12 μm ölçüldü. Bu bulgulardan yola çıkarak parazit tiplemesi yapılması mümkün değildir. Aynı şekilde yaz aylarında laboratuvar sıcaklığı zaman zaman 35°C ve yukarısı olunca promastigot formlarının bozularak, oval biçimli flagellalı promastigotların olduğu görüldü. Bunun için laboratuvar sıcaklığı klima ile kontrol altına alındı.

İzolatlar; başta Adana il merkezi olmak üzere Kadirli, Kozan, Düziçi ve Karaisalı yörelerini içine alan Çukurova bölgesinden gelen çok sayıda kuten lezyonlarından alındı. Aseptik şartlara uyularak, lezyon öncelikle %70 etanolle dezenfekte edilmesi sonucu kontaminasyonun önüne geçildi. Antibiyotikli PBS solusyonu içeren şırınganın iğnesi ile lezyon kenarından intradermal olarak deriye sokuldu. Aspirasyon, lezyon kenarı ile merkezinden yapılırken daha fazla amastigot alınabildi. Besiyeri standardizasyonu çalışmalarına göre izolasyon amaçlı kullanmayı kararlaştırdığımız bifazik besiyerinin yoğun kültür sıvısına inokülasyon yapıldı. Besiyeri 24°C sıcaklığındaki etüve kaldırıldı. Inkübasyonun yedinci günü bir damla örnek alınarak mikroskopta promastigot arandı. Gerekli ise örtü sıvısına distile su, glukozlu su veya tavşan tam kan lizatı eklendi. Ancak eklenen sıvının, orjinal sıvı hacmini geçmemesine özen gösterildi. 9-14.günler arası yapılan pasajın başarılı olduğu tesbit edildi. Pasaj, hem aynı taze bifazik besiyerine ve hem de %15 tavşan tam kan lizatı içeren 1x RPMI-1640 besiyerine yapıldı. Subkültüre 24°C'de devam edildi. Subkültür 7.günde kontrol edildikten sonra promastigot aktivite ve sayısı yoğunsa, buradan biyokütlenin alınacağı büyük hacme 2.sub pasaj yapıldı. Ayrıca hücreler bu aşamada log fazında bulunduklarından kriyoprezervasyonları yapıldı.

Pasaj sırasında bir çok faktöre bağlı olarak adaptasyon problemleri görüldü. Aspirasyon sırasında amastigot alınamaması, lezyonun küçük olması, lezyonun eski olması ve buna bağlı olarak fungal ve bakteriyal enfeksiyon taşınması ve hastaların o ana kadar medikal ve paramedikal uygulama yapmış

olmaları izolasyonu zorlaştıran etkenler oldu. Ancak bu konuda Çukurova ile Şanlıurfa örnekleri arasında büyük farklar göze çarptı. Şanlıurfa örneklerinde izolasyon ve adaptasyon problemi ortaya çıkmadı. Pasajlarda, her iki bölge izolatları için aynı besiyerleri kullanılmış olmasına rağmen, Şanlıurfa izolatları fazla gayret gerektirmedi. Bu da parazitler arası genotipik farklılığı ortaya koymaktadır. Şanlıurfa izolatları arasında adaptasyon konusunda, küçük te olsa farklar tesbit edildi. Çukurova örneklerinde izolasyonun 9.gününden önce yapılan pasajların izolat kaybına sebep olduğu belirlendi. Değişik laboratuvarlarda izolasyon amaçlı bir çok bifazik ve monofazik besiyeri kullanılmış, bunlarda da elde edilen başarılar farklı olmuştur. Yeni dünya izolatlarının izolasyonunda Brain Heart İnfüzyon Agar bifazik besiyeri uygun bulunurken, eski dünya izolatlarında klasik NNN ve Evans bifazik besiyerleri uygun bulunmuştur. Ancak tüm Dünya'da Schneider's Drosophila sıvı besiyeri en başarılı bulunmuştur^{2,11,29}. Bu besiyeri incelendiğinde içinde diğer besiyerlerine göre daha fazla miktarda prolin bulunmaktadır. İzolasyonda RPMI-1640 besiyerinin başarısı klasik NNN'le benzer bulunmuştur³³. Çoğu araştırmalarda, bifazik besiyerlerinin örtü sıvıları Schneider's Drosophila besiyeri kullanıldığında bir çok olgu etkeninin izole edildiği belirtilmiştir^{2,40,68}. Çalışmalarımıza göre, farklı örneklerin izolasyonlarında başarı sağlamak amacıyla, lezyonlardan alınan izolatların, kompozisyonları farklı bir kaç besiyerine verilmesi doğru olacaktır.

Moleküler tekniklerden restriksiyon analizinde her enzim başına en azından 2 µg total DNA gerektiği için fazla sayıda promastigota ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ise büyük hacimde kültür yapmakla mümkündür. Çeşitli çalışmalarda biyokütle elde etmek amacıyla Senekjie gibi bifazik besiyerleri kullanılmıştır. Ancak bu tip besiyerlerinde üretilen promastigotlarla beraber besiyerinden gelen antijenik karakterler ve DNA bulunduğundan moleküler çalışmalar için yalancı pozitiflikler söz konusudur⁴⁴. Daha sonraları, geniş amaçlı olarak, Medium-199, RPMI-1640, MEM, Grace's ve Schneider's Drosophila Besiyerleri kullanılmıştır. En yüksek hücre yoğunluğu %20 FCS içeren Schneider's Drosophila besiyerinde alınmıştır^{21,50,62}. Stasyonere faza erişme süresi, sıvı besiyerlerine insan tam kan lizati, hemin, prolin gibi

maddeler katılarak yapılan modifikasyonlar ile kısaltılmaya çalışılmış ve son zamanlarda bu modifikasyonlar RPMI-1640, ve Medium-199 gibi besiyeri karışımlarında da denenmiştir^{12,47,51}. Çukurova ve Şanlıurfa vakalarından izole edilen 25 izolat ile Dr.Alvar ve Dr.Strelkova'dan sağlanan 14 adet referans suşun biyokütle için büyük hacimde kültürleri, laboratuvarımızda modifiye edilen 1x RPMI-1640'ta yapıldı. İzolasyon sonrası birinci sub kültürün 7.gününden sonra 50 ml'lik yuvarlak kültür tüplerine inokülasyon yapıldı. Modifiye edilen besiyerinde ml'de $2-4 \times 10^7$ hücre elde edildiğinden ve diğer yandan total DNA çalışması için toplam $5 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ hücre kullanılacağından, büyük hacimli kültür (25 ml, 1x RPMI-1640) yapıldı. En iyi kültürasyon, besiyerinin kademeli olarak arttırılması esasına dayanan uygulama ile oldu³⁶. İlk kademede kullanılan 5 ml'lik RPMI-1640'a %15 tavşan tam kan lizati eklendi. Büyük hacmin tamamı kullanıldığında, doğal seleksiyonla adaptasyon gösteremeyen promastigotlar öldüğünden, birim hacme düşen hücre sayısının azaldığı, kültürün yok olduğu veya istenen hücre sayısına ulaşma zamanının arttığı belirlendi. Üreme eğrisi çalışmalarına ve Dr.Strelkova'nın önerileri doğrultusunda hücreler geç log fazında, yani kültürün 14.gününde toplandı.

Kriyoprezervasyon, pasaj ve total DNA için gerekli olan hücrelerde çalışmak amacıyla hücre üreme siklusunun bilinmesi şarttır. *L.tropica* (K-27) hem bifazik besiyerine hem de monofazik besiyerine ekilerek üreme eğrisi çıkarıldı. Bifazik besiyerinde ilk iki gün uyum, 2-7.gün log, 7-8.gün stasyoner ve 8.günden sonrası iniş fazı olarak tesbit edildi. Monofazik besiyerinde ise; ilk 2 gün uyum, 2-15.gün log, 15-17.gün stasyoner ve 17.günden sonrası iniş fazı olduğu belirlendi (Çizelge 2, Şekil 2).

Çeşitli laboratuvarlarda, kriyoprezervasyon için sıvı besiyerine kriyoprotektan olarak DMSO (dimetil sülfoksit) veya gliserol kullanılmıştır. Genellikle log fazındaki 1-3.sub kültürdeki hücreler kriyoya alınmıştır¹⁷. Eski dünya izolatları son derişimi %7.5 olan gliserol kullanılarak, izolasyonun hemen ardından dondurulmuştur^{20,42}. Yeni dünya izolatlarında 5-7 gün arayla yapılan 2-3 pasaj sonra kriyoprezervasyona girilmiştir^{50,52-54}. Log fazı promastigotları DMSO veya gliserol içeren besiyerlerinde aşamalı soğutmadan sonra, sıvı azota alınmıştır⁵⁵. Çukurova ve Şanlıurfa izolatlarında %7.5 gliserol

kriyoprotektanı kullanılarak aşamalı soğutma ve hızlı çözme işlemi uygulandı. Bu şekilde hücrelerin tekrar aktivasyonunda bir problemle karşılaşılmaı.

Schneider's *Drosophila* ile 1x RPMI-1640 besiyerlerinde yapılan kùltür çalışmalarının sonuçlarına göre sırasıyla ml'de $5-8 \times 10^7$, $2-5 \times 10^7$ promastigot elde edilmiştir^{5,21,35,56}. Birim hacme düşen hücre sayısını, yani populasyon taşıma kapasitesini arttırmak amacıyla kendi olanaklarımıza göre modifiye edilen 1x RPMI-1640 besiyerine değişik oranlarda tavşan ve insan tam kan lizatları eklendi. Ayrıca bifazik besiyeri olarak modifiye Evans besiyeri kullanıldı. Bu çalışma ile ml başına düşen hücre sayısının artmadığı görülürken, stasyonier faza erişme zamanının kısalıldığı tesbit edildi. Buna göre: -Modifiye Evans bifazik besiyerinde (1) *L.tropica* (K-27) ve *L.donovani* (DD-8) 14.günde; - Sade 1x RPMI-1640 besiyerinde (2) *L.tropica* (K-27) ve *L.donovani* (DD-8) 12.günde; -Defibrine tavşan tam kanlı (%15) 1x RPMI-1640 besiyerinde (3) *L.tropica* (K-27) ve *L.donovani* (DD-8), 8.günde; -Tavşan tam kan lizatı (%15) içeren 1x RPMI-1640 besiyerinde (4) *L.tropica* (K-27) 6. ve *L.donovani* (DD-8) 7.günde; -İnsan tam kan lizatı (%15) içeren RPMI-1640 besiyerinde (5) *L.tropica* (K-27) ve *L.donovani* (DD-8) 4.günde maksimum sayıya eriştikleri görüldü (Çizelge 3). Böylece kan lizatı katıldığında, büyük hacimde hücre toplama zamanı erkene alınabilmektedir. Ancak lizat, beraberinde antijenik faktörler de getirebileceğinden serodem ve zimodem analizine uygun değildir. Bu tür modifikasyonlar sık sık pasaj gerektirmektedir.

