

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VISSERAL LEİSHMANİASİS ETKENİ *LEISHMANIA INFANTUM*
PARAZİTLERİNİN BÜYÜK ÖLÇEKLİ ÜRETİMİ VE İMMUNOJEN ÖZELLİKLİ
GP63 MOLEKÜLÜNÜN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

MEHMET AYDOĞDU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. MELAHAT BAĞIROVA**

İSTANBUL, 2017

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VİSSERAL LEİSHMANİASİS ETKENİ *LEISHMANIA INFANTUM*
PARAZİTLERİNİN BÜYÜK ÖLÇEKLİ ÜRETİMİ VE İMMUNOJEN ÖZELLİKLİ
GP63 MOLEKÜLÜNÜN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Mehmet AYDOĞDU tarafından hazırlanan tez çalışması 15.06.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Sezen Canım ATEŞ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi



Bu çalışma, TÜBİTAK'ın SBAG 213S148 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca bilimsel ve akademik ilerlemem için her türlü desteği sağlayan, bilgi ve tecrübesini benden hiçbir zaman esirgemeyen çok sevgili danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya, çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan, her zaman yanımda olan, emeğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV'e, tezin incelenmesinde gösterdiği duyarlılıktan dolayı jüri üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Sezen Canım ATEŞ'e ve her zaman yardımına koşarak çalışmalarımı beni destekleyen sayın hocam Arş. Gör. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

SBAG 213S148 numaralı proje kapsamında gerçekleştirdiğim tez çalışması için TÜBİTAK'a

Ayrıca, projenin başlangıç aşamasından itibaren verdikleri katkılarından dolayı değerli çalışma arkadaşlarım Özlem Ayşe ÖZYILMAZ'a, Gizem COŞAR'a, Hilal ŞENTÜRK'e ve diğer tüm yüksek lisans arkadaşlarıma,

Bu tezin başarıyla yerine getirilmesine olanak sağlayan başta bölümümüzün kurucusu merhum Prof. Dr. Mustafa AKDESTEYE'ye, bölüm kurucu üyesi merhume Prof.Dr. Huriye KUZU'ya ve hali hazırda bölüm başkanı olan Prof. Dr. Sevil YÜCEL'e, bölümümüzün değerli öğretim üyeleri ile asistanlarına, Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına, Fen Bilimleri Enstitüsüne,

Beni bugünlere türlü zorluklarla getiren sevgili babam Kadir AYDOĞDU'ya ve sevgili annem Aynur AYDOĞDU'ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Haziran, 2017

Mehmet AYDOĞDU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ.....	v
KISALTMA LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	17
1.1 Literatür Özeti	17
1.2 Tezin Amacı	22
1.3 Hipotez	22
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	23
2.1 Leishmaniasis.....	23
2.1.1 Kütanoz Leishmaniasis.....	28
2.1.2 Visseral Leishmaniasis	30
2.1.3 <i>Leishmania</i> İmmünolojisi	31
2.2 Leishmaniasis Tanısından Kullanılan Yöntemler	32
2.2.1 Parazitolojik Yöntemler	32
2.2.2 İmmunojenik Yöntemler	33
2.2.3 Antijen Saptama	34
2.2.4 Direkt Aglütinasyon Testi.....	34
2.2.5 Indirect Fluorescent Antibody Testi (IFAT)	35

2.2.6	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)	35
2.2.7	İmmunokromatografik Strip Test (ICT)	36
2.2.8	Moleküler Yöntemler	36
2.3	Leishmaniasis Tedavisinde Güncel İlaçlar	37
2.3.1	Pentavalent Antimon	37
2.3.2	Amphotericin B	38
2.3.3	Liposomal Amphotericin B.....	38
2.3.4	Miltefosine	39
2.3.5	Diğer Yöntemler	40
2.4	Leishmaniasis'in Kontrolü için Aşı Geliştirilmesi.....	41
2.5	Glikoprotein 63 (GP63)	44
2.5.1	GP63 Ve Makrofaj İçi Yaşam	46
2.5.2	GP63 Tarafından Konakçı Makrofaj Sinyalizasyonunda Değişiklik ...	46
2.5.3	MARCKS Protein ve GP63	47
2.5.4	GP63'ün Makrofaj Transkripsiyon Faktörleri Üzerindeki Etkisi	48
2.5.5	<i>Leishmania</i> Tarafından Salgılanan Virülans Faktörü İçeren Ajanlar .	49
2.6	Biyoreaktör	49
2.6.1	Stirred tank(karıştırırmalı) Biyoreaktör	61
2.6.2	Havalandırılmalı (Airlift) Biyoreaktör.....	62
2.6.3	Sabit Yataklı (Packed Bed) Biyoreaktör.....	63
2.6.4	Akışkan Yataklı (Fluidized Bed) Biyoreaktör	64
2.6.5	Foto Biyoreaktör	65
2.6.6	Zar (Membrane) Biyoreaktör	66
2.6.7	Dönen Tambur (Rotary Drum) Biyoreaktör	66
BÖLÜM 3		
DENEYSEL ÇALIŞMALAR		70
3.1	Materyal.....	70
3.1.1	Ekipman	70
3.1.2	Kimyasallar	72
3.1.3	Kullanılan Tampon, Besiyerleri ve Kimyasalların Hazırlanışı	74
3.1.4	Deneylerde Kullanılan Hücreler	77
3.2	Metod	77
3.2.1	<i>L. infantum</i> Parazitlerinin Kriyobanktan Çıkarılması	77
3.2.2	<i>L.infantum</i> Parazitlerinin Flask ve Erlenmeyer Kültürü	77
3.2.3	Biyoreaktör Kurulumu ve Kültürü	78
3.2.4	Hücre Sayımı	79
3.2.5	<i>L.infantum</i> Parazitlerinin Kriyoprezervasyonu	80
3.2.6	Gp63 molekülünün İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	80
BÖLÜM 4		
DENEYSEL SONUÇLAR		91
4.1	Parazitlerin Biyoreaktör ve Kademeli Büyük Ölçek Kültürü	91
4.2	Gp63 Karakterizasyonunda SDS-PAGE Sonuçları	97
4.3	Gp63 Karakterizasyonunda ELISA Sonuçları	100

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER.....	101
KAYNAKLAR.....	105
ÖZGEÇMİŞ.....	124



SİMGE LİSTESİ

cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
Da	Dalton
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
Mw	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
Mn	Sayıca ortalama molekül ağırlığı
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
pH	Potansiyel hidrojen
α	Alfa
β	Beta
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
°C	Santigrat

KISALTMA LİSTESİ

AKL	Akut kütanöz leishmaniasis
BSA	Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albümine)
ConA	Concanavalin A
CD4+	CD4 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit
CD8+	CD8 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit
DAT	Direk Aglütinasyon Testi
DÇ	Dondur-Çöz
DEAE	Diethylaminoethyl
Dk	Dakika
DKL	Diffüze kütanöz leishmaniasis
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
FBS	Sığır Fetal Serum (Fetal Bovine Serum)
Gp63	Leishmania yüzey membran metaloproteazı
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
H ₂ O	Su
HCl	Hidroksi klorik asit
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
ICT	İmmünokromatografik test (Immunocromatografic Test)
IFAT	İmmunofloresan antikor testi (Immunofluorescent Antibody Test) IHA
IFN-γ	İnterferon gama
IL-10	İnterlökin 10
IL-12	İnterlökin 12
IL-4	İnterlökin 4
JAK	Jamus kinaz
K ₂ HPO ₄	Potasyum fosfat (di)
KCl	Potasyum klorür
kDNA	Kinetoplasta ait deoksiribonükleik asit
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat (mono)
KL	Kütanöz Leishmaniasis

KOH	Potasyum hidroksit
LPG	Lipofosfoglikan
LKL	Lokalize kütanöz leishmaniasis
MAPK	Mitojen activated protein kinaz
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MKL	Mukokütönöz leishmaniasis
MKY	Mikro kültür yöntemi
MW	Moleküler Ağırlık (Molecular Weight)
Na ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	Monosodyum fosfat
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
OTO	Otoklav
NO	Azot monoksit (Nitrik Oksit)
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate buffered saline)
pH	Potansiyel hidrojen
RNA	Ribonükleik asit
RPM	Bir dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
SDS	Sodium Dödesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodium dödesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SKP	Skin-derived precursor cells
SLA	Soluble leishmanial antigen
TEMED	Tetrametil etilen diamin
Th1	T helper 1 (Yardımcı T hücre yanıtı alt sınıf 1)
Th2	T helper 2 (Yardımcı T hücre yanıtı alt sınıf 2)
TNFα	Tümör nekroz faktör-alfa
VL	Visseral Leishmaniasis
WB	Western Blotting
ZnCl ₂	Çinko klorür

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1	Kutanöz, visseral ve mukokutanöz leishmaniasis.....	24
Şekil 2. 2	2007-2009 yılları arasında Türkiye’de Kutanöz Leishmaniasis vakalarının yaygınlığı.....	25
Şekil 2. 3	<i>Leishmania</i> parazitinin yaşam döngüsü.....	25
Şekil 2. 4	Dünya çapında Kutanöz Leishmaniasis’in Dağılımı (2010).....	28
Şekil 2. 5	Dünya çapında Visseral Leishmaniasis’in Dağılımı (2010).....	30
Şekil 2. 6	Leishmaniasis e karşı kullanılan ilaçlar ve etkileri.....	40
Şekil 2. 7	GP63 aracılı bozunma, konakçı hücresi sinyal ve işlevlerinin etkilenmesi...45	
Şekil 2. 8	GP63’ün çeşitli kinazların inaktivasyonuna yol açması.....	48
Şekil 2. 9	Karıştırıcı biyoreaktör.....	51
Şekil 2. 10	Hücrelerin yaşam evreleri.....	53
Şekil 2. 11	Flaskta ve endüstriyel boyutta hücre kültürü	54
Şekil 2. 12	Biyoreaktör parçaları.....	57
Şekil 2. 13	Kesikli işletim biyoreaktörü.....	58
Şekil 2. 14	Yarı kesikli biyoreaktör.....	58
Şekil 2. 15	Karıştırmalı biyoreaktör şeması.....	61
Şekil 2. 16	Çeşitli türlerde hava kaldırmalı biyoreaktörler.....	62
Şekil 2. 17	Paketlenmiş yataklı biyoreaktör şeması.....	63
Şekil 2. 18	Akışkan yataklı biyoreaktör şeması.....	64
Şekil 2. 19	Foto biyoreaktör örnekleri.....	65
Şekil 2. 20	Zar (membran) biyoreaktör şeması.....	66
Şekil 2. 21	Döner tambur biyoreaktör şeması.....	67
Şekil 3. 1	<i>L. infantum</i> parazit kültürünün klasik yöntemle kademeli olarak ölçek büyütülmesi.....	78
Şekil 3. 2	Biyoreaktörde <i>L. infantum</i> parazit kültürü	79
Şekil 3. 3	<i>L. infantum</i> kültüründen centrifüj ile toplanan parazit bioması.....	80
Şekil 3. 4	Lizis tamponu ile süspanse edilmiş pelletin vortekslenmesi.....	81
Şekil 3. 5	Ham membran pelletin sonikasyonu.....	82

Şekil 3. 6	ConA kolonuna yüklenen tüm antijenlerden gp63 ün saflaştırılması.....	83
Şekil 3. 7	ConA kolonunda saflaştırma için kullanılan tamponlar. Sırasıyla soldan sağa; bağlama tamponu, elüsyon tamponu, yıkama tamponu(pH 4.5), yıkama tamponu (pH8.5)	83
Şekil 3. 8	ConA kolonunda manuel olarak toplanan örnekler.....	84
Şekil 3. 9	SDS-PAGE jeline yüklenen yükleme tamponu ile birlikte denature edilen örnekler	85
Şekil 3. 10	Örneklerin jelde yürütülmesi.....	85
Şekil 3. 11	ConA ve DEAE kolonunda saflaştırılan örneklerin diyalizi.....	87
Şekil 3. 12	DEAE kolonuna yüklenen örnekten şırınga pompası ile 6ml/saat hızında gp63'ün saflaştırılması.....	88
Şekil 3. 13	DEAE kolonunda saflaştırma için kullanılan tamponlar. Sırasıyla soldan sağa; yıkama tamponu, elüsyon 1 tamponu, elüsyon 2 tamponu, elüsyon 3 tamponu.....	89
Şekil 4. 1	Biyoreaktörde günlük hücre sayısı ve pH değişimi.....	92
Şekil 4. 2	Biyoreaktörde günlük hücre sayısı ve pH değişimi	93
Şekil 4. 3	Biyoreaktör ve erlenmeyerde parazit kültürlerinin pH değişimi.....	93
Şekil 4. 4	Erlenmeyer kültüründe 3.gün parazit görüntüsü (20x).....	94
Şekil 4. 5	Erlenmeyer kültüründe 3.gün parazit görüntüsü (40x).....	94
Şekil 4. 6	Erlenmeyer kültüründe 6.gün parazit görüntüsü (20x).....	95
Şekil 4. 7	Erlenmeyer kültüründe 6.gün parazit görüntüsü (40x).....	95
Şekil 4. 8	Biyoreaktör kültüründe 9.gün parazit görüntüsü (20x).....	96
Şekil 4. 9	Biyoreaktör kültüründe 9.gün parazit görüntüsü (40x).....	96
Şekil 4. 10	Biyoreaktör ve erlenmeyer kültüründe zamanla parazit çoğalma dinamiği.....	97
Şekil 4.11	ConA ve DEAE kolonlarından saflaştırılan örneklerin SDS-PAGE sonuçları.....	98
Şekil 4.12	DEAE de saflaştırılan gp63 SDS-PAGE analizi.....	99
Şekil 4.13	Saflaştırılan gp63'ün antikora karşı verdiği ELISA sonucu.....	100

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1	Yeni ve Eski Dünyalarda bulunan başlıca <i>Leishmania</i> türlerinin hastalık bulguları ve bulaşmaları.....	26
Çizelge 2. 2	<i>Leishmania</i> enfeksiyonuna karşı bağışıklık tepkisi.....	31
Çizelge 2. 3	Biyoreaktör çeşitleri , avantajları ve dezavantajları.....	59

**VİSSERAL LEISHMANİASİS ETKENİ *LEISHMANIA INFANTUM*
PARAZİTLERİNİN BÜYÜK ÖLÇEKLİ ÜRETİMİ VE İMMUNOJEN ÖZELLİKLİ
GP63 MOLEKÜLÜNÜN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Mehmet AYDOĞDU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA

Leishmaniasis, *Leishmania* parazitleri ile enfekte olmuş *Phlebotomus*'ların kan emme esnasında parazitlerin memeli konaklara bulaşmasıyla gelişen bir hastalıktır. Hastalığın visseral, kütanöz ve mükokütanöz olmak üzere 3 klinik formu vardır. *L. infantum*'un neden olduğu visseral leishmaniasis (VL) iç organların tahribatına yol açar ve tedavi edilmediğinde ise ölümle sonuçlanır. Leishmaniasis dünyanın yaklaşık 98 ülkesinde özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerinde endemik olarak görülmektedir. Her yıl 3 milyon insan kütanoz, 500 bin insan ise visseral leishmaniasise yakalanır. Ülkemizde ise leishmaniasisin kütanoz ve visseral formları olup daha çok Ege, Akdeniz, İç ve Güneydoğu anadolu bölgelerinde tespit edilmektedir.

Leishmania parazitlerinin çoğaltılması *in vitro* ve *in vivo* modellerde gerçekleştirilir. Her iki model de *Leishmania* parazitlerinin izolasyonuna ve biomas elde edilmesine imkan sağlamaktadır. Günümüzde *Leishmania* parazitlerinin *in vitro* kültürünün yapılması ve çoğaltılması için RPMI 1640 , Brain heart, yeast extract gibi besiyerleri kullanılarak klasik yöntem tüplerde, flasklarda, erlenmeyerlerde çoğaltılmaktadır. *Leishmania* parazitlerinin çoğaltılmasıyla elde edilen biomas moleküler, genomik, immünolojik, biyokimyasal çalışmalarda ve doğal antijen temelli aşılıların geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, klasik büyük ölçek yöntemlerinin; parazitlerin

üremesine etki eden fiziksel ve kimyasal faktörler (pH, sıcaklık, CO₂, O₂, besiyeri), ekonomik açıdan pahalılık ve işgücü fazlalığı gibi dezavantajları vardır. Son yıllarda bu dezavantajları barındırmayan büyük ölçekli biyoreaktör sistemleri geliştirilmektedir. Bu sistemlerde protozoanlardan maleria, trypanosoma, hayvanlarda hastalık oluşturan *L. tarantolae* parazitlerinin kültürünün yapılmasına yönelik çalışmalar olsada, visseral leishmaniasis etkeni *L. infantum* kültürüne ait çalışma bulunmamaktadır.

Diğer *Leishmania* türlerinde olduğu gibi visseral leishmaniasise karşı şimdiye kadar aşının bulunmaması, hastalığın etkenlerinde kullanılan ilaçlara karşı dirençliğin gelişmesi ve var olan ilaçların çok toksik olması bu hastalığa karşı aşı geliştirilmesinin son derece önemli olduğunu göstermektedir. Son yıllarda leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde doğal immünojen moleküllere daha çok önem verilmektedir. Ancak *Leishmania* parazitleri prokaryotlardan farklı olarak kültür ortamında daha yavaş çoğaldığından ve büyük ölçekte elde edilmesi zor olduğundan yeteri kadar doğal immünojen moleküllerin izolasyonu mümkün olmamaktadır. *Leishmania* parazitinin yüzeyinde bulunan immünojen ve aşı geliştirilmesinde önerilen moleküllerden biri olan proteinaz glikoprotein 63 (gp63) molekülüdür. Ancak şimdiye kadar yapılan çalışmalarda büyük ölçekte *L. infantum*'un biyomasının elde edilmesinin zorluklarından dolayı gp63 molekülüyle ilgili çalışmalar dünyanın az sayılı laboratuvarında yapılmaktadır. Leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde önemli olan bu molekülün eldesi ancak biyoreaktörde büyük ölçekte *L. infantum* parazitlerinin çoğaltılmasıyla mümkün olabilir.

Bu bilgiler ışığında tezin amacı, visseral leishmaniasis etkeni *L. infantum* promastigot kültürünün ilk kez olarak pH ve sıcaklık değerleri kontrol edilebilir karıştırmalı biyoreaktör ortamında büyük ölçekte üretiminin incelenmesi, klasik büyük ölçek yöntemlerine göre daha fazla biyomass elde edilmesi için optimize edilmesi ve elde edilen biyomasın *Leishmania* parazitlerinin immünojen moleküllerinden gp63'ün izolasyonu ve karakterizasyonu için kullanılmasıdır. Tezin amaç ve hedefine ulaşmak için çalışmalarda aşağıdaki yöntemler kullanıldı. Bunlar; devamlı olarak flask ve laboratuvarımızda geliştirilmiş olan kademeli büyük ölçek kültürünün yapılması, karıştırmalı biyoreaktörde büyük ölçek kültürünün yapılması, yeteri miktarda toplanan parazit biyomasının gp63 izolasyonu için vorteks ve sonikasyon ile parçalanması, elde edilen tüm parazit antijenlerinin ConA ve DEAE kolonlarında kromatografileri yapılarak gp63'ün saflaştırılması, SDS-PAGE ve ELISA analizleri yapılarak karakterizasyonun gerçekleştirilmesidir.

Elde edilen sonuçlar göre sıcaklık, pH, besiyeri optimizasyonları yapılan biyoreaktörde klasik yöntemle göre 1.5 kat daha fazla üremenin olduğu görüldü. Erlenmeyerde 0.73 litre kültür hacminde 10 milyon/ml parazit sayısı ile 7.3 milyar parazit sayısında biyomas elde edilirken, optimize edilmiş biyoreaktörde 3.5 litre kültür hacminde 15 milyon/ml parazit sayısına ulaşarak 51 milyar parazit sayısında biyomas elde edildi. Biyoreaktör sistemiyle biyomas eldesinde 7 kat artış sağlandı.

Böylece bu tez kapsamında ilk kez olarak *L. infantum*'un pH ve sıcaklık değerleri kontrol edilebilir karıştırmalı biyoreaktörde üretilmesi gerçekleştirilmiş ve büyük ölçekte biyoması elde edilmiştir. Elde edilen biyomasın parazitin immünojen moleküllerinden olan gp63'ün izolasyonu ve karakterizasyonu için yeterli olduğu ortaya çıkmıştır. Geliştirilen bu sistemin diğer *Leishmania* parazitlerinin biyomasının

elde edilmesi için de önerilebilir. Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen SBAG 213S148 numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Visseral leishmaniasis, biyoreactör, *Leishmania infantum*, gp63 molekülü, saflaştırma



ABSTRACT

LARGE SCALE PRODUCTION OF *LEISHMANIA INFANTUM* WHICH CAUSE VISSERAL LEISHMANIASIS AND ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF IMMUNOGEN GP63 MOLECULE

Mehmet AYDOĞDU

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA

Leishmaniasis is a disease caused by infection of mammalian hosts with intracellular *Leishmania* protozoans during the blood-sucking of *Phlebotomus* (infected sand flies). The Leishmaniasis have three forms; Visceral, cutaneous, and mucocutaneous. Visceral leishmaniasis (VL), caused by *L. infantum*, is a chronic disease that can cause internal organ damage and death. Leishmaniasis is currently endemic in nearly 98 countries especially tropical and subtropical regions around the world. Every year, 3 million people are caught to cutaneous and 500 thousand people are caught visceral leishmaniasis. In Turkey, it is reported mostly in Aegean, Mediterranean, Central and Southeast Anatolia region.

Reproduction of *Leishmania* parasites occurs in *in vitro* and *in vivo* models. Both models allow isolation of *Leishmania* parasites and biomass retrieval. Today, *in vitro* culture of *Leishmania* parasites is carried out using conventional techniques with media such as RPMI 1640, Brain heart, yeast extract, in tubes, in flasks, in erlenmeyers. The biomas obtained by the amplification of *Leishmania* parasites are widely used in molecular, genomic, immunological, biochemical studies and in the development of natural antigen-based grafts. Bioreactors are used to eliminate the disadvantages of conventional large-scale microorganism production methods such as physical and

chemical factors (pH, temperature, O₂, CO₂) , economic reasons, and surplus labor. In these systems, there are no culture studies with *L. infantum* which causes visceral leishmaniasis, although studies have been done on protozoans such malaria, trypanosoma, and *L. tarantolae* which animal parasites.

The lack of vaccines against visceral leishmaniasis as in other *Leishmania* species, the development of resistance to the drugs used in the disease, and the high toxicity of existing drugs suggest that vaccine development is extremely important for this disease. In recent years, more emphasis has been given to natural immunogenic molecules in the development of vaccines against leishmaniasis. However, as *Leishmania* parasites differs from prokaryotes, it is difficult to isolate natural immunogen molecules as much as because it grows more slowly in the culture and is difficult to obtain on a large scale, one of the recommended molecules in the vaccine development is immunogen proteinase glycoprotein 63 (GP63) molecule which is on the surface of *Leishmania* parasite. However, because of the difficulties of obtaining the biomass of *L. infantum* on a large scale in studies carried up to now, studies on the gp63 molecule are being carried out in the world's few laboratories. This molecule, which is important in the development of vaccine against Leishmaniasis, can only be achieved by the multiplication of *L. infantum* parasites on a large scale in the bioreactor.

The aim of the thesis, examination of large scale production of *L. infantum* which causes visceral leishmaniasis promastigot culture in a stirred bioreactor which pH and temperature values can be controlled for the first time, optimization for more biomass than conventional large scale methods and the using biomass for isolation and characterization of gp63 which is immunogenic molecule of *Leishmania* parasites. The following methods were used when trying to reach the aim and objectives of the thesis. These are; Continuous flask and graduated large-scale culturing developed in our laboratory, large scale culturing in a stirred bioreactor, disruption of the collected parasite biomass by vortex and sonication for gp63 isolation, purification of gp63 from all obtained parasite antigens by performing chromatography on ConA and DEAE columns, SDS-PAGE and ELISA analyzes.

According to the results obtained, the number of parasites in classical large scale culture increased 10 times compared to the number of beginnings; 15 times higher in the bioreactor which temperature, pH, and nutrient optimizations were done. When equal volumes of cultures were compared, 1.5 times more parasites were detected in the bioreactor than in the conventional method. In Erlenmeyer, a biomass of 7.3 billion parasites was obtained at a culture volume of 0.73 liters of culture volume of 10 million / ml, reaching a total of 15 million / ml of parasites at a volume of 3.5 liters in the optimized bioreactor, resulted in a biomass of 51 billion parasites. The bioreactor system provided a 7 fold increase in biomass at one time compared to the conventional method.

Thus, for the first time in this thesis, culture of *L. infantum* were performed in a stirred bioreactor which pH and temperature values controllable and large scale biomass was obtained. It has been found that the obtained biomass is sufficient for the isolation and characterization of gp63, the immunogen molecule of parasite. This developed

system can also be proposed for the biomass of other *Leishmania* parasites. This study was carried out within the scope of SBAG 213S148 project supported by TÜBİTAK.

Keywords: Visceral leishmaniasis, bioreactor, *Leishmania infantum*, gp63 molecule, purification



BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Leishmania türündeki zorunlu hücre içi parazitlerin sebep olduğu leishmaniasis, dünyanın ve ülkemizin en önemli halk sağlığı problemlerinden biridir[1]. *Leishmania*'nın memeliler arasında promastigotlar şeklinde gelişimi, çoğaltılması ve aktarılması phlebotomus vektörü ile gerçekleştirilir[2]. Bir omurgalı konakçıyı phlebotomusların sokması ve kan emmesi sırasında geçiş yapan promastigotlar makrofajlar tarafından fagositize edilir ve kamçılarını kaybedip amastigota dönüştükten sonra çoğalırlar. Enfekte olmuş makrofajların patlamasıyla ortaya çıkan amastigotlar yeni sağlıklı intakt makrofajları enfekte ederek çoğalmalarına devam ederler[3]. Parazitin türüne bağlı olarak bulaştığı kişide kutanöz, muko-kutanöz veya visseral leishmaniasisin oluşumuna neden olur.

Leishmania hastalığı dünya sağlık örgütünün son değerlendirmelerine göre, yaklaşık 98 ülkede endemik olarak görülmektedir. Dünya genelinde her yıl 1.5 milyon insan hastalığın farklı formlarından kütanoz leishmaniasise yakalanırken, yaklaşık 500 bin kişi ise hastalığın öldürücü formu olan visseral leishmaniasise yakalanmaktadır[4], [5]. Kala-azar olarak da bilinen visseral leishmaniasis hastada oldukça yüksek ateşle başlar ve haftalarca ara ara ateşlenmeler görülür. Bu sırada hastanın dalağı, karaciğeri büyür, hasta günden güne zayıflar, anemiye neden olur[4]. Hastalık bir yıl kadar sürer müdahale edilmezse hastanın ölümüne sebep olabilir. Dünyada her yıl 60.000 kişinin leishmaniasise bağlı komplikasyonlar nedeniyle hayatını kaybettiği tahmin

edilmektedir[5]. Bu vakalarının %90'ı Hint alt kıtasında, Doğu Afrikada ve Brezilya'da görülmektedir[5]. Bu hastalık, ağırlıklı olarak tropikal ve subtropikal 350 milyondan fazla kişiyi tehdit etmektedir. Bir deri hastalığı olan kütanoz leishmaniasis de tropikal ve subtropik bölgelerde sık görülür. Halk arasında şark çıbanı güzellik yarası, halep çıbanı gibi isimlerle bilinen hastalık daha çok yüz el, kulak bilek boyun bacak gibi vücudun açık kalan kısımlarında görülür[6]. Bu hastalık 77 ülkede endemik olduğu ve Brezilya, Kolombiya, Peru, Afganistan Cezayir, İran, Pakistan gib ülkelerinin bulunduğu bölgelerde vakaların %90'ı görülür[7] .

Türkiyede leishmaniasis daha çok kütanoz leishmaniasis olmakla birlikte sıcaklık ortalamalarının yüksek olduğu güney ve güney doğu bölgelerimizde görülmektedir [8]. Akdeniz bölgesinin doğusunda L. infantum, güneydoğu bölgemizde ise L .tropica türleri etkilidir [9] [10].

Leishmaniasise karşı mücadelenin temelini *in vitro* ve *in vivo* modeller oluşturmaktadır [1]. Her iki model *Leishmania* parazitlerinin izolasyonuna ve biomas elde edilmesine imkan sağlamaktadır. Ancak, *in vivo*dan farklı olarak *in vitro* bu açıdan daha çok önem taşımaktadır[4]. *Leishmania* parazitleri *in vitro* ortamda hem promastigot hem de makrofaj kültüründe amastigot formu üretilmektedir. Prokaryotlardan farklı olarak bu parazit kültürünün yapılması ve büyük ölçekte çoğaltılması sorunlara yol açmaktadır[2]. Günümüzde leishmania parazitlerinin *in vitro* kültürünün yapılması ve çoğaltılması için RPMI 1640 [11], Brain heart[6], yeast extract[12] gibi besi yerleri kullanılarak flasklarda, erlenmeyerlerde çoğaltılmaktadır[13]. Bu yöntemlerde *Leishmania* parazitlerinin çoğaltılmasıyla elde edilen biomas moleküler, genomik, immünolojik, biyokimyasal çalışmalarda ve doğal antijen temelli aşılıların geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır[14].

Klasik yöntem erlenmeyerlerde büyük ölçek mikroorganizma üretiminin ; kültür pH düşmesi, buna bağlı olarak parazit maksimum parazit yoğunluğuna ulaşamaması, sıcaklık, ekonomik nedenler, işgücü fazlalığı gibi dezavantajları vardır. Son yıllarda bu dezavantajları içermeyen kültürden maksimum biomas eldesi için gerekli olan pH, sıcaklık gibi önemli ortam koşullarının optimum düzeyde tutulmasını sağlayan malilyet, zaman ve iş gücü tasarrufuna katkıda bulunan biyoreaktörler mikroorganizmaların üretiminde daha yaygın olarak kullanılmaktadır[15], [16].

Kültürü yapılacak hücre tipine göre biyorektörler de çeşitlilik göstermektedir. Süspanse kültürler için stirred, airlift, wave, membrane tarzı biyoreaktörlerden uygun olan seçilip kullanılmaktadır[16]. Bunlar da kendi içlerinde avantajlara ve dezavantajlara sahiptirler. pH, sıcaklık, karıştırma, hava giriş-çıkış gibi özelliklerinin olup olmamasına göre farklılık gösterebiliyor. Genellikle protozoanların büyük ölçek çoğaltılması için büyümeyi etkileyecek pH, sıcaklık, karıştırma gibi parametrelerin kontrol edilebilir ve optimum düzeyde tutulabilecek karıştırıcılı biyoreaktörler tercih edilir[17].

Plasmodium falciparum [17] [18], *Trypanosoma cruzi*[19], *L. Tarentolae*[20] [21] gibi Prokaryotların biomas elde edilmesinde farklı türde biyoreaktörler kullanılmış ve bu sistemlerin klasik kültür yöntemlerine göre daha avantajlı oldukları ortaya konmuştur.

Literatürde leishmania parazitlerinin biyoreaktör kullanılarak büyük ölçekli kültürlerinin yapılmasına yönelik oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde havalandırılarak karıştırılan kültürde, pH sabitken sıcaklık 24°C'de tutulmuştur. Parazitte rekombinant protein üretimi amacıyla biyoreaktörde büyük ölçek kültür yapılmış[20]. Bir diğer çalışmada hava akışının sağlandığı karıştırıcı ile karıştırılan biyoreaktörde 26°C kültür yapılırken pH kontrol edilmemiştir. Yest extract kullanılarak bioreaktörde *L. tarentolae* paraziterinin büyük ölçekte kültürü gerçekleştirilmiş. Başlangıç sayısına göre sayı 20 kat artış olduğu görülmüş[21].

Buna karşı özellikle visseral leishmaniasis etkeni parazitlerinden olan *L. infantum*'un bioreaktörde üretilmesine yönelik literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. *L. infantum* parazitlerinin hem visseral leishmaniasisin hem de kütanoz leishmaniasisin etkeni olması[22], bu türün dünya üzerinde en sık rastlanan *Leishmania* türlerinden biri olması ve buna karşı mücadelede geliştirilecek aşı adaylarının üretimi için büyük ölçekte parazit kültürüne gereksinim duyulması gibi faktörler bu parazitlerin çoğaltılmasında biyoreaktörlerin kullanımını zorunlu hale getirmektedir. Daha yüksek verimlilikle biomas eldesi için ise sıcaklık, pH ve karıştırma hızının kontrol edilebildiği bioreaktör kullanımı oldukça önemli olduğu düşünülmektedir.

Uzun yıllardır süregelen çalışmalara rağmen leishmaniasisten korunmayı sağlayacak etkili ve güvenilir bir aşı geliştirilmesi mümkün olmamıştır. Son yıllarda leishmaniasise karşı geliştirilmeye çalışılan aşılar parazitlerin doğal moleküllerinin saflaştırılmasıyla

veya rekombinant DNA teknolojisi ve ayrıca *ex vivo* peptid sentezi sayesinde bakterilerde veya mayalarda büyük ölçekli leishmanial antijenler üretmek suretiyle elde edilen altbirim antijenlerinden oluşuyor[14]. Farklı altbirim aşı adayları arasında en umut verici sonuçlar, doğal olarak saflaştırılmış immünojenik parazit moleküllerinin kullanımı yoluyla elde edilmiştir [23]. Bu aşı adaylarının, yüksek bir bağışıklık cevabı üretme potansiyeline sahiptir. Çok bulunmaları, immünojen olmaları nedeniyle native antijen olarak yüzey antijen önemi ortaya çıkmaktadır ve aşı çalışmalarında kullanılmaktadır[23] [24]. Bu moleküllerden en bilinenlerden birisi gp63 molekülüdür [25].

Leishmania parazitinin yüzeyinde bulunan glikoprotein 63 (GP63) ilk olarak 1980'lerde keşfedildi ve genetik ve biyokimyasal olarak çeşitli *Leishmania* türlerinin promastigotlarında eksprese edilen büyük bir yüzey antijeni olarak tanımlandı [26]. parazit yüzey molekülleri hücre dışı ortam ile doğrudan temas halindeyken kritik bir rol oynamaktadır. enfeksiyon sırasında *Leishmania* parazitleri çoklu memeli hücre sinyal moleküllerinin modüle ve inhibe eder[27]. Bu noktada gp63 kritik bir role sahiptir. Parazitin konakçı hücrelerine girmeden önce GP63'ün protein bozunumuna neden olması girdikten sonra da konakçı hücre olan makrofajların hücre çoğalması,, farklılaşma, apoptoz ile bağlantılı sinyal yollarını ve makrofaj spesifik gen ekspresyonlarını bloke etmesi parazitin makrofaj içinde çoğalmasını olanak sağlar[27]. Bu ve bunun gibi doğal subunit antijen molekül eldesi için parazitlerin büyük ölçek kültür üretiminin önemi ortaya çıkmaktadır.

Laboratuvarımızda konu ile ilgili çalışmalar yürütülmektedir. Prof. Dr. Adil Allahverdiyev yürütücülüğünde (TÜBİTAK, Proje No:108S170) “Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesinde polimerlere dayalı yeni bir yaklaşım: LPG-polimer konjugatları” projesi sonucunda *L. tropica* parazitlerinden en immün baskın molekül olan lipofosfoglikan (LPG) molekülü izole edilmiş ve bu molekülün hastalığa karşı %83 oranında koruyuculuk gösterdiği ortaya çıkmıştır. 2010 yılından itibaren laboratuvarımızda tamamlanmış ve hala yürütülmekte olan hem KL hemde VL etmeni parazitlere karşı hibridoma teknolojisine dayalı poliklonal ve monoklonal antikorların üretimine yönelik çalışmalar mevcuttur. “Visseral leishmaniasis etmeni *Leishmania infantum* antijenine karşı hibridoma tekniği ile monoklonal antikor elde edilmesi” (Serkan YAMAN, 2012) adlı yüksek lisans tezi sonucunda ilk kez olarak, *L. infantum'* un 15kDa antijenine karşı

spesifik olan monoklonal antikor elde edilmiştir. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından desteklenen proje kapsamında “*Leishmania tropica* parazitlerinden elde edilen immünojen molekülere karşı tanıda kullanılmak üzere hibridoma teknolojisine dayalı antikor üretilmesi” (Aslı Pinar ZORBA, 2015) adlı yüksek lisans tezi çalışmasında ise, kütanöz leishmaniasis etmeni *L. tropica*'ya karşı üretilen poliklonal antikorların *L. infantum* ve *L. major*'e karşı da farklı duyarlılıkta etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca “Kütanöz leishmaniasis etmeni *L. tropica*'dan izole edilen lpg molekülüne karşı hibridoma teknolojisine dayalı monoklonal antikorların büyük ölçek üretilmesi ve saflaştırılması” (Hilal ŞENTÜRK, 2017) adlı yüksek lisans tezi çalışması da bu proje kapsamında tamamlanmıştır.