Birim hacme düşen hücre sayısı ve geçen süreyi kısaltma konulu iyileştirme çalışmaları çerçevesinde olmak üzere; besiyerine, fitohemaglutinin, değişik konsantrasyonlarda eklendi. Ancak promastigot hücrelerinin etkilenmediğı tesbit edildi (Çizelge 4). Bunun nedeni muhtemelen, mitotik ajanın, parazitik hücreler ile iletişim kuramamasındandır.

CO₂ kontrolü bulunmayan etüvlerde, fazla katılan NaHCO₃ atmosferik CO₂ dengesizliğı nedeniyle zamanla pH'yı yükseltir ve besiyerlerine pasajlanan hücrelerin ölümüne yol açar. Karbondioksit kontrolü olmayan besiyerlerine pH yükselmelerini engellemek amacıyla 4-8 mM NaHCO₃ katılır⁴⁵. CO₂ kontrollü etüvümüz bulunmadığından, NaHCO₃'ın değişik konsantrasyonlarının promastigotlara etkisi araştırıldı. Buna göre nötral pH için en iyi

konsantrasyonun 4.76 mM NaHCO₃ olduğu tesbit edildi (Çizelge 5). Bu derişimin üzerine çıkıldığında, promastigotların pasajın hemen ardından adaptasyon evresinde yüksek pH nedeniyle öldükleri belirlendi. Ancak adaptasyon sağlanınca hücrelerden kaynaklanan asidite nedeniyle pH'nın yükselmesi söz konusu değildir.

Büyük hacimde geç log fazına gelen hücreler bu haliyle kültürde bırakılamaz. İniş fazını takiben promastigotlar rozetleşirler ve ölüm başlamasıyla beraber hücre lizisi gündeme gelir. DNaz açığa çıkar. Bu da DNA'nın parçalanmasına neden olur. Bu yüzden geç log fazına gelen hücreler santrifügasyonla toplanarak, %0.9 izotonik solüsyonla iki kez yıkandı. Ardından muhtemel DNaz aktivitesini inhibe etmek amacıyla, son olarak hücreler 100 mM EDTA içeren SET tamponu ile yıkandı ve kuru pelet olarak -20°C'ta kullanılabilecek kadar saklandı (örnek ve referans tam listesi EK.1.38). Bu aşamada hücreler ne kadar temiz olursa, elde edilen DNA'nın jeldeki görünümünün de o kadar temiz olduğu tesbit edildi. Çoğu laboratuvarında hücrelerin yıkanması için PBS, izotonik solüsyon veya lizis solusyonu gibi değişik tamponlar kullanılmış ve hücre peletleri -20 veya -70°C'de saklanır. Bazende hücre peleti SDS ile muamele edilerek lizat şeklinde -20°C'de korunmuştur^{9,49,60}.

Promastigotlardan total DNA elde etmek amacıyla, çeşitli laboratuvarlarda bileşimleri farklı bir çok lizis tamponu kullanılmıştır. Lizat elde edildikten sonra kromozomlarda bulunan proteinlerle, hücreden gelen çeşitli proteinlerin alt ünitelerine ayrılması ve bunların sindirimi için deterjan (SDS/sarkosil) ve enzim (pronaz/proteinaz K) karışımı kullanılmıştır. Hücrelerin lizisi amacıyla değişik sıcaklıklarda ve değişik sürelerle inkübasyon yapılmıştır. Ancak promastigot total DNA'larının purifikasyonunda genel olarak fenol-kloroform karışımı kullanılmıştır^{8,11,51,53}. Ayrıca son zamanlarda insan lökosit hücrelerinden genomik DNA elde edilmesinde "tuz ekstraksiyon" yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemle elde edilen DNA'nın; klonlamaya, restriksiyon kesime ve blotlamanın arkasından hibridizasyona uygun olduğu tesbit edilmiştir⁷⁶. Laboratuvarımız olanaklarına göre Gomez-Eichelmann et al⁵¹ SET hücre lizis tamponu kullanıldı. Lizatın elde edilmesinde pronazla beraber SDS kullanıldı. Deproteinizasyon işlemine gelindiğinde, fenol-kloroform ile tuz ekstraksiyon sistemleri

karşılaştırmalı olarak uygulandı. Bunun için ilk başta pronaz ve SDS ile elde edilen lizat iki tüpe ayrıldıktan sonra, birine fenol-kloroform diğerine tuz ekstraksiyon yöntemi uygulandı. Her iki yöntemle elde edilen total DNA'nın spektral analizle saflık ve verimi incelendi. Bunun sonucuna göre fenol-kloroform ile elde edilen total DNA'nın saflığı 1.565 ve verimi 0.18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak bulunurken, tuz ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen total DNA'nın saflığı 1.857, verimi ise 0.195 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak tesbit edildi (Çizelge 6). Bu sonuçlara bakıldığında tuz ekstraksiyon yönteminin fenol-kloroform yöntemlerine göre daha elverişli olduğu görülmüştür. Gerçekten de proteinlerin tuzla uzaklaştırılması hem saf DNA elde edilmesine katkıda bulunmakta, hem de fazla ekipman gerektirmemektedir. Aynı zamanda, ucuz ve non-toksiktir. Daha sonra, tuz ekstraksiyon yönteminde sarkozil ile SDS karşılaştırmalı olarak denemeye alındı. SDS'in, soğuk ortamda SDS-NaCl-protein presipitatu oluşturduğu görülürken, sarkozil böyle bir presipitat oluşturmamakla beraber dipte tuz çökeleği meydana getirdiği belirlendi. Bu yüzden SDS tercih edildi.

Yapılan çalışmalara göre; DNA hangi yöntemle pürifiye edilirse edilsin; ürün DNA'nın SDS, tuz, EDTA gibi istenmeyen kontaminantlar taşıyacağı kuşkusuzdur. Bunun için DNA'nın etanolle presipitasyon aşaması sırasında işlemin, ammonyum asetatla üç kez tekrarlanmasının DNA'yı daha iyi purifiye ettiği saptanmıştır. Aynı şekilde restriksiyon enzimlerinden tasarruf bile yapılabilmektedir^{75,77}. Çalışmalarımızda ammonyum asetat ile üç defa işlem gören total DNA'nın spektral analizle saflık ve verimi ölçüldü. Buna göre ilk işlem sonrası DNA, 1.52 saflık değeri ve 0.655 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olduğu, işlem tekrar edildiğinde saflık 1.61 ve verim 0.645 olarak ölçüldü. İşlem üçüncü kez tekrarlandığında ise saflığın 1.72, verim de 0.635 olarak belirlendi (Çizelge 8). Burada da görülmektedir ki purifikasyon sayısı arttıkça total DNA'da önemsiz kayıplar olurken, saflıkta önemsenir artışlar belirlendi. Böylece total DNA izolasyonuna bu işlemlerde eklenmiş oldu. Son olarak izole örnek ve referans total DNA'ları, TE tamponunda (pH8.0) ayrı ayrı çözüldü ve spektral analiz ile saflık ve verimleri belirlendi (Çizelge 7). Elde edilen total DNA miktarlarına bakıldığında, hepsi aynı özeni görmüş olmalarına rağmen, DNA miktarlarında

farklılıklar olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Burada, ufak genotipik farklılıkların ufak fenotipik yansımalarını görmekteyiz.

Total DNA'nın restriksiyon enzim profillerinin çıkarılması her şeyden önce total DNA'nın tam kesimine bağlıdır. Çeşitli laboratuarlarda promastigot genomik ve total DNA'ları PstI, PstI/PvuI, PvuI, Aval, EcoRI, HindIII, HpaII, SmaI, ApaI, MluI, Sall, HinfI, BamHI, XhoI gibi enzimlerle kesilmiştir. Buradaki fragmanlar agaroz jelinde görüntülenerek DNA polimorfizmi incelenmiştir^{12,53,58,60}. Aynı şekilde total DNA'da tam kesim yapmak amacıyla bir mikrogram DNA başına 3 U enzim verilmiş ve kesim 4 saatte tamamlanmıştır⁵⁸. Başka bir çalışma ile 50 µl reaksiyon hacminde her mikrogram DNA başına 5 U enzim kullanılmış ve kesim süresi 4 saat olarak yapılmıştır⁸. *T. cruzi* total DNA'sı 20 µl reaksiyon hacminde ve 3 µg total DNA varlığında kesilmiştir⁵³. Başka bir çalışma ile de 8 µg total DNA, 50 µl reaksiyon hacminde, bir mikrogram DNA başına 5 U enzim verilerek 4 saatlik bir kesim süresi uygulanmıştır^{12,35}. Laboratuvar koşullarımıza uygun olarak restriksiyon enzim miktarı, kesim hacmi ve kesim süresinin belirlenmesi amacıyla seri denemeler yapıldı. Her çalışma sırasında, referans amaçlı, aynı koşullarda λ DNA'sı da kesildi. Her uygulama ayrı ayrı elektroforezde değerlendirildi.

Bu çalışma sonuçlarına göre, izolatlarımızın total DNA'sı amonyum asetatla purifikasyon öncesi her mikrogram DNA başına 5 U, sonrasında da 3 U enzim kullanıldı. Buna göre en iyi kesim 1.5 ml Eppendorf tüpünde ve 30 µl reaksiyon hacminde 2 µg DNA, her mikrogram DNA başına 3 U enzim verilerek 4 saat boyunca 37°C'lik etüvde elde edildi. Çeşitli çalışmalarda sıcaklık su banyosu ile ayarlandığı ifade edilmişse de, böyle bir ortamda Eppendorf tüpü tümü ile suya batmadığından iç yüzeyleri arasında sıcaklık farkları olduğu, tüp kapağında suyun yoğunlaşmasıyla anlaşıldı. Bunun da kesim koşullarını etkilediği düşünüldü. Ayrıca son ürün PCR cihazlarında, ısı kontrolü amacıyla su kullanılmadığını biliyoruz. Gerçekten de sıcaklık ayarı kuru havada yapılırken Eppendorf tüpünün hiç bir yüzeyinde yoğunlaşma görülmemektedir.

Reaksiyon süresi sonunda, reaksiyonu durdurma aşamasında bir kısım enzimlerin ısı ile inaktif olmadığı bilinmektedir. Bu sorunu yenmek için ortama son derişimi 10 mM olan EDTA (pH8.0) eklenir⁷⁷. Bu koşulu sağlamak amacıyla

jelde fragman migrasyonun takibi için kullanılan takip-stop karışımına EDTA eklendi. Diğer yandan, düzgün DNA bandları elde etmek için takip-stop karışımına sırasıyla dansite artırıcı olarak gliserol, sukroz veya fikol eklendi. Çalışmalarımızda, gliserol ve sukroz ile hazırlanan takip boyasıyla yapılan aplikasyonların DNA bandlarını pürüzlü yaptığı, ancak son derişimi %5 olan fikol kullanıldığında düzgünleştirdiği görüldü. Elektroforez sırasında migrasyonun izlenmesi amacıyla takip-stop karışımına ksilen siyanol ve bromofenol mavisinin yanısıra yapışkan DNA uçlarını çözmek amacıyla karışıma %0.1 SDS katıldı.

Total DNA restriksiyon fragmanlarının jelde görüntülenmesi için, %0.6-1 arası agaroz jelleri kullanılmıştır. kDNA enzim profillerinde agarozdan ziyade akrilamid jeli kullanılmıştır^{35,52,62,74}. Optimizasyon çalışmaları sırasında EcoRI enzimi kullanıldı. Agaroz jeli, %0.3-3.0 arası konsantrasyonlarda hazırlanarak DNA fragman farklarını en iyi verebilecek agaroz konsantrasyonu belirlendi. Buna göre fragmanlar arası farkı en iyi %0.7 agarozun verdiği tesbit edildi. Ayrıca bu konsantrasyondaki jelin küçük DNA bandlarını gösterip gösteremediğini sınamak amacıyla aynı elektroforez, poliakrilamid jelinde de yapıldı. Aynı zamanda, daha küçük DNA bandlarını göstermede gümüş boyanın EtBr'ten üstünlüğü olup olmadığı denendi. Çalışma sonuçlarına göre, agaroz jelde elde edilen bandlardan daha fazlasının bulunmadığı ve bu nedenle de çok küçük bandların belirlenmesinde EtBr'e kıyasla daha hassas olduğu bilinen gümüş boyamanın da gereksiz olduğu tesbit edildi. Sonuç olarak, örnek ile referans suş total DNA'larının restriksiyon fragmanları, 20x15x0.4 cm ebatlarında, %0.7 agaroz jeli ve cm'ye 8 volt verilerek elektroforeze tabi tutuldu. Her kuyuya 15 µl hacimde yaklaşık bir mikrogram DNA aplike edildi. Ön denemelerde DNA fragmanları ksilen siyanol boyası ile beraber ilerliyorsa elektroforez süresi yaklaşık 4 saat, bromofenol mavisini ile koşuyorsa yaklaşık 2 saat kadar tutuldu. Zira ksilen siyanol boyası molekülleri bromofenol mavisinden daha büyüktür. Bu çalışmada da referans amaçlı EcoRI ile kesilmiş λ DNA fragmanları marker olarak kullanıldı.

Elektroforez süresi bitiminde, jel 30 dakika süre ile dinlenmesi amacıyla 0.5x TBE tamponunda bekletildi. Ardından transillüminatör filtresine dikkatlice

yerleştirilerek, Poloroid DS 34 kamerası ve 667 tip siyah-beyaz filmle fotoğraflandı. Değerlendirmede DNA bandlarının sayı ve büyüklüklerini belirlemek üzere aplikasyon noktasından itibaren aldığı yol cm olarak ölçüldü.

Daha önceleri, parazitleri tiplendirmek amacıyla çeşitli kriterlerden yararlanılıyordu. Bu tekniklerden bir tanesi promastigotların dış görünüşü ve büyüklüğü ile bunlara bağlı olarak hastalarda oluşturdıkları periferik belirtiler idi^{6,17}. Bu yöntemlerin yetersizliği ve çağdaş moleküler yöntemlerin gelişmesiyle yeni ve daha güvenilir teknikler ortaya çıktı. Bu bağlamda, küçük halka kDNA restriksiyon fragman profilini içine alan şizodem analizi^{17,59,62}, parazit antijenlerinin monoklonal antikorlarla tarandığı serodem analizi^{1,39,54}, parazit enzimlerinin karşılaştırıldığı zimodem analizi^{44,46}, genomik ve total DNA restriksiyon fragman profilinin karşılaştırılmasına dayanan RFLP analizi^{20,53,62}, total ve kDNA'ya dayalı ve bir fragmanın olup olmadığına bağlı PCR taraması^{54,59}, kromozom veya büyük DNA fragmanlarının karşılaştırılmasına dayanan PFGE analizi^{8,61,62}, rastgele primer kullanılarak taranan fragmanlar arasındaki polimorfizmi tesbit edebilen RAPD analizi^{69,71} gibi çok sayıda teknik sayılabilir. Bu tekniklerden serodem ile zimodem fenotipik karakterleri karşılaştırmada, diğer teknikler ise genotip karşılaştırması şeklindedir. Daha önceleri, türden türe farklılık gösteren küçük halka kDNA'nın restriksiyon enzimleriyle taranması yaygın görülmüşse de günümüzde total DNA'nın restriksiyonlarla taranmasına dayanan RFLP analizine kayılmıştır^{13,38}. Ancak bu analiz şeklinin güvenilirliğini arttıran Southern blotlama ve hibridizasyonu takiben otoradyografinin uygulanması halinde, büyük bir ekipman, uzun zaman ve pahalı bir maliyet gerektirmektedir.

Çukurova ve Şanlıurfa yöresinden elde ettiğimiz izolatların ilk etapta RFLP analizi ile taranarak aralarında fark olup olmadığını sınamak amacıyla, testin pahalı olan kısmına şimdilik girilemedi. Zaten son zamanlarda, problemli kütürasyon aşamasını ve proba sadece sınırlı sayıda fragman taranabilmesi gerçeğini atlayabilmek için RAPD analizi uygulamaya alınmıştır^{72,73}. Artık, parazitlerin tam olarak identifikasyonunun, bir kaç tekniğin beraberce uygulanmasına bağlı olduğu kabul görmektedir^{40,66}.

Elimizde bulunan EcoRI, HindIII, HinfI, HaeIII, AluI ve RsaI enzimlerin kullanımıyla Çukurova ve Şanlıurfa yöresinden elde edilen izolatların (Ek 1.38) total DNA fragmanları arasında farklar bulunduğu tesbit edildi.

EcoRI'le elde edilen DNA profiline bakıldığında, izolatlar arasında 5, referans suşlar arasında 3 farklı grup tesbit edildi (Şekil 3). Örnek ve referansların tümünde farklı büyüklüklerde birer fragman gözlemlendi; Çukurova ve Şanlıurfa örnekleri arasında toplam 5 farklı DNA fragmanı belirlendi (Çizelge 9.A). Bu enzimin DNA profilleri dikkatlice incelendiğinde, bu farkların bir yörenin kendi içinde de olduğu görülür. Sonuç olarak aynı ve farklı coğrafyalarda leishmania parazitleri arasında heterojenite bulunduğu görülmektedir. Referans suşlarda tesbit edilen 3 farklı DNA bandının (Çizelge 9.B); Çukurova ve Şanlıurfa örnekleri EcoRI DNA fragmanlarına benzememektedir.

Total DNA HindIII fragmanları incelendiğinde bu enzim yönünden izolatlar arasında 4, referans suşlarda 5 fark gözlenmektedir (Şekil 4). Çukurova ve Şanlıurfa örnekleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde, Şanlıurfa örneklerinin 6 tanesinin benzer, sadece birinin farklı olduğu ve bunun Çukurova örneklerine benzediği görülmektedir. Böylece bu enzimin fragmanları yönünden, Çukurova örneklerinin Şanlıurfa örneklerinden daha heterojen olduğu belirlendi. Tespit edilen 4 farklı fragmanın 3'ü, referans total DNA-HindIII fragmanlarıyla benzer bulundu. Özellikle bu benzerlik, *L.donovani* (DD-8), *L.tropica* (K-27), *L.turanica* (KD-51), *L.turanica* (PH-40), *L.turanica* (Clone-3720) ve *L.gerberi* (gerbilli) örnekleriyle daha fazla görülmektedir. Bu referansların çoğunun Orta Asya kaynaklı (Rusya) olması önemlidir. Hatta örneklerin diğer farklı grubu yine de Rusya orijinli *L.turanica* (TSH-III) suşuna benzemesi ayrı bir önem arz etmektedir (Çizelge 10.B).

Total DNA'nın HaeIII fragmanları incelendiğinde, çok küçük ve çok sayıda band vermesi nedeniyle değerlendirilebilir bir DNA bandı gözlenemedi. Sadece *L.arabica* (JISH-220) tüm referans ve örneklerden farklı olarak değerlendirilebilir bir DNA bandı verdiği gözlemlendi. Ancak şekil dikkatle incelenirse silik bandlar arasında da farklar olduğu görülebilir (Şekil 5).

HinfI DNA fragmanları tetkik edildiğinde; izolatlar arasında 5, referans suşlar arasında da 3 farklı DNA fragmanı görülür (Şekil 6). Örnekler arasında

Hinfl restriksiyon profilleri analiz edildiğinde, Şanlıurfa örneklerinin birinin fragmanı dışında diğerlerinin benzer olduğu görülmektedir. Çukurova örneklerinin Şanlıurfa örneklerinden genotipik olarak daha heterojen olduğunun belirlenmesi, Çukurova örneklerinin izolasyon ve adaptasyon zorluğunun bulunduğunu adeta kanıtlamaktadır. Ayrıca örneklerin bu enzim fragmanları yönünden fererans suş fragmanlarıyla uyum içinde olmadığını görmekteyiz (Çizelge 11.A). Referans suşlar arasında Hinfl enzimi yönünden 3 farklı fragman tesbit edildi. Heterojenitenin bu enzim yönünden referanslarda fazla olmadığı görülmektedir (Çizelge 11.B).

İzolat ve referans total DNA-Alul restriksiyon profillerine bakıldığında, örnekler ve referanslar arasında 5 er farklı DNA fragmanı olduğu gözlenir (Şekil 7). Örnekler açısından değerlendirme yapıldığında, bu enzimin, Çukurova ile Şanlıurfa örneklerini tam olarak genotipik yönden ayırdığını belirlemenin yanısıra Şanlıurfa örneklerinden birisinin Çukurova örneklerine benzediğini gözler önüne sermesi oldukça anlamlıdır. Böylece bu Şanlıurfa örneğinin, bu enzim yönünden oldukça heterojen olan Çukurova örneklerinden orijin aldığı kanısını güçlendirmektedir (Çizelge 12.A). Referans suşlarının DNA fragmanları arasında 5 farklı fragman görülmekle beraber, yine çoğunluğunu Orta Asya (Rusya) orijinli referansların oluşturduğu DNA fragmanlarını tamamen Şanlıurfa örneklerine benzemesi oldukça dikkat çekicidir. Bu benzerliğe *L.tropica* (K-27) suşunun katılmış olması da ayrıca önemlidir (Çizelge 12.B). Ayrıca bazı örneklerde bu enziminin silik bandlar verdiği izlendi.