Bu tez çalışmasının da desteklendiği SBAG 213S148 No'lu “*L. infantum*'un Neden Olduğu Visseral Leishmaniasis'e Karşı Nanopartikül Temelli Aşı Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Koruyucu Etkilerinin Belirlenmesi” adlı TÜBİTAK projesi devam etmekte olup, parazite özgü LPG, gp63 ve SLA antijenlerinin nanopartikülle kapsüllenerek farklı kombinasyonlarla aşı adayı olarak etkinliğini belirleme çalışmaları devam etmektedir. Bu projeler kapsamında karşılaşılan zorluklardan biri parazitlerden antijen izolasyonu için gerekli olan biyomassın yeteri kadar elde edilmesidir. Bu nedenle parazitlerin biyoreaktörde büyük ölçek üretimine gereksinim duyulmaktadır.

Pellet elde edilme zorluğu ve izolasyonda kullanılan yöntemlerin zorluğu nedeniyle gp63 dünya genelinde az sayıda laboratuvarında çalışılmaktadır. Yapılan sınırlı sayıda çalışmada ise gp63 molekülü düşük miktarlarda izole edilmiştir[28]. Bu molekülün daha yüksek miktarlarda eldesi için biyoreaktörlerde üretilen parazit kültürüne ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak literatürde *Leishmania* parazitlerinden gp63 molekülünün izolasyonunda parazit kültürünün elde edilmesi amacıyla biyoreaktörlerin kullanıldığını gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Diğer yandan ülkemizde gp63 molekülünün *Leishmania* parazitlerinden izole edilmesi ve aşı çalışmalarında kullanılmasına yönelik de bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle aşı çalışmalarında kullanılmak üzere *L. infantum*'dan immünojen gp63 molekülünün izolasyonunda pH ve sıcaklık değerleri kontrol edilebilir karıştırmalı biyoreaktörlerin kullanılmasıyla yeterli miktarda parazit pelletinin elde edilebileceği ve daha yüksek düzeylerde gp63 molekülünün izole edilebileceği düşünülmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı VL etkeni *L. infantum* promastigot kültürünün ilk kez olarak pH ve sıcaklık değerleri kontrol edilebilir karıştırmalı biyoreaktör ortamında büyük ölçekte üretiminin incelenmesi, klasik büyük ölçek yöntemlerine göre daha fazla biomass elde edilmesi için optimize edilmesi ve elde edilen biomasın *Leishmania* parazitlerinin immünojen moleküllerinden gp63'ün izolasyonu ve karakterizasyonu için kullanılmasıdır.

1.3 Hipotez

VL etkeni *L. infantum*'un biomasının elde edilmesine etki eden en önemli faktörler kültür ortamına etki eden fiziksel ve kimyasal faktörlerin aynı anda kontrol edilememesinin bilinmesidir. Buna göre de önerilen tezin hipotezinin temelini bahsedilen dezavantajları barındırmayan daha büyük ölçekte parazitlerin çoğaltılması ve parazit üremesini etkileyen fiziksel ve kimyasal faktörlerin kontrol altında tutulmasını imkan sağlayan karıştırmalı biyoreaktör kullanımının uygunluğunun incelenmesi, elde edilen sonuçların kademeli ölçek büyütme yöntemiyle kıyaslanması ve bu yöntemlerle elde edilen biomasdan immünojen gp63 molekülünün izolasyonunda ve karakterizasyonunda mümkünlüğünü ortaya koymak olmuştur.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Leishmaniasis

Leishmania türündeki zorunlu hücre içi parazitlerin sebep olduğu leishmaniasis, dünyanın ve ülkemizin en önemli halk sağlığı problemlerinden biridir[1] . *Leishmania*'nın memeliler arasında promastigotlar şeklinde gelişimi, çoğaltılması ve aktarılması tatarcık böcek vektörü ile gerçekleştirilir[2]. Bir omurgalı konakçıya inokülasyondan sonra, promastigotlar makrofajlar tarafından fagositize edilir ve amastigota dönüştükten sonra çoğalırlar. Makrofajlar içinde çoğalan amastigotlar makrofajın liziz olmasıyla serbest kalır [3]. Parazitin bulaştığı kişide kutanöz lezyonların gelişmesinden, muko-kutanöz hastalıkların ve ölümcül visseral leishmaniasisin oluşumuna kadar uzanan patolojilere neden olur.

Dünya sağlık örgütünün son değerlendirmelerine göre, yaklaşık 98 ülkede endemik olarak görülmektedir. Dünya genelinde her yıl 1.5 milyon insan hastalığın farklı formlarından kütanoz leishmaniasise yakalanırken, yaklaşık 500 bin kişi ise hastalığın öldürücü formu olan visseral leishmaniasise yakalanmaktadır[4] [5]. Kala-azar olarak da bilinen visseral leishmaniasis oldukça yüksek bir ateşle başlar ve yükselip alçalarak haftalarca sürer. Bu sırada hastanın dalağı, karaciğeri büyür, hasta günden güne zayıflar, kansızlığa düşer, derisi kararır. Hastalık bir yıl kadar sürer müdahale edilmezse hastanın ölümüne sebep olabilir. Dünyada her yıl 60.000 kişinin leishmaniasise bağlı komplikasyonlar nedeniyle hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. Bu vakalarının %90'ı Hint alt kıtasında, Doğu Afrikada ve Brezilya'da görülmektedir[5]. Bu hastalık,

tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde 350 milyondan fazla kişiyi tehdit etmektedir. Bir deri hastalığı olan kütanoz leishmaniasis de tropikal ve subtropik bölgelerde sık görülür. Halk arasında şark çıbanı güzellik yarası, halep çıbanı gibi isimlerle bilinen hastalık daha çok yüz el, kulak bilek boyun bacak gibi vücudun açık kalan kısımlarında görülür[6]. Bu hastalık 77 ülkede endemik olduğu ve Brezilya, Kolombiya, Peru, Afganistan Cezayir, İran, Pakistan gib ülkelerinin bulunduğu bölgelerde vakaların %90'ı görülür[7] .

Leishmania cinsi protozoonlar leishmaniasis adı verilen, klinik belirtileri kutanöz, mukokutanöz ve visseral olmak üzere üç ana tipe ayrılmış, farklı derecelerde ciddiyet ve mortalite sergileyen kompleks bir hastalığa neden olurlar.



Şekil 2. 1 Kutanöz, visseral ve mukokutanöz leishmaniasis [5],[6]

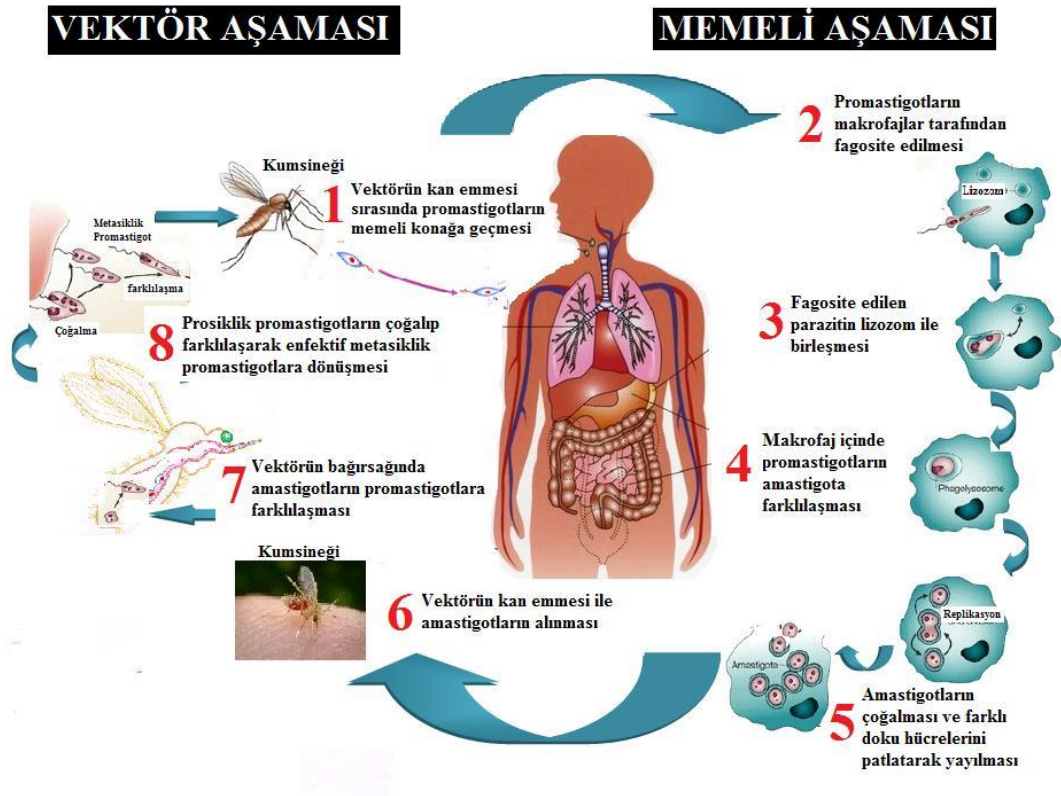
Leishmania parazitleri, Akdeniz'in çevresindeki ülkeler gibi daha ılıman bölgeler de dahil olmak üzere dünyanın tropikal ve alt tropikal bölgelerinde yaşayan milyonlarca insana bulaşmaktadır. Bu hastalık, tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde 88 ülkede 350 milyondan fazla kişiyi tehdit etmektedir. Türkiyede leishmaniasis daha çok kütanoz leishmaniasis olmakla birlikte sıcaklık ortalamalarının yüksek olduğu güney ve güney doğu bölgelerimizde görülmektedir [8], [29]. Akdeniz bölgesinin doğusunda *L. infantum*, güneydoğu bölgemizde ise *L. tropica* türleri etkilidir [9] [10].



Şekil 2. 2007-2009 yılları arasında Türkiye’de Kutanöz Leishmaniasis vakalarının yaygınlığı[30]

Leishmania’nın memeliler arasında promastigotlar şeklinde gelişimi, çoğaltılması ve aktarılması tatarcık böcek vektörü ile gerçekleştirilir.

Bir omurgalı konakçıya inokülasyondan sonra, promastigotlar makrofajlar tarafından fagositize edilir ve amastigota dönüştükten sonra çoğalır.



Şekil 2. 3 *Leishmania* parazitinin yaşam döngüsü[31]

Makrofajlar tarafından fagosite edildikten sonra promastigotlar, amastigotlara dönüşür ve makrofajlar içinde hayatta kalır ve bölgede bölünür. Ev sahibinde kutanöz

lezyonların gelişmesinden, muko-kutanöz hastalıkların ve ölümcül visseral leishmaniasisin oluşumuna kadar uzanan patolojilere neden olur[31].

Nitrik oksit (NO), tümör nekroz faktör-alfa (TNF α), interlökin-12 (IL-12), radikal oksijen türleri (ROS) üretimi de dahil olmak üzere ana konakçı hücre fonksiyonlarının indüksiyon ve regülasyonunu hızla bloke ederek konakçının içinde çoğalma fırsatı bulur. Bu protozoon parazit Janus kinaz (JAK) ve mitojen activated protein kinaz (MAPK) ailelerinden çeşitli kinazların fosforilasyon ve aktivasyon durumuna müdahale ederek makrofajın sinyal yollarını hızla etkileyebilir[30].

Dolayısıyla, parazitler çeşitli anti-mikrobiyallerin tam aktivasyonu için kritik olan transkripsiyon faktörlerini ve inflamatuvar ajanları kontrol etmek ve koruyucu uyarlanabilir bağışıklık tepkisini daha da indüklemek için gerekli olan enflamatuvar mediatörleri etkilerler.

Çizelge 2.1 Yeni ve Eski Dünyalarda bulunan başlıca *Leishmania* türlerinin hastalık bulguları ve bulaşmaları[5], [32], [33]

<i>Leishmania</i> (L) türleri	Vektör tatarcık (Phlebotomus [P] or Lutzomyia [L]) türleri	Etkilediği bölgeler	Konak	Hastalık türü
<i>L. aethiopica</i>	<i>P. longipes</i> <i>P. pedifer</i>	Etiyopya, Kenya	Kemirgen	Kütanoz, Mukozal
<i>L. amazonensis</i>	<i>L. flaviscutellata</i>	Doğu And dağları	Kemirgen	Kütanoz,
<i>L. braziliensis</i>	<i>L. ovallesi</i> <i>L. wellcomei</i> <i>L. neivai</i> <i>L. whitmani</i>	Doğu ve Batı And dağları	Kemirgen, keseli Sıçanlar, Köpek	Kütanoz, Mukozal
<i>L. donovani</i>	<i>P. argentipes</i>	Hindistan, Bangladeş, Nepal Butan	İnsan	Visseral
	<i>P. martini</i> <i>P. orientalis</i>	Sudan, Etiyopya		

<i>Leishmania</i> (L) türleri	Vektör tatarcık (Phlebotomus [P] or Lutzomyia [L]) türleri	Etkilediği bölgeler	Konak	Hastalık türü
<i>L. guyanensis</i>	<i>L. umbratilis</i>	Doğu And dağları	Orman memelileri	Kütanoz, Mukozal
<i>L. infantum</i> (same as <i>L. chagasia</i> in the New World)	<i>P. ariasi</i> <i>P. perniciosus</i>	Akdeniz bölgesi	Köpek	Visseral, Kütanoz
	<i>L. longipalpis</i>	Güney Amerika		
<i>L. major</i>	<i>P. duboscqi</i>	Sahra altı Afrika	Kemirgen	Kütanoz
	<i>P. papatasi</i>	Kuzey Afrika, orta doğu	Kemirgen	
		İran, Pakistan, Hindistan		
<i>L. mexicana</i>	<i>L. olmeca olmeca</i>	Doğu and dağları	Kemirgen, Keseli Sıçanlar	Kütanoz, Mukozal
<i>L. panamensis</i>	None proven	Doğu and dağları	Orman memelileri	Kütanoz, Mukozal
<i>L. peruviana</i>	None proven	Peru	Kemirgen, Keseli sıçanlar, Köpek	Kütanoz, Mukozal
<i>L. tropica</i>	<i>P. sergenti</i>	kuzey Afrika, orta doğu, iran Afganistan	İnsan	Kütanoz
	<i>P. arabicus</i> <i>P. guggisbergi</i>	Kuzey ve Sahra altı Afrika	Kemirgen	

2.1.1 Kütanoz Leishmaniasis

KL tüm leishmaniasis formlarının en yaygın olanıdır. Leishmaniasis'in yayınlanan vakalarında son 25 yıldaki yayılımının neredeyse % 80'inin KL[34] ile ilgili olduğu görülmektedir. Son tahminlere göre, KL, 88 farklı ülkede endemiktir; bunların 72'si gelişmekte olan ülkelerdir ve yaklaşık 350 milyon kişi enfeksiyon ve hastalık riski altındadır, her yıl 1.5 milyon yeni vaka bulunmaktadır. Vakaların% 90'dan fazlası Eski Dünyadaki beş ülkede (Cezayir, Suudi Arabistan, İran, Irak ve Afganistan) ve Yeni Dünyadaki iki ülkede (Brezilya ve Peru) meydana geliyor[35]. KL, kırsal alanlarda, yağmur ormanlarından (orman ortamları) kurak bölgeler arasında değişen oranlarda daha sık görülür; Bununla birlikte Eski ve Yeni Dünyadaki kent ve banliyö bölgelerinde, Akdeniz havzasındaki *L. infantum*'un neden olduğu VL'ye benzer bir model oluşturduğu bildirilmektedir[36].



Şekil 2.4 Dünya çapında Kütanoz Leishmaniasis'in Dağılımı (2010)[7]

KL'de yer alan başlıca türleri: Eski Dünyada *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. major* ve *L. infantum* ve *Leishmania*'ya ait parazitler (*L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. Venezuelensis*) ve *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. [V.] braziliensis* ve Yeni Dünya'da (New World veya American CL, ACL) *L. [V.] peruviana*, *L. adamanensis* kompleksi, üç tür, *L. [V.] guyanensis*, *L. [V.] shawi* ve *L. [V.] panamensis*), *L. [V.] naiffi*, *L. lanesoni* ve *L. subgenus*. Eski Dünya türlerinin çoğu iyi huylu kütanoz hastalığa neden olmakla birlikte, Yeni Dünya türleri, konakçı ve enfekte olan türlerin bağışıklık durumu da dahil olmak üzere birden fazla parametreye bağlı olarak hafif kütanoz hastalıktan şiddetli mukozal lezyonlara kadar uzanan bir hastalık yelpazesine neden olmaktadır[35]. Daha detaylı

olarak, AKL'nin belirtileri lokalize kutanöz leishmaniasis (LKL), anergik diffüz kutanöz leishmaniasis (DKL) ve aynı zamanda literatürde yayılmış kutanöz leishmaniasis ve mukokutanöz leishmaniasis (ML) olarak anılır. Bu geniş klinik spektrumun ortasında LKL, AKL'nin en yaygın şeklidir. *Leishmania* enfeksiyonu kontrol altına alınmadığında (yetersiz tedavi, kötü uyuma veya immünosüpresif bir durumun gelişmesi), DKL vakalarında olduğu gibi ML'de de hücrel hipo-duyarlılığı gösteren veya hücrel hipersensitivite gösteren iki polar formdan birine ilerleyebilir.

Buna ek olarak, son zamanlarda, kronik evrim eğilimi nüksetmesi için DKL'ye benzer DKL ve ML aşırı formlarının LKL ile arasında bir ara maddeyi temsil eden ayrı bir nazolojik varlık olarak bir orta / sınırdaki yaygın deri leishmaniasis örneği ve standart antiliskemik tedaviye kısmi direnç tanımlanmıştır. *Leishmania* enfeksiyonuna karşı immünolojik yanıtta hücrel bağışıklık, özellikle de T-hücre aracılı bir bağışıklık önemlidir. Bir tip 1 T yardımcı (TH1) baskın yanıt tedavi ile ilişkili iken, bir TH2 baskın yanıtı veya yeterli bir TH1 cevabı olmaması hem hastalığın kötüleşmesi ve / veya tedavi başarısızlığı ile ilişkilidir. LKL ile ortaya çıkan AKL'den etkilenen kişiler, bağışık yanıt veren kişiler olarak karakterize edilirken, yaygın hastalığı (DKL) olan kişiler, yanıt vermeyen kişiler olarak tanımlanmaktadır. LKL ile tezahür edenler orta derecede bir yanıt vericidirler. LKL, TH1 ile ilişkili sitokinlerin üretimi ile LKL'nin baskın bir cevabı geliştirmesi durumunda, DKL'nin baskın olan bir TH2'ye sahip olduğu ve TH2 ile ilişkili sitokinlerin üretildiği (çoğunlukla IL- 4 ve IL-10). Bunun aksine, beklendiği gibi LKL alt kümesinde, en azından kısmen korunmuş TH1 bağışıklık tepkisi ile karışık bir sitokin profili vardır.

Leishmania ve *Viannia* alttürünün herhangi bir üyesi, LKL'nin olası etyolojik ajanlarını temsil eder. Bununla birlikte, *L. [V.] braziliensis*, Amerika'daki bu hastalık formuyla ilişkili en önemli parazit olarak kabul edilmektedir. *L. [V.] braziliensis*'in neden olduğu LKL vakalarında, lezyonların histopatolojisi, ülserli lezyon ve kısıtlı makrofajları çevreleyen deride mütevazı bir infiltrasyonu kanıtlar. Daha seyrek olarak, eğer LKL *L. amazonensis*'den kaynaklanıyorsa, patoloğlar lezyonun kenarında büyük bir infiltrasyonu ve amastigotlarla dolu dermisdeki vakuolize makrofajların yoğun infiltrasyonunu vurgularlar.

DKL vakalarında, *L. [L.] amazonensis* ve *L. [L.] mexicana*, başlıca nedensel ajanlardır. Dermiste, histopatolojik özellikler, bol miktarda amastigot içeren makrofajların ciddi bir infiltrasyonudur; buna karşın, lenfositler ve plazma hücreleri nadirdir. Son olarak, Viannia alt geninin parazitleri, özellikle *L. [V.] braziliensis*, ICL'nin başlıca etyolojik ajanı olarak tanımlanmıştır [37], [38].

2.1.2 Visseral Leishmaniasis

VL, Akdeniz ülkelerinin yanı sıra tropikal ve subtropikal bölgelerde 60'dan fazla ülkede endemiktir. Her yıl yaklaşık 2 milyon vaka ve % 90'ı sadece Hindistan, Nepal, Bangladeş, Etiyopya, Sudan ve Brezilya olmak üzere altı ülkeyi ilgilendiren yılda 500.000 vakanın görülme sıklığına sahiptir. Güney Amerika'daki Akdeniz havzasındaki *L. infantum*, Hint altındaki kıtada *Leishmania donovani*, Asya ve doğu Afrika ve *Leishmania chagasi* (*L. infantum* MON 1) VL'nin ana nedenleridir. Günümüzde en yaygın olanı Çin Halk Cumhuriyeti'nden Yeni Dünyaya kadar uzanan *L. infantum*'dur[39]. Akdeniz ülkelerinde ve Güney Amerika'da hastalık zoonotiktir ve özellikle bebekler ve küçük çocukları etkilemektedir[40]. Bununla birlikte, Akdeniz havzasında, HIV ile birlikte enfekte hastalar ve herhangi bir immünosupressif tedavi altındaki hastalar gibi, bağışıklık sistemi zayıflamış ve bağışık baskılanmış erişkin bireylerin oranı artmaktadır[41], [42], [43].



Şekil 2.5 Dünya çapında Visseral Leishmaniasis'in dağılımı (2010)[7]

Bu ülkelerde başıboş ve evcil köpekler ve bol miktarda kum sinekleri enfeksiyon için ana kaynaktır.

Sonuç olarak, bu alanlarda profilaktik ilaçlar ve köpek leishmaniasisinin tedavisi için geniş bir pazar vardır[44], [45]. Hint alt kıtasında ve Afrika'da, VL antroponotiktir (bir rezervuar barınağının katılımı olmaksızın kum sinekleri yoluyla insandan insana geçiş) hem yetişkinleri hem de çocukları etkiler[35] .

Uluslararası turizm, askeri operasyonlar, endemik ülkelerden gelen göçmen akını ve HIV ile enfekte olmuş kişiler arasında son on yılda gelişmiş, endüstrileşmiş, endemik olmayan ülkelerdeki ithal edilen vakalarda artış olmuştur[39], [46], [47], [48], [49].

2.1.3 *Leishmania* İmmünolojisi

Leishmania enfeksiyonuna karşı bağışıklık tepkisi (Çizelge 2.2) hücre aracılıdır. Enfeksiyonun sonucu, konakçının (T helper) Th1 veya Th2'ye bağlanıp bağlanmadığına bağlı olacaktır[50]. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, aynı parazit epitopunun, hastalığın ilerlemesiyle hayvanlarda Th1 yanıtını veya diğerleri arasında Th2 yanıtını indükleyebildiğini göstermektedir[51] . Diğer hayvan çalışmalarında, , interleokin (IL) 4 üreten Th2 hücreleri enfeksiyona yatkınlık kazandırırken, Th1 ve doğal öldürücü hücrelerin direnci oluşturan interferon c (IFNc) ürettiğini göstermiştir [52]. İnsan çalışmaları ayrıca, Th2 yanıtının bir bileşeni olan IL4'ün hastalık ilerlemesi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir[53] .

Çizelge 2.2 *Leishmania* enfeksiyonuna karşı bağışıklık tepkisi

Th1 bağışıklık yanıtı:
IL2, IL3, IFNc üreten T yardımcı CD4 hücreleri Sitotoksik T hücrelerini, doğal öldürücü hücreleri ve makrofajları harekete geçirerek öncelikle hücre aracılı / inflamatuvar olan bağışıklık tepkilerini teşvik edecektir Leishmaniasis'de hastalıkların çözülmesi ile ilişkilidir
Th2 bağışıklık yanıtı:
Th2 hücreleri, B hücreleri tarafından antikor yanıtlarının uyarılmasını destekleyen IL4, IL5, IL6, IL10 üretir Leishmaniasis'de hastalık ilerlemesi ile ilişkilidir

Th1 yanıtında, promastigotlar retiküloendotelyal hücelere bağlanır ve T yardımcı CD4 hüceleri makrofajları aktive eden IL2, IL3 ve IFN γ üretir. IL12 ve tümör nekroz faktörü (TNF) de bu tip cevapta önemlidir. Promastigotlar daha sonra aktif hale getirilmiş makrofajlar tarafından vakuollere fagositize edilir ve daha sonra lizozomlarla kaynaşırlar.

Kaçınılmaz olarak konakçı genetiği bağışıklık yanıtının türünü etkiler. Farelerde ve insanlarda yapılan çalışmalar, doğal direnç ile ilişkili makrofaj protein 1, TNF veya majör histokompatibilite kompleksini kodlayan genlerin enfeksiyonun sonucunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [54].

Parazitin kendisi makrofaj ve dendritik hücre yanıtlarını etkileyebilir. A2 geni gibi özel gen lokusu, *L. donovani* enfektivitesini destekleyen ürünleri kodlayabilir [55]. Böylece, konakçı tarafından belirlenen gecikmeli tip hipersensitivite, antijen spesifik T hücre aktivitesi ve sitokin salgısı arasındaki etkileşim ve enfeksiyona neden olan *Leishmania* türü konakta hangi hastalık ekspresyonunun tipinin gelişceğinde rol oynar.

Bazı vakaların hastalık bildirilmeden önce belirsiz dönemler için *Leishmania* organizmalarına sahip olduğu düşünülür ve gizli enfeksiyona işaret eder[56] . Klinik iyileşmeden sonra da lenf düğümlerinde parazitler tespit edilmiştir[57]. Bu da muhtemelen, hücre aracılı bağışıklık bozulursa, ilk enfeksiyondan on yıllar sonra ortaya çıkabilen leishmaniasisin yeniden nüksetmesinin temelini oluşturur. Viseral enfeksiyonda tam bağışıklığın muhtemelen nadiren geliştiği düşünülmektedir.

2.2 Leishmaniasis Tanısından Kullanılan Yöntemler

VL'nin teşhisi için mevcut yöntemler, dokularda parazitin gösterilmesi, *in vitro* kültür, hayvan inokülasyonu, serolojik ve moleküler teknikler gibi çeşitli teknikleri içerir[58], [59] .

2.2.1 Parazitolojik Yöntemler

Parazitolojik teşhis, dokularda parazitin amastigot formunun gösterilmesi, promastigot formun kültürlerde izole edilmesi veya moleküler analizlerle teyit edilebilir. Yüksek özgüllüğü nedeniyle bu VL teşhisinde altın standart olmaya devam etmektedir.

Değişken duyarlılığı olan mikroskopik muayene ile amastigotların doğrudan görselleştirilmesi için dalak, lenf nodu ve kemik iliği aspirasyonları, periferik kanın buffy coat'u ve karaciğer biyopsisi kullanılmıştır[60], [61], [62], [63] . Amastigotlar, Giemsa boyalı kanı veya aspirat numunelerinin mikroskopik muayenesinde mononükleer veya makrofaj hücrelerinde görülebilir[62] . Duyarlılık, incelenen aspiratlara göre değişirken yöntemin özgüllüğü yüksektir. Klinik örnekler aynı zamanda monofazik (Schneider's böcek ortamı, M199 veya Grace ortamı) veya bifazik kültür ortamı (Novy-McNeal-Nicolle orta ve Evans modifiye Tobie orta) içine de kültürlenebilir. 22-28°C'de inkübasyondan sonra, kültürler amastigotlar promastigotlara dönüşene kadar haftalık olarak dört hafta boyunca incelenir [58]. Dalak veya kemik iliği aspiratlarının kültürü yüksek özgüllüğe sahiptir, ancak zaman harcayan, uzmanlaşmış, pahalı ekipman gerektiren ve bu nedenle sevk araştırma merkezleri ve hastanelerle sınırlıdır[61] [38]. Tanısal duyarlılık, özellikle periferik kan mononükleer hücreler VL hastalarının kanından izole edilerek parazit izolasyonu için daha hassas mikro kültür yöntemi (MCM) geliştirilerek iyileştirilebilir [60], [61]. Allahverdiyev ve arkadaşları tarafından geliştirilen mikro kültür yöntemi (MKY), klasik yöntemden farklı olarak VL ve KL'nin tanısında en kısa sürede (1-3 gün), ortamdaki parazit sayısına bağlı olmaksızın yüksek duyarlılık gösteren ve daha ekonomik olan bir yöntemdir [64], [65], [66]. Mikrokültür aynı zamanda dünyanın çeşitli ülkelerinde hem tanı hem de moleküler tiplemeye de kullanılmaktadır[67].

2.2.2 İmmunojenik Yöntemler

Farklı antijenleri kullanan birkaç tahlil, spesifik anti-leishmanial antikorların saptanması için kullanılmıştır. Son yıllarda, sayısız rekombinant antijen, VL serolojik tanıda kullanılmıştır, çünkü ham antijenlerin kullanımı genellikle sınırlıdır. Günümüzde VL tanısında doğrudan aglütinasyon testi (DAT), indirekt floresan antikor testi (IFAT), dolaylı hemagglutinasyon testi (IHA), enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA) ve immünokromatografik testler (ICT) kullanılmaktadır[59], [60], [61], [62], [68], [69], [70], [71]. Serolojik testler en sık VL tanısı için kullanılır ve genellikle oldukça duyarlıdır, ancak bu yöntemlerin özgüllüğü değişebilir[72] .

2.2.3 Antijen Saptama

VL hastalarında antijenler belirlenirken aglütinasyon testleri kullanıldı[61] . Antijen saptama testleri, antikor üretiminde eksiklik bulunan *Leishmania*-HIV ile enfekte hastalarda olduğu gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda antikor tespit yöntemlerine alternatif oluşturmaktadır[73] [74]. Teorik olarak, bu yöntemler çapraz reaktiviteyi önlediğinden ve şimdiki enfeksiyonlardan ayırt edebileceğinden antikor tespit testlerinden daha spesifik olmalıdır[68] . Bununla birlikte, çeşitli immünolojik faktörler önemli antijenik belirleyicileri kapsayabileceği veya antikorların serbest antijenle bağlanmasını rekabette inhibe edebildiği için, serum en uygun örnek değildir[73] . Bu nedenle, idrarda antijen tespit yöntemleri, çoğunlukla VL tanısı için basit, noninvaziv, hızlı, güvenilir ve kolaylıkla uygulanabilir bir test olan lateks aglütinasyon testi (KAtex) kullanılmaktadır[75] . KAtex, VL hastalarının idrarında düşük molekül ağırlıklı (5-20 kD) glikosonjugat, ısıya dayanıklı, karbonhidrat antijeni tespit eder ve bu da parazitin promastigot ve amastigot formlarında bulunur[74] [76], [77].

2.2.4 Direkt Aglütinasyon Testi

Direkt Aglütinasyon Testi (DAT), özellikle gelişmekte olan ülkelerde en endemik alanlarda yaygın olarak geçerliliği olan, yarı niceliksel, basit, güvenilir ve maliyet etkin bir testtir[68] [60] [61]. Antijen genellikle promastigotlardan oluşur ve test serum, plazma ve tam kanda yürütülebilir [70]. Bütün, tripsinize edilmiş, coomassie boyalı promastigotlar süspansiyon olarak veya dondurularak kurutulmuş formda kullanılabilir [60]. Test, bir hastanın numunesinin seyreltilmelerinin boyanarak öldürülmüş promastigotlarla karıştırıldığı mikro titre plakalarını kullanıyor. Spesifik antikorlar varsa, aglütinasyon 18 saat sonra görülür [68]. DAT titeri, aglütinasyonun halen görünür olduğu en yüksek seyreltme olarak gösterilir ve 1: 3200'de pozitif olarak kabul edilir[78], [79] , ancak pozitif testin eşik titreleri 1: 800 ila 1: 6400 arasında değişen farklı tanımları bildirilmiştir[80] . Bu yöntem, bazıları çapraz reaktif olabilen kullanılan antijenler mozaik nedeniyle düşük antikor seviyeleri tespit etme avantajına sahiptir. Bu nedenle, pozitif bir test için kesme değerlerinin belirlenmesine dikkat edilmelidir[71] . DAT oldukça hassas ve spesifik bir yöntem olarak düşünülür; Bununla birlikte, kesme

değeri sadece duyarlılık ve özgüllüğe dayandırılmamalıdır, zira testin prediktif değerleri epidemiyolojik bağlam ve enfeksiyon prevalansına da bağlıdır [81].

2.2.5 Indirect Fluorescent Antibody Testi (IFAT)

IFAT, enfeksiyözün erken evrelerinde gösterilebilen ve tedaviden altı ila dokuz ay sonra saptanamayan antikorların tespit edilmesine dayanmaktadır, buna karşın düşük titrelerin varlığı genellikle nüks olasılığının bir göstergesidir[70] . Duyarlılık (% 87-100) ve özgüllük (% 77-100) için kabul edilebilir tahminler göstermiştir[62] . IFAT tarafından kullanılan antijenler için promastigot veya amastigot formları kullanılmıştır [60] [70]. 1:160'dan yüksek bir titre, pozitif bir reaksiyon gösterir[82] . IFAT, floresan mikroskopları ve nispeten iyi donanımlı laboratuvarlar gerektirmesine rağmen bazı endemik bölgelerde rutin serolojik bir test olmaya devam etmektedir[83] . Doğrudan yöntemlerin kısıtlılıkları nedeniyle IFAT, Brezilya Leishmaniasis Kontrol Programı tarafından kullanılan yöntemdir ve duyarlılık ve özgüllük değerleri sırasıyla% 88-92 ve% 81-92'dir[84] . Çapraz reaktivite, tripanozomiyazis, sıtma, tüberküloz, bruselloz ve tifo hastasında bildirilmiştir[60], [85] .

2.2.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

ELISA leishmaniasis de dahil olmak üzere neredeyse tüm bulaşıcı hastalıklar için tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır [58]. Teknik, spesifik bir antikoru yakalamak için başlangıç reaktifi olarak yüksek oranda spesifik bir antijen gerektirir; Bu nedenle, yüzey antijenleri, ribozomal veya nükleer proteinler, histonlar ve kinesin ile ilgili proteinler gibi birkaç antijenik moleküle dayanır. ELISA'nın duyarlılığı ve özgüllüğü, kullanılan antijene bağlıdır[61], [86], [87] . En çok kullanılan antijenlerden biri çözünen bir antijen olan (CSA)[58] 'dir. Tüberküloz, tripanozomiaz ve toksoplazmozlu hastalar arasındaki çapraz reaktivite bildirilirken, CSA kullanan yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla% 80 ila 100 ve% 84 ila% 95 arasında değişmektedir[60] [58] . Son zamanlarda, özgüllüğü yüksek (% 95), ancak daha düşük hassasiyet (% 88) olan bir *L. donovani* spesifik 12.6 kDa çözünebilir (fosfat tamponlu salin) promastigot antijeni olan BHUP3 kullanılmıştır. Buna ek olarak, sıtma ve tüberküloz geçiren hastalarla çapraz reaktivitenin% 3'ü bildirilmiştir [88]. *L. donovani*'nin ısı şok protein ailesinden 70 kDa'luk BHUP1 olarak

adlandırılan bir üyenin VL'nin teşhisinde iyi bir potansiyele sahip olduğu bulunmuştur. BHUP1'in duyarlılığı% 95, özgüllüğü% 96 bulundu. Ayrıca bir yıl sonra tedavi edilen VL hastalarının% 54'ünde negatif, DAT'nin ise bir yıllık izlem sonrasında tedavi edilen bireylerin% 93'ünde pozitif kaldığı görülmüştür[89] .