Rsal total DNA profilleri incelendiğinde de, izolatlar arasında 3, referans suşlar arasında da 4 farklı DNA fragmanının olduğu görülür (Şekil 8). Bu enzim profilleri yönünden Şanlıurfa örnek fragmanlarının benzer olduğu ve Çukurova örneklerinin bunlara göre çok heterojen oldukları görülmektedir. Bu enzim verileri de diğer enzim verilerini tamamen destekler durumundadır. Çukurova örnekleri ile, kültürasyon çalışmaları sırasında karşılaşılan izolasyon ve adaptasyon farklılıkları, moleküler tekniklerle elde edilen heterojenitenin acaba bir kanıtı mıdır? (Çizelge 13.A). Rsal, referans suşları arasındaki heterojeniteyi göstermekle beraber, örneklerin de farklı görünüme sahip olduklarını göstermektedir (Çizelge 13.B).

Sonuç olarak, örneklerimiz arasında genotipik olarak büyük bir heterojenite bulunmaktadır. İzolasyon, adaptasyon ve kltrasyonlar sırasında karşılaşılan fenotipik güçlükler acaba genotipdeki heterojenitenin yansıması mıdır?; Bu heterojenite, direnç değişikliği ve kutanöz ajanların viskerotropik dönüşümünün temeli midir?; Yoksa, bu görünüm bölgesel rezervuar zenginliğinin bir göstergesi midir?.

Çalışmamız, bu soruları yaratmıştır. zm, kuşkusuz daha ileri gayretler gerektirmektedir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Genotipik farklılığın yansıması olan fenotipik farklılıklar nedeniyle Leishmania Parazitlerinin izolasyonu ve adaptasyonları için ortak bir besiyeri önerilememektedir. Çalışmamızda Çukurova bölgesinde bulunan tüm kutanöz leishmania örneklerinin izolasyonuna yanıt verebilen bir besiyeri elde edilemedi. Ancak %10 defibrine tavşan kanı içeren Modifiye Evans bifazik besiyeri ile Şanlıurfa bölgesindeki örnekler Çukurova bölgesindeki örneklerden çok daha kolay izole edebildi. Bununla beraber tüm İzolasyon ve adaptasyon için laboratuvar imkanları gözönünde tutularak, aspirat sıvıları birkaç besiyerine verilmelidir. Böyle olunca bu besiyerlerinden birisi bunların ihtiyacını karşılayabilecektir.
2. Çalışma yapılan her iki bölgede elde edilen izolatlar, bulunması muhtemel tüm izolatları temsil edemediği kanısındayız. Bu nedenle özellikle Çukurova bölgesi için izolatif amaçlı besiyerleri üzerinde çalışılmalıdır.
3. İzolasyonda sade RPMI-1640 besiyerinin başarısız olduğunu tesbit ettik. Ancak bu besiyeri aşama aşama arttırılarak ve ilk aşamasına %15 tavşan tam kan lizatı eklenmek suretiyle, geniş hacimli biyokütle kültüründe başarılı olarak kullanılabilir. Burada besiyeri pH'sı ve besiyerine katılan kan lizatının önemi büyüktür.
4. CO₂ kontrolü bulunmayan etüvlerde kültür yapıldığında, yüksek konsantrasyonda NaHCO₃ katılması pH'yı yükselterek parazit adaptasyonunu zorlaştırmaktadır. Leishmania parazitlerinin kültürü pH 7 dolayında çok iyi yapılabilmektedir. Ayrıca bu parazitlerin HCO₃ iyonlarına ihtiyaçları minimaldir. Bu nedenle yaklaşık 5 mM NaHCO₃'ın 1x RPMI-1640 besiyerine katılması yeterlidir.
5. Populasyon Taşıma Kapasitesinin yükseltilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, klasik sayının aşılamadığı tesbit edildi. Ancak modifikasyonlar la, maksimum biyokütleyle erişme zamanı kısaltılabilir.
6. Leishmania promastigot mitotik indeksi, T lenfositlerini stimüle eden mitojenlerden etkilenmemektedir.

7. Kriyopezervasyon genç hücrelerle yapıldığında daha iyi sonuç alınmaktadır. Biyokütle ise geç log fazındaki hücrelerden alındığında, daha temiz total DNA elde edilmektedir. Stasyonier fazda, hücre lizisi başladığından DNaz bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yüzden her laboratuvar çalıştığı besiyerine ve diğer şartlara göre üreme eğrisi çıkarmalıdır.
8. RFLP analizi sonucu, Çukurova ve Şanlıurfa bölgelerinde farklı genotipte parazitler olduğu tesbit edildi. Eldeki referans suşların DNA fragmanlarıyla izolatların fragmanları arasında benzer olanlar bulunmasına rağmen, heterojenite mevcuttur.
9. Laboratuvarımızda yapılan total DNA restriksiyon profil analizi ile farklı izolatların tanımlanması zordur, ancak polimorfizm olduğu gösterebilmektedir. Suş şeklinde identifikasyon yapabilmek için Uluslararası kabul edilmiş problemlerle çalışmanın yanısıra, referans problemlerle identifikasyonu mümkün olmayan bölge izolatlarının genomik veya kDNA'larının sekans analizi yapılarak, bölgeden prob seçimine gidilmesi çok yararlı olacaktır.
10. Çalışmamızda az sayıda görünebilir DNA bandı oluşması DNA'nın çok sayıda fragmana ayrıldığına kanıttır. Kullandığımız restriksiyon endonükleaz enzimlerinin baz tanıma bölgelerinden çok daha uzun DNA tanıma bölgesi enzimler kullanılmalıdır. Bu durumda uzun tanımalı enzimlerle DNA daha az yerlerden kesilecektir. Böylece daha az sayıda fragman oluşacağından bunları karşılaştırmak mümkün olacaktır.
11. Bölgemizdeki izolatların genotipik polimorfizmlerini belirlemek amacıyla prob kullanılmadan, polimorfizmleri belirleyecek daha fazla sayıda enzim belirlenip kullanılmalıdır.
12. Çukurova ve Şanlıurfa yöresinden elde edilen izolatlar arasında genotipik heterojenite tesbit edildiğine göre, lezyonlarda muhtemel enfeksiyonal karışımların olup olmadığı saptanmalıdır. Her enfeksiyonal faktörün tek tek klonları çıkarılmalıdır.
13. Bölge izolatlarının tür ve alt türlerin identifikasyonu için moleküler tekniklerden RAPD analizi kullanılabilir. Bu analiz siteminde 4-10 ng DNA kullanıldığı için büyük hacimli kültür gerekmemektedir. Sadece promastigot

izolasyonu yeterli olmaktadır. Bunun yanında nükleaz enzimleri gerekmemektedir ve Southen blotlama sonrası kullanılan proplar yerine primer ve PCR makinası yeterli olacaktır. Böylece bölgemizde kültür yolu ile belirlenemeyen izolatlar tesbit edilecektir



7. KAYNAKLAR

1. **Memişoğlu HR, Kotoğyan A, Acar MA, Özpoyraz M.** Leishmaniosis. Eds. Tüzün Y, Kotoğyan A, Aydemir EH, Baransü O. *Dermatoloji*, 2.baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 1994, 221-230.
2. **Evans DA.** Leishmania. In: *In vitro methods for parasite cultivation*, Acad. Press Ltd., London, 1986:52-75.
3. **Kar K, Mukerji K, Naskar K, Bhattacharya A, and Ghosh DK.** Leishmania donovani: A chemically defined medium suitable for cultivation and cloning of promastigotes and transformation of amastigotes to promastigotes. *J. Protozool.*, 1990; 37(4):277-279.
4. **Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet J-P, and Bastien P.** The leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Research*, 1996; 24(9):1688-1694
5. **Jimenez MI, Gutierrez-Solar B, Benito A, Aguiar A, Garcia E, Cercenado E, and Alvar J.** Cutaneous Leishmania (L.) infantum zymodemes isolated from bone marrow in AIDS patients. *Research and Reviews in Parasitology*, 1991; 51(1-4):95-99.
6. **Lopes UG, Momen H, Grimaldi JrG, Marzochi MCA, Pacheco RS, and Morel CM.** Schizodeme and zymodeme characterization of leishmania in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J. Parasit.*, 1984; 70(1):89-98.
7. **Jimenez M, Puente S, Gutierrez-Solar B, Martinez P, and Alvar J.** Visceral leishmaniasis in Angola due to Leishmania (Leishmania) infantum. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994; 50(6):687-692.
8. **van Eys GJJM, Schoone GJ, Ligthart GS, Alvar J, Evans DA, and Terpstra W.** Identification of "old world" leishmania by DNA recombinant probes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1989; 34:53-62.
9. **Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi JrG, Grogl M, Rowton ED, Young DG, Morales A, McMahon-Pratt D, Guzman H, and Tesh RB.** Characterization of Leishmania colombiensis spp (kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and Phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1991; 44(6):662-675.
10. **Jimenez M, Ferrer-Dufol M, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Molina R, Laguna F, Lopez-Valez R, Cercenado E, Dauden E, Blazquez J, de Guevara CL, Gomez J, de la Torre J, Barros C, Altes J, Serra T, and Alvar J.** Variability of Leishmania (Leishmania) infantum among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiology letters*. 1995; 131:197-207.
11. **Strelkova MV, Pacheco RS, Bulat SA, Rakitskaya TA.** Comparison of some molecular-genetic techniques for identification of leishmania circulating in natural foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis in the Central Asia Region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 1997; 92(1):109-114.
12. **Lu H-G, Zhong L, Guan L-R, Qu J-Q, Hu X-S, Chai JJ, Xu Z-B, Wang C-T, and Chang K-P.** Separation of Chinese leishmania isolates into five genotypes by kinetoplast and chromosomal DNA heterogeneity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994; 50(6):763-770.

13. **Özbel Y, Turgay N, Özensoy S, Kroon CN, Schoone GJ, Oskam L, Alkan MZ, Özcel MA.** Klinik materyallerde leishmania parazitlerinin PCR (Polymerase Chain Reaction) ve Southern blot hibridizasyon teknikleri yardımı ile saptanması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 1997; 21(4):350-356.
14. **Delgado O, Guevara P, Silva S, Belfort E, and Ramirez JL.** Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* using conventional immunologic techniques and polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1996; 55(3):267-272.
15. **Özbilge H.** Leishmaniasis. 10. *Ulusal Parazitoloji Kongresi*. Ankara Gülhane Askeri Tıp Akademisi, 8-12 Eylül 1998:25.
16. **Desjeux P.** Information on the epidemiology and control of the Leishmaniasis by country. WHO/LEISH/91.30. Distr. Limited English only p31. Medical officer, Trypanosomosis and Leishmaniasis control, Division of tropical Diseases, WHO, Geneva, Switzerland, 1991.
17. **Jackson PR, Wohlhieter JA, Jackson JE, Sayles P, Diggs CL, and Hockmeyer WT.** Restriction endonuclease analysis of leishmania kinetoplast DNA characterizes parasites responsible for visceral and cutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1984; 33(5):808-819.
18. **Beverley SM, Ismach RB, and McMahon-Pratt D.** Evolution of the genus leishmania as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1987; 84:484-488.
19. **Rodgers MR, Popper SJ, and Wirth DF.** Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of leishmania. *Experimental Parasitology*, 1990; 71:267-275.
20. **Strelkova MV, Shurkhal AV, Kellina OI, Eliseev LN, Evans DA, Peters W, Chapman CJ, Le Blanca SM, and van Eys GJJM.** A new species of leishmania isolated from the great gerbil *Rhombomys opimus*. *Parasitology*, 1990; 101:327-335.
21. **Armijos RX, Chico ME, Cruz ME, Guderian RH, Kreutzer RD, Berman JD, Rogers MD, and Grogil M.** Human cutaneous leishmaniasis in Ecuador: Identification of parasites y enzyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1990; 42(5):424-428.
22. **Grogil M, Daugirda JL, Hoover DL, Magill AJ, and Berman JD.** Survivability and infectivity of viscerotropic *Leishmania tropica* from operation desert storm participants in human blood products maintained under blood bank conditions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1993; 49(3):308-315.
23. **Berman JD, and Neva FA.** Effect of temperature on multiplication of leishmania amastigotes within human monocyte-derived macrophages in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1981; 30(2):318-321.
24. **Weigle K, De Davalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, and D'Alessandro A.** Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: A comparison of seven methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1987; 36(3):489-496.
25. **Zilberstein D.** The role of pH and temperature in development of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1994; 48:449-470.
26. **Simpson L, Simpson AM, Kidane G, Livingston L, and Spithill TW.** The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1980; 29(5):1053-1063.

27. **Englund PT, and Marini JC.** The replication of kinetoplast DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1980; 28(3):1064-1069.
28. **Muhich ML, Neckelmann N, and Simpson L.** The divergent region of the *Leishmania tarentolae* kinetoplast maxicircle DNA contains a diverse set of repetitive sequences. *Nucleic Acids Research*, 1985; 13(9):3241-3260.
29. **Hendricks L, and Wright N.** Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by in vitro cultivation of saline aspirates in Schneider's Drosophila Medium. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1979; 28(6):962-964.
30. **Santrich C, Segura I, Arias AL, and Saravia NG.** Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1990; 42(1):51-55.
31. **Navin TR, Arana FE, de Merida AM, Arana BA, Castillo AL, and Silvers DN.** Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: Comparison of diagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1990; 42(1):36-42.
32. **Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Palau MT, Caceres E, Duque S, Pelaez D, Rodriguez G, Nichols S, Hernandez CA, Morales A, Young DG, and Ferro de Carrasquilla C.** Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1990; 42(3):206-214.
33. **Lightner LK, Chulay JD, and Bryceson ADM.** Comparison of microscopy and culture in the detection of *Leishmania donovani* from splenic aspirates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1983; 32(2):296-299.
34. **Alvar J, Ballesteros JA, Soler R, Benito A, van Eys GJJM, Schoone J, and Cabrer B.** Mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: Biochemical characterization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1990; 43(6):614-618.
35. **Guizani I, van Eys GJJM, ben Ismail R, and Dellagi K.** Use of recombinant DNA probes for species identification of old world leishmania isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994; 50(5):632-640.
36. **Jaffe CL, Grimaldi G, and McMahon-Pratt D.** The cultivation and cloning of leishmania. In: Morel CM. Ed. *Genes and antigens of parasites*, Rio de Janeiro: A laboratory manual, publication of the UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; 1984:47-91.
37. **Neto ByMPO, Marzochi MCA, Grimaldi JrG, Pacheco RS, Toledo LM, and Momen H.** Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1986; 80(6):587-592.
38. **Hashiguchi Y, Gomez EA, de Coronel VV, Mimori T, Kawabata M, Furuya M, Nonaka S, Takaoka H, Alexander JB, Quizhpe AM, Grimaldi Gjr, Kreutzer RD, and Tesh RB.** Andean leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*-like parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1991; 44(2):205-217.
39. **Anthony RL, Grogl M, Sacchi JB, and Ballou RW.** Rapid detection of leishmania amastigotes in fluid aspirates and biopsies of human tissues. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1987; 37(2).
40. **Velasco O, Savarino SJ, Walton BC, Gam AA, and Never FA.** Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1989; 41(3):280-288.

41. **Saran R, Gupta AK, Shrivastava SN, and Prasad LSN.** Use of modified Grace's insect medium for the primary isolation of *Leishmania donovani donovani* in Bihar, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1986; 35(3):488-490.
42. **Le Blancq SM, Schnur LF, and Peters W.** Leishmania in the old world: 1. The geographical and hostal distribution of *Leishmania major* zymodemes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1986; 80:99-112.
43. **Kaddu JB, and Nyamori MP.** Nutrient broth for the cultivation of leishmania. *J. Parasitol.*, 1990; 76(2):265-266.
44. **Kreutzer RD, and Christensen HA.** Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1980; 29(2):199-208.
45. **Doyle A, Griffiths JB, Newell DG.** *Cell and Tissue culture: Laboratory procedures*, John Wiley and Sons Ltd; England, 1995: p:3A.1.1, 3C.1.1.
46. **Kreutzer RD, Semko ME, Hendricks LD, and Wright N.** Identification of *Leishmania* spp. by multiple isozyme analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1983; 32(4):703-705.
47. **Scott P, Pearce E, Natovitz P, and Sher A.** Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. *The Journal of Immunology*, 1987; 139(1):221-227.
48. **Mary C, Ange G, Dunan S, Lamouroux D, and Quilici M.** Characterization of a circulating antigen involved in immune complexes in visceral leishmaniasis patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1993; 49(4):492-501.
49. **Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Fe Filho NM, Queiroz RG, Santana EW, Bozza M, Sallenave SM, Valim C, David JR, and Lopez UG.** The identity of leishmania isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in baturite, Northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994; 50(2):158-164.
50. **Cupolillo E, Grimaldi G Jr, and Momen H.** A general classification of new world leishmania using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994; 50(3): 296-311.
51. **Gomez-Eichelmann MC, Holz JrG, Beach D, Simpson AM, and Simpson L.** Comparison of several lizard leishmania species and strains in terms of kinetoplast minicircle and maxicircle DNA sequences, nuclear chromosomes, and membrane lipids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1988; 27:143-158.
52. **Kahl LP, Byram JE, David JR, Comerford SA, and von Lichtenberg F.** *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: Comparative pathology of golden hamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in tres bracos, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1991; 44(2):218-232.
53. **Zavala-Castro J, Velasco-Castrejon O, and Hernandez R.** Molecular characterization of mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1992; 37(2):201-209.
54. **Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, and Arevalo J.** Diagnosis of leishmania using the polymerase chain reaction: A simplified procedure for field work. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1993; 49(3):348-358.
55. **Frank P, Simlone MS.** *Cryopreservation manual*. Nalge Company, Printed in USA. 1992

56. **Lawrie JM, Jackson PR, Stiteler JM, and Hockmayer WT.** Identification of pathogenic leishmania promastigotes by DNA: DNA hybridization with kinetoplast DNA cloned into E.coli plasmids. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1985**; 34(2):257-265.
57. **Menon JN, and Bretscher PA.** Characterization of the immunological memory state generated in mice susceptible to Leishmania major following exposure to low doses of Leishmania major and resulting in resistance to a normally pathogenic challenge. *Eur. J. Immunol.*, **1996**; 26:243-249.
58. **van Eys GJJM, Schoone GJ, Ligthart GS, Laarman JJ, and Terpstra WJ.** Detection of leishmania parasites by DNA in situ hybridization with non-radioactive probes. *Parasitol. Res.*, **1987**; 73:199-202.
59. **Smyth AJ, Ghosh A, Hassan MDQ, Basu D, de Bruijn MHL, Adhya S, Mallik KK, and Barker DC.** Rapid and sensitive detection of leishmania kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, **1992**; 105:183-192.
60. **Piarroux R, Azaiez R, Lossi AM, Reynier P, Muscatelli F, Gambarelli F, Fontes M, Dumon H, and Quilici M.** Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from Leishmania infantum: Development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1993**; 49(3):364-369.
61. **Morel C, and Simpson L.** Characterization of pathogenic Trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1980**; 29(5):1070-1074.
62. **Katakura K, Matsumoto Y, Gomez EAL, Furuya M, and Hashiguchi Y.** Molecular karyotype characterization of Leishmania panamensis, Leishmania mexicana and Leishmania major-like parasites: Agents of cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1993**; 48(5):707-715.
63. **Dobner P, Löscher T, Rinder H.** Intra-and interspecific polymorphisms of Leishmania donovani and Leishmania tropica minicircle DNA. *Parasitol. Res.*, **1994**; 80:474-477.
64. **Pacheco RS, Martinez JE, Valderrama L, Momen H, Saravia NG.** Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **1995**; 69:197-209
65. **Pacheco RS, Lopes UG, Morel CM, Grimaldi JrG, and Momen H.** Schizodeme analysis of leishmania isolates and comparison with some phenotypic techniques. *IMEEE Montpellier*, **1986**; 57-65.
66. **Mimori T, Grimaldi JrG, Kreutzer RD, Gomez EA, McMahon-Pratt D, Tesh RB, and Hashiguchi Y.** Identification using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies, of leishmania isolated from humans and wild animals of Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1989**; 40(2):154-158.
67. **Reiner NE, Lo R, Llanos-Cuentas A, Guerra H, Button LL, and McMaster WR.** Genetic heterogeneity in Peruvian leishmania isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1989**; 41(4):416-421.
68. **Kreutzer RD, Grogl M, Neva FA, Fryauff DJ, Magill AJ, and Aleman-Munoz MM.** Identification and genetic comparison of leishmanial parasites causing viscerotropic and cutaneous disease in soldiers returning from operation desert storm. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1993**; 49(3):357-363.