2.2.7 İmmunokromatografik Strip Test (ICT)

VL serodiyagnosisinde rK39 antijenine dayanan basit, hızlı ve doğru bir ICT geliştirilmiştir [58]. RK39 hızlı test, düşük VL endemiklik bölgelerinde bile% 100'e kadar yüksek hassasiyet ve özgüllük gösteren noninvaziv ve maliyet etkin bir yöntemdir [90]. HIV ile enfekte hastaların serodiagnozunda da kullanılmıştır [90]; Bununla birlikte, bu hastalarda düşük sensitivite VL tanısı için kullanımı sınırlamıştır[83] . VL serodiagnozu için birkaç rekombinant antijen mevcut olmasına rağmen, en hızlı testler esas olarak rK39'a dayanıyorlar, çünkü Brezilya'da ve Hint alt kıtasında VL teşhisinde oldukça etkilidirler, ancak Doğu Afrika'da kullanımı tatmin edici değildir[91] . Anti-rK39 antikorları idrar ve balgamdan da tespit edilmiştir, bu da VL teşhisinde faydalı olmaktadır. Son zamanlarda tükürük kullanan bir rK39 hızlı testi düşük duyarlılık gösterdi; Bu nedenle tükürük, VL tanısı için uygun bir numune değildir[92] .

2.2.8 Moleküler Yöntemler

Moleküler teknikler, dikkate değer hassaslık, özgüllük, kullanılan örneklerin çeşitli seçenekleri ve genellikle konvansiyonel parazitolojik ve serolojik yöntemlerle gösterilen sınırlamalar nedeniyle giderek daha fazla alakalı hale gelmektedir[61], [86] . Asemptomatik *Leishmania* enfeksiyonunu saptamak ve VL hastalarının teşhisi ve takibi için başarıyla kullanılmıştır[93] , tedavi edilen VL hastalarında nüksler ve enfeksiyonları saptayabilirler[83] . Geleneksel PCR ve nested PCR, seminested-PCR ve RT-PCR gibi varyasyonlar önemli tanı araçları olarak gösterilmiştir [86]. Bunlar kemik iliği, dalak, lenf nodu bulguları, periferik kan ve serum örnekleri üzerinde yapılabilir [94]. PCR Kan ve kemik iliği örnekleri üzerinde çok hassas bir yöntemdir; İmmünometanif bireylerde her iki örnek için duyarlılık neredeyse eşittir [95]. Son on yılda, immün yetmezlik görülen hastalardan alınan idrar örnekleri üzerine yeni tanıtilen PCR, yüksek duyarlılık (% 96.6) ve özgüllük (% 100) göstermiştir [94]. Daha yakın zamanlarda, oral sıvı bazlı bir

rt-PCR,% 94.6 sensitivite gösterdi ve özgüllüğü% 90 idi [63]. Kinetoplastid DNA, rRNA, mini ekson türevi RNA genleri, â-tübülün gen bölgesi, gp63 gen lokusu bölgeleri de dahil olmak üzere çeşitli hedef sekanslar kullanılmıştır[61] .

2.3 Leishmaniasis Tedavisinde Güncel İlaçlar

Yüksek maliyetli ilaçlar, yüksek ilaç dozajı, ilaç direnci insidansı ve yaygınlığı, yan etkileri ve uygun fiyatlı yeni antiliskimyasal ilaçların olmaması gibi birçok problem olduğu için leishmaniasisin tedavisi hala bir zorluktur. Şimdiye kadar, düşük maliyetli ve asgari olumsuz yan etkilere sahip ilaçlar geliştirmeye yönelik çok sayıda girişim yapılmasına rağmen hala leishmaniasisten kaynaklanan morbidite ve mortalite azalıyor değildir. Leishmaniasis'i tedavi etmek için ideal bir ajan ihtiyacı kaçınılmazdır. İdeal bir ilaç minimum dozlarda etkili olmalı, ilaç direnci oluşturmamalı, düşük maliyetli olması, teratojen olmaması ve yan etkileri bulunmaması gerekir. Son yıllarda leishmaniasis tedavisinde iyileştirmeler yapılmıştır. Yeni ilaçlar, yeni doğum sistemleri ve yeni tedavi rejimleri tasarlanmış ve uygulanmıştır[96].

2.3.1 Pentavalent Antimon

Leishmaniasis'e karşı beş değerli antimonyal (Sb veya SbV) kullanılmıştır. Dünyanın birçok yerinde, sodyum stiboglukonat (Pentostam®, C₁₂H₃₈O₂₆Sb) ve meglumin antimoniat (Glucantime®, C₁₄H₂₉O₁₀N₂Sb) de dahil olmak üzere beş değerli antimonialler, leishmaniasis hastalığının tedavisinde ilk ilaç ve altın standart olarak kabul edilmektedir[97]. Bununla birlikte, bu ilaçlar uzun süreli uygulama yollarına (30 güne kadar) ihtiyaç duymakta ve insanlar için çok toksiktir [98]. Kas içine tolere edildiğinde kardiyotoksisite, hepatotoksisite, pankreatit, reversibl renal yetmezlik, anemi, lökopeni, trombositopeni, karın ağrısı, mide bulantısı, kusma, kan bozuklukları ve enjeksiyon yerindeki ağrı bazı istenmeyen olumsuz yan etkilerdir[99]. Bu tedavi rejimi hamile kadınlar ve yaşlılar için kısıtlama ve yüksek maliyet, parenteral uygulama ve benzeri diğer dezavantajlara sahiptir. Şu anda birkaç rapor bu ilaçların etkinliğinin önemli ölçüde azaldığını göstermiştir[100]. Dahası, son yıllarda büyük ölçekli ilaç direnci ve tedavi başarısızlıkları bildirilmiştir [101], [102]. Genellikle bu ilaçlar leishmaniasisin sistemik tedavisinde ve bazen de diğer ajanlarla kombinasyon halinde

tek başına kullanılırlar [103]. Bununla birlikte, pentavalent antimonyallerin uygulanmasında tedavi başarısızlığı gibi bir sınırlama olduğunda, amfoterisin B, paromomisin ve pentamidin gibi alternatif ilaçlar kullanılmalıdır[104].

2.3.2 Amphotericin B

Amfoterisin B veya fungizon (C₄₇H₇₃NO₁₇), *Leishmania*'nın farklı türlerine karşı etkili antileishmanyal aktivite gösteren bir antibiyotik ve antifungal ilaçtır. Amfoterisin B genellikle leishmaniasis için ikinci basamak tedavisi olarak uygulanır ve genellikle iyi klinik sonuçlar verir. Bu ilaç, ilk tercih edilen tedavi olarak kullanılmış ve beş değerli antimonyallere karşı yaygın direnişin sürdüğü Hindistan'da yaklaşık% 100 iyileşme oranına ulaşılmıştır[105], [106]. Bununla birlikte, advers yan etkiler Amfoterisin B'nin verilmesinde başlıca kısıtlayıcı faktörlerdir. Ateş, mide bulantısı, kusma, anemi, hipokalemi, nefrotoksisite, hepatotoksisite, kardiyotoksisite, aşırı duyarlılık ve anafilaksi gibi ortak yan etkilerle ilişkilidir [107], [108], [109]. Her ne kadar amfoterisin B kötü gastrointestinal absorpsiyon göstermesine rağmen günlük ya da alternatif günlerde intravenöz infüzyon olarak uygulanır ve hastanede yatış süresinin uzun olması gerekir. Üstelik, kullanımının yüksek frekansı nedeniyle direnç oluşabilir[105].

2.3.3 Liposomal Amphotericin B

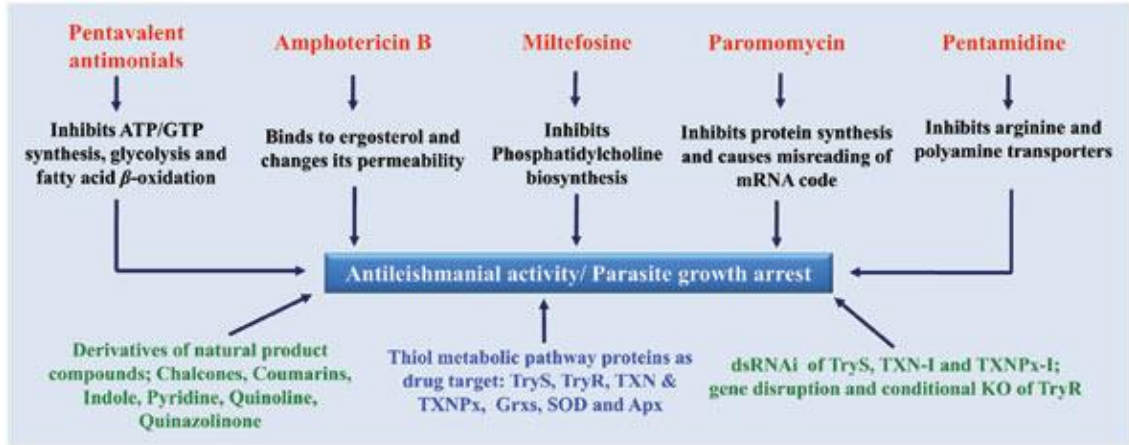
Son yıllarda gelişen lipozomal amfoterisin B, amfoterisin B sorunlarını azalttı. Dünya Sağlık Örgütü, yüksek etkinlik ve güvenilirliğine dayanan lipozomal amfoterisin B'nin uygulanmasını önerdi [110]. Bu amfoterisin B formu daha az toksiktir, daha biyolojik olarak bulunur ve hastalar tarafından daha iyi tolere edilir[111]. Ek olarak, amfoterisin B'nin lipit formu makrofajlar tarafından seçici olarak alınır ve daha az nefrotoksiktir. Konvansiyonel amfoterisin B'ye kıyasla, lipozomal amfoterisin B'nin tedaviden sonra çözülen üriküler döküntü ve böbrek yetmezliği gibi hafif yan etkileri vardır[112], [113]. Bununla birlikte, lipozomal amfoterisin B'nin uygulanmasındaki ana sınırlayıcı faktör yüksek maliyetlidir[108]. Dahası, amfoterisin B'nin lipit formu kısa devridaim yarılanma ömrüne sahiptir ve karaciğer ve dalaktaki yüksek konsantrasyonlarına hızla ulaşır [108] [96]. Amfoterisin B ve lipit formu etkili bir şekilde leishmaniasis'e karşı terapötik dayanak oluşturmuştur, ancak son zamanlardaki kısıtlılık raporlarında alternatif tedavi

yöntemlerinin değerlendirilmesi gerekmiştir. Paromomisin, pentamidin ve sitamaquin bazı durumlarda kullanılır, ancak her biri kullanıma uygunluk, şu an kullanılan ilaçlara direnç, toksisite gibi kısıtlamalara sahiptir ve parenteral uygulama gerektirir[114]. Bununla birlikte, bu hastalığa karşı savaşmak için yeni terapötik anti-Leishmania ajanları ve yeni tedavi yöntemleri gereklidir.

2.3.4 Miltefosine

Miltefosin (hekza desil fosfokolin, Impavido®), mikrobiyal ve mantar enfeksiyonu, göğüs kanserinin kutanöz metastazları, katı tümörler, şistozomiyazis ve kutanöz ve visseral leishmaniasis tedavisinde kullanılan bir alkil fosfokolin bileşiğidir[115], [116]. Miltefosinin leishmaniasis tedavisinde girişi belirgin bir olay olarak düşünülmüştür, çünkü miltefosin ilk non-parenteral ilaçtır ve leishmaniasis tedavisinde ağız yoluyla ve lokal olarak uygulanabilir. Bu ilaçla yapılan tedavide hastanın hastaneye kaldırılması gerekmez ve evde tedavisi mümkündür; Bu nedenle hastaneye kaldırma ve hemşirelik ile ilgili masraflar ortadan kalkar. Buna ek olarak, beş değerli antimoniyal dirençli hastalarda miltefosinin etkinliği bildirilmiştir. Dahası, miltefosine ile tedavi maliyeti beş değerli antimonialardan düşüktür[117]. Genel olarak, oral miltefosin kullanan klinik sonuçlar tatmin edicidir ancak bu ilaç yaygın kullanım üzerine direncin gelişmesini desteklemektedir.

Miltefosinin yanlış kullanımı, 7 günlük uzun yarılanma ömrü ve uyuşturucu alımında sorumlu genlerin inaktivasyonu, miltefosine karşı direnç gelişmesinin üç nedeni olmuştur[96], [117]. Bununla birlikte, mide-barsak, karaciğer ve böbrek sistemlerinde kusma, diyare, toksisite gibi miltefosinin çeşitli yan etkileri literatürde bildirilmiştir [101] [96], [118], [119]. Bu bileşik gastrointestinal rahatsızlıkları olan hastalarda intravenöz yolla uygulanmalıdır. Fakat reçeteli bu yol, tromboflebit ve hemoliz gibi yan etkiler nedeniyle sınırlıdır. Bazı durumlarda bu ilaçla tedavi edilen tedavide başarısızlık ve relaps raporları da gözlemlenmiştir [117]. Buna ek olarak, miltefosin teratojeniktir ve hamile kadınlarda ve çocuk sahibi yaştaki bireylerde uygulanmamalıdır[96], [101], [108].



Şekil 2.6 Leishmaniasis e karşı kullanılan ilaçlar ve etkileri[120]

2.3.5 Diğer Yöntemler

Mevcut kemoterapilerin leishmaniasis tedavisinde yüksek maliyet, parenteral reçete, yüksek toksisite, direnç gelişimi ve istenmeyen birçok olumsuz yan etki gibi bir dizi kısıtlılığı vardır. Bu nedenle, bu tedavinin tedavisinde diğer terapilerin geliştirilmesi önemlidir. Nanoteknolojideki gelişmeler son yıllarda leishmaniasis tedavisinde yeni yaklaşımlar sağlamaktadır. Nanoteknoloji, bu enfeksiyonun tedavisinde iki prosedür üretir. Birincisi, yaygın ve konvansiyonel ilaçlar için nano-ilâç dağıtım sistemlerinin tasarımıdır. Bu yöntem, ilâç geliştirme alanında dikkate değer bir ilgi gösterdi ve güçlendirilmiş farmakokinetik özelliklerden dolayı en umut verici antileishmaniyaal terapilerden birini sunuyor. Dahası, bu tür ilâç iletim sistemi etkinliği artırır ve emilim, dağıtım ve boşaltımı içeren ilacın metabolizması üzerinde toksisiteyi azaltır [121]. Böylece, nano-ilâç dağıtım sistemleri, yüksek etkinlik, yüksek hedef teslim etkisi, düşük toksisite, yüksek konsantrasyon, kontrollü sistemli uyuşturucuları bırakma ve uzamış sistemik dolaşım ömrü ile sonuçlanır [122]. Tipik olarak, nano ve mikro taşıyıcılar kullanılarak verilen doğum, biyoyararlanımı artırır ve karaciğer, böbrekler ve dalak gibi memelilerin vücut organlarında uyuşturucu kalışının uzatılması ile kombine edilmiş olan ilaçları metabolizmaya karşı korur ve reçeteler arasındaki zamanı uzatır[123]. ilâç formülasyonuna ikinci yaklaşım ilacın nanonizasyonudur. Makrofajlar makrofajlar içerisinde *Leishmania* için spesifik doğumu hedefleyen yabancı cisimler olarak nanopartikülleri fagositozlamaktadır[106], [111]. Nanopartiküllerin, geniş yüzey alanlarına ve normal formlara veya yığın boyutlarına kıyasla özel kimyasal, fiziksel ve

mekanik özelliklere sahip oldukları kadar hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır [124]. Allahverdiyev ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda Gümüş, TiO₂@Ag, Meglumine antimon-TiO₂@Ag ve Çörek otu yağı-TiO₂@Ag nanopartiküllerinin *L. tropica* ve *L. infantum* parazitlere karşı antileishmanyal etkileri olduğu görülmüştür. [67], [125], [126], [127].

2.4 Leishmaniasis'in Kontrolü için Aşı Geliştirilmesi

Leishmaniasis'e karşı ömür boyu bağışıklık kazanılması, hastalığa profilaktik aşı protokollerinin geliştirilmesine de ilham verdi, ancak az sayıda çalışma insan deney aşamasında ilerledi [128]. Leishmaniasis'e karşı ideal bir aşı adayı, hem toplum için uygun hem de emniyetli olmalıdır ve her iki farklılaşma kümesini 4+ (CD4 +) ve farklılaşma 8+ (CD8 +) T hücre yanıtlarını ve uzun vadeli immünolojik hafıza kümesini indükleyebilmelidir. Doğal enfeksiyonlarla desteklenerek gerekli aşı dozlarının sayısını azaltır. Buna ek olarak, ideal bir aşı, farklı *Leishmania* türlerine karşı etkili olmalı ve oda sıcaklığında veya 4 ° C'de stabil olmalı ve -20 ° C veya -80 ° C'de [129] depolanma ihtiyacını ortadan kaldırmalıdır. Bununla birlikte, aday aşılarda çoğunluğu sadece türlere spesifik koruma sağlayan antijenlerden oluştuğundan, uzun ömürlü bağışıklığın teşvik edilmesi ve farklı *Leishmania* türlerine karşı koruma sağlanması çok zordur [130], [131], [132], [133], [134], [135].

Son birkaç yılda tanımlanmış antijenik bileşenlerden oluşan ve *Leishmania* enfeksiyonlarına karşı etkili hücresel bağışıklığı uyandırmak üzere tasarlanmış ikinci nesil aşılarda geliştirilmesine yönelik önemli çalışmalar gösterilmiştir. *L. braziliensis*'in neden olduğu mükokütanöz leishmaniasis ve *L. amazonensis*'in neden olduğu diffüz kütanöz leishmaniasis, MKL çalışması için uygun fare modelleri bulunmadığından, aşı çalışmalarının çoğunluğu *L. major* enfeksiyonundan kaynaklanan kütanöz leishmaniasis'e ya da *L. Donovanii* 'den kaynaklanan visseral leishmaniasis'e odaklanmıştır [136], [137]. *Leishmania* enfeksiyonuna karşı koruma sağlamak için birkaç strateji araştırılmasına rağmen şu anda kütanöz veya visseral leishmaniasis için etkili bir aşı bulunmamaktadır. Leishmaniasis'i önlemenin en başarılı yolu, canlı parazitlerle enfeksiyon olan 'Leishmanization' diye adlandırılan bu prosedür yüzyıllar boyunca vücudun maruz kalmış kısımlarındaki lezyonlara karşı koruma sağlamak için

kullanılmıştır. Bu yöntemin genellikle etkili olmasının yanında parazitin virölans kaybı, standardizasyon zorluğu ve iyileşmeyen lezyonların gelişimi ile ilişkilendirilebilir[138]. Bunlara ek olarak, parazitlerin asla vücuttan temizlenmemesi ve bağışıklık sistemi baskılanan bireylerde enfeksiyonun tekrarlama riski olduğundan bu yaklaşım günümüzde kullanılmamaktadır. Bununla birlikte, leishmanization'ın başarısı, leishmaniasis için bir aşı olabileceği fikrini destekledi. Bununla birlikte, canlı aşılardan daha geleneksel aşılarla olan uçurum, başlangıçta düşünülenenden çok daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır. Öldürülen tüm parazitler, zayıflatılmış canlı parazitler, parazit proteinleri, altbirim rekombinant aşılar, vektörlü aşılar ve DNA aşıları ile aşılama girişimlerinden sınırlı başarı elde edildi. Güvenlik österilerine rağmen, tüm parazitlerin öldürülmüş faz III aşı denemeleri başarısız olmuştur [138].

VL'ye karşı koruyucu bağışıklık, bir antijenin ve IFN- γ , IL-2, IL-12, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktörün(GM-CSF) ve diğer sitokinler üretilmesiyle başlatılan parazit spesifik T yardımcı 1 (Th1) gelişimine bağlıdır [139] [140] [141], [142] [143] [144]. Parazit antijenlerine karşı CD4 + Th1 hücre yanıtlarının indüksiyonu, IFN- γ gibi sitokinler, internalize olmuş parazitleri öldürebilen aktive fagositik hücreler tarafından nitrik oksit üretimi indüklediğinde primer enfeksiyonun kontrolünde çok önemlidir [145], [146]. CD4 + T hücrelerinin rolü ile birlikte, CD8 + T hücreleri aynı zamanda hastalığa karşı korunmaya katkıda bulunurlar ve Th1 cevabını IFN- γ üretimine bağımlı bir mekanizma ile arttırarak primer enfeksiyonların kontrolünde önemli bir role sahiptirler [147]. fakat, interlökin-4 (IL-4), interlökin-10 (IL-10), interlökin-13 (IL-13), interlökin-18 (IL-18) ve transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β), Th1 cevabını inhibe eden, enfekte olmuş makrofajların ve dolayısıyla hastalığın gelişmesine katkıda bulunan hastalık teşvik eden molekülleri temsil eder[148] [149], [150] .

Rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemeler, rekombinant proteinler şeklinde aday aşılar olarak çeşitli türlere veya formlara özgü *Leishmania* moleküllerinin kapsamlı bir şekilde incelenmesine yol açmıştır. Bu adayların en büyük avantajları saflıkları ve ulaşılabilir üretim verimleridir. Birçok protein, leishmaniasis'in kutanöz formu için aday aşılar olarak sıklıkla araştırılmıştır; Bununla birlikte, bunların birçoğu, memeli VL modellerinde değerlendirilmiştir [151]. Rekombinant proteinler, genellikle aşı formülasyonuna ve ilişkili immün adjuvanlara ve test için kullanılan hayvan modeline

bağlı olarak, değişken derecelerde başarı ile VL için ikinci nesil aşılar olarak değerlendirildi. Amastigot ve promastigot parazit antijenler test edilen en yaygın aşı adaylarıdır.

A2 antigene karşı immün korumanın indüklenmesi için test edilen amastigotlara özgü antijenler arasında etkili bir aday olarak ortaya çıkmıştır. VL'ye [152] neden olan bazı *Leishmania* türlerinin amastigot formlarında bol miktarda ifade edilen multigen ailesi tarafından kodlanır. Adjuvanlarla [153], [154], bir DNA aşısı [155] olarak, patojenik olmayan bakteriler[156] , virülans olmayan *Leishmania tarentolae* [157] veya zayıflatılmış replikatif olmayan virüsler [158], ile bağlantılı rekombinant A2 proteininin uygulanmasına yönelik çalışmalar memeli modellerinde koruyucu etkisinin kanıtını sağlamıştır. Genel olarak anti-A2 koruyucu bağışıklık, A2 proteiniyle veya parazit özütleriyle yeniden tepkimesinde T hücreleri tarafından yüksek düzeylerde anti-leishmanial IFN- γ ve düşük seviyelerde IL-10 üretimi ile birlikte[152] parazite özgü IgG2a antikorlarının üretilmesi ile ilişkilidir.

Leishmania parazitlerinin promastigot formlarında VL'ye karşı aşı adayları olarak ifade edilen antijenler değerlendirildiğinde, parazit yüzey antijen-2 PSA-2, tatmin edici sonuçlar verdi. Bu immünojen, adjuvan olarak *Corynebacterium parvum* ile ilişkili olarak uygulandığında, bir Th1 tipi tepki geliştirilmesi yoluyla, farelerde bir *Leishmania* challengeine karşı koruma sağlamayı başardı [159].

Her iki parazit formunda ifade edilen farklı *Leishmania* proteinleri içeren bir formülasyonun VL'ye karşı daha etkin ve koruyucu bir aşı açısından daha iyi sonuçlar vermesi gerektiği öne sürülmüştür[154], [160] . Farklı proteinleri birleştiren aşılardan kullanımı, farklı *Leishmania* türüne karşı korunmak için yalnızca tek bir aşı üretilmesi gerekeceği için artan kolaylık ve düşük üretim maliyetleri sağlayabilir[161] . Bununla birlikte, az sayıdaki çalışma, tek antijenlerin araştırılması üzerine yapıldığı için[29] [162], [163], [164] , VL'ye karşı koruma amaçlı kimerik aşılardan değerlendirilen az sayıda çalışma[165], [166] değerlendirmiştir.

Çok antijenik bir aşı geliştirilmesi, bileşiminde kullanılmak üzere biyolojik hedeflerin uygun bir şekilde seçilmesini gerektirir. Yakın tarihli bir çalışmada, monofosforil lipit A, KSAC ile formüle edilen bir poliprotein aşısının, immünojenik olduğu ve farelerde *L.*

infantum ve *L. major*'e karşı koruma sağlamada etkili olduğu gösterildi. KSAC aktifleştirilmiş C kinaz LACK, gp63, tiol-spesifik c-antioksidan TSA, hidrofilik açillenmiş yüzey proteini B HASPB, sterol 24-c-metil transferaz SMT, KMP-11, A2 ve CPB proteinler için reseptörün *Leishmania* homologundan oluşan bir kimerik proteindir. Her iki *Leishmania* türü ile mücadele eden modellerde, koruyucu yanıt düşük seviyelerde IL-4 ve azaltılmış antileishmaniya IgG1 yanıtı ile kombine edilmiş yüksek IFN- γ üretimi ile ilişkilendirildi[167] .

Yeni aday VL aşılarının keşfi ile ilgili olarak geliştirilebilecek bir diğer alan da vektör tükürük proteinlerine dayanmaktadır. Bugüne kadar, kanıtlar, aşılanmış hayvanlarda Th1 tipi bir tepki uyandıran tükürük moleküllerinin sokma bölgesinde koruyucu bir immünolojik ortam oluşturabileceğini ve hastalığın kontrolünü ve buna eşlik eden *Leishmania*'ya özgü bağışıklığı arttırdığını gösteriyor[168] . Isırma alanındaki bu antijenlere yanıt olarak Th1 tipi bağışıklık ortamı, parazit direncine karşı koruyucu bir bağışıklık tepkisi oluşturabilir. Bu bağlamda, *Phlebotomus duboscqi*'den 15 kDa'lık bir tükürük proteini olan PdSP15, insan dışı primatlarda leishmaniasis'e karşı aday bir antijen olarak değerlendirildi [169].

2.5 Glikoprotein 63 (GP63)

Leishmania parazitleri Bir memeli organizmasına girdikten sonra bu yabancı çevreye uyum sağlamalı ve hemen çevre bileşenleri ve hücrelerinden yararlanmalıdır. *Leishmania* parazitinin yüzeyinde bulunan glikoprotein 63 (GP63) ilk olarak 1980'lerde keşfedildi ve genetik ve biyokimyasal olarak *Leishmania* promastigotlarında çeşitli türlerden eksprese edilen büyük bir yüzey antijeni olarak tanımlandı [26].

GP63, promastigotlarda bol bulunur, ancak amastigotlarda daha az bulunduğu gösterilmiştir [27]. Bu süreç boyunca, parazit yüzey molekülleri hücre dışı ortam ile doğrudan temas halindeyken kritik bir rol oynamaktadır. Enfeksiyon sırasında *Leishmania* parazitleri çoklu memeli hücre sinyal moleküllerinin modüle ve inhibe eder. GP63'ün fibronektin reseptörü ile etkileştiği bulunmuştur ve bu nedenle gp63 parazitin makrofajlara yapışmasına daha fazla yardımcı olabilir [170].

Parazitin konakçı hücrelerine girmeden önce GP63'ün protein bozunumuna neden olması, konakçı hücre içi boşluğuna geçmesine izin veren bir mekanizma anlamına gelir. Kutanöz (*Leishmania tropica*) ya da visseral (*Leishmania infantum*) leishmaniasis'e neden olan klinik izolatların *L. amazonensis*, *L. major*, *L. mexicana* ve *L. donovani*'nin kültür süpernatantlarında proteolitik olarak aktif GP63 saldıgı gözlenmiştir[172] [173] .



Leishmania GP63'ün, hücre sinyal yollarında ve işlevsel düzenlemelerinde yer alan geniş bir yelpazede konak hücre substratları üzerinde hızla hareket edebilen oldukça aktif proteaz olduğu oldukça açıktır. GP63'ün makrofaj anti-mikrobik ve iltihap fonksiyonları üzerindeki etkisi de literatürde belgelenmiş ve en azından başlangıçta *Leishmania*'nın hayatta kalımına katkıda bulunan önemli bir virülans faktörü olarak kilit rolünü güçlendirmiştir[176].

Leishmania enfeksiyonu sırasında GP63'ün makrofaj lipidsel mikro alanı içinde lokalize olduğu bulundu. GP63 girişinin bloke edilmesi, PTP bölünmesi ve aktivasyonu ile sağlanır. GP63'ün çeşitli giriş mekanizmasının var olabileceğini düşünülmektedir [176].

Bu bağlamda, GPI ile bağlanmış GP63'ün lipidsel mikro alanı vasıtasıyla girişini desteklediğinden şüpheleniliyor, oysa GPI'ye sabitlenmeyen GP63, örneğin makrofaj çekirdek bölmesine erişmek için henüz tanımlanamayan bir mekanizma yoluyla girebilir.

2.5.1 GP63 Ve Makrofaj İçi Yaşam

Makrofajlar tarafından yakalandıktan sonra *Leishmania* parazitleri, fagolysozomun yıkıcı ortamında amastigot olarak hayatta kalır ve çoğalır. GP63, promastigotlardan daha az miktarda amastigotlarla ifade edilmesine rağmen, posttranslasyonel modifikasyonları ve lokalizasyonu (yani, membrana bağlı, sitosolik, flagellar cep), *Leishmania* yaşam evreleri arasında farklılık gösterir. GP63 şimdiye kadar incelenen tüm *Leishmania* türlerinin amastigotlarında saptanabilir. GP63'ün makrofajların sert ortamından hücre içi amastigotların korunmasında önemli bir rol oynadığı görülmektedir [177] [177].

2.5.2 GP63 Tarafından Konakçı Makrofaj Sinyalizasyonunda Değişiklik

Sırasıyla kinazlar ve fosfatazlar tarafından yapısal ve düzenleyici proteinler üzerindeki Ser / Thr / Tyr kalıntılarının fosforilasyonu ve defosforilasyonu arasındaki denge, ökaryotik hücrelerdeki hücre içi mekanizmaların kontrol edilmesi için kritik önem taşır. *Leishmania* parazitleri, bu yolların negatif düzenleyicileri olarak fosfatazların rolünden istifade ederek konukçu makrofaj sinyalizasyonunu ve anti-mikrobik

fonksiyonları engellemede özellikle etkilidir [178]. GP63, bu parazit kaçış mekanizmalarının birçoğuna doğrudan etkiler.

2.5.3 MARCKS Protein ve GP63

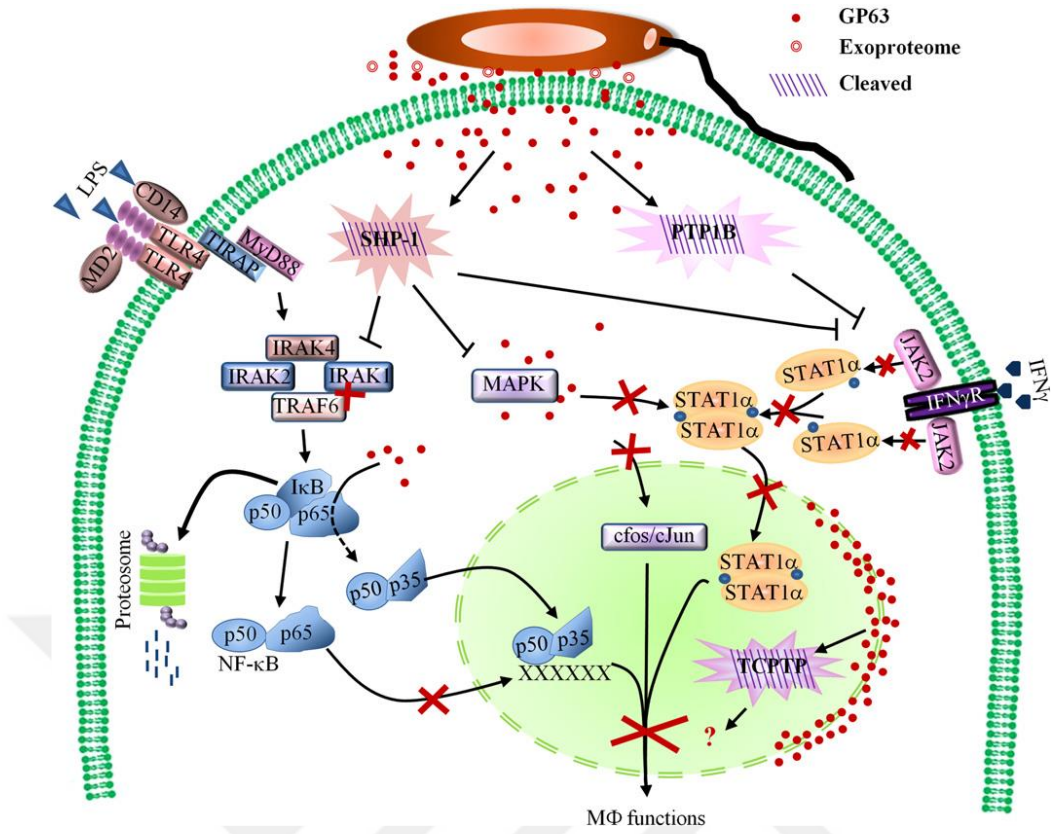
Sinyalizasyona dahil olan ve GP63'ten etkilenen ilk moleküllerden biri, miristoillenmiş alanin açısından zengin C kinaz substratı (MARCKS) ve MARCKS ile ilgili proteinler (MRP), makrofajlar da dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde PKC substratlarıdır [59]. Genellikle MARCKS ve MRP'nin ekspresyonu, LPS'ye ve sitokin stimülasyonuna tabi tutulan makrofajlarda kuvvetle yukarı regüle edilir.

Leishmania parazit ile enfekte olan makrofajlarda, hücre çoğalması, farklılaşma ve apoptoz ile bağlantılı sinyal iletiminde rol oynayan protein kinaz C (PKC) kritik serin / treonin kinazlar önemli ölçüde etkiler ve ROS gibi anti-mikrobiyal ajanların inhibisyonundan sorumludur [179].

2.5.3.1 GP63'ün Makrofaj Sinyal Yolları Üzerindeki Etkisi

En çok ilgi çeken nokta, JAK2 / STAT1a yolağının, NO dahil olmak üzere birçok antimikrobiyal ajan üretmekten sorumlu IFN γ aracılı sinyallemede büyük bir rolü olduğunun keşfinin *Leishmania* ile enfekte hücrelerde derin şekilde değiştiği bulunmuştur[180]. Bu inaktivasyon sürecinin altında yatan potansiyel mekanizmaları inceleyen birçok grup aynı anda protein tirozin fosfataz (PTP) SHP-1'in JAK2 / STAT1a yolağında yer aldığını bildirmiştir [180].

Leishmania GP63 metalloproteazı, JAK kinaz ailesinin üyelerini (örn., JAK1, JAK2, TYK2) büyük ölçüde etkilediği bilinen PTP'ler olan negatif düzenleyici moleküllerin aktivasyonundan sorumludur [176]. GP63, SHP-1, PTP1B ve TCPTP olmak üzere üç ana PTP'nin etkinleşmesinden etkili bir şekilde sorumludur. GP63, bu aktivasyonu, C0 terminal bölümünde PTP'leri parçalayarak arabuluculuk eder [176].



Şekil 2.8 GP63'ün çeşitli kinazların inaktivasyonuna yol açması[175]

2.5.4 GP63'ün Makrofaj Transkripsiyon Faktörleri Üzerindeki Etkisi

NF-κB, STAT1 ve AP-1 gibi makrofaj spesifik gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan birçok transkripsiyon faktörü vardır. NF-κB ailesi, geniş bir makrofaj fonksiyonları dizisindeki gen ekspresyonuna müdahale ederken, STAT ailesi üyeleri, IFNγ indüklü iNOS ifadesi gibi sitokin aracılı sinyallemedeki merkezi rolleri ile bilinirler. İlginçtir, birkaç çalışma, *Leishmania* enfeksiyonunun STAT1a sinyalini değiştirdiğini gösterdi [179].

NF-κB ve STAT1a transkripsiyon faktörlerine ek olarak, birçok laboratuvar tarafından IFNγ kaynaklı NO üretiminde de kritik olan AP-1'in *Leishmania* enfeksiyonundan şiddetle etkilendiğini bildirmişti [179]. Gp63'ün AP-1 inaktivasyonuna nasıl katkı sağladığı ve bu transkripsiyon faktörünü oluşturan çeşitli alt birimlerinin bozunumu araştırılmıştır.

GP63, PTP aktivasyonuna yol açan süreçte ve parazitin içselleştirilmesinden bağımsız olarak, makrofaj sitoplazmasına hızla ulaştıktan sonra c-Jun ve diğer AP-1 alt birimlerini

indirgeyen nükleer bölüme ulaşabilir. *Leishmania* enfeksiyonunun erken anı boyunca transkripsiyon faktörü AP-1'in bütünlüğünü büyük ölçüde etkiler [181]. AP-1 doğuştan gelen enflamatuvar cevabın düzenlenmesinde rol oynayan kritik bir transkripsiyon faktörü olduğundan, hızlı inaktivasyonu, NF-kB davranışının modifikasyonu ile eşzamanlı olarak, ilk makrofaj enflamatuvar ve anti-mikrobik maddeleri yeterince inhibi edilerek parazitin hayatta kalmasına yardımcı olmalı .

Leishmania metalloproteaz GP63'ün konakçı hücre transkripsiyon faktörleri ve translasyonel sistemi etkilediği açıktır. Makrofaj fonksiyonlarını ve koruyucu bir bağışıklık tepkisinin gelişimini etkileyerek konakçı içinde *Leishmania*'nın yaşamını ve progresyonunu sağlar[180].

2.5.5 *Leishmania* Tarafından Salgılanan Virülans Faktörü İçeren Ajanlar

Eksozomlar olan *L. donovani*'den atılan veziküllerin bir kez makrofaj fagolysosomal bölmesinde kaynaşabileceğini ve içeriğini enfekte olmuş hücre sitoplazmalarına bırakmaktadır[182]. GP63'ün makrofaj sitoplazması içindeki hızlı hareketi makrofaj plazma zarının, konukçu makrofaj ortamında GP63 girişi için bir başka rota temsil eden eksozom füzyonundan gelebileceğini göstermektedir.

Eksozomların GP63, CP'ler gibi virülans faktörleri içerdiğini ve bu proteinlerin makrofaj plazma membranı ile eksozomların füzyonuyla potansiyel olarak makrofajlara verilebileceği bildirilmiştir [183]. *Leishmania* promastigotlarının memeli konukçuya girişini taklit eden ortam sıcaklığından 37 ° C'ye kadar sıcaklığın yükselişini takiben protein ve ekzovezikül serbestleşmesinde artış meydana gelirken, bu artışın 4 saat gibi kısa bir sürede çok hızlı bir şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir [184].

2.6 Biyoreaktör

Biyoreaktör; organizmanın kendisinin büyük ölçekte veya istenen bir ürünü üretmesi için dizayn edilmiş sistemlerdir. Organizmaların optimum büyüme, metabolik aktivite ve üretim için tasarlanmışlardır [185].

Biyoreaktörler genelde endüstriyel fermentasyon, atık su artımı, gıda endüstrisi, ilaç ve rekombinant proteinlerin (antikor, büyüme faktörü, aşı, antibiyotik vb.) büyük ölçek üretimlerinde kullanılmaktadır[186].

Biyoreaktörler, hücre büyümesi ve ürün oluşumu için devam ettirilebilir koşullarda uygun içeriğe sahip olmalıdırlar. Bir hücre kültürü reaktörünün sahip olması istenen özellikleri aşağıdaki gibi özetlenebilir [187]:

- Hücre- hücre iletişimini sağlamalı,
- Homojen ve düşük kayma gerilimli karıştırma ve havalandırmayı sağlamalı ,
- Isı transferi için yeterli türbilans oluşmalı,
- Hava ve gazların yeterli dağılımı olmalı,
- Substrat ayrışımından kaçınılmalı,
- Proses değişkenleri ve anahtar parametreler ölçülebilmeli,
- Ölçek büyütülebilmeli,
- Uzun süreli stabilite ve sterilite sağlamalı,
- Kullanımı kolay olmalı,
- Bakımı ve işletmesi kolay olmalı.



Şekil 2.9 Karıştırıcılı biyoreaktör[188]

Bir biyoreaktörün temel özellikleri;

- Steril çalışmaya elverişli gövde ve kısımları olmalıdır.
- Uygun karıştırma O_2 , ısı, kütle ve momentum transferi sağlanmalıdır.
- Steril katkılara elverişli girişler ve katkı sistemleri içermelidir.
- Kontrol aletleriyle birlikte olmalıdır.

Biyoreaktörde Kültür Şartlarının Avantajları:

Biyoreaktörlerin sağladığı önemli avantajlar vardır[189]. Bunlar:

- *In vivo* ortama benzer üç boyutlu dokular oluşturmaları,
- Hızlı ve yüksek yoğunluklu hücre kültürüne izin vermesi,
- Hücrelerden değerli ürünlerin (enzim, insülin vb) sağlanabilmesi,
- Sonuçların sürekliliği,

- Kullanımda geniş ölçekli çalışılabilmesi,
- Kullanımının kolay olması,
- Nispeten düşük maliyetli olması,
- Kullanıcı güvenliği,
- Ürün verimliliğinin yüksek olması,
- Kültür malzemelerinin maliyetinde azalma sağlaması hücre kültüründe biyoreaktör kullanımının önemli faydalarıdır.
- Proliferasyonu, rediferansiyasyonu uyarır
- Besin difüzyonunu kolaylaştırır
- Düzgün karıştırma ile gerilimi azaltır

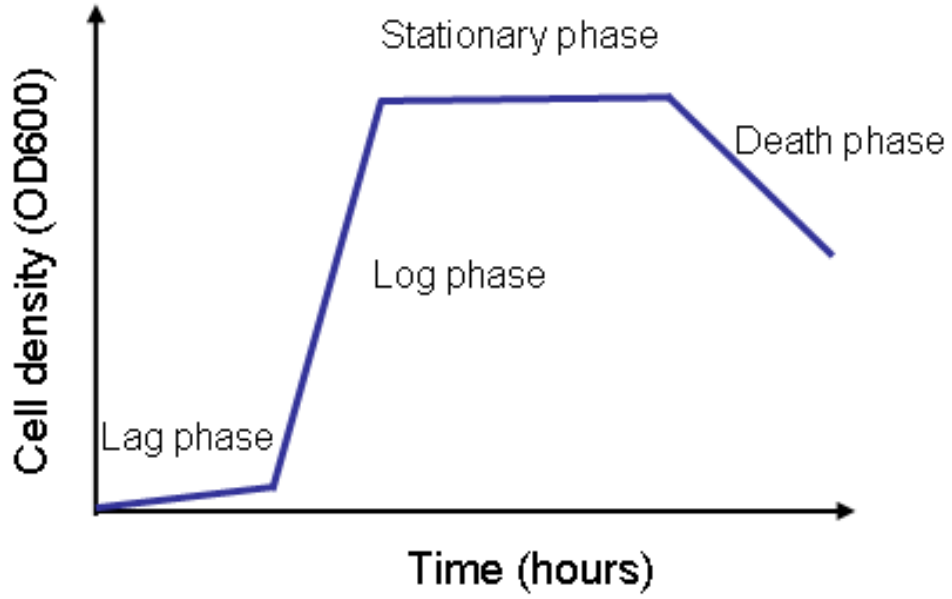
Biyoreaktörler aşağıda verilen fonksiyonların biri veya birkaçını gerçekleştirmek ve/veya düzenlemek için dizayn edilirler. Bu fonksiyonlar;

-Kültür ortamındaki koşulları (sıcaklık, pH, ozmolalite, oksijen, besinler, metabolitler, düzenleyici maddeler) kontrol altında tutmak.

-Hücreler ve kültür ortamı arasında kütle aktarımını sağlamak.

-Fizyolojik olarak gerekli sinyalleri sağlamaktır (kayma gerilimi, basınç, akış, sıkıştırma, elektriksel sinyal vb.)

Hücrelerin kültür boyunca canlılığının, genetik stabilitelerinin ve fenotipik stabilitelerinin sağlanabilmesi için eksponansiyel fazda tutulmaları gerekmektedir. Bu nedenle hücre kültürleri hücreler önerilen maksimum dansiteye ulaşmadan önce, yani stasyoner faza girmeden önce subkulture edilmelidirler.



Şekil 2.10 Hücrelerin yaşam evreleri[190]

Lag Fazı : Kültür ekimi yapıldıktan hemen sonra hücrelerin subkulture edilme stresinden yavaş yavaş kurtulduğu ve ortama adaptasyona çalıştığı dönemdir.

Log veya Ekspansiyonel Faz : Hücreler bu evrede hücre konsantrasyonu medium kapasitesini aşana dek hızlı bir şekilde büyürler,

Stasyoner veya Plato Fazı : Hücre çoğalması bu evrede yavaşlar ve durur,

Düşüş Fazı : Bu evrede kültür mediumu değiştirilmezse ve hücre sayısı azaltılmazsa hücreler hayat yetlerini kaybederler ve sayıları azalır.

Üretilen hücre miktarına göre kullanılan kültür şartları ve prosedürü değişmektedir. Hücreler 1-10 L kapasiteli olan stirrer kültürlerde üretilebilirken geniş ölçekli kültürler 100 L' lik laboratuvar fermentörlerinden 100-1000 L' ye varabilen yarıendüstriyel pilot reaktörlere kadar kullanılarak üretilebilirler. Tam ölçekli endüstriyel üretim ise 500-20.000 L' lik biyoreaktörlerde gerçekleştirilirler[189].



Şekil 2.11 Flaskta ve endüstriyel boyutta hücre kültürü[191], [192]

Biyoreaktörler ve fermantörler birbirlerinin sinonimi olmamalarına rağmen çoğu zaman aynı şekilde değerlendirilebilirler. Fermantörler bakteri ve mantar üretimi gibi mikrobial kültür sistemleri olmalarıyla beraber geçmişte 50-100 L 'lik laboratuvar kapasitelerinde kullanmalarına rağmen günümüzde monolayer kültürler ve suspense kültürlerin yapılabilmesi için değişik türlerde tasarlanmışlardır ve biyoreaktör ismini almışlardır[189].

Kültür ölçeğinin büyütülmesi çoğaltılacak hücrelerin ortamda çoğalabilmelerine ya da substrata bağlı olup olmamalarına bağlıdır. Süspansiyon hücre kültürleri ölçek büyütmede sağladıkları kolaylık nedeniyle sıkça kullanılmaktadırlar.

Hücre kültürlerinin çoğaltılmasına öncelikle kültür volümünün artırılması ile başlanır. Derinliğin 5 mm'yi geçtiği ve 5-10 cm üzerinde olan kültürlerle hava ve CO₂ altında gaz değişimi sağlamak için çalkalama / karıştırma yapılır. Bu sistemlerde karıştırma cam bir pendulum ile kaplı bir magnet ile veya geniş yüzey alanlı paddle ile yavaş bir biçimde yapılır. Karıştırma hızı 30-100 rpm olmalıdır. Bu hız sedimentasyonu engelleyecek fakat hücrelerde shear stress kaynaklı hasar oluşturmayacak düzeyde olmalıdır.

Biyoreaktör Tasarlarken;

Biyoreaktör tasarımıındaki en önemli konulardan biri kütle aktarımıdır. Kütle aktarımı istenilen düzeyde olmadığı takdirde, üretilen hücrelerin yeterli derecede beslenememesi söz konusudur[189].

Biyoreaktörler, öncelikle;

- Hücrelere besinleri (glikoz ve amino asitler),
- Biyokimyasal faktörleri ve oksijeni sürekli olarak ulaştırmalı,
- Laktik asit gibi hücre metabolizmasının yan ürünlerini sürekli uzaklaştırmalıdır.
- Ayrıca pH, oksijen oranı ve besin miktarı gibi çok önemli parametreler, kütle aktarımının etkinliğine bağlı olarak kontrol edilebilmektedirler.

Hücre kültüründe işlevsel olarak bir biyoreaktörün sahip olması gereken özelliklere bakıldığında, üzerinde çalışılacak olan hücrenin yaşaması ve büyümesi için gereken şartlar çok büyük önem taşımaktadır . Her bir hücre tipi için özelleştirilmiş biyoreaktör tasarımına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden, hücreye özgü biyoreaktörlerin tasarımı biyolojinin ve mühendislik yaklaşımlarının iyi bir şekilde anlaşılmasıyla mümkündür.

Biyoreaktörlerin tasarımıındaki diğer önemli noktalar, elde edilmek istenen ürünün tekrarlanabilirliğinin ve güvenilirliğinin klinik çalışmalar için büyük ölçekte sağlanabilmesidir. Aynı zamanda biyoreaktörlerde istenilen hücreye özgü fonksiyonların takibinin yapılabilmesi için, uzun vadede aseptik koşulların sağlanması şarttır.

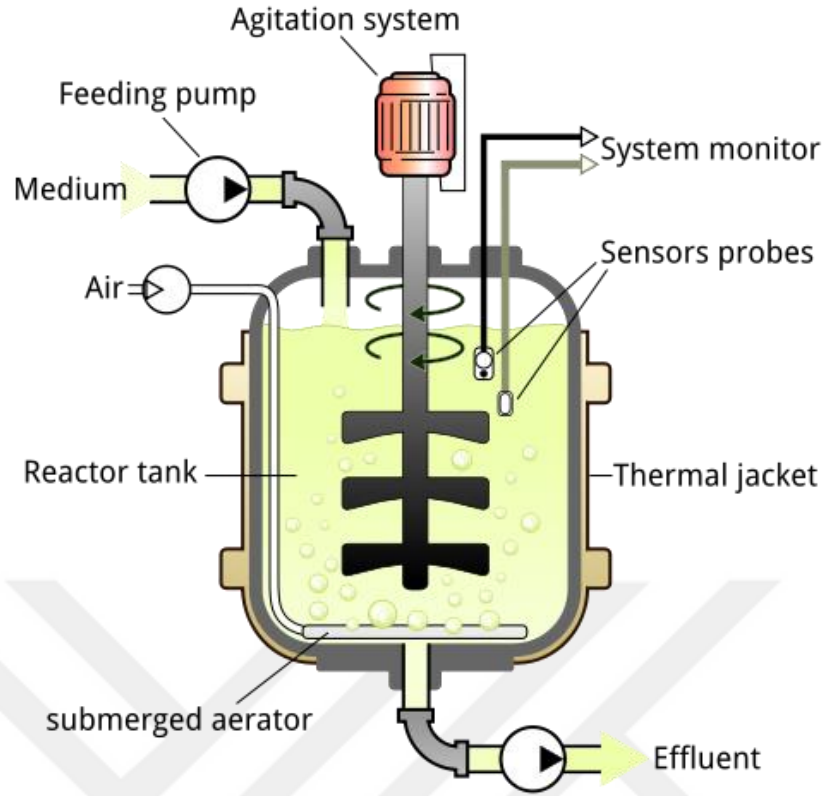
Hücre Kültür Kapları:

Küçük ölçekli *in vitro* çalışmalarda tercih edilen ve kesikli çalışan en basit biyoreaktörlerdir. Hücre kültür kapları durgun sistemlerdir ve birinci nesil reaktörler olarak bilinmektedir. Hücre kültür kaplarında hücrelere besin ve gazların ulaşımı pasif difüzyon ile gerçekleşir. Kültür ortamı, belirlenen aralıklarda taze ortamla değiştirilir veya seyreltilir.

- Kültür ortamının içeriği, her bir göze konulacak ortam miktarı, ortamın değiştirilme veya seyreltilme sıklığı biyoreaktör olarak hücre kültür kapları kullanıldığında kültürü etkileyecek parametrelerdir.
- Ayrıca ortamın sıcaklık, pH ve oksijen oranı gibi değerleri, bu kültür kabının yerleştirileceği inkübatörden kontrol edilir. Petri kaplarının yanısıra, gözlü hücre kültür kapları ticari olarak çok kolay elde edilebilen sistemlerdir.
- Genellikle polistirenden üretilmiş olan bu kültür kaplarının hücre yapışmasını engelleyecek şekilde modifiye edilmiş veya kollajenle kaplanmış olanları da bulunmaktadır.

Biyoreaktör Parçaları:

- Reaktör Kabı;
- Ceket;
- Mikroorganizma Ekim Yeri;
- pH için giriş noktası;
- Karıştırıcı;
- Gaz Püskürtücü;
- Motor;
- rn ıkışı;
- Görüş Camı;
- Asit, Baz, Köpük Kırıcı Bağlantısı;
- Hava Girişi;Besiyeri Girişi;
- Hava ıkışı;
- Aygıt Girişi (eşitli);
- Köpük Kırıcı;



Şekil 2.12 Biyoreaktör parçaları[193]

Biyoreaktör Çeşitleri:

Biyoreaktörler işletim şekillerine göre kesikli, yarı kesikli ve sürekli olmak üzere sınıflandırılabilirler.

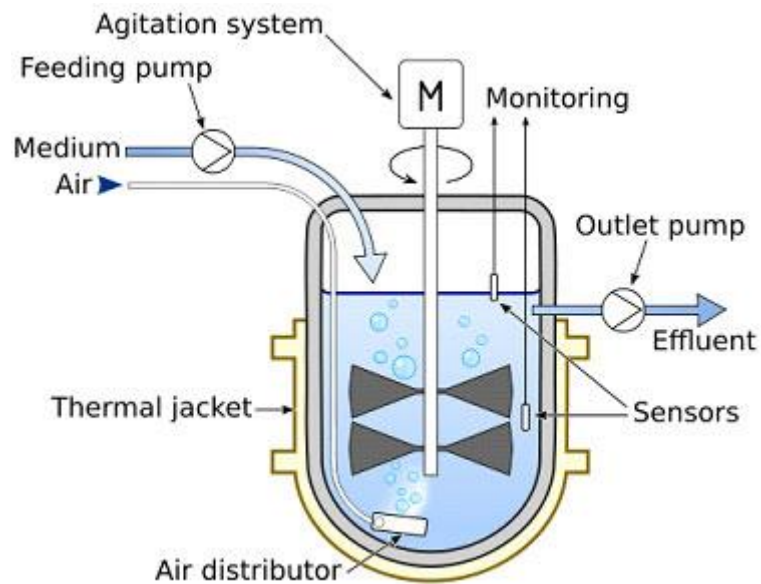
Kesikli işletim (Batch): Endüstriyel biyoreaktörler genellikle kesikli işletim ile çalıştırılırlar. Kesikli işletimde, biyoreaktör ilk önce fermantasyon sıvısı ile doldurulur, hücreler ortama aşılır ve hücrelerin üremeleri için belli bir süre beklenir. Bu süre sonunda hücre yoğunluğunun veya ürün derişiminin belli bir değere ulaşması öngörölür. Bu süre sonunda reaktör boşaltılır ve yeni bir işlem için hazırlanır[194].

Kesikli işletimde, reaktör hazırlama, hücre üremesi, reaktör boşaltma ve temizleme olmak üzere dört evre söz konusudur. Fermantasyon işlemi boyunca herhangi bir besleme veya ürün uzaklaştırma işlemi yapılmaz. Sadece havalı fermantasyon için hava beslemesi yapılır. Reaksiyon süresince substrat ve biyokütle derişimi değişir. Reaksiyon boyunca substrat derişimi azalırken, biyokütle derişimi artar.



Şekil 2.13 Kesikli işletim biyoreaktör[195]

Yarı kesikli işletim (Fed-batch): Yarı kesikli işletimde, biyoreaktöre fermentasyon boyunca substrat beslemesi yapılır. Reaktörden alınan örnekler dışında herhangi bir ürün uzaklaştırması söz konusu değildir. Sürekli substrat beslemesi yapılması ve ürün uzaklaştırılmaması nedeniyle toplam reaksiyon hacmi zamanla artar. Yarı kesikli işletim, girdi beslemesi yapılarak kesikli işletimin devamı olarak çalıştırılabileceği gibi hücre büyüme ve çoğalma evreleri ayrı fazlar olarak kontrol edilebilir. Bunun yanında yarı kesikli işletimde farklı besleme şekilleri ile farklı kontrol metotları uygulanabilir. Bu işletimde yüksek derişimde biyokütle ve ürün elde edilir[196].



Şekil 2.14 Yarı kesikli biyoreaktör[197]

Sürekli işletim (Continuous): Sürekli işletimde, bir taraftan reaktöre substrat beslemesi yapılırken, diğer taraftan da ürün uzaklaştırılır. Besleme ve uzaklaştırma hızları reaktör hacmi sabit kalacak şekilde yapılır[185].

Sürekli işletimle çalışan reaktörlerde, reaksiyon başladıktan kısa bir süre sonra sistem yatışkın hale ulaşır. Bu işletim şekli arıtma endüstrisinde ve diğer bazı endüstrilerde kullanılır. Ayrıca laboratuvar çalışmalarında, organizmaların üreme kinetiklerinin ve enzim reaksiyon kinetiklerinin belirlenmesinde kullanılır.

Çizelge 2.3 Biyoreaktör çeşitleri, avantajları ve dezavantajları[15], [16]

Biyoreaktör çeşidi	Avantajları	Sınırlamalar
Dalga Biyoreaktör	-Ölçek büyütme -Otomasyon kolaylığı -Farklı modlarda çalıştırma	-100 L'ye kadar ölçeklendirme zor. -Çok daha büyük alan gerekir.
Karıştırıcılı Biyoreaktör	-Tasarım kolaylığı	-Büyük hacimli, yüksek yoğunluklu hücre kültürlerinin oksijen ihtiyacını karşılamak
	- Ölçeklenebilirlik -Farklı modlarda çalıştırma -Besiyeri ve hücreler de dahil olmak üzere anlık ve yerinde izleme.	-Pervanenin neden olduğu aşırı shear stresi
Hollow fiber biyoreaktor	-En yüksek kültür yoğunluğuyla yüzey / hacim oranının artması - Düşük shear stres. -Liflerin kan damarlarını taklit ettikleri <i>in vivo</i> ortam	-Yerinde izleme zor. -Ölçek artırımı gösterilmedi. -Besin maddeleri ve metabolitlerdeki gradyan zararlı olabilir. -Hücrelerin alınması zor.

Biyoreaktör çeşidi	Avantajları	Sınırlamalar
Dönen yüzey tipi biyoreaktör	-Daha iyi besin arzı ve metabolik atık giderme -Son derece düşük shear stress ve türbülans -Hareketli parçalar yok ve mekanik çalkalama yok	-Klinik uygulama için ilgili sayıda hücre üretme kapasitesi sınırlı -Dönme hareketi nedeniyle ölçeklendirme mümkün değildir.
Packed-bed biyoreaktör	-Hücre tutunma ve çoğalması için geniş yüzey alanı -Sık sık pasaja ihtiyaç duymaz, böylece kültür ortamıyla ilgili maliyetlerden tasarruf sağlanır	-Özellikle büyük damarlarda yoğunlaşmaya meyilli -Ambalaj malzemesi hücre hasatını sınırlayabilir. -Yerinde izleme mümkün ancak sadece ortam ölçümü.

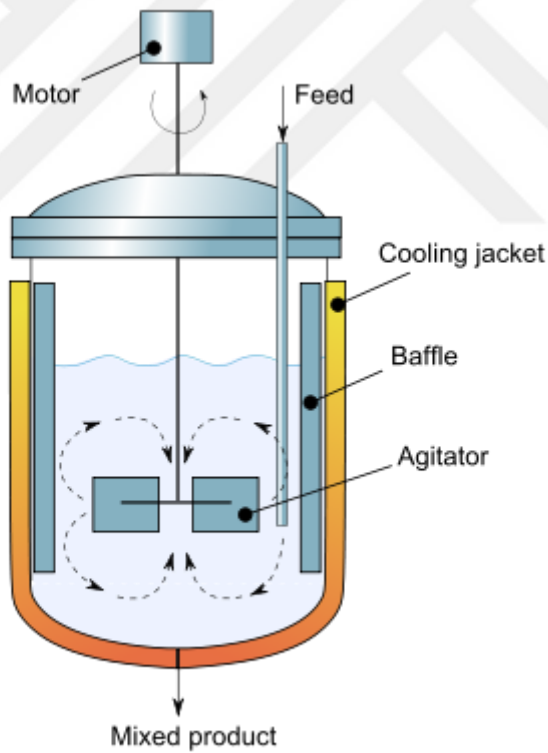
Biyoreaktörlerin çalışma prensiplerine göre çeşitleri vardır. Bunlar;

- Karıştırılmalı (Stirred tank) biyoreaktör
- Hava kaldırmalı (Airlift) biyoreaktör
- Paketlenmiş yataklı (Packed bed) biyoreaktör
- Akışkan yataklı (Fluidized bed) biyoreaktör
- Foto biyoreaktör
- Zar (Membrane) biyoreaktör
- Dönen tambur (Rotary drum) biyoreaktör
- Püskürtmeli biyoreaktör

2.6.1 Stirred tank(karıştırılmalı) Biyoreaktör

Mekanik bir karıştırıcıyla reaktör içindeki kültürün sürekli olarak karıştırıldığı sistemlerdir. Organizmaya göre gaz giriş çıkışı olabilir. En yaygın kullanılan reaktör çeşidinden biridir. Süspanse hücre kültürlerinin büyük ölçekte üretilmesinde kullanılırlar. Bu biyoreaktörlerin avantajları olarak;

- Sürdürülebilir olması
- Sıcaklık kontrolü
- Basit kurulum
- Düşük işletme maliyeti
- Kolay temizlenebilmesi gibi avantajlara sahip



Şekil 2.15 Karıştırılmalı biyoreaktör şeması[198]

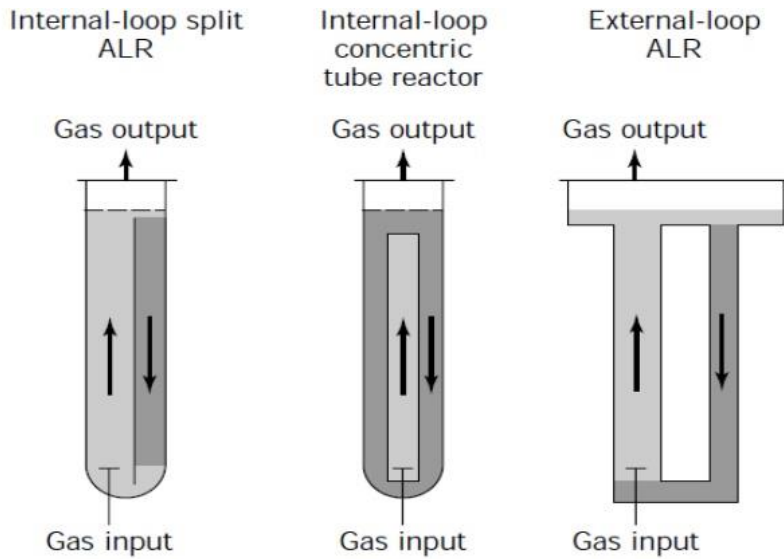
2.6.2 Havalandırmalı (Airlift) Biyoreaktör

Aşağıdan gaz girişiyle reaktör içindeki sıvının herhangi başka bir alet olmadan sirkülasyonu sağlanan sistemlerdir. Bir diğer yaygın olarak kullanılan biyoreaktör çeşididir. Süspanse kültürde çoğalan aerobik hücrelerin üretimi için uygundur[196], [199]. Avantajları olarak;

- Sirkülasyon ve oksijen transferi iyi sağlanır.
- Enerji tüketimi az
- Mekanik karıştırıcı reaktörlerin aksine aşınma/sürtünme etkileri gözlenmez
- Aerobik kültürler için ideal
- Basit dizayn.
- Kolay sterilizasyon
- Düşük maliyet

Dezavantajları;

- Köpük oluşumu ve engelleyici mekanizmanın olmaması
- Yüksek basınçlı gaza ihtiyaç varsa bunun maliyeti



Şekil 2.16 Çeşitli türlerde hava kaldırmalı biyoreaktörler[200]

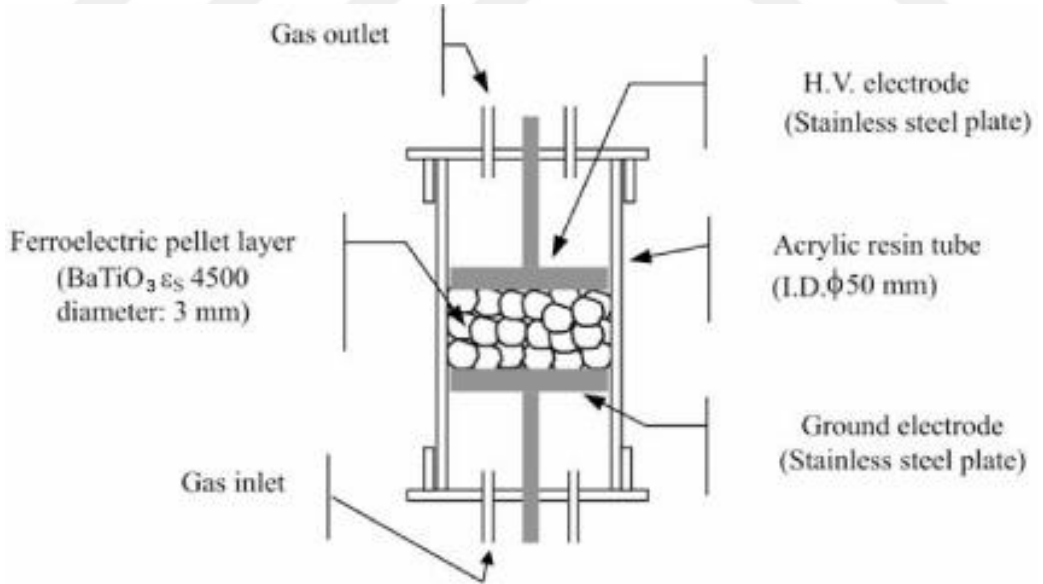
2.6.3 Sabit Yataklı (Packed Bed) Biyoreaktör

Sabitlenmiş biofilmler üzerinde immobilize hücreler veya biyokatalizörlerden oluşan sistemdir. Bu biyoreaktörler daha çok adhesive yani yüzeye tutunan hücrelerin kültürücü için uygundur. Hücrelerin tutunabileceği, substrat etkileşiminin yüksek yüzey alanını genişleten bir ortam sunar[201]. Sunduğu avantajları;

- Sıvıyla mikroorganizmalar arası iyi etkileşim ve yüksek verim
- Düşük maliyet
- Basit dizayn
- Ürünlerin ayrıştırılmasının kolaylığı
- Devamlı operasyon

Dezavantajı olarak;

- Porlarda tıkanıklık
- Temizliği zor



Şekil 2.17 Sabit yataklı biyoreaktör şeması[202]

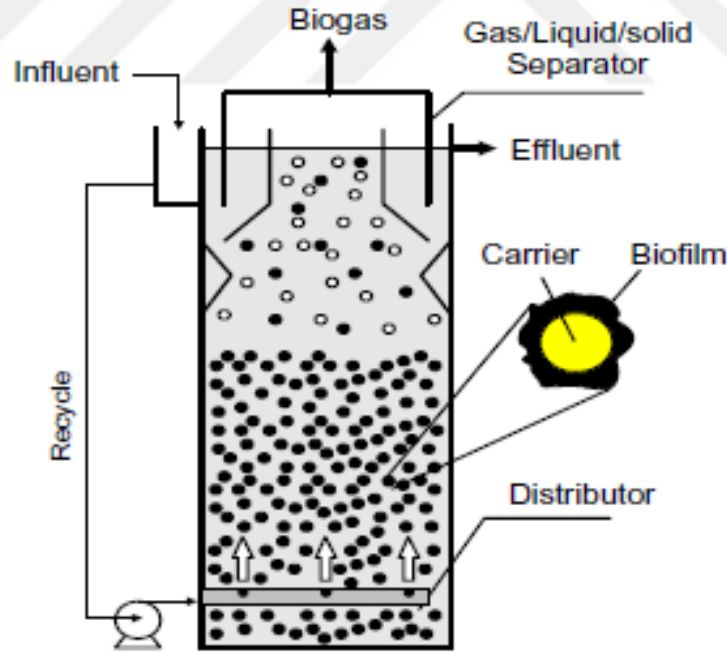
2.6.4 Akışkan Yataklı (Fluidized Bed) Biyoreaktör

Aşağıdan yukarı doğru hareketli sıvının içerisinde bulunan serbest biofilm taşıyıcılara(kum, granül aktif karbon) bağlı hücre veya biyokatalizörlerin olduğu sistemdir. Hücrelerin tutunduğu taşıyıcılar homojen bir şekilde reaktör içinde hareketlidir. Kullanıcıya sunduğu avantajları şunlardır[203];

- Dengeli partikül ve sıcaklık dağılımı
- Devamlı olarak sisteme yeni substrat eklenmesi ve ürün alımı

Dezavantajları;

- Büyük tankın gereksinimi
- Sürekli gaz pompalanması
- Pompalama durursa reaksiyonun durması
- Partiküllerin sürtünmesi sonucu aşınması



Şekil 2.18 Akışkan yataklı biyoreaktör şeması[204]

2.6.5 Foto Biyoreaktör

Gelişimi için ışığa ihtiyaç duyan organizmaların(algler) büyük ölçekte üretilmesi için geliştirilen sistemlerdir. Mikroalgler gıda sektöründe, tıp, eczacılık alanlarında, kozmetik ürünlerinde katkı maddesi ve hayvan gıdası olarak değerlendirilirler. Hücrelerin ışıktan maksimum şekilde faydalanabileceği yüksek alan hacim oranı tasarımı biyoreaktörler üretilir[205]. Bu sistemlerin artı yönleri;

-Dengeli sıcaklık dağılımı

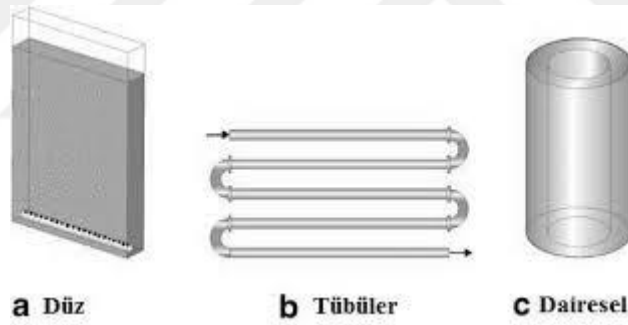
-Alan tasarrufu

Dezavantajları olarak;

-Maliyeti yüksek

-Sterilizasyon zorluğu

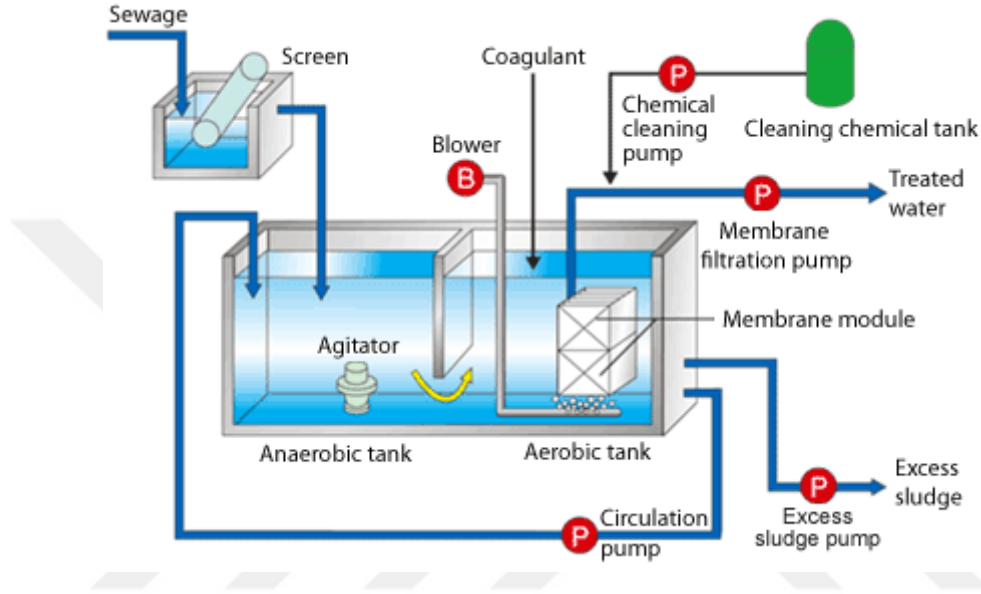
-Maliyet verim oranı düşük



Şekil 2.19 Foto biyoreaktör örnekleri[206], [207]

2.6.6 Zar (Membrane) Biyoreaktör

Membrane(selüloz) içinde bulunan organizmaların sürekli olarak beslenmesi ve atık maddelerinin uzaklaştırılmasına dayanan sistemdir[208]. Hücre kültüründe ve Büyük miktarlarda endüstriyel ve kanalizasyon atık su arıtımında kullanılır. Hücre kültürüne örnek olarak; Hibridoma hücrelerinin monoklonal antikor üretimi çalışması gerçekleştirilmiştir.[209]

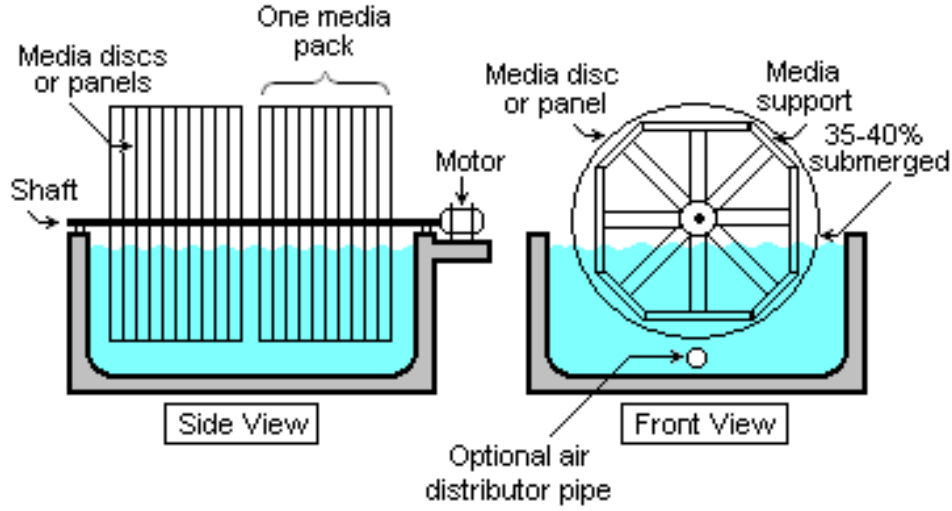


Şekil 2.20 Zar (membran) biyoreaktör şeması[210]

2.6.7 Dönen Tambur (Rotary Drum) Biyoreaktör

Üzerinde organizmaların bağlı olduğu disklerin %40 sıvı doldurulmuş tank içinde dönmesiyle oluşturulan sistemdir. Diskler döndükçe hücreler hem havalanıyor hem de sıvı içinde faaliyetlerini gerçekleştiriyorlar. Zamanla tank sıvısı boşaltılıp yenisi ekleniyor. Bu durum avatajlarının yanında bazı zorlukları da beraberinde getiriyor[211];

- İyi karıştırma ve yüksek havalandırma özelliklerine sahip
- Sistemi büyütme zor ve maliyetli bir süreç.