69. **Noyes HA, Belli AA, and Maingon R.** Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for leishmania identification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1996; 55(1):98-105.
69. **Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C, Koç NK.** A National Training Course on Genetic Manipulation of Plants at the University of Çukurova Faculty of Agriculture Department of plant protection. Adana/Turkey, 14-18 June 1993.
71. **Welsh J, and McClelland M.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 1990; 18(24):7213-18.
72. **Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, and Tingey SV.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990; 18(22):6531-35.
73. **Schönian G, Schweynoch C, Zlateva K, Oskam L, Kroon N, Graser Y, and Presber W.** Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus leishmania using single primers in the polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1996; 77:19-29.
74. **Shah JS, Lamontagne L, Unnasch TR, Wirth DF, and Piessens WF.** Characterization of a ribosomal DNA clone of *Brugia malayi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1986;19:67-75.
75. **Titus DE.** *Promega protocols and applications guide*. 2nd. Ed. printed in USA, 1991; 17-44.
76. **Miller SA, Dykes DD, and Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 1988; 16(3):1215
77. **Maniatis T, Fritsch EF, and Sambrook J.** *Molecular cloning*. A laboratory manual. New York: Cold spring harbor, 1982.
78. **Matur A.** *Moleküler Biyolojide Teknikler, Nükleik Asitler*. Ed. Walker JM. Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları; 1996.
79. **Spithill TW, and Samaras N.** Genomic organization, chromosomal location and transcription of dispersed and repeated tubulin genes in *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1987; 24:23-37.
80. **Williams SA, McCarrey JR, Weil G, Ramzy R, Hamburger J, Karim A, Bierwert LA, Lizotte M, and Ibrahim GH.** *Molecular Biology and tropical diseases*. Summer workshop Massachusetts. laboratory manual Smith College, Northampton, 1993.
81. **Panyim S.** Agarose gel electrophoresis. In: Panyim S, Wilairat P, and Yuthavong Y. Eds. *Application of genetic engineering to research on tropical disease pathogens with special reference to plasmodia*, Bangkok: A laboratory manual of selected techniques. publication of the UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; 1985.

EKLER

EK 1

Tampon ve Besiyerlerinin Hazırlanması

1. Klasik NNN Bifazik Besiyeri (100 ml)

1.4 gr Bacto-agar (Difco)

0.6 gr NaCl (Merck)

Bidistile su (90 ml) ile bu içerikler iyice çözüldü. pH 7.0'a ayarlandı. Hazırlanan besiyeri 121°C'de 1.5 atmosfer basınç altında 15 dakika süre ile otoklavdan geçirilerek sterilize edildi. Ardından steril hale getirilen besiyeri ile yine steril olarak alınan 10 ml tavşan kanı cam bilyelerle defibrine edilerek 56°C'lik su banyosunda beklemeye alındılar. Her iki kap 56°C'ye geldiğinde bakteriyolojik ekim kabinde aseptik koşullara uyularak birleştirildi ve homojen olmaları için dikkatlice karıştırıldı. Kontaminasyonu engellemek için gentamisin (100 µg/ml) eklendi. Sıcaklık uygun duruma gelince, 10 ml'lik konik tabanlı plastik kültür tüplerine 2'şer ml şeklinde dağıtıldı. Tüpler 45°'lik bir zemine alınarak 1-2 saat kadar tutuldu ve yatık agar oluşumu sağlandı. Hemen ardından buzdolabına alınarak yoğun kültür sıvısının oluşumu sağlandı. Önce besiyerleri etüve (37°C) kaldırılıp bir gece steriliteden emin olunduktan sonra işleme alındı. Aspirat aşılamasından önce, tüpler oda sıcaklığına getirildi. Yeterince yoğun kültür sıvısı oluşmamışsa 100 µl kadar steril bidistile su eklendi.

2. Nutrient Agarlı Bifazik Besiyeri (100 ml)

1.4 gr Nutrient agar (Oxoid)

Bidistile su (85 ml) ile içerik eritildi. Tüm hazırlık klasik NNN'de olduğu gibi yapıldı. Ancak katılan defibrine tavşan kanı %15 oldu.

3. Brain Heart İnfuzyon Agarlı Bifazik Besiyeri (BHI-Agar, Oxoid)

%1.2 Brain heart infuzyon agar için 1.2 gr BHI-Agar ve %4.7 Brain heart infuzyon agar için de 4.7 gr BHI-Agar alındı ve ayrı ayrı 85'şer ml bidistile su içinde eritildi. Her iki besiyerine katılan defibrine tavşan kanı oranı %15 oldu. Hazırlanmaları klasik NNN'de olduğu gibidir.

4. Modifiye Evans Bifazik Besiyeri

0.5 gr Bakteriyolojik pepton (Oxoid)

0.3 gr Beef-extract [Lab lemco powder (Oxoid)]

2 gr Agar (Sigma)

0.8 gr NaCl (Merck)

Bidistile su (90 ml) ile içerikler iyice eritildi. pH 7.0'a ayarlanarak %10 defibrine tavşan kanı eklendi. Tüm hazırlık Klasik NNN'de olduğu gibi yapıldı.

5. FBS (Fetal Bovin Serum) ve FCS (Fotal Calf Serum) (Seromed)

Kompleman inaktivasyonu için serumlar 56°C'de 30 dakika tutuldu. On ml'lik steril cam tüplere dağıtılarak -20°C'de stoklandı.

6. L-Glutamin (200 mM, Seromed)

Beş ml'lik steril şişelere dağıtılarak -20°C'de saklandı.

7. 1M HEPES-Na₂, pH 8.2 (Sigma)

100 ml, 1M, solusyonları hazırlandı. pH 8.15'e ayarlandı ve 0.22 µm por çaplı milipor filtre ile sterilize edildi. Filtrasyon sonrası pH'sı 8.2 oldu. Bu şekliyle buzdolabında saklandı.

8. %7.5 NaHCO₃ (Sigma)

Yüz ml'lik şişede steril olarak hazırlanmış olup buzdolabında korundu.

9. Gentamisin (40 mg/ml, Roche)

Ticari olarak temin edildiği haliyle buzdolabında tutuldu.

10. 1x RPMI-1640 Monofazik Besiyeri

10 ml 10x RPMI-1640 (Sigma)	1x
10 ml FBS (Fetal bovine serum)	%10
1 ml L-glutamin (200 mM)	2 mM
0.5 ml %7.5 NaHCO ₃	4.76 mM
2.5 ml HEPES-Na (1 M, pH 8.2)	25 mM
0.25 ml Genta (40 mg/ml)	100 µg/ml
Steril bidistile su	75 ml
Son pH yaklaşık 7.0 oldu	

11. PBS, pH 7.2 (Fosfat Tamponlu Tuzlu Su)

1.5 mM NaH₂PO₄ (Merck)

8.0 mM K₂HPO₄ (Merck)

137 mM NaCl (Merck)

2.5 mM KCl (Merck)

Bu içerikler 1000 ml suda eritildi. Bu solüyonun pH'sı yaklaşık olarak 7.2 oldu. Otoklavda sterilize edildi. Buzdolabında tutuldu.

12. %2 Formalinli PBS (pH7.2)

Formaldehit'ten (Merck) (%37'lik) 0.54 ml alınıp, 9.46 ml PBS (pH 7.2) içinde karıştırıldı. Buzdolabına alınarak, bu solusyon promastigot sayımında hücreleri hareketsiz yapmak amacıyla kullanıldı.

13. EBLB (Pseudo Evans Blood Lysate Broth)

Aseptik koşullarda alınan 10 ml kan, içinde heparin (Li) bulunan tüpe aktarıldı. Yavaşça alt üst edilerek homojen olması sağlandı. Santrifuj (4.000 rpm'de 10 dakika) edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Plazması atıldı ve üzerine total hacmi koruyacak şekilde %0.9 NaCl solusyonu katıldı ve karıştırıldı. Çöktürölerek (4.000 rpm'de 10 dakika) üst faz atıldı. Bu yıkama iki kez tekrarlanarak hücre dışında kalan ve üremeye olumsuz etkisi bulunan kan proteinleri (antikorlar vs) uzaklaştırıldı. Santrifuj sonrası, kan hücrelerine orijinal hacmi koruyacak şekilde steril distile su eklendi. Hemolizin tamamlanması için kaba lizat, buzdolabında 10 dakika bekletildi. Sonra tekrar oda sıcaklığına alınarak 5.000 rpm'de 15 dakika santrifuj edildi. Böylece patlamamış lökosit hücreleri çöktürölü. Üst lizat fazı alınarak buzdolabında kullanılana kadar tutuldu.

14. PHA-L (Phytohaemagglutinin-L, Seromed)

PHA-L'ye (liyofilize, 1.2 mg) 5 ml steril bidistile su eklenerek karıştırıldı. Kullanılana kadar buzdolabında tutuldu.

15. Promastigot Sayımı

En küçük karesinin bir kenarı 1/20 mm olan ve iki adet sayım alanı bulunan Thoma lamı kullanıldı. Sayım alanlarının derinliğı 0.1 mm'dir. Sayım alanlarının toplam olarak aldığı hacim 200 µl'dir. Bunun için sayım yapılacak hücre süspansiyonundan 25 µl alınarak promastigot hareketlerinin durdurulması amacıyla 175 µl %2 formalinli PBS ile karıştırıldı. Tespit edilen hücreler otomatik pipetle Thoma lamı sayım alanlarına verildi. İki dakika kadar beklenerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Her bir sayım alanının 5 küçük karesinde bulunan toplam hücre sayısı tesbit edildi. Diğer sayım alanında aynı işlem tekrarlanarak, her iki alanda tespit edilen hücre sayısının ortalaması alınarak aşağıdaki formüle göre ml'deki promastigot sayısı belirlendi.

$$\text{Hücre/ml} = [\text{Ortalama hücre sayısı}] \times [\text{Seyreltme katsayısı}] \times 50.000$$

16. Amastigot ve Promastigot Boyama

Ayrı ayrı Amastigot için alınan 10 µl aspirat ve Promastigot için alınan 10 µl kültür daha önceden temizlenmiş lamlara yayıldı. Saç kurutucu ile hızla kurutulan preparatlar 2 dakika süre ile metanolde fikze edildi. Ardından preparat musluk suyundan geçirildi ve tekrar kurutuldu. Kurutulan preparatlar boyama düzeneğine yerleştirildi ve taze olarak musluk suyunda hazırlanan Giemsa (Merck) (%5) ile yaklaşık 30-45 dakika boyandı. Boya dökülerek preparatlar musluk suyunda yıkandı ve kuruduktan sonra entellan ile kapatıldı.