Şekil 2.21 Döner tambur biyoreaktör şeması[212]

Biyoreaktör Kültüründe pH Etkisi:

Farklı türlerde hücrelerin kültüründe pH etkisi incelendiğinde; pH'ın optimum değerlerde tutulan kültürlerde pH'ın kontrol edilmeyen kültüre göre hücre canlılığının, sayısının, biomas yoğunluğunun daha yüksek olduğu görülmüştür. Kültür ortamının pH'sı normal olarak mikroorganizmaların biyokimyasal reaksiyon özelliklerini etkiler. Hücresel aktivitelerin aşırı pH ile bozulması nedeniyle, kültür çökmesi oluşabileceği için kültür pH'sını optimum aralıkta tutmak çok önemlidir.[213], [214], [215].

Literatürde farklı türde hücrelerin kültürlerinde biyoreaktör kullanıldığı zaman daha fazla verim alındığı ortaya konulmuştur. Darvishi ve arkadaşları rekombinant laccase üretimi için biyoreaktör kullanarak *Yarrowia lipolytica* nin kültürünü yapmışlar. PH, sıcaklık ve oksijenin kontrol edilebildiği stirred biyoreaktörde shake flaska göre daha hızlı ve yüksek protein üretimi olduğu görülmüş[216]. Bir başka çalışmada, Agabalyan ve arkadaşları skin-derived precursors (SKPs) hücrelerinin kültürünü stirred biyoreaktörde gerçekleştirmişler. Sabit pH'ta gerçekleşen biyoreaktör kültürüyle statik kültürün çoğalmaları karşılaştırıldığında biyoreaktörde 5 katı daha fazla üreme olduğu görülmüş. Her iki kültürdeki SKP'ler incelendiğinde, köklü kıl foliküllerinde dermal kök hücre nişini yeniden oluşturma yeteneklerinde herhangi bir fark görülmemiş [217]. Tang ve arkadaşları MethA tümör hücre kültürü için pH ve sıcaklığın önemini stirred

biyoreaktörde incelenmiş. Kültür pH'sının ve sıcaklığın kontrol edilmediğinde ortalama spesifik büyüme oranının belirgin bir azalmasına yol açtığı gösterilmiştir[218].

Beslemeli biyoreaktörlerde, kültürü besiyeri eklenmesiyle dolaylı yoldan pH'ın optimum değerlerde kaldığı örnek çalışmalarda sonuçlar pH ın kontrol edilmediği klasik kültürlerle karşılaştırıldığında hücre çoğalmasında daha fazla artış meydana geldiği görülmüş. Olmer ve arkadaşları yaptıkları çalışmada human pluripotent kök hücrelerin üretiminde statik kültüre karşı stirred biyoreaktörde üretimin önemini incelemişler. Bu çalışmada biyoreaktörde kültüre günlük besiyeri eklemenin sonucunda düzenli hücre artışı görülmüş ve dolaylı olarak ortamın pH'ın optimum değerlerde tutulmasını sağlamış. Statik kültürde besi yeri eklenmediği zaman pH düşüşü, oksijen azalması, metabolik atıkların kötü etkisi gibi nednelerle hücre sayısında belli bir sürenin ardından azalma görülmüştür[219].

Rafiq ve arkadaşları human mesenchymal kök hücrelerin beslemeli stirred biyoreaktörde kültürünü incelemiş. Beslemeden kaynaklı, pH hücrelerin yaşamsal değerleri olan 7.2 ila 6.7 arasında değişkenlik göstermiş. biyoreaktörde flask kültürüne oranla daha fazla hücre yoğunluğu elde edilmiştir[189]. Bir başka çalışmada ise Surrao ve arkadaşları, Human Skin-Derived Precursor hücrelerini stirred biyoreaktörde ve statik kültürde büyümelerini karşılaştırmalı olarak incelemişler. Yapılan çalışmalarında statik kültüre oranla stirred kültürlerde hücre yoğunluğunun daha fazla arttığı, biyoreaktörde kontrol edilmeyen kültür pH'ının ise statik kültüre oranla daha yavaş düştüğü, düşük pH'ın hücre canlılığını ve yoğunluğunu olumsuz etkilediği gösterilmiş [214].

Kültür besiyerinde, parazitlerin büyüme ve çoğalma sırasında fizyolojik koşullar değişir, çünkü glikoz tüketilip laktoz üretimiyle birlikte pH'da azalma meydana gelir. Trypanosomatidlerin enerji metabolizması sırasında piruvat, süksinat ve asetat gibi esasen kısmen oksitlenmiş ürünler ortaya çıkardığını açıklamışlardır. Özellikle besin maddelerinin bolluğu, hücreler katabolize olabildiklerinden daha fazla glikoz tüketirken, organik asit üretimine neden olur[220]. Bu nedenle kültür boyunca pH'ın sabit tutulması, pH'ı kontrol edilmeyen kültüre göre daha uzun kültür süresi ve maksimum hücre sayısına ulaşmada önem taşır.

Literatürde insan için patojen olmayan hayvanlarda hastalığa yol açan[1], [221] *L. tarantolae*'ya ait az sayıda biyoreaktör çalışması bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde *L. tarentolae* parazitlerini kullanarak human Cu/Zn superoxide dismutase rekombinant proteini üretmişler. Bunu için ise airlif ile havalandırılarak karıştırılan biyoreaktörde pH'ı sabit tutarak 24°C sıcaklıkta parazitlerin kültürü gerçekleştirilmiş [20]. Bir diğer çalışmada besi yeri olarak yest extract kullanılarak biyoreaktörde *L. tarentolae* parazitlerinin büyük ölçekte kültürü gerçekleştirilmiş. hava akışının sağlandığı stirred ile karıştırılan biyoreaktörde 26°C kültür yapılırken pH kontrol edilmemiştir. Bu sistem kullanılarak parazit sayısının başlangıca göre 20 kat arttığı gözlenmiş [21]. Buna karşı özellikle visseral leishmaniasis etkeni parazitlerinden olan *L. infantum*'un bioreaktörde üretilmesine yönelik literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Daha yüksek verimlilikle biomas eldesi için sıcaklık, pH ve karıştırma hızının kontrol edilebildiği bioreaktör kullanımı oldukça önemli olduğu düşünülmektedir.

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Gerçekleştirilen bütün çalışmalar, 2015-2017 yılları arasında Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik bölümünde yer alan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarında Prof. Dr. Adil M. Allahverdiyev ve Yrd. Doç. Dr. Melahat Bağirova'nın önderliğinde deneysel metodolojik bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.1 Materyal

3.1.1 Ekipman

- Hava akımlı kabin (Thermo Scientific)
- İnkübatör (Friocell)
- Pastör fırın (Memmert)
- İnverted mikroskop (Olympus CKX41)
- Santrifuj (Hitachi)
- Manyetik karıştırıcı (heidolph MR3000)
- pH metre (HANNA instruments)
- Hassas terazi (precisa Gravimetrics AG)
- Buz makinesi (Scotsman AF100)

- Vortex (LMS VTX 3000L)
- Su banyosu(Kerman)
- Dondurucu (Beko(+4, -20°C), Arçelik(+4, -20°C), GFL(-40°C))
- -197°C azot tankı
- Otoklav (Kerman, Hirayama)
- Biyoreaktör(TIBO Trends In Innovative Biotechnology Organization)
- Saf su sistemi(GFL 2104)
- 10, 100, 1000 µl mikropipetler (Thermo pipetman)
- 1, 5, 10 ve 25 ml serolojik pipet(Blu Brand Germany)
- Serolojik pipet tabancası (Thermo)
- Santrifüj tüpleri 15, 50 ve 200ml (isoLAB)
- Hücre kültürü flaskları 25 cm² ve 75cm² (TPP)
- 1l erlenmeyer flask (isoLAB)
- Diyaliz membranı (MWCO 50k Thermo)
- 50- 1000ml'lik otoklavlanabilir cam şişeler (ISOLAB, SCHOTT)
- Thoma lamı (Menzel superior)
- 50 cc enjektör (Ayset)
- 0.22 µm ve 0.45 µm şırıncı filtreleri (Millipore)
- SDS-Page jel elektroforez sistemi (Cleaver Scientific Ltd.)
- Çalkalayıcı (GFL)
- Sonikatör (Bandelin sonopuls hd 2070)
- Vorteks (LMS)
- Şırınga pompası (Razel)

- 50, 100, 250 ve 500ml beher
- Liyafilizator (Telster Cruodos)

3.1.2 Kimyasallar

- RPMI 1640 (Fenol red'li) besiyeri (GIBCO Invitrogen 11875-085)
- FBS- fetal bovine serum (GIBCO Invitrogen 10437036)
- Gentamisin (GIBCO 15750060)
- Hemin (Sigma 16009-13-5)
- Adenosin (Sigma A9251)
- Brain heart infusion broth(Biolife 4012352)
- Dmso (Sigma 472301)
- NaOH (Sigma 221465)
- Formaldehit (Riedel M1040022500)
- Löpeptin(Roche 103476-89-7)
- EDTA (AppliChem A5097,0250)
- Fenilmetilsülfonil fluorür (Sigma 159719)
- İyodoasemit (Sigma I1149)
- Tris-HCL tamponu (Sigma 93283)
- Oktil-β-D-glukopiranozit (Sigma O8001)
- Konkavalin A-sefaroze kolon dolgu maddesi (GE healthcare 17044001)
- α-metil-d-mannoside (Sigma S963941)
- Sodyum asetat (Sigma S2889)
- Sodyum klorür (Sigma S9888)
- MgCl₂ (Fluka 7786-30-3)

- MnCl_2 (Sigma 7773-01-5)
- CaCl_2 (Sigma 449709)
- Triton x-100 (MP Biomedicals LLC 02300221)
- Tween-20 (MP Biomedicals LLC 9005-64-5)
- HCl (Riedel-de Haën 7647-01-0)
- Sodyum dödesil sülfat (SDS) (Sigma L3771)
- Tris base (Sigma 77-86-1)
- Glycine (Sigma G8898)
- Amonyum persülfat (MERCK 101200.5000)
- Akrilamid (Sigma 146072)
- Bisakrilamid (Sigma 110-26-9)
- N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin TEMED(Sigma T9281)
- Etanol (MERCK 1.00983)
- Metanol (Tekkim TK.120320.01000)
- Asetik asit (Riedel 33209)
- Sodium thiosulfate (Sigma 10102-17-7)
- Gümüş nitrat (MERCK M1090811000)
- Sodyum karbonat (MERCK 1.06392.1000)
- DEAE kolon dolgu maddesi (GE healthcare 17070901)
- Protein ladder (low range) (Thermoscientific 26628)
- BSA (Sigma A3675)
- Monopotasyum fosfat KH_2PO_4 (Sigma 7778-77-0)
- Sodyum di hidrojen fosfat mono hidrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MERCK 106586)

- KCl (Sigma P9541)
- Süzkroz (MERCK 1.07651.1000)
- β - merkaptotetanol (Fluka M6250)
- Bromofenol mavisi (aMReSCO ES101190)
- Anti-fare IgGs (G,A,M)-Alkaline Fosfat Antikoru (Sigma A3562)
- Yağısız süt tozu (AppliChem A0830,0500)

3.1.3 Kullanılan Tampon, Besiyerleri ve Kimyasalların Hazırlanışı

3.1.3.1 Tamponlar

-Örnek Yükleme Tamponu: 2 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0.5 g SDS, 5 g Sukroz, 0,25 ml β - merkaptotetanol ve bromofenol mavisi karıştırıldı ve distile suyla 50ml'ye tamamlandı.

-Yürütme Tamponu: Toplamda 1 litreye 1 g SDS, 3.03 g Tris ve 14.4 g glisin tartılarak distile suda çözödüröldü. Tampon pH 8.3'e ayarlandı.

-%10 Amonyum Persölfat: 0.2 g amonyum persölfat toplam hazim 2 ml olacak biçimde distile suda çözödüröldü.

-%10 SDS: Toplam hacim 100 ml olacak şekilde 10 g SDS distile suda çözödüröldü.

-Stok %30 Akrilamid Çözeltisi: Toplam hacim 100 ml olacak şekilde 0.8 g bisakrilamid ve 30 g akrilamid distile suda çödüröldü.

-Stok 4X Stacking Tris: Toplamda 200 ml olacak şekilde, 12,12 g Tris base, 8 ml %10 SDS distile su ile karıştırıldı. pH 6,8'e ayarlandı.

-Stock 4X Resolving Jel Tris: Toplamda 200 ml olacak şekilde, 36.4 g Tris base, 8 ml %10 SDS distile su ile karıştırılıp pH 8.8'e ayarlandı.

-Seperation Jel Hazırlama: 6.3 ml distile su, 5 ml %30 stok akrilamid çözeltisi, 3.75 ml 4X stok resolving jel tris çözeltisi ve 150 μ l %10 amonyum persölfat bir beherde karıştırıldı. En son 15 μ l TEMED eklendi.

-Stacking Jel Hazırlama: 4.2ml distile su, 0.65ml %30 stok akrilamid çözeltisi, 1.6ml 4X stok stacking jel tris çözeltisi ve 67 µl %10 amonyum persülfat bir beherde karıştırıldı. En son 6.7 µl TEMED eklendi.

-PBS Tamponu: 8 g NaCl, 2 g KCl, 1.8g Na₂HPO₄.2H₂O ve 0.2 g KH₂PO₄ bir miktar distile suda çözdürüldü. pH 7.4 e ayarlandıktan sonra çözelti 1 litreye tamamlandı ve otoklavlandı.

-PBS-Tween 20 Tamponu: Hazırlanan fosfat tamponuna (PBS) hacimce %0,05 olacak şekilde Tween-20 eklendi.

-Kaplama Tamponu (pH; 9,6): 1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃ ve 0,2 g NaN₃ hassas terazide tartılarak pH'ı 9,6'ya ayarlandı. Tamponun hacmi distile su ile 1lt'ye tamamlandı.

-Bloklaama Çözeltisi (ELISA): Kaplama tamponuna %2 (ağırlık/hacim) olacak şekilde yağsız süt tozu ilave edildi.

-PBS/Tween20/Süt Tozu: PBS/Tween20 çözeltisine %2 (ağırlık/hacim) olacak şekilde yağsız süt tozu eklendi.

-Substrat Tamponu (pH:10,4): 0,02 g ZnKL₂, 0,04 g MgKL₂ ve 1,5 g glisin hassas terazide tartılarak distile suda çözüldü. pH; 10,4'e ayarlandı ve son hacim 200 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

- Lizis Tamponu: 5µg/ml löpeptini 1mM EDTA, 1mM fenilmetil sülfonil fluorür, 1mM iyodoasetamit (lizis tamponu) ve 5mM Tris-HCl tamponu (pH 7,6) içerecek şekilde 100ml (pH 7.6) hazırlandı. 4°C de muhafaza edildi.

-ConA Bağlanma Tamponu: Hazırlanan 1. lizis tamponunun içinde %1 oktil-β-D-glukopiranozit eklenerek karıştırıldı. 4°C de muhafaza edildi.

-ConA Kolonu Ön Yıkama Tamponu: 0,1 M NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 1mM CaCl₂ ve 20mM tris-HCl oranlarında 500ml lik tampon hazırlandı ve pH 7,2 ye ayarlandı.

-ConA Elüsyon Tamponu: 0,1M olacak şekilde α-metil-d-mannoside tartılıp 100ml distile suda çözdürüldü.

- ConA Yıkama Tamponu (pH 4.5): 100ml'lik pH 4.5 sodyum asetat tamponu hazırlandı.
- ConA Yıkama Tamponu (pH 8.5): 100ml'lik pH 8.5 Tris-HCl tamponu hazırlandı.
- ConA Elüsyon Diyaliz Tamponu: 1 litrelik 5mM Tris-HCl, %0,2 triton x-100 pH 8,5 tamponu hazırlandı.
- Fiksasyon Çözeltisi: 40% etanol, 10% asetik asit ve 50% dH₂O içeren fiksasyon çözeltisi hazırlandı.
- Sodyum tiosülfat Çözeltisi: %0.02 oranında sodyum tiosülfat içeren 100ml çözelti hazırlandı.
- Gümüş nitrat Çözeltisi: 4'C de soğuk 0.1% gümüş nitrat ve 0.02% formaldehit içeren 100ml'lik çözelti hazırlandı.
- Sodyum Karbonat Çözeltisi: 0.1% sodyum karbonat (Na₂CO₃) ve 0.02% formaldehit içeren 100ml'lik çözelti hazırlandı.
- Jel Saklama Çözeltisi: %5 asetik asit içeren 200ml'lik çözelti hazırlandı.
- DEAE Yıkama Tamponu: 5mM Tris-HCl ve %0.2 triton x100 içeren, pH 8,5'a ayarlanmış 1l yıkama tamponu hazırlandı.
- DEAE Elüsyon 1 Tampon: 0.1M NaCl, 5mM Tris-HCl ve %1 Tritonx100 içeren 200ml elüsyon 1 tamponu hazırlandı.
- DEAE Elüsyon 2 Tampon: 0.2M NaCl, 5mM Tris-HCl ve %1 Tritonx100 içeren 200ml elüsyon 2 tamponu hazırlandı.
- DEAE Elüsyon 3 Tampon: 0.5M NaCl, 5mM Tris-HCl ve %1 Tritonx100 içeren 200ml elüsyon 3 tamponu hazırlandı.
- DEADE Elüsyon Diyaliz Tamponu: 5mM Tris-HCl, 2 ml Triton x100 içeren ve pH 7.4 ayarlanmış +4'C'de distile su ile 1 litreye tamamlanmış diyaliz tamponu hazırlandı.

3.1.3.2 Besiyerleri

- L. infantum* Parazitlerinin Flask Kültürü için RPMI 1640 Besiyeri: Fenol redli RPMI 1640'a %10 FBS ve 1ml/litre Gentamisin eklenerek besiyeri hazırlandı. Steril bir şekilde +4'C'de saklandı.

-*L. infantum* Parazitlerinin Erlenmeyer Flask Kùltürü için Brain-Heart Infusion Besiyeri:

37 gram toz brain hart infusion tartılarak 949 ml distile suda çözdürölüp ve otolavlandı. Üzerine steril 30ml FBS, 0.005g/l hemin, 0.026g/l adenosin, 1ml gentamisin eklenenerek toplamda 1 litrelik besi yeri hazırlandı.

-*L. infantum* Parazitlerinin Biyoreaktör Kùltürü için Brain-Heart Besiyeri:

Hazırlanıp otoklavlanan 46.25 gr/litre brain-heart infusion besiyeri üzerine steril 110ml FBS, 0.00625/litre Hemin, 0.0325/litre adenosine, 1ml/litre gentamisin eklenerek toplamda 3 litre besi yeri hazırlandı.

3.1.4 Deneylerde Kullanılan Hücreler

3.1.4.1 Biyoreaktörde Büyük Ölçek Üretilen ve gp63 Antijenin Eldesinde Kullanılan *Leishmania infantum* Paraziti

Hücre Kùltürü ve Doku Mühendisliğı Laboratuvarımızda kriyobankı oluşturulmuş *L. infantum* (EP 126) promastigotları kullanılarak büyük ölçek üretim yapıldı ve gp63 molekülünün izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirildi.

3.2 Metod

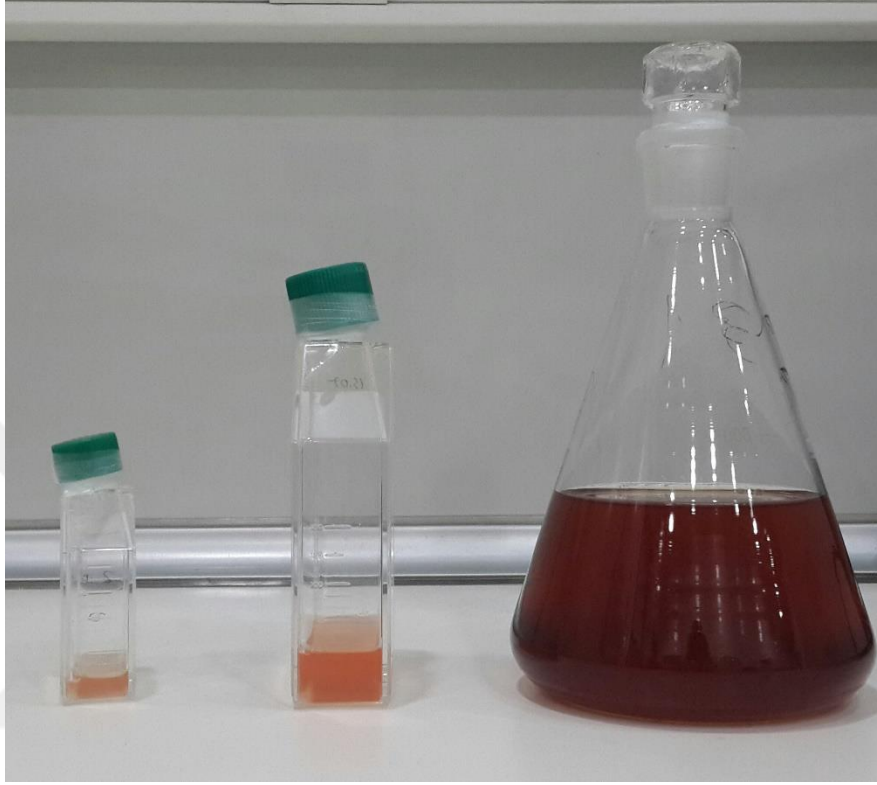
3.2.1 *L. infantum* Parazitlerinin Kriyobanktan Çıkarılması

Sıvı azottan çıkarılan hücreler 27°C'de ki su banyosunda iyicene çalkalanarak çözdürölüdü. Çözdürölülen hücrelerin tamamı kriyotüpün içërisinden alınarak, 5 ml %10 FBS içëren RPMI 1640 besiyerinin bulunduğı 25cm²'lik flasklara 10⁶ parazit / ml olacak şekilde ekimi yapıldı.

3.2.2 *L. infantum* Parazitlerinin Flask ve Erlenmeyer Kùltürü

Parazit kùltürü 25 cm²'lik flasklarda 1milyon/ml olmak üzere 5 ml 10% FBS+RPMI 1640 mediumuyla başladı . 3-4 gün sonra 8-10 milyon/ml sayısına ulaşan kùltürde ölçek büyötmeye gidildi. 25 cm²'lik flasklardan 75 cm²'lük flasklara yaklaşık 4.5ml kùltür

ekimi yapılır ve üzerine 35 ml 10% FBS+RPMI 1640 mediumu eklenerek 1 milyon/ml parazit sayısı ile büyük flaskta kültür başlatıldı. 3-4 gün sonra 75 cm²'lik flaskta maximum 8-10 milyon/ml parazit sayısına ulaşıldı. Kültür boyunca flasklar 26°C'lik etüvde tutuldu. Hücre sayımları hemocytometer ile yapıldı.



Şekil 3. 1 *L. infantum* parazit kültürünün klasik yöntemle kademeli olarak ölçek büyütülmesi

75 cm²'lik flaskta 8-10 milyon/ml parazit sayısına ulaşan kültürde yeniden ölçek büyötmeye gidilerek 1 litrelik erlenmeyer flaskta geçildi. İki 75 cm²'lik flastaki toplam 80 ml'lik parazit kültürü bir erlenmeyere aktarıldı. Üzerine 30 ml FBS, 0.005g/l hemin, 0.026g/l adenosin, 1ml gentamisin eklenerek hazırlanmış toplamda 1 litrelik brain-heart infusion mediumundan 330 ml eklenerek 1milyon/ml parazit sayısı ile kültür başlatıldı. Erlenmeyer kültürleri oda sıcaklığında shakerda tutuldu (şekil 3.1).

3.2.3 Biyoreaktör Kurulumu ve Kültürü

Hazırlanıp otoklavlanan 46.25 g/litre brain heart besi yerine; FBS-%4, Hemin-0.00625/litre, adenosine-0.0325/litre, gentamicin-1ml/litre eklenerek toplamda 3 litre besi yeri hazırlandı. Biyoreaktörün tüm parçaları ayrı ayrı paketlenip otoklavlandı.

Biyoreaktörün cam haznesine öncelikle hazırlanan besi yeri eklendi üzerine başlangıç hücre sayısı 1 milyon/ml olması için 10 milyon/ml hücre olan *L. infantum* kültüründen 400 ml eklendi(şekil 3.2). pH metre, termometre ve ısıtıcının elektrik bağlantıları takıldı. PH düzenlenmesi için otoklavlanan 0.5M NaOH çözeltisi biyoreaktörün peristaltik pompasına bağlandı. Kontrol panelinden pH 7.25'e ayarlandı. Biyoreaktör sonlandırılana kadar kültürün pH'ı 7.25'in altına düşmemesi sağlandı. Kültür sıcaklığı 26°C'ye ayarlandı ve kültür sonuna kadar sabit tutuldu. Biyoreaktörde kültür, manyetik balık karıştırıcıyla süreç boyunca 70-90 rpm de karıştırıldı. Parazitler, kültürden alınan örneğin 1:10 oranında seyreltilmesiyle hemocytometerde sayıldı. 9 günün sonunda kültür sonlandırıldı.



Şekil 3. 2 Biyoreaktörde *L. infantum* parazit kültürü

3.2.4 Hücre Sayımı

Parazit kültüründen alınan 10 µl örnek 90 µl %2'lik formol ile iyi karıştırıldı. Lamel ile kapatılmış Thoma laminin iki tarafına sayım tüpündeki karışım yüklendi. Inverted mikroskop ayarlanarak Thoma laminin alt ve üst tarafındaki 16 şar büyük karedeki parazitler sayıldı, aritmetik ortalaması alındı ve hücrelerin canlılıkları aşağıdaki formül ile hesaplandı:

Hücre sayısı (1ml) = Ort. hücre sayısı x Sulandırma katsayısı x Thoma lamı sabiti

Ortalama hücre sayısı: Thoma laminin alt ve üst kısımlarında bulunan 16 karedeki canlı hücrelerin aritmetik ortalaması

Sulandırma katsayısı: Pelletten alınan hücrelerin sayımı için yapılmış sulandırma katsayısı

Thoma lamı sabiti: 10.000

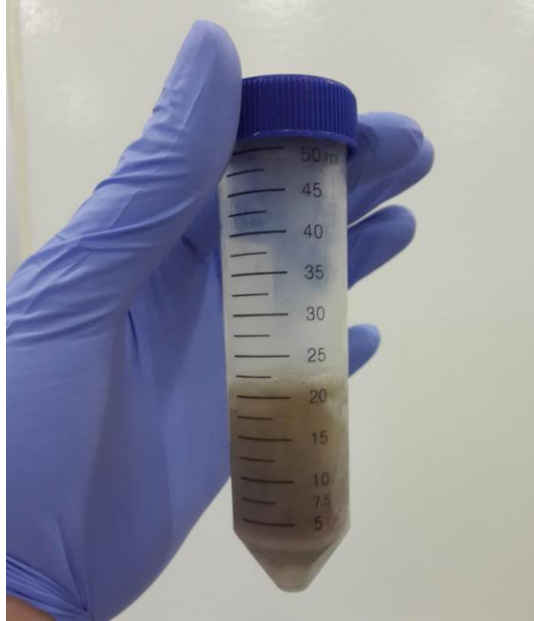
3.2.5 *L.infantum* Parazitlerinin Kriyoprezervasyonu

Parazitlerin kriyoprezervasyonu için kademeli yavaş dondurma işlemi gerçekleştirildi. %10 DMSO içeren besiyerine 1 milyon parazit/ml olacak şekilde parazit eklendi ve her bir kriyo tüpüne 1ml kondu. Kademeli olarak 1 saat 4°C, 2 saat -20°C ve 1 gece -40°C de bekletilen tüpler -190°C kriyo tankına alındı.

3.2.6 Gp63 molekülünün İzolasyonu ve Karakterizasyonu

3.2.6.1 Pellet parçalama

L. infantum biyomasından 15 ml alınarak üzerine daha önce hazırlanmış olan soğuk lizis tamponundan (pH 7,6) 10 ml ilave edildi.



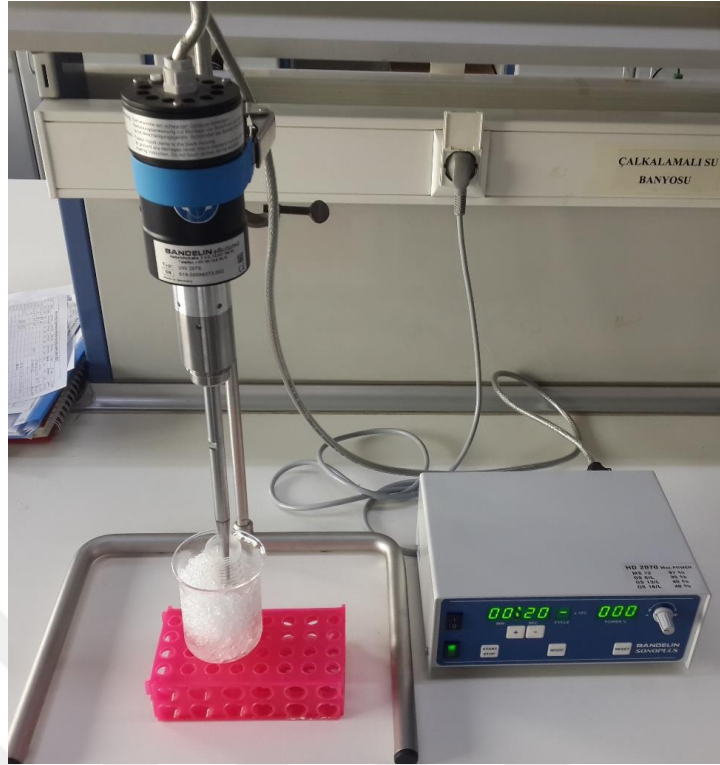
Şekil 3. 3 *L. infantum* kültüründen sentrifüj ile toplanan parazit biyoması

Lizis tampon; 5µg/ml löpeptin, 1 mM EDTA, 1 mM fenilmetilsülfonil fluorür, 1 mM iyodoasetamit (lizis tamponu) ve 5 mM soğuk Tris-HCl tamponu (pH 7.6) içerecek şekilde 100 ml (pH 7.6) hazırlandı. Lizis tamponu ile süspanse edilmiş parazit pelleti buz üzerinde 10 dakika aralıklarla 2 dakika süre ile 6 kez vortekslendi(Şekil 3.4).



Şekil 3. 4 Lizis tamponu ile süspanse edilmiş pelletin vortekslenmesi

Parazit süspansiyonu 4800 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjledikten sonra pellet toplandı. Ham membran pellet aynı tamponun 10 ml'si içinde tekrar süspanse edildi ve buz üzerinde 1'er dakika aralıklarla 50 Voltta üç kez 20'şer saniye sonike edildi(Şekil 3.5).



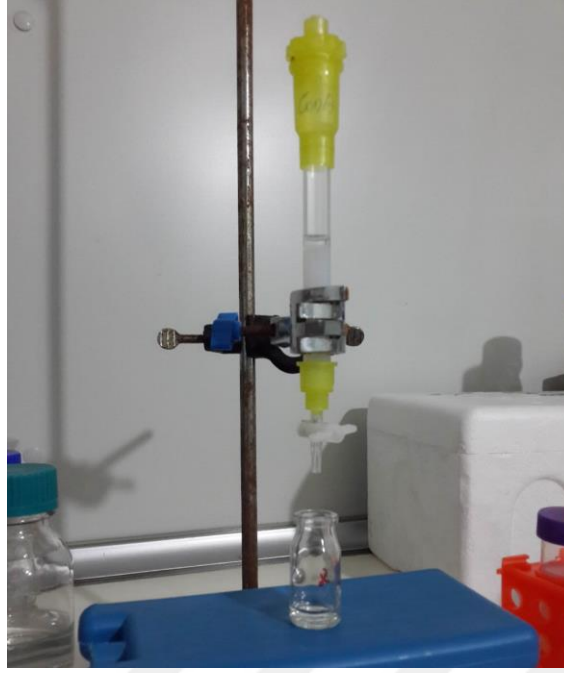
Şekil 3. 5 Ham membran pelletin sonikasyonu

Bu şekilde elde edilen süspansiyon %1 oktil- β -D-glukopiranozit (ağırlık / hacim) içeren lizis tamponunda çözüldü ve 4°C de gece boyunca bekletildi. Ertesi gün örnekler gradient santrifüj (1000rpm 'de 5 dk, 5000rpm'de 5 dk ve 14000 rpm'de 30 dk +4°C) yapıldı.

Elde edilen SLAg (çözünür *leishmania* antijeni) içeren süpernetant konkavalin A kolona yüklemek üzere liyofilizatörde kurutuldu. Geriye kalan parçalanmış olan pellet pelet aynı şekilde yeniden parçalandı.

3.2.6.2 Konkavalin A (Con A) kolon Kromatografisinin Yapılması

Gp63 molekülünün saflaştırılması için 3 ml ConA-sefaroze dolgu maddesi kolona yüklendi ve daha sonra kolon bağlama tamponu (%1 oktil- β -D-glukopiranozit içeren tampon) ile dengelendi. Kolonun musluğu açılarak tampon akışına izin verildi ve ConA-sefarozenin kolona oturması sağlandı (Şekil 3.6). Kolon %1 oktil- β -D-glukopiranozit ile dengelendikten sonra, SLAg yüklenmesi için hazır duruma getirildi.



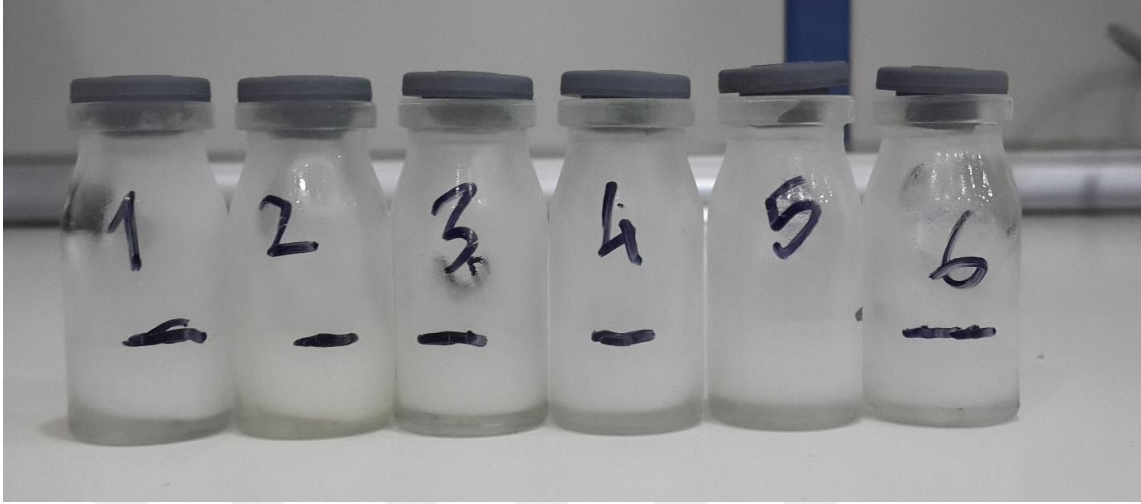
Şekil 3. 6 ConA kolonuna yüklenen tüm antijenlerden gp63'ün saflaştırılması

Örnek de 2 ml bağlama tamponunda çözüldü ve kolona yüklendi. 3 ml/saat'lik akış hızında kolon hacmi kadar bağlama tamponu ConA-Sefaroz kolondan geçirilerek kolona tutunmayan yapılar uzaklaştırıldı(Şekil 3.7).



Şekil 3.7 ConA kolonunda saflaştırma için kullanılan tamponlar. Sırasıyla soldan sağa; bağlama tamponu, elüsyon tamponu, yıkama tamponu(pH 4.5), yıkama tamponu (pH8.5)

Bağlanmamış protein 1-oktil- β -D-glukopiranozit tampon ile kolondan yıkandı. Kolona bağlı materyal ise 10 ml/saat akış hızında daha önce hazırlanmış olan 0,1M gradyanında α -metil-d-mannoside tamponun 3 er ml'si ile elüe edildi(şekil 3.8).



Şekil 3. 8 ConA kolonunda manuel olarak toplanan örnekler

İşlemler 4°C'te soğuk odada gerçekleştirildi. ConA kolon sonrası eluat pH 8,5 tamponunda diyaliz edildi.

Konkavalin A Kolonun Rejenerasyonu

Elüsyon sonrası Con a kolondan öncelikle pH 4,5 sodyum asetat tampon daha sonra pH 8,5 Tris HCl tampon 3 kolon hacmi kadar geçirilir daha sonra ön yıkama tamponu ile (prewash) (pH 7,2 500 mL ; 0,1 M NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 1mM CaCl₂, 20mM tris-HCl) 5 kez kolon hacmi kadar yıkanır. Bu şekilde 4°C'te bir sonraki kullanıma kadar muhafaza edilir.

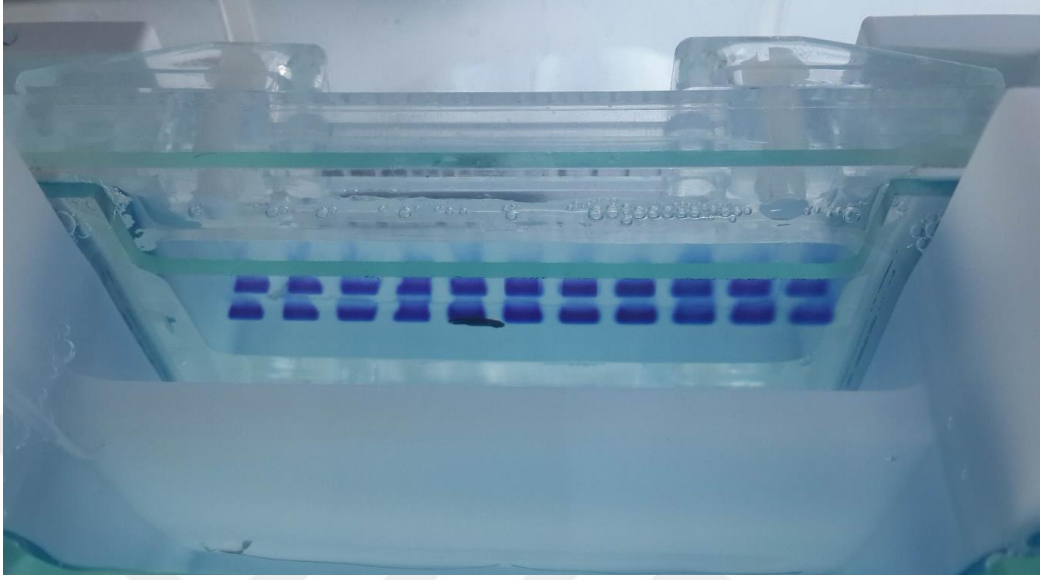
3.2.6.3 SDS-page ve gümüş nitrat jel boyaması

Seperation ve stacking jelleri hazırlanıp cam hazneye yüklendi.

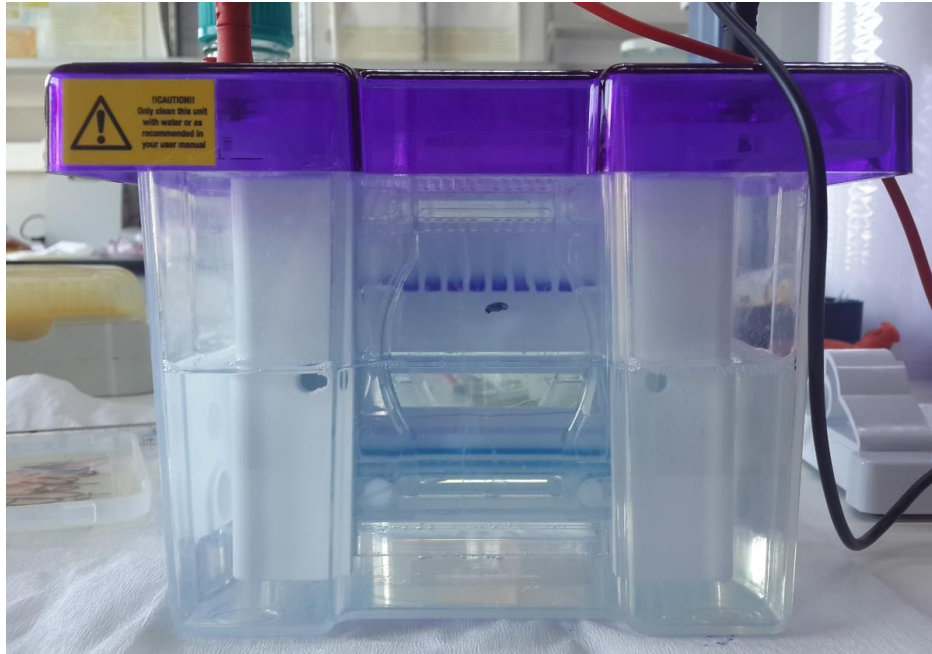
Kolon sonrası ayrı ayrı toplanan elüsyonlardan 15 μ l örnekler alındı. 5 μ l boya ile karıştırıldı. 95°C de 20 dk denatüre edilirler. Denatüre edilen örneklerden 5 μ l alındı ve jeldeki kuyuya yüklendi.

Jeldeki örneklerin koşturulması;

15 dk boyunca 150 voltta örnekler yürütülür. Örnekler Seperation jeline ulaştıktan sonra 240 voltta 35 dk yürütülürler(şekil 3.10). Yürüyen boya jelin sonuna ulaştığında yürütme işlemi durdurulur.



Şekil 3. 9 SDS-Page jeline yüklenen yükleme tamponu ile birlikte denature edilen örnekler



Şekil 3. 10 Örneklerin jelde yürütülmesi

Gümüş Nitrat ile Jel Boyama:

- Yürümesi bitmiş olan jel fiksasyon çözeltisinde (40% etanol, 10% asetik asit, 50% H_2O) 4 saat (veya 1 gece) inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası jel 30 dk boyunca distile su ile yıkandı.
- Ardından jel 0.02% sodyum tiosülfat çözeltisinde 1 dk tutuldu.
- Jel 3X20 sn boyunca distile su ile yıkandı.
- Daha sonra 4°C'de soğuk 0.1% gümüş nitrat ve 0.02% formaldehit solusyonunda 20 dk inkübe edildi.
- Jel 3X20 sn boyunca distile su ile yıkandı.
- Başka bir kaptaki yıkanmış jel 3% sodyum karbonat çözeltisine (3 g Na_2CO_3 in 100 ml H_2O , 0.05% formaldehide) aktarılır ve renk dönüşümleri gözlemlenene kadar elde çalkalandı.
- Jel 3X20 sn boyunca distile su ile yıkandı.
- Boyama 5%lik asetik asit çözeltisinde 5 dk tutularak sonlandırıldı.
- Jel 4°C de %1 asetik asit çözeltisinde saklandı.

3.2.6.4 Diyaliz

Con A ile saflaştırılan örnekler 5mM Tris-HCl, %0,2 triton x-100 pH 8,5 içersinde 1 gece 50 MW gözenekli diyaliz membranında +4°C 'de diyaliz edildi. Ardından liyofilizatör de kurutuldu ve böylece DEAE kolon yüklemesi için örnek hazır hale getirildi.



Şekil 3.11 ConA ve DEAE kolonunda saflaştırılan örneklerin diyalizi

DEAE kolonunda saflaştırılan ve 50lik diyaliz membranına koyulan gp63 örneği hazırlanan diyaliz solüsyonunda (1litre dH₂O, 5mM Tris-HCl, 2 ml Triton x100, pH 7.4) +4°C’te bir gece boyunca manyetik karıştırıcıyla karıştırılır (3.11). Daha sonra membrandaki örnek kurutulmak üzere -40°C’a kaldırılır.

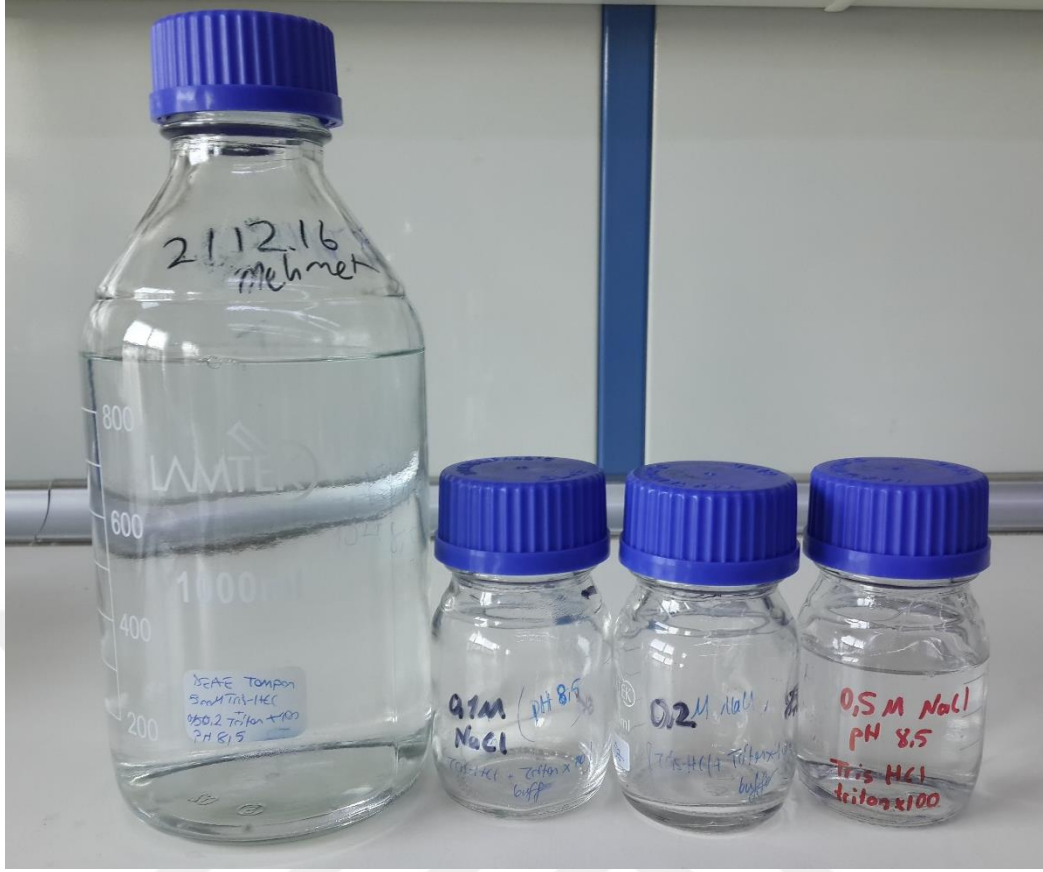
3.2.6.5 DEAE kolonunda gp63 örneklerinin saflaştırılması

DEAE dolgu maddesi kolona yüklendikten sonra önce kolon hacmi kadar distile suyla yıkanır. DEAE yıkama tamponuyla(5mM Tris-HCl, %0.2 tritonx100, pH 8,5) iki kolon hacmi kadar yıkandıktan sonra kolon örnek yüklemeye hazır hale gelir.



Şekil 3. 12 DEAE kolonuna yüklenen örnekten şırınga pompası ile 6ml/saat hızında gp63'ün saflaştırılması

Kurutulmuş gp63 örneği 1ml distile suyla çözdürüldükten sonra kolona yüklenir ve 1 saat beklenir. Kolon hacmi kadar yıkama tamponu kolona eklenir. Şırınga pompası kolona bağlanır ve saatte 6ml olacak şekilde çalıştırılır(Şekil 3.12). Kolondan manuel şekilde bağlanmayan, yıkama örnekleri ayrı ayrı toplanır. Kolondan yıkama tamponu tamamen geçtikten sonra kolon hacmi kadar sırasıyla ve ayrı ayrı elisyon1 bufferı(0.1M NaCl, tris-Hcl, Tritonx100), elisyon2 bufferı(0.2M NaCl, tris-HCl, Tritonx100), elisyon3 bufferı(0.5M NaCl, tris-Hcl, Tritonx100) (Şekil 3.13) eklenir ve akması beklenir.



Şekil 3. 13 DEAE kolonunda saflaştırma için kullanılan tamponlar. Sırasıyla soldan sağa; yıkama tamponu, elüsyon 1 tamponu, elüsyon 2 tamponu, elüsyon 3 tamponu

Her bir elüsyon manuel şekilde ayrı ayrı toplanırlar. Son elüsyondan sonra iki kolon hacmi kadar yıkama tamponuyla kolon yıkanır.

3.2.6.6 ELISA

Saflaştırılan gp63'ün karakterizasyonunun ELISA işlemi için ilk önce 96 gözlü plaka gp63 ile kaplandı. Her kuyuya 1 µg gp63 ve 100 µL kaplama solüsyonu düşecek şekilde hesaplama yapıldı. Belirlenen kuyulara 100'er µL gp63 + kaplama solüsyonu konuldu. Plaka 1 gece +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün antijenle kaplanan plaka 3 kez yıkandı. (Yıkama solüsyonu 1L PBS + 0,5 ml Tween 20) Antijenle kaplanan plakada antijenle kaplanmayan yerlerin kaplanması için %2'lik süt tozu içeren kaplama tamponu hazırlandı. Her kuyucuğa 100 µl süt tozu karışımı ilave edildi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. 1 saat sonunda plaka 3 kere yıkandı. Kuyulara 100 µl PBS ile çözdürülen gp63 antikoru koyuldu ve yaklaşık 1,5 saat 37°C'de inkübe edildi. 1 saatin sonunda plaka 3 kez yıkandı. Anti- Mouse Polyvalent 1/1000 oranında olacak şekilde

PBS+Tween 20 ile karıştırılarak hazırlandı. Her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde ilave edildi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. 1 saatin sonunda plaka 5 kez yıkandı. -40°C'de saklanan 4-nitrophenyl phosphate di(tris) salt substratı her kuyucukta 1mg/ml olacak şekilde substrat tamponu ile hazırlandı. Yapılan bu çözelti karanlık ortamda her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde ilave edildi ve oda sıcaklığında 35-45 dk boyunca karanlıkta bekletildi. Bu süre sonunda plaka ELISA reader cihazında 405 nm dalga boyunda okutularak sonuçlar kaydedildi.

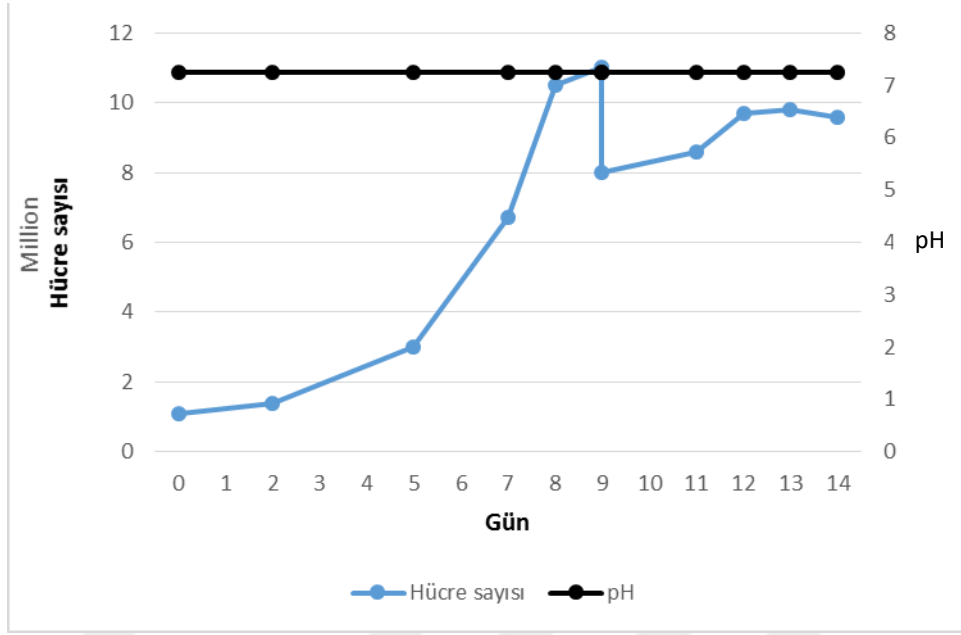


BÖLÜM 4

DENEYSEL SONUÇLAR

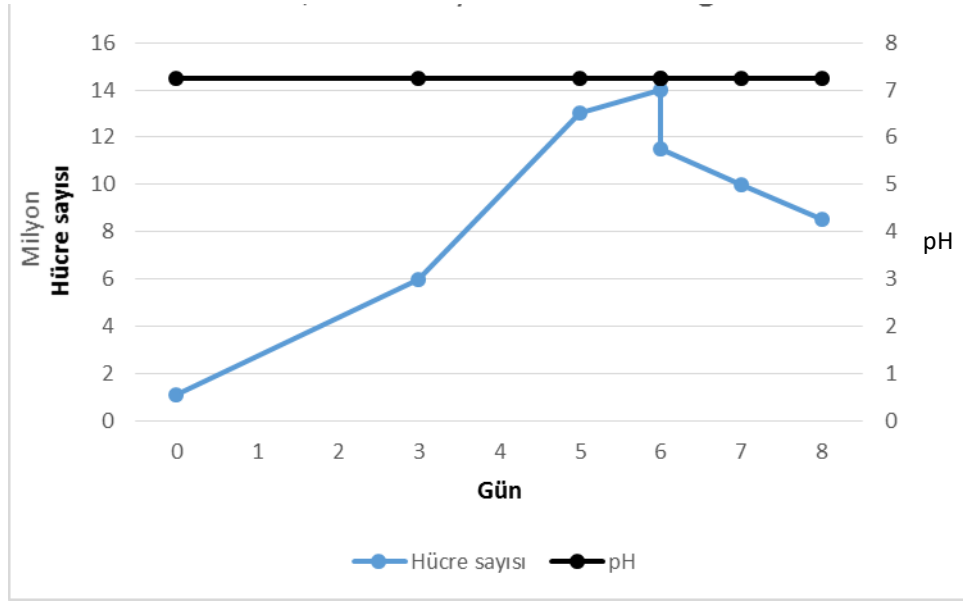
arazitlerin Biyoreaktör ve Kademeli Büyük Ölçek Kültürü

Karıştırmalı biyoreaktörde yapılan ilk denemelerde 74 gr. Brain-heart infusion medium 2 litre distile suda çözdürölüp otoklavlandı. Daha sonra 60ml FBS, 20ml adenosine, 20ml hemin, 2ml gentamicin eklendi. 1milyon/ml hücre olacak şekilde parazit kültürü eklenerek biyoreaktör başlatıldı. 0.5M NaOH çözeltisinden otomatik olarak yeteri miktarda eklenmesiyle pH 7.25'te sabit tutuldu. 9. günde 11 milyon/ml hücre sayısına ulaşan kültürde üreme yavaşladı. Üremenin yavaşladığı anda besiyeri takviyesi yapıldı . 500ml'de 37 gram brain-heart infusion medium, 50ml FBS içeren besiyeri biyoreaktöre eklendi. Eklenen besiyeriyle birlikte artan hacimden dolayı ml'de parazit sayısında düşüş meydana geldi. Mililitrede 8 milyon sayısına düşen parazitler sonraki 3 günde 9.8 milyona kadar çıktı ve üremenin durduğu görüldü. 14. Günün sonunda kültür sonlandırıldı. Hücre büyümesi ve pH dinamikleri Şekil 4.1'de sunulmuştur.



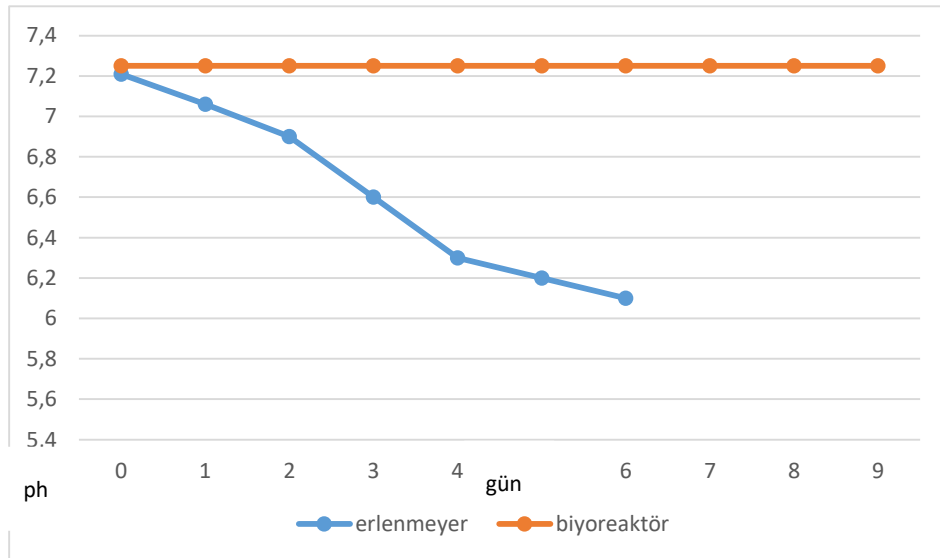
Şekil 4.1 Biyoreaktörde günlük hücre sayısı ve pH değişimi

Bir başka biyoreaktörde parazit kültürü çalışmasında 74 gr. Brain-heart infusion medium 2 litre distile suda çözündürülüp otoklavlandı. Daha sonra 75ml FBS, 25ml adenosine, 25ml hemin, 2ml gentamicin eklendi. 1milyon/ml hücre olacak şekilde parazit kültürü eklenerek biyoreaktör başlatıldı. 0.5M NaOH çözeltisinden otomatik olarak yeteri miktarda eklenmesiyle pH 7.25'te sabit tutuldu. 6. günde 14 milyon/ml hücre sayısına ulaşan kültürde üreme yavaşladı. Üremenin yavaşladığı anda besiyeri takviyesi yapıldı . 500ml'de 53 gram brain-heart infusion medium, 45ml FBS, 12.5ml adenosine, 12.5 ml hemin içeren besiyeri biyoreaktöre eklendi. Eklenen besiyeriyle birlikte artan hacimden dolayı ml'de parazit sayısında düşüş meydana geldi ve gitgide azalmanın olduğu görüldü. 8. Günün sonunda kültür sonlandırıldı. Hücre büyümesi ve pH dinamikleri Şekil 4.2'de sunulmuştur.

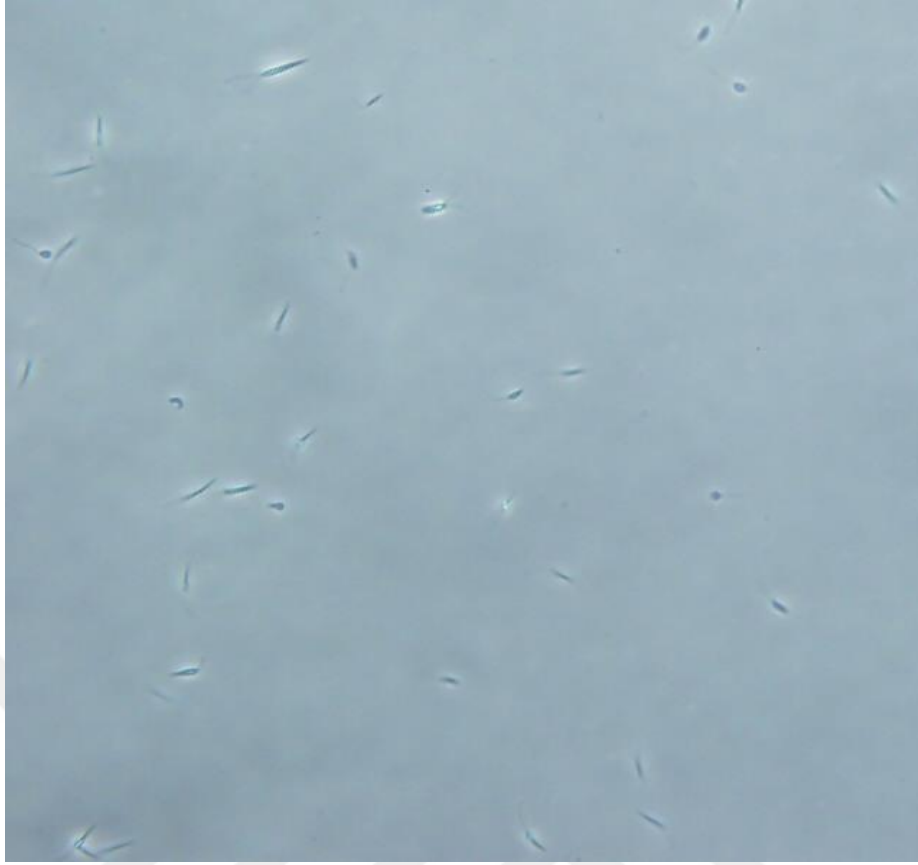


Şekil 4.2 Biyoreaktörde günlük hücre sayısı ve pH değişimi

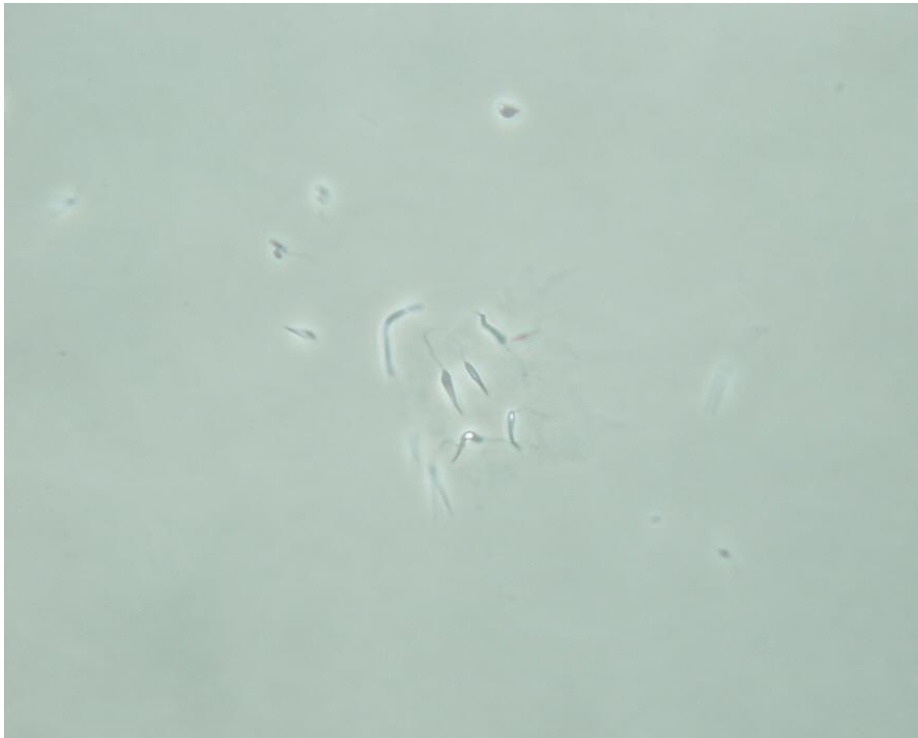
Karıştırmalı biyoreaktördeki ve erlenmeyerdeki kültürün pH dinamikleri Şekil 4.3'de sunulmuştur. Biyoreaktörde kültür boyunca ölçümü yapılan pH 0.5M NaOH çözeltisinden otomatik olarak yeteri miktarda eklenmesiyle 7.25'te sabit tutulmuştur. Ancak erlenmeyerde 7.20 başlayan pH parazitlerin yaşamsal faaliyetleri sonucu metabolit artıklarının etkisiyle 7.20'den 6.1'e kadar sürekli olarak düştüğü görülmüştür.



Şekil 4. 3 Biyoreaktör ve erlenmeyerde parazit kültürlerinin pH değişimi



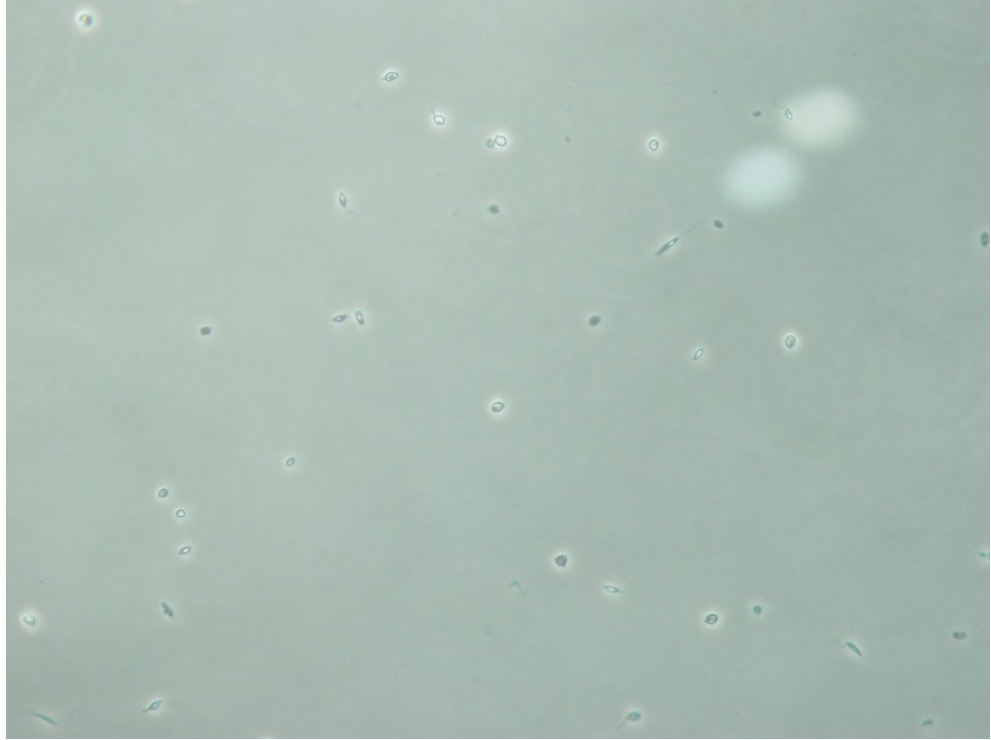
Şekil 4. 4 Erlenmeyer kültüründe 3.gün parazit görüntüsü (20x)



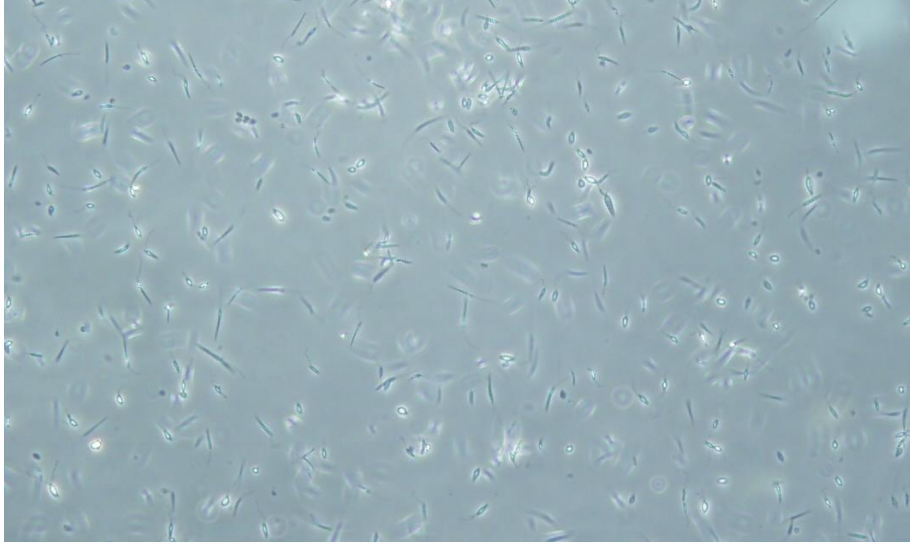
Şekil 4. 5 Erlenmeyer kültüründe 3.gün parazit görüntüsü (40x)



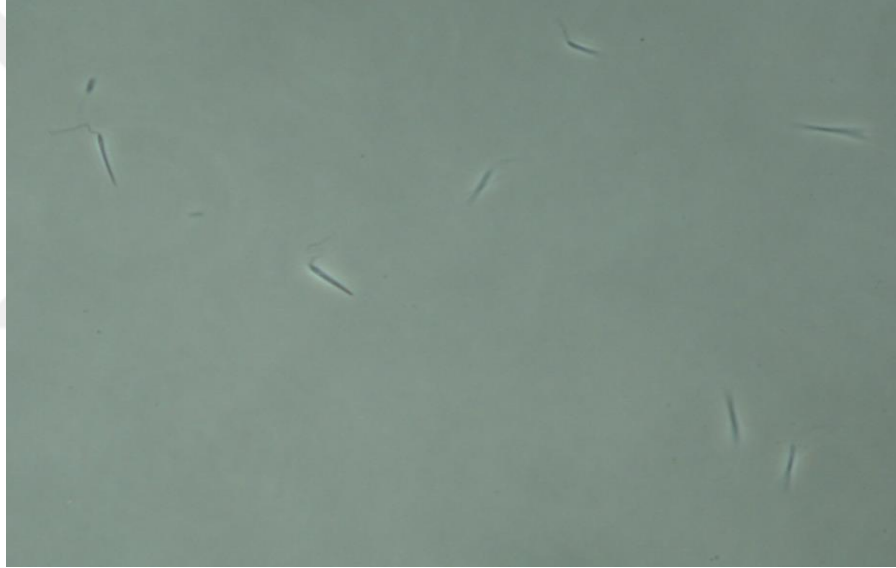
Şekil 4. 6 Erlenmeyer kültüründe 6.gün parazit görüntüsü (20x)