17. %87 Gliserol (Merck)

Beş ml Gliserol 10 ml'lik kapaklı şişeye alınarak otoklav ile sterilize edildi. Bu solusyon oda sıcaklığında temiz bir yerde bırakıldı.

18. 0.5 M EDTA-Na₂, pH 8.0 (Sigma)

EDTA-Na₂, 0.5 M'lık olarak 100 ml distile su içinde hazırlandı, 1 N NaOH ile pH 8.0'a ayarlandı ve otoklav edildi. Buzdolabında muhafaza edildi.

19. 1M Tris.HCl, pH8.0 (Sigma)

Tris.HCl, 1 M hazırlanarak 1 N HCl ile pH'a 8.0'a ayarlandı. Otoklav ile sterilize edildi. Buzdolabında korumaya alındı.

20. 6 M NaCl (Merck)

NaCl, 6 M hazırlanarak otoklavda sterilize edildi. Buzdolabında korumaya alındı.

21. Fenol ve Kloroform Karışımının Hazırlanması

A: Fenol (Sigma) Hazırlanması:

- Kristal Fenol 50 gr olarak tartılıp 68°C'de eritildi.
- Oda sıcaklığına getirildikten sonra üzerine antioksidan olarak %0.1 8-hidroksikinolin (Sigma) katıldı.
- Fenol hacmi kadar, üzerine 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0) katılarak iyice karıştırıldı. İki faz oluşana kadar oda sıcaklığında kendi haline bırakıldı.
- Üst faz atılarak, kalan fenol'e eşit hacimde 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) katıldı ve karıştırıldı. Bu tamponla yıkama, üst fazın pH'sı 7.8 olana kadar tekrarlandı.
- Bu şekilde yıkanan fenol üzerine 1/10 hacim 0.1 M Tris-HCl eklendi ve koyu şişeye alındı.

B. Kloroform (Merck) Hazırlanması:

Kloroform'dan 24 ml ve izoamil alkol'den (Sigma) (DNA solusyonunda köpürmeyi engellemek amacıyla) 1 ml karıştırıldı. Sıkı kapaklı cam şişede korumaya alındı.

Deproteinizasyon işlemi sırasında, DNA solusyonuna, eşit hacimde fenol-kloroform (bire bir oranında) karışımı katılarak proteinler uzaklaştırıldı. Elde edilen solusyondaki fenol-kloroform-izoamil alkol oranı 25:24:1 oldu.

22. %10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat, Sigma)

SDS, %10'luk olarak 10 ml bidistile suda hazırlandı, pH'sı 7.2'ye ayarlandı. Otoklavlanmadan buzdolabında tutuldu. Soğukta presipite olduğu için kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilerek şeffaflaşması için beklendi.

23. SET Tamponu, pH 8.0 (Tuz-EDTA-Tris)

	<u>Son Konsant.</u>
1 M Tris.HCl, pH 8.0	10 mM
0.5 M EDTA.Na ₂ , pH 8.0	100 mM
6 M NaCl	150 mM

İstenen hacme steril distile su ile tamamlandı. Aseptik koşullara steril stoklardan hazırlandı. Ayrıca otoklavlanmadı. Buzdolabında korumaya alındı.

24. Pronaz (10 mg/ml, Sigma)

SET tamponu (pH 8.0) içinde 10 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. İçinde bulunması muhtemel DNaz aktivitesini inhibe etmek amacıyla 80°C'lık etüvde 10 dakika tutuldu. Isı ile denatüre edilen DNaz'ın sindirimi için 37°C'de 1 saat daha inkübe edildi. Pronaz bu haliyle -20°C'de tutuldu. Bu enzim 70°C'ye kadar aktiftir

25. TE Tamponu, pH8.0 (Tris-EDTA)

	<u>Son konsant.</u>
1 M Tris.HCl	10 mM
0.5 M EDTA.Na ₂	1 mM

Hazırlanma şekli ve korunması SET tamponun aynısıdır.

26. 7.5 M Ammonyum Asetat, pH 7.5 (Sigma)

NH₄oAc (7.5 M) hazırlandı. pH ayarlanmadan ~7.5'tur. Sterilizasyonu 0.22 µm por çaplı milipor filtreyle yapıldı. Oda sıcaklığında korundu.

27. 5x Takip-Stop Karışımı

%25 Fikol tip 400 (Sigma)

0.05 M EDTA-Na₂, pH 8.0

%1 SDS

%0.3 Bromofenol mavisi (Merck)

%0.3 Ksilen siyanol F (Merck)

Bu karışım kullanım sırasında 1x olacak şekilde DNA solusyonuna katıldı. Oda sıcaklığında korundu.

28. EtBr Boyasının Hazırlanması (Sigma)

EtBr, 10 mgr tartılarak 1 ml suda eritildi ve bu solüsyon karanlıkta ve koyu şişe içinde muhafaza edildi. Jele, 0.5 µg/ml olarak katıldı.

29. 10x TBE Tamponu, pH 8.3 (Tris-Borat-EDTA)

0.89 M Tris.HCl

0.89 M Borik asit (Merck)

0.02 M EDTA-Na₂

Bu tamponun pH'sı 1 N NaOH ile 8.3'e ayarlandı. Kullanım sırasında 0.5xTBE'ye düşürmek için 0.5 birim 10x TBE'ye 9.5 birim distile su eklenerek hazırlandı.

30. Agaroz (Sigma) Jelinin Hazırlanması

Çalışılacak jel kalınlığı belirlendikten sonra, bilinen jel döküm tablası boyutları kullanılarak gerekli jel miktarı hesaplandı. Gerekli agaroz (%0.7) miktarı tartılıp 0.5x TBE (pH8.3) içinde karıştırıldı. Kaynar su banyosuna kondu ve jel eriyip homojen bir hal alana kadar bırakıldı. Isınip buharlaşmasının önüne geçmek için jelin hazırlandığı erlenin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. Bu işlem devam ederken jel döküm tablasının kenarları, plastik bantla çevrildi. Tarak (30 dişli, her diş 3x1 mm), jel döküm tablasının (20x15 cm) üzerine kondu ve tarak dişlerinin jel döküm tablasının 1 mm üzerinde olacak şekilde ayarı yapıldı. Tarak kaldırıldı. Eriyen jel, su banyosundan alınıp oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Bu arada jele, 0.5 µg/ml olacak şekilde stok EtBr'ten eklendi ve jel döküm tablasına döküldü, hemen ardından tarak yerleştirildi. Katılaşması için yaklaşık 45 dakika beklendi. Süre bitiminde jelin tarak dişleri bölümüne kuyuların bozulmaması için 0.5x TBE tamponu eklendi. Daha sonra tarak dikkatli bir şekilde alındı. Ardından plastik bant çıkarıldı, jel tablasıyla beraber, elektroforez tankına horizontal olarak yerleştirildi. Tanka, 0.5x TBE tamponundan jelin üzerine 1mm tampon olana kadar döküldü. DNA solüsyonuna uygulanacak akım kadar bir akım, agaroz porlarının açılması

amacıyla boş jele tatbik edildi. Aplike edilecek DNA miktarı hesaplanıp ve hazırlandıktan sonra Takip-stop karışımı ile karıştırıldı (4/1 oranında). DNA'nın yapışkan uçlarını yumuşatmak amacıyla bu solüsyondaki DNA 65°C'de 10 dakika tutuldu.

31. Poliakrilamid Jelinin Hazırlanması

STOK SOLUSYONLAR

a. %30 akrilamid solusyonu ,10 ml, (%30T, %5C)

2.85 gr akrilamid (Sigma)

0.15 gr bis-akrilamid (Sigma)

%30 akrilamid solusyonu için akrilamid ve bis-akrilamid 10 ml bidistile suda karıştırılarak, koyu bir şişede buzdolabında korumaya alındı

b. %10 Ammonyum Persülfat (APS, Sigma)

0.05 gr Ammonyum persülfat

0.5 ml'ye bidistile su ile tamamladı. En fazla 1 hafta saklandı.

c. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, Sigma) soğukta saklandı.

Son PAG Solusyonu (%5, 15 ml)'nin hazırlanması:

%30 akrilamid 2.5 ml

10xTBE, pH 8.3 1.5 ml (1x)

Bidistile su 10.8 ml

%10 APS 0.09 ml (%0.06)

Karışım hazırlandı ve oksijeni vakum cihazı ile çekilerek solüsyona 15 µl TEMED katıldı ve karıştırıldı. Karışım bekletilmeden, sıvı ve hava yönünden kaçak yapmayacak şekilde önceden hazırlanan sandeviç biçiminde iki plaka arasına dökülerek tarak derhal yerleştirildi. Polimerizasyonun tamamlanması için yaklaşık bir saat kadar bekletildi. Tarak çekildi ve dış yerlerinin bozulmaması için 1x TBE ile dişler yıkandı. Jel düzeneği, vertikal olarak elektroforez tankına yerleştirilerek elektrot tamponu (1x TBE), istenen seviyeye kadar eklendi. DNA aplikasyonu agaroz jeline olduğu gibi yapıldı. DNA bandlarının görüntülenebilmesi için jel, elektroforez sonrası 0.5 µg/ml EtBr

içeren 1x TBE tamponunda yaklaşık 30 dakika tutuldu. Görüntüleme UV transilluminatör ile yapıldı.

32. Gümüş Boyama Solüsyonları

1. FİKSATİFLER

a. %50 Metanol-%10 Asetik asit (100 ml)

50 ml Metanol (Merck)

10 ml Asetik asit (Merck)

40 ml Bidistile su

b. %50 Metanol-%7 Asetik asit (100 ml)

50 ml Metanol

7 ml Asetik asit

43 ml Bidistile su

c. %10 Glutaraldehit (100 ml) (Merck)

40 ml %25 glutaraldehit

60 ml Bidistile su

2. AgNO₃ BOYASI

0.1 gr AgNO₃ (Sigma)

100 ml bidistile suda eritilir. Metal karıştırıcı kullanılmaz.

3. GELİŞTİRME

3 gr Na₂CO₃ (Merck)

100 ml bidistile suda eritildi

50 µl %37'lik Formaldehit

4. STOP SOLUSYONU

2.3 M Sitrik asit monohidrat (Merck)

33. Gümüş Boyama Protokolü

1. Jel, DNA'nın tespiti amacıyla 30 dakika süre ile %50 Metanol-%10 asetik asit fiksatifinde karıştırıldı.
2. Jel, %50 Metanol-%7 Asetik asit içinde 30 dakika tutuldu.