Şekil 4. 7 Erlenmeyer kültüründe 6.gün parazit görüntüsü (40x)



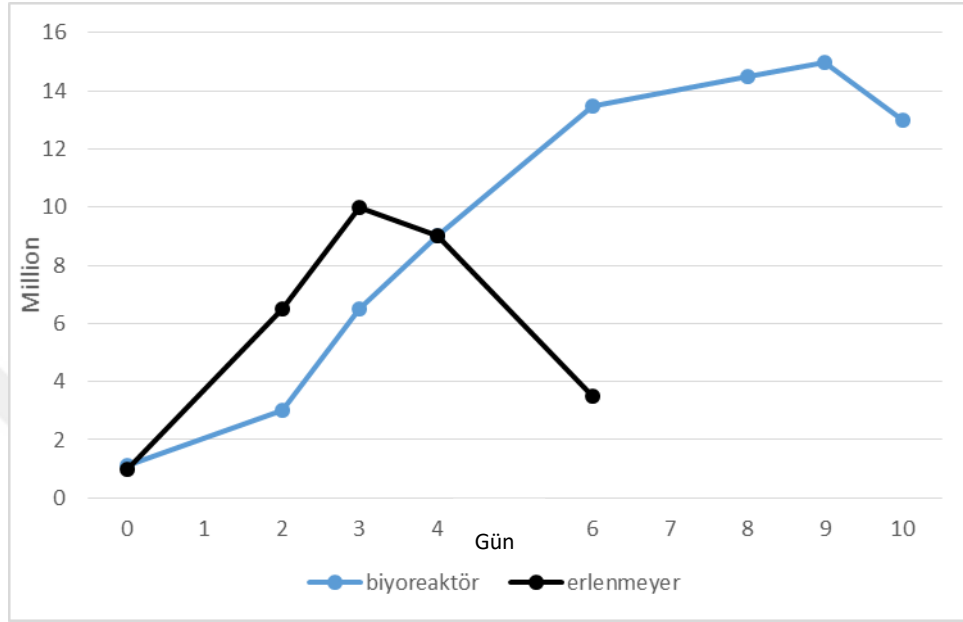
Şekil 4. 8 Biyoreaktör kültüründe 9.gün parazit görüntüsü (20x)



Şekil 4. 9 Biyoreaktör kültüründe 9.gün parazit görüntüsü (40x)

Erlenmeyer kültüründe ilk üç gün parazitler çoğalarak 10 milyon/ml (Şekil 4.10) sayısına ulaşmıştır. Bu noktada pH'ın 6.6 ya kadar düşmesi parazit büyümesini etkileyerek hücre sayısında düşüş başlamıştır. 6. Günün sonunda hücre sayısında düşüş ve mikroskopik incelemeler sonucunda parazitlerin morfolojik yapılarının bozulduğu gözlemlendi (Şekil 4.6, Şekil 4.7). Buna karşılık biyoreaktörde 6. Günde parazitler sayıca çoğalma eğilimindedir. Biyoreaktörde sabit pH ın etkisiyle parazitler 9. Gün de 15 milyon/ml sayısına ulaşabilmektedir. 9. Günden sonra parazit sayısında düşüş görülmüştür. Ayrıca erlenmeyerde parazitler ilk üç gün biyoreaktöre göre çok hız büyüme göstermiştir. Erlenmeyerde 3. Günde 10 milyon/ml ulaşan parazitler,

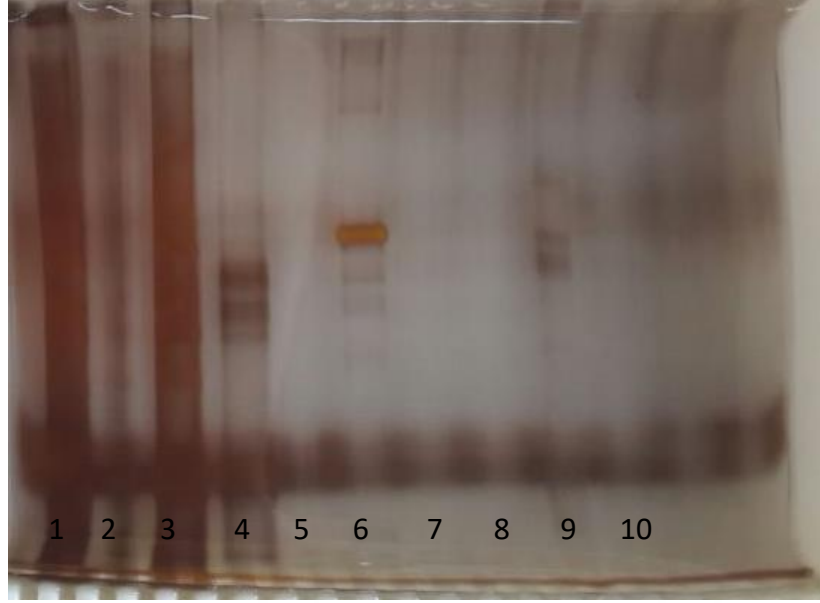
biyoreaktörde yaklaşık 5. Günde aynı sayıya ulaşabilmiştir. Diğer yandan erlenmeyerde parzit sayısı en fazla 10 milyona çıkabilirken biyoreaktörde maximum ml de 15 milyon parazit sayısına ulaşabildiği Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 10 Biyoreaktör ve erlenmeyer kültüründe zamanla parazitin çoğalma dinamiği

4.2 Gp63 Karakterizasyonunda SDS-PAGE Sonuçları

Gp63 molekülünün izolasyonu sonrası karakterizasyon için kolonlardan elüyon toplanan örneklerinin SDS-page analizi yapılmıştır. Yapılan bu analizler sonucu parazit tüm antijenleri içerisinde önce ConA daha sonra DEAE kolon saflaştırması sonucu gp63 molekülü izole edilebilmiştir.



Şekil 4.11 ConA ve DEAE kolonlarından saflaştırılan örneklerin SDS-PAGE sonuçları soldan sağa sırasıyla; 1-SLAG, 2-boş, 3- Con A kolona bağlanmayanlar, 4- Con A kolon elüsyon 0,1 M α -metil-d-mannoside, 5-boş, 6-BSA, 7- DEAE kolon bağlanmayanlar, 8- DEAE kolon yıkama, 9- DEAE kolon elüsyon 0,1M NaCl, 10- DEAE kolon Elüsyon 0,2 M NaCl, 11- DEAE kolon Elüsyon 0,5 M NaCl.

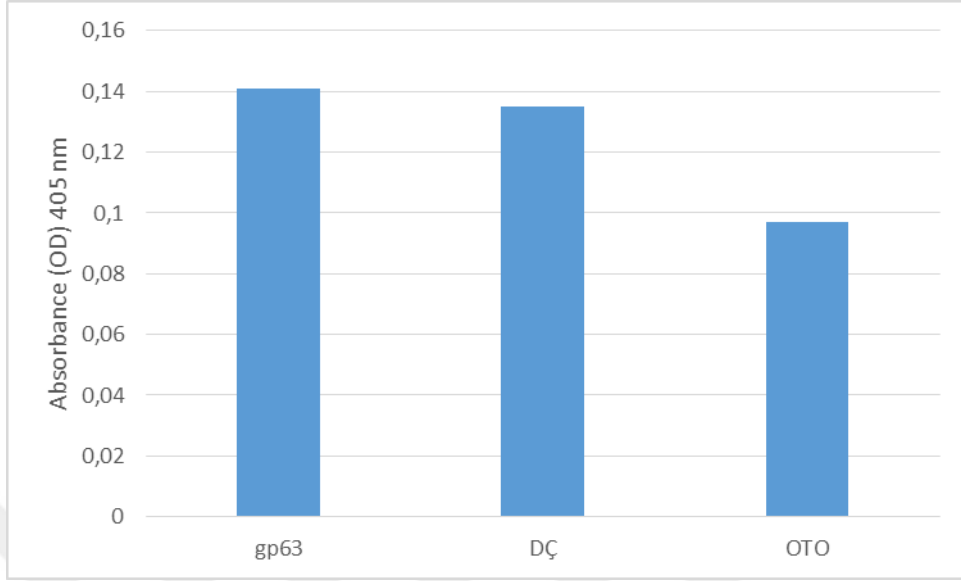
ConA kolonunda saflaştırma işlemi sonucu manuel olarak toplanan örneklerin SDS-page sonucu Şekil 4.11'deki gibidir. 4. kuyuya yüklenen elüsyon örneğinde 6. Kuyuya yüklenen 66.5 kDa luk BSA ile karşılaştırıldığında 63 kDa boyutuna denk gelen gp63 antijeni tespit edilmiştir. Gp63 tespit edilen bu örnek DEAE kolonunda saflaştırılmak üzere diyalizi yapıp kurutuldu.



Şekil 4.12 DEADE de saflaştırılan gp63 SDS-PAGE analizi

DEADE kolonunda saflaştırma işlemi sonucu manuel olarak toplanan örneklerin SDS-page sonucu Şekil 4.12'deki gibidir. 2. kuyuya yüklenen elüsyon örneğinde 6. Kuyuya yüklenen 66.5 kDa luk BSA ile karşılaştırıldığında 63 kDa boyutuna denk gelen gp63 antijeni tespit edilmiştir.

4.3 Gp63 Karakterizasyonunda ELISA Sonuçları



Şekil 4.13 Saflaştırılan gp63'ün antikora karşı verdiği ELISA sonucu

Saflaştırılan gp63, Dondurulup çözündürülmüş (DÇ) ve otoklavlanmış (OTO) tüm antijenler ile kaplanmış 96'lı plate gp63 antikoru kullanılarak ELISA analizi yapıldı. Yanıtlar 405nm absorbansta ölçülerek Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Buna göre en yüksek sonuç gp63 ile kaplanan kuyularda alındı. Dondurulup çözündürülerek hazırlanan antijenlerde de gp63 olduğundan DÇ kaplı kuyularda da yanıt görüldü. Otoklavlanarak hazırlanan antijenlerde sıcaklıktan dolayı proteinler denatüre olacağından oto antijeni kaplı kuyuda anlamlı yanıt görülmemiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Leishmania türündeki zorunlu hücre içi parazitlerin sebep olduğu leishmaniasis, dünyanın ve ülkemizin en önemli halk sağlığı problemlerinden biridir[1]. Kala-azar olarak da bilinen visseral leishmaniasis oldukça yüksek bir ateşle başlar ve yükselip alçalarak haftalarca sürer. Bu sırada hastanın dalağı, karaciğeri büyür, hasta günden güne zayıflar, anemiye neden olur. Hastalık bir yıl kadar sürer müdahale edilmezse hastanın ölümüne sebep olabilir[4],[5].

Diğer *Leishmania* türlerinde olduğu gibi visseral leishmaniasise karşı şimdiye kadar aşının bulunmaması, hastalığın etkenlerinde kullanılan ilaçlara karşı dirençliğin gelişmesi ve var olan ilaçların çok toksik olması bu hastalığa karşı aşı geliştirilmesinin son derece önemli olduğunu göstermektedir. Son yıllarda leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde doğal immünojen moleküllere daha çok önem verilmektedir. Ancak *Leishmania* parazitleri prokaryotlardan farklı olarak kültür ortamında daha yavaş çoğaldığından ve büyük ölçekte elde edilmesi zor olduğundan yeteri kadar doğal immünojen moleküllerin izolasyonu mümkün olmamaktadır. [14]. Farklı altbirim aşı adayları arasında en umut verici sonuçlar, doğal olarak saflaştırılmış immünojenik parazit moleküllerinin kullanımı yoluyla elde edilmiştir [20]. Bu aşı adaylarının, yüksek bir bağışıklık cevabı üretme potansiyeline sahiptir. Çok bulunmaları, immünojen olmaları nedeniyle native antijen olarak yüzey antijen önemi ortaya çıkmaktadır ve aşı

alışmalarında kullanılmaktadır[20] [21]. Bu moleküllerden en bilinenlerden birisi gp63 molekülüdür [22]

Pellet elde edilme zorluğu ve izolasyonda kullanılan yöntemlerin zorluğu nedeniyle gp63 dünya genelinde az sayıda laboratuvar da çalışılmaktadır. Yapılan sınırlı sayıda çalışmada ise gp63 molekülü düşük miktarlarda izole edilmiştir [28]. Bu molekülün daha yüksek miktarlarda eldesi için biyoreaktörlerde üretilen parazit kültürüne ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak literatürde *Leishmania* parazitlerinden gp63 molekülünün izolasyonunda parazit kültürünün elde edilmesi amacıyla biyoreaktörlerin kullanıldığını gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Diğer yandan ülkemizde gp63 molekülünün *Leishmania* parazitlerinden izole edilmesi ve aşı çalışmalarında kullanılmasına yönelik de bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle aşı çalışmalarında kullanılmak üzere *L. infantum*'dan immünojen gp63 molekülünün izolasyonunda pH ve sıcaklık değerleri kontrol edilebilir karıştırmalı biyoreaktörlerin kullanılmasıyla yeterli miktarda parazit pelletinin elde edilebileceği ve daha yüksek düzeylerde gp63 molekülünün izole edilebileceği düşünülmektedir.

Bu amaç doğrultusunda yapılan tez çalışmasında aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir;

- Kriyodan ıkarılan *L. infantum* kültürü 26 C'de T25 flasklarda RPMI 1640 besiyerinde 1milyon/ml olmak üzere başladı . 3-4 gün sonra 8-10 milyon/ml sayısına ulaşan kültür T75 flasklara alınarak ölçek b y tmeye gidildi. 3-4 gün sonra T25 flaskta 8-10 milyon/ml parazit sayısına ulaşan kültür 1 litrelik erlenmeyer flaska aktararak yeniden ölçek b y tmeye gidildi. Hazırlanan brain-heart infusion besiyerinden eklenerek 1milyon/ml parazit sayısıyla kültür başlatıldı. Erlenmeyer kültürleri oda sıcaklığında shakerda tutuldu.

- Elde edilen sonuçlar göre sıcaklık, pH, besiyeri optimizasyonları yapılan biyoreaktörde klasik yönteme göre 1.5 kat daha fazla üremenin olduğu görüldü. Erlenmeyerde 0.73 litre kültür hacminde 10 milyon/ml parazit sayısıyla 7.3 milyar parazit sayısında biyomas elde edilirken, optimize edilmiş biyoreaktörde 3.5 litre kültür hacminde 15 milyon/ml parazit sayısına ulaşarak 51 milyar parazit sayısında biomas elde edildi. Biyoreaktör sistemiyle biyomas eldesinde 7 kat artış sağlandı.

Biyoreaktör sisteminde düşen pH ın büyümeye olan olumsuz etkilerini elimine ederek sabit pH a bağlı olarak parazit kültürünün çok daha uzun süreli gerçekleştirilebileceği ve bu sayede daha yüksek verimlilikle biomass elde edilebileceği ortaya çıkmıştır. Parazitler sentrifuj ile toplanarak gp63 izolasyonu için biriktirildi.

-Toplanan *L. infantum* parazit biomasından gp63 izolasyonu için hücre parçalama işlemi gerçekleştirildi. lizis tamponuyla süspanse edilen hücreler vorteks ve sonikasyon ile parçalandı. Parçalanmış hücre lizatı sentrifujlenerek *Leishmania* tüm yüzey antijenleri elde edildi.

- Elde edilen tüm antijen karışımı ConA kolonundan geçirilerek glikoproteinlerin izolasyonu sağlandı. Kolondan toplanan örneklerin SDS-PAGE analizleri yapılarak gp63 molekülünün bulunduğu örnekler tespit edildi. Bu örneklerin 8.5 pHlı tamponda diyalizi yapılarak proteinlerin yüklenmesi ve diğer moleküllerin örneğin içinden uzaklaştırılması sağlandı. Diyaliz sonrası örnekler liyofilizatörde kurutuldu.

- Konkanavalin A kolonundan izole edilen glikoproteinlerin DEAE kolon kromatografisi yapılarak gp63 molekülü saflaştırıldı. Kolondan toplanan örneklerin SDS-PAGE analizleri yapılarak gp63 molekülünün bulunduğu örnekler tespit edildi. Bu örneklerin diyalizi yapılarak diğer moleküllerin örneğin içinden uzaklaştırılması sağlandı. Diyaliz sonrası saflaştırılan gp63 örnekleri liyofilizatörde kurutuldu.

- ConA ve DEAE kolonlarında saflaştırılan gp63 örneklerinden SDS-PAGE analizleri yapıldı ve elde edilen bantlar ladder ve BSA ile kıyaslandığında gp63'ün boyutu olan 63 kDa boyutuna denk gelen sonuçlar elde edildi. Elde edilen bu gp63 örneğine ve diğer DÇ, otoklav antijenlerine karşı gp63 antikoru kullanılarak yapılan ELISA analizi sonucunda ise; en yüksek yanıtın gp63 antijenine karşı alındığı, içerisinde gp63 olduğu düşünülen DÇ antijenlerinin gp63 den daha az da olsa yanıt verdiği, yüksek sıcaklıkta proteinlerin yapısı bozulacağından otoklav antijenlerine karşı ise anlamlı yanıtın olmadığı görülmüş.

Bu tez çalışmasında amaç ve hedefe uygun olarak aşı çalışmalarında kullanılmak üzere *L. infantum*'dan immünojen gp63 molekülünün izolasyonunda ilk kez olarak pH ve sıcaklık değerleri kontrol edilebilir karıştırmalı biyoreaktörlerin kullanılmasıyla yüksek

verimlilikte parazit kültürünün dolayısıyla daha fazla biomassın elde edildiği ve daha yüksek düzeylerde gp63 molekülünün izole edildiği ortaya konmuştur.

Geliştirilen bu sistem diğer *Leishmania* parazitlerinin biyomasının elde edilmesi için de önerilebilir, elde edilecek biyomasın aşı, tanı ve tedavi çalışmaları için gerekli olan diğer antijenlerin izolasyonunda kullanılabilir.



KAYNAKLAR

- [1] Allahverdiyev, A., Bağırova, M., Çakır Koç, R., Öztel, O.N., Elçiçek, S., Ateş, S.C. ve Karaca, T.D., (2010). "Approaches and Problems in Vaccine Development Against Leishmaniasis", Türkiye Parazitolojisi Dergisi, 34: 122-130.
- [2] Elçiçek, S., Bağırova, M. ve Allahverdiyev, A.M., (2013). "Generation of Avirulent Leishmania Parasites and Induction of Nitric Oxide Production in Macrophages by Using Polyacrylic Acid", Experimental Parasitology, 133: 237-242.
- [3] Borghi, S.M., Fattori, V., Conchon-Costa, I., Pinge-Filho, P., Pavanelli, W.R. ve Verri, W.A., Jr., (2017). "Leishmania Infection: Painful or Painless?", Parasitology Research, 116: 465-475.
- [4] Allahverdiyev, A.M., Abamor, E.S., Bağırova, M., Üstündağ, C.B., Kaya, C., Kaya, F. ve Rafailovich, M., (2011). "Antileishmanial Effect of Silver Nanoparticles and Their Enhanced Antiparasitic Activity Under Ultraviolet Light", International Journal Nanomedicine, 6: 2705-2714.
- [5] Bern, C., Maguire, J.H. ve Alvar, J., (2008). "Complexities of Assessing The Disease Burden Attributable to Leishmaniasis", Plos Neglected Tropical Disease, 2: E313.
- [6] Allahverdiyev, A.M., Koc, R.C., Ateş, S.C., Bağırova, M., Elçiçek, S. ve Öztel, O.N., (2011). "Leishmania Tropica: The Effect of Darkness and Light on Biological Activities In Vitro", Experimental Parasitology, 128: 318-323.
- [7] Daumerie, D. ve Savioli, L., (2010). "Working to Overcome The Global Impact of Neglected Tropical Diseases: First Who Report on Neglected Tropical Diseases (Vol. 1)", World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [8] Uzun, R.V.B., (2005). "TC Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Şark Çıbanı, Ankara."
- [9] Akman, L., Aksu, H.S., Wang, R.Q., Özensoy, S., Özbel, Y., Alkan, Z., Özcel, M.A., Çulha, G., Özcan, K., Uzun, S., Memişoğlu, H.R. ve Chang, K.P., (2000). "Multi-Site Dna Polymorphism Analyses of Leishmania Isolates Define Their Genotypes

- Predicting Clinical Epidemiology of Leishmaniasis in a Specific Region", *Journal Eukaryot Microbiology*, 47: 545-554.
- [10] Gouzelou, E., Haralambous, C., Amro, A., Mentis, A., Pratlong, F., Dedet, J.P., Votypka, J., Volf, P., Toz, S.O., Kuhls, K., Schonian, G. ve Soteriadou, K., (2012). "Multilocus Microsatellite Typing (Mlmt) of Strains From Turkey and Cyprus Reveals a Novel Monophyletic *L. Donovanii* Sensu Lato Group", *Plos Neglected Tropical Disease*, 6: E1507.
 - [11] Limoncu, M.E., Özbilgin, A., Balcıoğlu, I.C. ve Özbel, Y., (2004). "Evaluation of Three New Culture Media for The Cultivation and Isolation of Leishmania Parasites", *Journal Basic Microbiology*, 44: 197-202.
 - [12] Castelli, G., Galante, A., Lo Verde, V., Migliazzo, A., Reale, S., Lupo, T., Piazza, M., Vitale, F. ve Bruno, F., (2014). "Evaluation of Two Modified Culture Media for Leishmania Infantum Cultivation Versus Different Culture Media", *Journal Parasitol*, 100: 228-230.
 - [13] Lemesre, J.L., Darcy, F., Kweider, M., Capron, A. ve Santoro, F., (1988). "Requirements of Defined Cultivation Conditions for Standard Growth of Leishmania Promastigotes In Vitro", *Acta Tropical*, 45: 99-108.
 - [14] Bağırova, M., Allahverdiyev, A.M., Abamor, E.S., Ullah, I., Coşar, G., Aydoğdu, M., Şentürk, H. ve Ergenoğlu, B., (2016). "Overview of Dendritic Cell-Based Vaccine Development for Leishmaniasis", *Parasite Immunology*, 38: 651-662.
 - [15] Merten, O.W., Cruz, P.E., Rochette, C., Geny-Fiamma, C., Bouquet, C., Goncalves, D., Danos, O. ve Carrondo, M.J., (2001). "Comparison of Different Bioreactor Systems for The Production of High Titer Retroviral Vectors", *Biotechnology Program*, 17: 326-335.
 - [16] Warnock, J.N. ve Al-Rubeai, M., (2006). "Bioreactor Systems for The Production of Biopharmaceuticals from Animal Cells", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 45: 1-12.
 - [17] Dalton, J.P., Demanga, C.G., Reiling, S.J., Wunderlich, J., Eng, J.W. ve Rohrbach, P., (2012). "Large-Scale Growth of The Plasmodium Falciparum Malaria Parasite in a Wave Bioreactor", *International Journal of Parasitology*, 42: 215-220.
 - [18] Duffy, S., Loganathan, S., Holleran, J.P. ve Avery, V.M., (2016). "Large-Scale Production of Plasmodium Falciparum Gametocytes for Malaria Drug Discovery", *Nature Protocols*, 11: 976-992.
 - [19] Wynne De Martini, G.J., Abramo Orrego, L., De Rissio, A.M., Alvarez, M. ve Mujica, L.P., (1980). "Culture of Trypanosoma Cruzi in a Monophasic Medium. Application to Large-Scale Cultures in Fermentation Processes", *Medicina (B Aires)*, 40 Supply 1: 109-114.
 - [20] Gazdag, E.M., Cirstea, I.C., Breitling, R., Lukes, J., Blankenfeldt, W. ve Alexandrov, K., (2010). "Purification and Crystallization of Human Cu/Zn Superoxide Dismutase Recombinantly Produced in The Protozoan Leishmania Tarentolae", *Acta Crystallographica Section F*, 66: 871-877.

- [21] Fritsche, C., Sitz, M., Weiland, N., Breitling, R. ve Pohl, H.D., (2007). "Characterization of The Growth Behavior of *Leishmania Tarentolae*: A New Expression System for Recombinant Proteins", *Journal Basic Microbiol*, 47: 384-393.
- [22] Gharbi, M., Mhadhbi, M., Rejeb, A., Jaouadi, K., Rouatbi, M. ve Darghouth, M.A., (2015). "Leishmaniosis (*Leishmania Infantum* Infection) in Dogs", *Review Sci-Tech*, 34: 613-626.
- [23] Leal, J.M., Mosquini, M., Covre, L.P., Stagmiller, N.P., Rodrigues, R.R., Christensen, D., Guedes, H.L., Rossi-Bergmann, B. ve Gomes, D.C., (2016). "Intranasal Vaccination with Killed *Leishmania Amazonensis* Promastigotes Antigen (Laag) Associated with Caf01 Adjuvant Induces Partial Protection in Balb/C Mice Challenged with *Leishmania* (Infantum) Chagasi - Corrigendum", *Parasitology*, 143: 123.
- [24] Shargh, V.H., Jaafari, M.R., Khamesipour, A., Jaafari, I., Jalali, S.A., Abbasi, A. ve Badiie, A., (2012). "Liposomal Sla Co-Incorporated with Po Cpg Odns or Ps Cpg Odns Induce The Same Protection Against The Murine Model of Leishmaniasis", *Vaccine*, 30: 3957-3964.
- [25] Connell, N.D., Medina-Acosta, E., McMaster, W.R., Bloom, B.R. ve Russell, D.G., (1993). "Effective Immunization Against Cutaneous Leishmaniasis with Recombinant Bacille Calmette-Guerin Expressing The *Leishmania* Surface Proteinase Gp63", *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 90: 11473-11477.
- [26] Yao, C., Donelson, J.E. ve Wilson, M.E., (2003). "The Major Surface Protease (Msp Or Gp63) of *Leishmania* Sp. Biosynthesis, Regulation of Expression, and Function", *Molecular Biochemical Parasitol*, 132: 1-16.
- [27] Schneider, P., Rosat, J.P., Bouvier, J., Louis, J. ve Bordier, C., (1992). "*Leishmania* Major: Differential Regulation of The Surface Metalloprotease in Amastigote and Promastigote Stages", *Experimental Parasitology*, 75: 196-206.
- [28] Bhowmick, S., Ravindran, R. ve Ali, N., (2008). "Gp63 in Stable Cationic Liposomes Confers Sustained Vaccine Immunity to Susceptible Balb/C Mice Infected with *Leishmania Donovanii*", *Infection Immunology*, 76: 1003-1015.
- [29] Uzun, S., Durdu, M., Culha, G., Allahverdiyev, A.M. ve Memişoğlu, H.R., (2004). "Clinical Features, Epidemiology, and Efficacy and Safety of Intralesional Antimony Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: Recent Experience in Turkey", *Journal Parasitology*, 90: 853-859.
- [30] Özbilgin, A., Culha, G., Uzun, S., Harman, M., Topal, S.G., Okudan, F., Zeyrek, F., Gündüz, C., Ostan, I., Karakus, M., Toz, S., Kurt, O., Akyar, I., Erat, A., Güngör, D., Kayabaşı, C., Çavuş, I., Bastien, P., Pratlong, F., Kocagöz, T. ve Özbel, Y., (2016). "Leishmaniasis in Turkey: First Clinical Isolation of *Leishmania Major* From 18 Autochthonous Cases of Cutaneous Leishmaniasis in Four Geographical Regions", *Tropical Medicine & International Health*, 21: 783-791.
- [31] Petersen, C.A. ve Greenlee, M.H., (2011). "Neurologic Manifestations of *Leishmania* Spp. Infection", *Journal Neuroparasitology*, 2.

- [32] Ready, P.D., (2013). "Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents", *Annual Review of Entomology*, 58: 227-250.
- [33] Pace, D., (2014). "Leishmaniasis", *Journal Infection*, 69 Supplement 1: S10-18.
- [34] Pavli, A. ve Maltezou, H.C., (2010). "Leishmaniasis, an Emerging Infection in Travelers", *International Journal of Infectious Diseases*, 14: E1032-E1039.
- [35] Hc., M., (2010). "Tropical and Emerging Infectious Diseases", India: Research Signpost: 165-183.
- [36] Jones, T., Johnson, W., Barretto, A., Lago, E., Badaro, R., Cerf, B., Reed, S., Netto, E., Tada, M. ve Franca, F., (1987). "Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania Braziliensis Brasiliensis*", *Journal of Infectious Diseases*, 156: 73-83.
- [37] Paniz Mondolfi, A.E., Duffey, G.B., Horton, L.E., Tirado, M., Reyes Jaimes, O., Perez-Alvarez, A. ve Zerpa, O., (2013). "Intermediate/Borderline Disseminated Cutaneous Leishmaniasis", *International Journal of Dermatology*, 52: 446-455.
- [38] Silveira, F.T., Lainson, R. ve Corbett, C.E., (2004). "Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to The Disease in Amazonian Brazil: A Review", *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 239-251.
- [39] Pérez-Ayala, A., Norman, F., Pérez-Molina, J.A., Herrero, J.M., Monge, B. ve López-Vélez, R., (2009). "Imported Leishmaniasis: A Heterogeneous Group of Diseases", *Journal of Travel Medicine*, 16: 395-401.
- [40] Kafetzis, D.A. ve Maltezou, H.C., (2002). "Visceral Leishmaniasis in Paediatrics", *Current Opinion in Infectious Diseases*, 15: 289-294.
- [41] Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J.-P., Gradoni, L., Ter Horst, R., López-Vélez, R. ve Moreno, J., (2008). "The Relationship Between Leishmaniasis and Aids: The Second 10 Years", *Clinical Microbiology Review*, 21: 334-359.
- [42] Basset, D., Faraut, F., Marty, P., Dereure, J., Rosenthal, E., Mary, C., Pratlong, F., Lachaud, L., Bastien, P. ve Dedet, J.-P., (2005). "Visceral Leishmaniasis in Organ Transplant Recipients: 11 New Cases and a Review of The Literature", *Microbes Infection*, 7: 1370-1375.
- [43] Xynos, I.D., Tektonidou, M.G., Pikazis, D. ve Sipsas, N.V., (2009). "Leishmaniasis, Autoimmune Rheumatic Disease, and Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy, Europe", *Emerging Infectious Diseases*, 15: 956.
- [44] Coura-Vital, W., Marques, M.J., Veloso, V.M., Roatt, B.M., De Oliveira Aguiar-Soares, R.D., Reis, L.E.S., Braga, S.L., Moraes, M.H.F., Reis, A.B. ve Carneiro, M., (2011). "Prevalence and Factors Associated with *Leishmania Infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5: E1291.
- [45] Dujardin, J.-C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J.-P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y. ve Boelaert, M., (2008). "Spread of Vector-Borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe".

- [46] Antinori, S., Gianelli, E., Calattini, S., Longhi, E., Gramiccia, M. ve Corbellino, M., (2005). "Cutaneous Leishmaniasis: an Increasing Threat for Travellers", *Clinical Microbiology and Infection*, 11: 343-346.
- [47] Lawn, S., Whetham, J., Chiodini, P., Kanagalingam, J., Watson, J., Behrens, R. ve Lockwood, D., (2004). "New World Mucosal And Cutaneous Leishmaniasis: an Emerging Health Problem Among British Travellers", *Qjm*, 97: 781-788.
- [48] Stark, D., Van Hal, S., Lee, R., Marriott, D. ve Harkness, J., (2008). "Leishmaniasis, an Emerging Imported Infection: Report of 20 Cases From Australia", *Journal of Travel Medicine*, 15: 351-354.
- [49] Ahluwalia, S., Lawn, S.D., Kanagalingam, J., Grant, H. ve Lockwood, D.N., (2004). "Lesson of The Week: Mucocutaneous Leishmaniasis: an Imported Infection Among Travellers to Central and South America", *Bmj: British Medical Journal*, 329: 842.
- [50] Heinzl, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Coffman, R. ve Locksley, R.M., (1989). "Reciprocal Expression of Interferon or Interleukin 4 During The Resolution or Progression of Murine Leishmaniasis", *Journal Experimental Medicine*, 169: 199.
- [51] Reiner, S.L., Wang, Z.-E., Hatam, F., Scott, P. ve Locksley, R.M., (1993). "T $\sim$ H1 And T $\sim$ H2 Cell Antigen Receptors in Experimental Leishmaniasis", *Science-New York Then Washington-*, 259: 1457-1457.
- [52] Reed, S.G. Vve Scott, P., (1993). "T-Cell And Cytokine Responses in Leishmaniasis", *Current Opinion in Immunology*, 5: 524-531.
- [53] Sundar, S., Reed, S.G., Sharma, S., Mehrotra, A. ve Murray, H.W., (1997). "Circulating T Helper 1 (Th1) Cell-And Th2 Cell-Associated Cytokines in Indian Patients With Visceral Leishmaniasis", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 56: 522-525.
- [54] Roberts, L.J., Handman, E. ve Foote, S.J., (2000). "Science, Medicine, and The Future: Leishmaniasis", *British Medical Journal*, 321: 801-804.
- [55] Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R. ve Saravia, N.G., (2005). "Advances in Leishmaniasis", *The Lancet*, 366: 1561-1577.
- [56] Costa, C.H., Stewart, J.M., Gomes, R.B., Garcez, L.M., Ramos, P.K., Bozza, M., Satoskar, vA., Dissanayake, S., Santos, R.S. ve Silva, M.R., (2002). "Asymptomatic Human Carriers of Leishmania Chagasi", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66: 334-337.
- [57] Dereure, J., Thanh, H.D., Lavabre-Bertrand, T., Cartron, G., Bastides, F., Richard-Lenoble, D. ve Dedet, J., (2003). "Visceral Leishmaniasis. Persistence of Parasites in Lymph Nodes After Clinical Cure", *Journal of Infection*, 47: 77-81.
- [58] Sundar, S. ve Rai, M., (2002). "Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis", *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9: 951-958.
- [59] Savoia, D., (2015). "Recent Updates and Perspectives on Leishmaniasis", *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9: 588-596.

- [60] Elmahallawy, E.K., Martinez, A.S., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallescot, Y., Agil, A., Mari, J.M.N. ve Fernandez, J.G., (2014). "Diagnosis of Leishmaniasis", *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8: 961-972.
- [61] Srividya, G., Kulshrestha, A., Singh, R. ve Salotra, P., (2012). "Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Developments Over The Last Decade", *Parasitol Research*, 110: 1065-1078.
- [62] Boelaert, M., Bhattacharya, S., Chappuis, F., El Safi, S.H., Hailu, A., Mondal, D., Rijal, S., Sundar, S., Wasunna, M. ve Peeling, R.W., (2007). "Evaluation of Rapid Diagnostic Tests: Visceral Leishmaniasis", *Nature Reviews Microbiology*, 5: S30.
- [63] Galaï, Y., Chabchoub, N., Ben-Abid, M., Ben-Abda, I., Ben-Alaya-Bouafif, N., Amri, F., Aoun, K. ve Bouratbine, A., (2011). "Diagnosis of Mediterranean Visceral Leishmaniasis by Detection of Leishmania Antibodies and Leishmania Dna in Oral Fluid Samples Collected Using an Oracol Device", *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 3150-3153.
- [64] Allahverdiyev, A.M., Uzun, S., Bağırova, M., Durdu, M. ve Memişoğlu, H.R., (2004). "A Sensitive New Microculture Method for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis", *Am J Trop Med Hyg*, 70: 294-297.
- [65] Allahverdiyev, A.M., Bagirova, M., Uzun, S., Alabaz, D., Aksaray, N., Kocabas, E. ve Köksal, F., (2005). "The Value of a New Microculture Method for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis by Using Bone Marrow and Peripheral Blood", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 276-280.
- [66] Ateş, S.C., Bağırova, M., Allahverdiyev, A.M., Kocazeybek, B. ve Koşan, E., (2013). "Utility of The Microculture Method for Leishmania Detection in Non-invasive Samples Obtained from a Blood Bank", *Acta Tropical*, 128: 54-60.
- [67] Serin, M.S., Dağlıoğlu, K., Bağırova, M., Allahverdiyev, A., Uzun, S., Vural, Z., Kayar, B., Tezcan, S., Yetkin, M., Aslan, G., Emekdaş, G. ve Köksal, F., (2005). "Rapid Diagnosis and Genotyping of Leishmania Isolates from Cutaneous and Visceral Leishmaniasis by Microcapillary Cultivation and Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism of Miniexon Region", *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 53: 209-214.
- [68] Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J. ve Boelaert, M., (2007). "Visceral Leishmaniasis: What Are The Needs for Diagnosis, Treatment and Control?", *Nature Reviews Microbiology*, 5: 873-882.
- [69] Ready, P.D., (2014). "Epidemiology of Visceral Leishmaniasis", *Clinical Epidemiology*, 6: 147-154.
- [70] Moody, A. ve Chiodini, P., (2000). "Methods for The Detection of Blood Parasites", *Clinical & Laboratory Haematology*, 22: 189-201.
- [71] Maia, Z., Lírio, M., Mistro, S., Mendes, C.M.C., Mehta, S.R. ve Badaro, R., (2012). "Comparative Study of Rk39 Leishmania Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6: E1484.