3. Jel, ardından %10 glutaraldehit içinde 30 dakika süre ile son olarak fikze edilerek suda yıkandı.
4. Derhal %0.1 AgNO₃ içinde 30 dakika tutuldu, sonra su ile yıkandı.
5. Boya gelişimi için, %3 Na₂CO₃'a (İçine %37'lik formaldehitten 50 µl katıldı) alınarak burada karıştırmalı olarak kahverengli DNA bantları görünene kadar (yaklaşık 30 dakika) bekletildi.
6. Gelişim solusyonuna 2.3 M'lık sitrik asitten 5 ml katılarak reaksiyon durduruldu.
7. Suda yıkanarak incelemeye alındı. Burada kesinlikle kirlilik oluşturmamak için metal pens kullanımından kaçınıldı.

34. λ (Lambda) DNA (0.5 µg/µl, Biores)

Bu DNA 48.502 bç uzunluğundadır. Tavsiyeler uyarınca -20°C'ta saklandı ve gerektiği zaman oda sıcaklığına getirilerek gereken miktarlar steril olarak alındı.

35. λ DNA-EcoRI, Marker DNA (0.4 µg/µl, Biores)

Ticari olarak bu DNA (48.502 bç) EcoRI enzimi ile kesilmiş olup 6 adet DNA fragmanına ayrılmıştır. Fragmanlar sırasıyla; 21.226, 7.421, 5.804, 5.643, 4.878 ve 3.530 bç şeklindedir. Tavsiyeler uyarınca -20°C'ta saklandı ve gerektiği zaman oda sıcaklığına getirilerek çözündü. Gerekli miktarda steril olarak alındı.

36. φx174RFI Virüs DNA-HaeIII, Marker DNA (0.5 µg/µl, Promega)

Ticari olan bu DNA (5.386 bç) HaeIII enzimi ile kesmiş olup 72 ile 1.353 bç'lik 11 fragmana ayrılmıştır. Fragmanlar sırasıyla; 1.353, 1.078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 ve 72 bç şeklindedir. Tavsiyeler doğrultusunda -20°C'ta saklandı. Gerektiğinde oda sıcaklığına getirilerek çözündü.

37. Kullanılan Restriksiyon Endonükleazlar

EcoRI (25 U/μl, Biores)

Bu enzim, *Escherichia coli* RY 13 bakterisinden izole edilir. Tanıdığı bölge ve kesim şekli şöyledir. 5'..G[↓]AATTC..3'

3'..CTTAA[↑]G..5'

37°C'de aktivite gösterir. λ DNA'sını 5 noktadan keser ve jelde 6 fragman bandı görüntülenir. 65°C'ta 10 dakika süre ile veya final 10 mM EDTA ile inaktive olur.

Maksimum aktivite gösterdiği tampon (1x):

50 mM TrisHCl (pH 7.4)

50 mM NaCl

10 mM MgCl₂

1 mM DTT

100 μg/ml BSA

Metilazlara duyarlıdır, yani kesim yapamaz.

İzoşizomerik enzimi: Bulunmamaktadır.

Saklama sıcaklığı: -20°C

HindIII (12 U/μl, Biores)

Haemophilus influenzae Rd'den izole edilir. Tanıdığı bölge ve kesim şekli şöyledir. 5'..A[↓]AGCTT..3'

3'..TTCGA[↑]A..5'

37°C'de aktivite gösterir. λ DNA'sını 6 noktadan keserek jel üzerinde 7 DNA bandı verir. Isı ile inaktive olmaz. Final olarak 10 mM EDTA ile inaktive olur.

Maksimum aktivite gösterdiği tampon (1x):

50 mM Tris.HCl (pH 8.0)

50 mM NaCl

10 mM MgCl₂

1 mM DTT

100 μg/ml BSA

İzoşizomerik enzimi: Bulunmamaktadır.

Saklama sıcaklığı: -20°C

AluI (6 U/μl, Sigma)

Arthrobacter luteus'tan izole edilir. Tanıdığı bölge ve kesim şekli şöyledir.

5'..AG[↓]CT..3'

3'..TC[↑]GA..5'

37°C'de aktivite gösterir. λ DNA'sını 143 noktadan keser ve jel üzerinde 144 band oluşturur. 65°C'de 10 dakika süre veya 10 mM EDTA ile inaktive olur.

Maksimum çalışma tamponu (1x): (Ticari olarak sarı ambalaj)

10 mM Bis-Tris-Propan-HCl, pH 7.0

10 mM MgCl₂

İzoşizomerik enzimi: Bulunmamaktadır.

Saklama sıcaklığı: -20°C

Hinfl (10 U/ μ l, Sigma)

Haemophilus influenzae RF bakteri hücrelerinden izole edilir. Tanıdığı bölge ve kesim şekli şöyledir.

5'..G[↓]ANTC..3'

3'..CTNA[↑]G..5'

DNA'yı 37°C'de keser. λ DNA'sını 148 noktadan keser ve jelde 149 DNA bandı oluşturur. Isı ile inaktive olmaz. Son derişimi 10 mM EDTA ile inaktive olur.

Maksimum çalışma tamponu (1x):

10 mM Tris-HCl, pH 7.9

10 mM MgCl₂

50 mM NaCl

1 mM DTT

İzoşizomerik enzimi: Bulunmamaktadır.

Saklama sıcaklığı: -20°C

HaeIII (14 U/ μ l, Sigma)

Haemophilus aegypticus'tan izole edilir. Tanıdığı bölge ve kesim şekli şöyledir.

5'..GAGCT[↓]C..3'

3'..C[↑]TCGAG..5'

DNA'yı 37°C'de keser. Isı yerine 10 mM EDTA ile inaktive olur. λ DNA'sını 149 noktadan keser ve jel üzerinde 150 adet DNA bandı verir.

Maksimum çalışma tamponu (1x):

10 mM Bis-Tris-Propan-HCl, pH 7.0

10 mM MgCl₂

1 mM DTT

100 µg/ml BSA

İzoşizomerik enzim: Pall

Saklama sıcaklığı: -20°C

RsaI (14 U/µl, Sigma)

Rhodopseudomonas sphaeroides'ten izole edilir. Tanıdığı bölge ve kesim şekli şöyledir.

5'..GT^IAC..3'

3'..CA^ITG..5'

DNA'yı 37°C'de keser. λ DNA'sını 113 noktadan keser ve jel üzerinde 114 DNA bandı verir.

Maksimum çalışma tamponu (1x):

50 mM TrisHCl (pH 8.0)

10 mM MgCl₂

İzoşizomerik enzimi: Bulunmamaktadır.

Saklama sıcaklığı: -20°C

**38. Çukurova ve Şanlıurfa Yöresinden Elde Edilen İzolatlarla,
Referans Suşların Tam Listesi**

<u>Örnek No</u>	<u>Adı Soyadı</u>	<u>Yöre</u>
1	FB	Düziçi
2	ÖG	Karaisalı
3	HI	Karaisalı
4	HM	Düziçi
5	RK	Kozan
6	NA	Adana
7	MG	Karaisalı
8	MG	Karaisalı
9	TA	Karaisalı
10	HI	Düziçi
11	AD	Adana
12	AGÖ	Karaisalı
13	RÖ	Karaisalı
14	EK	Düziçi
15	KY	Düziçi
16	İK	Adana
17	ZG	Adana
18	SE	Düziçi
19	HD	Şanlıurfa
20	TD	Şanlıurfa
21	İT	Şanlıurfa
22	MK	Şanlıurfa
23	ZT	Şanlıurfa
24	AG	Şanlıurfa
25	CÇ	Şanlıurfa
26	<i>L.infantum</i> (MHOM/DZ/82/LIPA-59, LEM-417)	
27	<i>L.major</i> (MHOM/SU/73/5-ASKH)	
28	<i>L.donovani</i> (MHOM/IN/80/DD-8)	
29	<i>L.tropica</i> (MHOM/SU/74/K-27)	
30	<i>L.infantum</i> (MHOM/FR/78/LEM-75)	
31	<i>L.infantum</i> (MHOM/ES/90/BCN-1, LEM-2205)	
32	<i>L.turanica</i> (MRHO/SU/83/KD-51)	
33	<i>L.turanica</i> (PHCAY/SU/95/PH-40)	
34	<i>L.turanica</i> (MRHO/SU/80/Clone-3720)	
35	<i>L.gerberilli</i> (MRHO/CN/60/gerbilli)	
36	<i>L.turanica</i> (MRHO/SU/86/TSH-III)	
37	<i>L.arabica</i> (MPSM/SA/84/JISH-220)	
38	<i>L.major</i> + <i>L.turanica</i> =Mixture (MRHO/SU/95/9537)	
39	<i>L.major</i> (MRHO/SU/59/Nealp)	
λ DNA	Biores, 0.5 µg/µl	

EK 2

Kullanılan Cihazlar

1. pH Metre (8417, Hanna instruments)
2. Santrifüj Makinası (NF 415, Nüve)
3. Eppendorf Santrifuj Makinası (Biofuj 13, Heraeus)
4. Spektrofotometre.(UV-1201 Shimadzu)
5. Transillüminatör (Mighty Bright, Hoefer)
6. Polaroid DS 34 Fotoğraf Makinası (Direct Screen Instant Camera, Hoefer)
7. Güç Kaynağı (PS 500 XT, 500 V, 400 mA, 200 W, Hoefer)
8. Horizontal Elektroforez tankı (Super Sub, Hoefer)
9. Vertikal Elektroforez Tankı (Mighty Small II SE 250, Hoefer)
10. Çalkalayıcı (Red Rocker, Hoefer)
11. Vakum cihazı (Red Evac Model No PV 100, Hoefer)
12. Vorteks (Elektro-mag)
13. Etüv (102 D Incubator, Stuart Scientific Instruments)
14. Fırın (Oven 252 D, Stuart Scientific Oven Instruments)
15. Polaroid Tip 667, 3000 ASA, Siyah-beyaz film
16. Thoma lamı
17. Mikroskop (Monoküler, Nikon)
18. Basit Bakteriyolojik Ekim Kabini
19. Kriyo tüpleri (NUNC)
20. Konik Tabanlı Plastik Kültür Tüpleri (10, 50 ml; Granier)
21. Eppendorf tüpleri (0.5, 1.5 ml; Sigma)

ÖZ GEÇMİŞ

1960 yılında Hatay'da doğdum. İlkokulu köyde, Ortaokulu ilçe'de, Lise'yi de Antakya'da tamamladım. 1984 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı'ndan mezun oldum. Uzun bir süre Türkiye'nin değişik yerlerinde Biyoloji Öğretmenliği yaptım. Çevre Bakanlığı'nda da kısa bir dönem için Biyolog olarak görev aldım. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansımı tamamladıktan sonra, aynı Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisiyim.

Evli ve iki çocuk babasıyım.