- [72] Ryan, J.R., Smithyman, A.M., Rajasekariah, G.-H., Hochberg, L., Stiteler, J.M. ve Martin, S.K., (2002). "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Soluble Promastigote Antigen Detects Immunoglobulin M (Igm) and IgG Antibodies in Sera From Cases of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis", *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1037-1043.
- [73] Cruz, I., Chicharro, C., Nieto, J., Bailo, B., Canavate, C., Figueras, M.-C. ve Alvar, J., (2006). "Comparison of New Diagnostic Tools for Management of Pediatric Mediterranean Visceral Leishmaniasis", *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 2343-2347.
- [74] Riera, C., Fisa, R., Lopez, P., Ribera, E., Carrió, J., Falcó, V., Molina, I., Gállego, M. ve Portús, M., (2004). "Evaluation of a Latex Agglutination Test (Katex) for Detection of Leishmania Antigen in Urine of Patients with Hiv-Leishmania Coinfection: Value in Diagnosis and Post-Treatment Follow-Up", *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23: 899-904.
- [75] Ahsan, M., Islam, M., Mollah, A., Hoque, M., Hossain, M., Begum, Z. ve Islam, M., (2010). "Evaluation of Latex Agglutination Test (Katex) for Early Diagnosis of Kala-Azar", *Mymensingh Medical Journal*, 19: 335-339.
- [76] Sundar, S., Agrawal, S., Pai, K., Chance, M. ve Hommel, M., (2005). "Detection of Leishmanial Antigen in The Urine of Patients with Visceral Leishmaniasis by a Latex Agglutination Test", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 269-271.
- [77] Salam, M., Khan, M.G. ve Mondal, D., (2011). "Urine Antigen Detection by Latex Agglutination Test for Diagnosis and Assessment of Initial Cure of Visceral Leishmaniasis", *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105: 269-272.
- [78] Abass, E., Kang, C., Martinkovic, F., Semião-Santos, S.J., Sundar, S., Walden, P., Piarroux, R., El Harith, A., Lohoff, M. ve Steinhoff, U., (2015). "Heterogeneity of Leishmania Donovanii Parasites Complicates Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Comparison of Different Serological Tests in Three Endemic Regions", *Plos One*, 10: E0116408.
- [79] Boelaert, M., Rijal, S., Regmi, S., Singh, R., Karki, B., Jacquet, D., Chappuis, F., Campino, L., Desjeux, P. ve Le Ray, D., (2004). "A Comparative Study of The Effectiveness of Diagnostic Tests for Visceral Leishmaniasis", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70: 72-77.
- [80] Bern, C., Jha, S.N., Joshi, A.B., Thakur, G. ve Bista, M.B., (2000). "Use of The Recombinant K39 Dipstick Test and The Direct Agglutination Test in a Setting Endemic for Visceral Leishmaniasis in Nepal", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 63: 153-157.
- [81] Akhoundi, B., Mohebali, M., Babakhan, L., Edrissian, G.-H., Eslami, M.-B., Keshavarz, H. ve Malekafzali, H., (2010). "Rapid Detection of Human Leishmania Infantum Infection: a Comparative Field Study Using The Fast Agglutination Screening Test and The Direct Agglutination Test", *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8: 305-310.

- [82] Iqbal, J., Hira, P.R., Saroj, G., Philip, R., Al-Ali, F., Madda, P.J. ve Sher, A., (2002). "Imported Visceral Leishmaniasis: Diagnostic Dilemmas and Comparative Analysis of Three Assays", *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 475-479.
- [83] Cota, G.F., De Sousa, M.R., De Freitas Nogueira, B.M., Gomes, L.I., Oliveira, E., Assis, T.S.M., De Mendonça, A.L.P., Pinto, B.F., Saliba, J.W. ve Rabello, A., (2013). "Comparison of Parasitological, Serological, and Molecular Tests for Visceral Leishmaniasis in Hiv-Infected Patients: A Cross-Sectional Delayed-Type Study", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89: 570-577.
- [84] De Assis, M., Santana, T., Rabello, A. ve Werneck, G.L., (2012). "Latent Class Analysis of Diagnostic Tests for Visceral Leishmaniasis in Brazil", *Tropical Medicine & International Health*, 17: 1202-1207.
- [85] Kohanteb, J. ve Ardehali, S., (2005). "Cross-Reaction of Sera from Patients with Various Infectious Diseases with *Leishmania Infantum*", *Medical Principles and Practice*, 14: 79-82.
- [86] De Paiva-Cavalcanti, M., De Moraes, R.C.S., Pessoa-E-Silva, R., Trajano-Silva, L.A.M., Da Cunha Gonçalves-De-Albuquerque, S., Tavares, D.D.H.C., Brelaz-De-Castro, M.C.A., E Silva, R.D.F. ve Pereira, V.R.A., (2015). "Leishmaniasis Diagnosis: an Update on The Use of Immunological and Molecular Tools", *Cell & Bioscience*, 5: 31.
- [87] Rajasekariah, G.-H.R., Ryan, J.R., Hillier, S.R., Lisa, P.Y., Stiteler, J.M., Cui, L., Smithyman, A.M. ve Martin, S.K., (2001). "Optimisation of an ELISA for The Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis Using In Vitro Derived Promastigote Antigens", *Journal of Immunological Methods*, 252: 105-119.
- [88] Kumar, D., Kumar, S., Chakravarty, J. ve Sundar, S., (2011). "A Novel 12.6-Kda Protein of *Leishmania Donovanii* for The Diagnosis of Indian Visceral Leishmaniasis", *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11: 1359-1364.
- [89] Kumar, S., Kumar, D., Chakravarty, J., Rai, M. ve Sundar, S., (2012). "Identification and Characterization of a Novel *Leishmania Donovanii* Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 601-605.
- [90] Monno, R., Giannelli, G., Rizzo, C., De Vito, D. ve Fumarola, L., (2009). "Recombinant K39 Immunochromatographic Test for Diagnosis of Human Leishmaniasis".
- [91] Abass, E., Bollig, N., Reinhard, K., Camara, B., Mansour, D., Visekruna, A., Lohoff, M. ve Steinhoff, U., (2013). "Rklo8, A Novel *Leishmania Donovanii*-Derived Recombinant Immunodominant Protein for Sensitive Detection of Visceral Leishmaniasis in Sudan", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7: E2322.
- [92] Vaish, M., Singh, O.P., Chakravarty, J. ve Sundar, S., (2012). "Rk39 Antigen for The Diagnosis of Visceral Leishmaniasis by Using Human Saliva", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 598-600.

- [93] Fukutani, K.F., Figueiredo, V., Celes, F.S., Cristal, J.R., Barral, A., Barral-Netto, M. ve De Oliveira, C.I., (2014). "Serological Survey of Leishmania Infection in Blood Donors in Salvador, Northeastern Brazil", *Bmc Infectious Diseases*, 14: 422.
- [94] Motazedian, M., Fakhar, M., Motazedian, M.H., Hatam, G. ve Mikaeili, F., (2008). "A Urine-Based Polymerase Chain Reaction Method for The Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Immunocompetent Patients", *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60: 151-154.
- [95] De Ruiter, C., Van Der Veer, C., Leeftang, M., Deborggraeve, S., Lucas, C. ve Adams, E., (2014). "Molecular Tools for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Test Accuracy", *Journal of Clinical Microbiology*, 52: 3147-3155.
- [96] Oryan, A., (2015). "Plant-Derived Compounds in Treatment of Leishmaniasis", *Iranian Journal of Veterinary Research*, 16: 1-19.
- [97] Kedzierski, L., Sakthianandeswaren, A., Curtis, J.M., Andrews, P.C., Junk, P.C. ve Kedzierska, K., (2009). "Leishmaniasis: Current Treatment and Prospects for New Drugs and Vaccines", *Current Medicinal Chemistry*, 16: 599-614.
- [98] Herwaldt, B.L. ve Berman, J.D., (1992). "Recommendations for Treating Leishmaniasis with Sodium Stibogluconate (Pentostam) and Review of Pertinent Clinical Studies", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46: 296-306.
- [99] Igbineweka, O., Aghedo, F., Idusuyi, O. Ve Hussain, N., (2012). "Evaluating The Efficacy of Topical Silver Nitrate and Intramuscular Antimonial Drugs In The Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Sokoto, Nigeria", *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 13: 90-97.
- [100] Sazgarnia, A., Taheri, A.R., Soudmand, S., Parizi, A.J., Rajabi, O. ve Darbandi, M.S., (2013). "Antiparasitic Effects of Gold Nanoparticles with Microwave Radiation on Promastigots and Amastigotes of Leishmania Major", *International Journal Hyperthermia*, 29: 79-86.
- [101] Sundar, S. ve Chatterjee, M., (2006). "Visceral Leishmaniasis - Current Therapeutic Modalities", *Indian Journal Medical Research*, 123: 345-352.
- [102] Chakravarty, J. ve Sundar, S., (2010). "Drug Resistance in Leishmaniasis", *Journal Global Infection Disease*, 2: 167-176.
- [103] Roberts, W.L., McMurray, W.J. ve Rainey, P.M., (1998). "Characterization of The Antimonial Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime)", *antimicrobial agents chemotherapy*, 42: 1076-1082.
- [104] Wiwanitkit, V., (2012). "Interest in Paromomycin for The Treatment of Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar)", *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 8: 323-328.
- [105] Sundar, S., More, D.K., Singh, M.K., Singh, V.P., Sharma, S., Makharia, A., Kumar, P.C. ve Murray, H.W., (2000). "Failure of Pentavalent Antimony in

Visceral Leishmaniasis in India: Report from The Center of The Indian Epidemic", *Clinical Infectious Diseases*, 31: 1104-1107.

- [106] Kumara, R., Sahoo, G.C., Pandeya, K., Dasa, V., Yousuf, M., Ansaria, S.R. ve Dasa, P., (2014). "Plga-Peg Encapsulated Sitamaquine Nanoparticles Drug Delivery System Against Leishmania Donovanii", *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3: 85-90.
- [107] Minodier, P. ve Parola, P., (2007). "Cutaneous Leishmaniasis Treatment", *Travel Medicine and Infectious Disease*, 5: 150-158.
- [108] Lauletta, J.A., (2012). "Review of The Current Treatments for Leishmaniasis".
- [109] Gamboa-Leon, R., Vera-Ku, M., Peraza-Sanchez, S.R., Ku-Chulim, C., Horta-Baas, A. ve Rosado-Vallado, M., (2014). "Antileishmanial Activity of a Mixture of Tridax Procumbens and Allium Sativum in Mice", *Parasite*, 21: 15.
- [110] World Health Organization, (2010). "Control Of The Leishmaniasis", World Health Organization technical report series 949, 22–26.
- [111] Muller, R.H., Jacobs, C. ve Kayser, O., (2001). "Nanosuspensions as Particulate Drug Formulations in Therapy. Rationale for Development and What We Can Expect for The Future", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47: 3-19.
- [112] Sundar, S. ve Chakravarty, J., (2013). "Leishmaniasis: an Update of Current Pharmacotherapy", *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14: 53-63.
- [113] Chavez-Fumagalli, M.A., Ribeiro, T.G., Castilho, R.O., Fernandes, S.O., Cardoso, V.N., Coelho, C.S., Mendonca, D.V., Soto, M., Tavares, C.A., Faraco, A.A. Ve Coelho, E.A., (2015). "New Delivery Systems For Amphotericin B Applied To The Improvement Of Leishmaniasis Treatment", *Rev Soc Bras Med Trop*, 48: 235-242.
- [114] Sen, R., Ganguly, S., Saha, P. ve Chatterjee, M., (2010). "Efficacy of Artemisinin in Experimental Visceral Leishmaniasis", *International Journal Antimicrobial Agents*, 36: 43-49.
- [115] Sundar, S. ve Olliaro, P.L., (2007). "Miltefosine in The Treatment of Leishmaniasis: Clinical Evidence for Informed Clinical Risk Management", *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3: 733-740.
- [116] Eissa, M.M., El-Moslemany, R.M., Ramadan, A.A., Amer, E.I., El-Azzouni, M.Z. ve El-Khordagui, L.K., (2015). "Miltefosine Lipid Nanocapsules for Single Dose Oral Treatment of Schistosomiasis Mansoni: A Preclinical Study", *Plos One*, 10: E0141788.
- [117] Das, S., Khan, W., Mohsin, S. ve Kumar, N., (2011). "Miltefosine Loaded Albumin Microparticles for Treatment of Visceral Leishmaniasis: Formulation Development and in Vitro Evaluation", *Polymers for Advanced Technologies*, 22: 172-179.
- [118] Sachdeva, H., Sehgal, R. ve Kaur, S., (2013). "Studies on The Protective and Immunomodulatory Efficacy of Withania Somnifera Along with Cisplatin Against Experimental Visceral Leishmaniasis", *Parasitol Research*, 112: 2269-2280.

- [119] Fernandez, O.L., Diaz-Toro, Y., Ovalle, C., Valderrama, L., Muvdi, S., Rodriguez, I., Gomez, M.A. ve Saravia, N.G., (2014). "Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of Leishmania Viannia Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8: E2871.
- [120] Singh, K., Garg, G. ve Ali, V., (2016). "Current Therapeutics, Their Problems and Thiol Metabolism as Potential Drug Targets in Leishmaniasis", *Current Drug Metabolism*, 17: 897-919.
- [121] Vyas, S.P. ve Gupta, S., (2006). "Optimizing Efficacy of Amphotericin B Through Nanomodification", *International Journal Nanomedicine*, 1: 417-432.
- [122] De Carvalho, R.F., Ribeiro, I.F., Miranda-Vilela, A.L., De Souza Filho, J., Martins, O.P., Cintra E Silva Dde, O., Tedesco, A.C., Lacava, Z.G., Bao, S.N. ve Sampaio, R.N., (2013). "Leishmanicidal Activity of Amphotericin B Encapsulated in Plga-Dmsa Nanoparticles to Treat Cutaneous Leishmaniasis in C57bl/6 Mice", *Experimental Parasitology*, 135: 217-222.
- [123] Gershkovich, P., Wasan, E.K., Lin, M., Sivak, O., Leon, C.G., Clement, J.G. ve Wasan, K.M., (2009). "Pharmacokinetics and Biodistribution of Amphotericin B in Rats Following Oral Administration in a Novel Lipid-Based Formulation", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64: 101-108.
- [124] Qasim, M., Lim, D.J., Park, H. ve Na, D., (2014). "Nanotechnology for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases", *Journal Nanoscience Nanotechnology*, 14: 7374-7387.
- [125] Abamor, E.S., Allahverdiyev, A.M., Bağırova, M. ve Rafailovich, M., (2017). "Meglumine Antimoniate-TiO₂@Ag Nanoparticle Combinations Reduce Toxicity of The Drug While Enhancing Its Antileishmanial Effect", *Acta Tropica*, 169: 30-42.
- [126] Abamor, E.S. Ve Allahverdiyev, A.M., (2016). "A Nanotechnology Based New Approach for Chemotherapy of Cutaneous Leishmaniasis: TiO₂@Ag Nanoparticles - Nigella Sativa Oil Combinations", *Experimental Parasitology*, 166: 150-163.
- [127] Allahverdiyev, A.M., Abamor, E.S., Bağırova, M., Baydar, S.Y., Ateş, S.C., Kaya, F., Kaya, C. ve Rafailovich, M., (2013). "Investigation of Antileishmanial Activities of TiO₂@Ag Nanoparticles on Biological Properties of L. Tropica And L. Infantum Parasites, In Vitro", *Exp Parasitol*, 135: 55-63.
- [128] Martins, V.T., Chavez-Fumagalli, M.A., Costa, L.E., Canavaci, A.M., Martins, A.M., Lage, P.S., Lage, D.P., Duarte, M.C., Valadares, D.G., Magalhaes, R.D., Ribeiro, T.G., Nagem, R.A., Darocha, W.D., Regis, W.C., Soto, M., Coelho, E.A., Fernandes, A.P. Ve Tavares, C.A., (2013). "Antigenicity and Protective Efficacy of a Leishmania Amastigote-Specific Protein, Member of The Super-Oxygenase Family, Against Visceral Leishmaniasis", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7: E2148.
- [129] Reed, S.G., Coler, R.N., Mondal, D., Kamhawi, S. ve Valenzuela, J.G., (2016). "Leishmania Vaccine Development: Exploiting The Host-Vector-Parasite Interface", *Expert Review of Vaccines*, 15: 81-90.

- [130] Rachamim, N. ve Jaffe, C.L., (1993). "Pure Protein from Leishmania Donovanii Protects Mice Against Both Cutaneous and Visceral Leishmaniasis", *Journal Immunology*, 150: 2322-2331.
- [131] Afrin, F., Anam, K. ve Ali, N., (2000). "Induction of Partial Protection Against Leishmania Donovanii by Promastigote Antigens in Negatively Charged Liposomes", *Journal Parasitology*, 86: 730-735.
- [132] Bhowmick, S., Ravindran, R. ve Ali, N., (2014). "IL-4 Contributes to Failure, and Colludes with IL-10 to Exacerbate Leishmania Donovanii Infection Following Administration of a Subcutaneous Leishmanial Antigen Vaccine", *BMC Microbiology*, 14: 8.
- [133] Iborra, S., Parody, N., Abanades, D.R., Bonay, P., Prates, D., Novais, F.O., Barral-Netto, M., Alonso, C. ve Soto, M., (2008). "Vaccination with The Leishmania Major Ribosomal Proteins Plus Cpg Oligodeoxynucleotides Induces Protection Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis in Mice", *Microbes and Infection*, 10: 1133-1141.
- [134] Kumari, S., Kumar, A., Samant, M., Singh, N. ve Dube, A., (2008). "Discovery of Novel Vaccine Candidates and Drug Targets Against Visceral Leishmaniasis Using Proteomics and Transcriptomics", *Current Drug Targets*, 9: 938-947.
- [135] Stager, S., Smith, D.F. ve Kaye, P.M., (2000). "Immunization with a Recombinant Stage-Regulated Surface Protein from Leishmania Donovanii Induces Protection Against Visceral Leishmaniasis", *Journal Immunology*, 165: 7064-7071.
- [136] Coler, R.N. ve Reed, S.G., (2005). "Second-Generation Vaccines Against Leishmaniasis", *Trends Parasitology*, 21: 244-249.
- [137] Sukumaran, B. ve Madhubala, R., (2004). "Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development", *Current Molecular Medicine*, 4: 667-679.
- [138] Noazin, S., Modabber, F., Khamesipour, A., Smith, P.G., Moulton, L.H., Nasseri, K., Sharifi, I., Khalil, E.A., Bernal, I.D., Antunes, C.M., Kieny, M.P. ve Tanner, M., (2008). "First Generation Leishmaniasis Vaccines: A Review of Field Efficacy Trials", *Vaccine*, 26: 6759-6767.
- [139] Agallou, M., Smirlis, D., Soteriadou, K.P. ve Karagouni, E., (2012). "Vaccination with Leishmania Histone H1-Pulsed Dendritic Cells Confers Protection in Murine Visceral Leishmaniasis", *Vaccine*, 30: 5086-5093.
- [140] Das, A. ve Ali, N., (2012). "Vaccine Prospects of Killed but Metabolically Active Leishmania Against Visceral Leishmaniasis", *Expert Review of Vaccines*, 11: 783-785.
- [141] Murray, H.W., Cervia, J.S., Hariprasad, J., Taylor, A.P., Stoeckle, M.Y. ve Hockman, H., (1995). "Effect of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Experimental Visceral Leishmaniasis", *Journal Of Clinical Investigation*, 95: 1183.
- [142] Dumas, C., Muyombwe, A., Roy, G., Matte, C., Ouellette, M., Olivier, M. ve Papadopoulou, B., (2003). "Recombinant Leishmania Major Secreting

Biologically Active Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Survives Poorly in Macrophages In Vitro and Delays Disease Development in Mice", *Infection and Immunity*, 71: 6499-6509.

- [143] Lage, D., Martins, V.T., Duarte, M.C., Garde, E., Chávez-Fumagalli, M.A., Menezes-Souza, D., Roatt, B., Tavares, C.A., Soto, M. ve Coelho, E.A., (2015). "Prophylactic Properties of a Leishmania-Specific Hypothetical Protein in a Murine Model of Visceral Leishmaniasis", *Parasite Immunology*, 37: 646-656.
- [144] Martins, V.T., Lage, D.P., Duarte, M.C., Costa, L.E., Garde, E., Rodrigues, M.R., Chávez-Fumagalli, M.A., Menezes-Souza, D., Roatt, B.M. ve Tavares, C.A.P., (2016). "A New Leishmania-Specific Hypothetical Protein, Lihyt, Used as a Vaccine Antigen Against Visceral Leishmaniasis", *Acta Tropical*, 154: 73-81.
- [145] Green, S.J., Mellouk, S., Hoffman, S.L., Meltzer, M.S. ve Nacy, C.A., (1990). "Cellular Mechanisms of Nonspecific Immunity to Intracellular Infection: Cytokine-Induced Synthesis of Toxic Nitrogen Oxides From L-Arginine by Macrophages and Hepatocytes", *Immunology Letters*, 25: 15-19.
- [146] Blackwell, J., (1996). "Genetic Susceptibility to Leishmanial Infections: Studies in Mice and Man", *Parasitology*, 112: S67-S74.
- [147] Kharazmi, A., Kemp, K., Ismail, A., Gasim, S., Gaafar, A., Kurtzhals, J., El Hassan, A., Theander, T. ve Kemp, M., (1999). "T-Cell Response in Human Leishmaniasis", *Immunology Letters*, 65: 105-108.
- [148] Wilson, M.E., Jeronimo, S.M. ve Pearson, R.D., (2005). "Immunopathogenesis of Infection with The Visceralizing Leishmania Species", *Microbial Pathogenesis*, 38: 147-160.
- [149] Stäger, S., Alexander, J., Carter, K.C., Brombacher, F. ve Kaye, P.M., (2003). "Both Interleukin-4 (Il-4) and Il-4 Receptor a Signaling Contribute to The Development of Hepatic Granulomas with Optimal Antileishmanial Activity", *Infection and Immunity*, 71: 4804-4807.
- [150] Afonso, L. ve Scott, P., (1993). "Immune Responses Associated with Susceptibility of C57bl/10 Mice to Leishmania Amazonensis", *Infection and Immunity*, 61: 2952-2959.
- [151] Joshi, J., Malla, N. ve Kaur, S., (2014). "A Comparative Evaluation of Efficacy of Chemotherapy, Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis-an Experimental Study", *Parasitology International*, 63: 612-620.
- [152] Fernandes, A.P., Costa, M.M.S., Coelho, E.A.F., Michalick, M.S.M., De Freitas, E., Melo, M.N., Tafuri, W.L., De Melo Resende, D., Hermont, V. ve De Freitas Abrantes, C., (2008). "Protective Immunity Against Challenge with Leishmania (Leishmania) Chagasi in Beagle Dogs Vaccinated with Recombinant A2 Protein", *Vaccine*, 26: 5888-5895.
- [153] Ghosh, A., Zhang, W.W. ve Matlashewski, G., (2001). "Immunization with A2 Protein Results in A Mixed Th1/Th2 and a Humoral Response Which Protects Mice Against Leishmania Donovanii Infections", *Vaccine*, 20: 59-66.

- [154] Coelho, E.A.F., Tavares, C.A.P., Carvalho, F.A.A., Chaves, K.F., Teixeira, K.N., Rodrigues, R.C., Charest, H., Matlashewski, G., Gazzinelli, R.T. ve Fernandes, A.P., (2003). "Immune Responses Induced by The Leishmania (Leishmania) Donovanii A2 Antigen, But Not by The Lack Antigen, Are Protective Against Experimental Leishmania (Leishmania) Amazonensis Infection", *Infection and Immunity*, 71: 3988-3994.
- [155] Zanin, F.H., Coelho, E.A., Tavares, C.A., Marques-Da-Silva, E.A., Costa, M.M.S., Rezende, S.A., Gazzinelli, R.T. ve Fernandes, A.P., (2007). "Evaluation of Immune Responses and Protection Induced by A2 and Nucleoside Hydrolase (Nh) Dna Vaccines Against Leishmania Chagasi and Leishmania Amazonensis Experimental Infections", *Microbes and Infection*, 9: 1070-1077.
- [156] Yam, K.K., Hugentobler, F., Pouliot, P., Stern, A.M., Lalande, J.-D., Matlashewski, G., Olivier, M. ve Cousineau, B., (2011). "Generation and Evaluation of A2-Expressing Lactococcus Lactis Live Vaccines Against Leishmania Donovanii in Balb/C Mice", *Journal of Medical Microbiology*, 60: 1248-1260.
- [157] Mizbani, A., Taheri, T., Zahedifard, F., Taslimi, Y., Azizi, H., Azadmanesh, K., Papadopoulou, B. ve Rafati, S., (2009). "Recombinant Leishmania Tarentolae Expressing The A2 Virulence Gene as a Novel Candidate Vaccine Against Visceral Leishmaniasis", *Vaccine*, 28: 53-62.
- [158] Resende, D.M., Caetano, B.C., Dutra, M.S., Penido, M.L., Abrantes, C.F., Verly, R.M., Resende, J.M., Piló-Veloso, D., Rezende, S.A. ve Bruna-Romero, O., (2008). "Epitope Mapping and Protective Immunity Elicited by Adenovirus Expressing The Leishmania Amastigote Specific A2 Antigen: Correlation with Ifn- γ and Cytolytic Activity by Cd8⁺ T Cells", *Vaccine*, 26: 4585-4593.
- [159] Sjölander, A., Baldwin, T.M., Curtis, J.M., Bengtsson, K.L. ve Handman, E., (1998). "Vaccination with Recombinant Parasite Surface Antigen 2 from Leishmania Major Induces a Th1 Type of Immune Response But Does Not Protect Against Infection", *Vaccine*, 16: 2077-2084.
- [160] Martins, V.T., Chávez-Fumagalli, M.A., Lage, D.P., Duarte, M.C., Garde, E., Costa, L.E., Da Silva, V.G., Oliveira, J.S., De Magalhães-Soares, D.F. ve Teixeira, S.M.R., (2015). "Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in The Promastigote and Amastigote Stages of Leishmania Infantum Against Visceral Leishmaniasis", *Plos One*, 10: E0137683.
- [161] Beaumier, C.M., Gillespie, P.M., Hotez, P.J. ve Bottazzi, M.E., (2013). "New Vaccines for Neglected Parasitic Diseases and Dengue", *Translational Research*, 162: 144-155.
- [162] Rachamim, N. ve Jaffe, C., (1993). "Pure Protein From Leishmania Donovanii Protects Mice Against Both Cutaneous and Visceral Leishmaniasis", *The Journal of Immunology*, 150: 2322-2331.
- [163] Joshi, J. ve Kaur, S., (2014). "Studies on The Protective Efficacy of Second-Generation Vaccine Along with Standard Antileishmanial Drug In Leishmania Donovanii Infected Balb/C Mice", *Parasitology*, 141: 554-562.

- [164] Baharia, R.K., Tandon, R., Sharma, T., Suthar, M.K., Das, S., Siddiqi, M.I., Saxena, J.K., Sunder, S. ve Dube, A., (2015). "Recombinant Nad-Dependent Sir-2 Protein of Leishmania Donovanii: Immunobiochemical Characterization as a Potential Vaccine Against Visceral Leishmaniasis", PLOS Neglected Tropical Diseases, 9: E0003557.
- [165] Kumari, S., Kumar, A., Samant, M., Singh, N. ve Dube, A., (2008). "Discovery of Novel Vaccine Candidates and Drug Targets Against Visceral Leishmaniasis Using Proteomics and Transcriptomics", Curr Drug Targets, 9: 938-947.
- [166] Saljoughian, N., Taheri, T., Zahedifard, F., Taslimi, Y., Doustdari, F., Bolhassani, A., Doroud, D., Azizi, H., Heidari, K. ve Vasei, M., (2013). "Development of Novel Prime-Boost Strategies Based on a Tri-Gene Fusion Recombinant L. Tarentolae Vaccine Against Experimental Murine Visceral Leishmaniasis", PLOS Neglected Tropical Diseases, 7: E2174.
- [167] Goto, Y., Bhatia, A., Raman, V.S., Liang, H., Mohamath, R., Picone, A.F., Vidal, S.E., Vedvick, T.S., Howard, R.F. ve Reed, S.G., (2011). "Ksac, The First Defined Polyprotein Vaccine Candidate for Visceral Leishmaniasis", Clinical and Vaccine Immunology, 18: 1118-1124.
- [168] Kamhawi, S., Aslan, H. ve Valenzuela, J.G., (2014). "Vector Saliva in Vaccines for Visceral Leishmaniasis: A Brief Encounter of High Consequence?", Frontiers in Public Health, 2.
- [169] Oliveira, F., Rowton, E., Aslan, H., Gomes, R., Castrovinci, P.A., Alvarenga, P.H., Abdeladhim, M., Teixeira, C., Meneses, C. ve Kleeman, L.T., (2015). "A Sand Fly Salivary Protein Vaccine Shows Efficacy Against Vector-Transmitted Cutaneous Leishmaniasis in Nonhuman Primates", Science Translational Medicine, 7: 290ra290-290ra290.
- [170] Brittingham, A., Chen, G., Mcgwire, B.S., Chang, K.P. ve Mosser, D.M., (1999). "Interaction of Leishmania Gp63 with Cellular Receptors for Fibronectin", Infection and Immunity, 67: 4477-4484.
- [171] Kulkarni, M.M., Jones, E.A., McMaster, W.R. ve Mcgwire, B.S., (2008). "Fibronectin Binding and Proteolytic Degradation by Leishmania and Effects on Macrophage Activation", Infection and Immunity, 76: 1738-1747.
- [172] Ellis, M., Sharma, D.K., Hilley, J.D., Coombs, G.H. ve Mottram, J.C., (2002). "Processing and Trafficking of Leishmania Mexicana Gp63. Analysis Using Gp18 Mutants Deficient in Glycosylphosphatidylinositol Protein Anchoring", The Journal of Biological Chemistry, 277: 27968-27974.
- [173] Mcgwire, B.S., O'connell, W.A., Chang, K.P. ve Engman, D.M., (2002). "Extracellular Release of The Glycosylphosphatidylinositol (Gpi)-Linked Leishmania Surface Metalloprotease, Gp63, Is Independent of Gpi Phospholipolysis: Implications for Parasite Virulence", The Journal of Biological Chemistry, 277: 8802-8809.
- [174] Debroy, S., Keenan, A.B., Ueno, N., Jeronimo, S.M., Donelson, J.E. ve Wilson, M.E., (2010). "Leishmania Infantum Chagasi: A Genome-Based Approach to

- Identification of Excreted/Secreted Proteins", *Experimental Parasitology*, 126: 582-591.
- [175] Olivier, M., Atayde, V.D., Isnard, A., Hassani, K. ve Shio, M.T., (2012). "Leishmania Virulence Factors: Focus on The Metalloprotease Gp63", *Microbes and Infection*, 14: 1377-1389.
 - [176] Gomez, M.A., Contreras, I., Halle, M., Tremblay, M.L., McMaster, R.W. ve Olivier, M., (2009). "Leishmania Gp63 Alters Host Signaling Through Cleavage-Activated Protein Tyrosine Phosphatases", *Science Signaling*, 2: Ra58.
 - [177] Shi, J. ve Casanova, J.E., (2006). "Invasion of Host Cells by Salmonella Typhimurium Requires Focal Adhesion Kinase and P130cas", *Molecular Biology of the Cell*, 17: 4698-4708.
 - [178] Coelho-Finamore, J.M., Freitas, V.C., Assis, R.R., Melo, M.N., Novozhilova, N., Secundino, N.F., Pimenta, P.F., Turco, S.J. ve Soares, R.P., (2011). "Leishmania infantum: Lipophosphoglycan Intraspecific Variation and Interaction with Vertebrate And Invertebrate Hosts", *International Journal Parasitology*, 41: 333-342.
 - [179] Olivier, M., Gregory, D.J. ve Forget, G., (2005). "Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape The Host Immune Response: A Signaling Point of View", *Clinical Microbiology Reviews*, 18: 293-305.
 - [180] Shio, M.T., Hassani, K., Isnard, A., Ralph, B., Contreras, I., Gomez, M.A., Abu-Dayyeh, I. ve Olivier, M., (2012). "Host Cell Signalling and Leishmania Mechanisms of Evasion", *Journal of Tropical Medicine*, 2012: 819512.
 - [181] Contreras, I., Gomez, M.A., Nguyen, O., Shio, M.T., McMaster, R.W. ve Olivier, M., (2010). "Leishmania-Induced Inactivation of The Macrophage Transcription Factor Ap-1 Is Mediated by The Parasite Metalloprotease Gp63", *PLOS Pathogens*, 6: E1001148.
 - [182] Silverman, J.M., Clos, J., De'oliveira, C.C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L.J. ve Reiner, N.E., (2010). "An Exosome-Based Secretion Pathway is Responsible for Protein Export from Leishmania and Communication with Macrophages", *Journal of Cell Science*, 123: 842-852.
 - [183] Silverman, J.M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A.Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., Lynn, M.A., McMaster, W.R., Foster, L.J., Levings, M.K. ve Reiner, N.E., (2010). "Leishmania Exosomes Modulate Innate and Adaptive Immune Responses Through Effects on Monocytes and Dendritic Cells", *Journal Immunology*, 185: 5011-5022.
 - [184] Hassani, K., Antoniak, E., Jardim, A. ve Olivier, M., (2011). "Temperature-Induced Protein Secretion by Leishmania Mexicana Modulates Macrophage Signalling and Function", *Plos One*, 6: E18724.
 - [185] Chang, H.N., Jung, K., Choi, J.D., Lee, J.C. ve Woo, H.C., (2014). "Multi-Stage Continuous High Cell Density Culture Systems: A Review", *Biotechnology Advances*, 32: 514-525.

- [186] Sugiki, T., Fujiwara, T. ve Kojima, C., (2014). "Latest Approaches for Efficient Protein Production in Drug Discovery", Expert Opinion on Drug Discovery, 9: 1189-1204.
- [187] Garcia-Ochoa, F. ve Gomez, E., (2009). "Bioreactor Scale-Up and Oxygen Transfer Rate in Microbial Processes: An Overview", Biotechnology Advances, 27: 153-176.
- [188] Somatco Fermentation System,
<https://www.somatco.com/fermentationsystem.htm>, 10 Mayıs 2017.
- [189] Rafiq, Q.A., Brosnan, K.M., Coopman, K., Nienow, A.W. ve Hewitt, C.J., (2013). "Culture of Human Mesenchymal Stem Cells on Microcarriers in a 5 L Stirred-Tank Bioreactor", Biotechnology Letters, 35: 1233-1245.
- [190] Biomine, http://wiki.biomine.skelleftea.se/wiki/index.php/log_phase, 10 Mayıs 2017.
- [191] Lavallab, <http://lavallab.com/products/fermentor-bioreactor/industrial-bioreactors-fermenters/>, 10 Mayıs 2017.
- [192] Sigmaaldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/labware/labware-products.html?tablepage=17215950>, 10 Mayıs 2017.
- [193] Parts Of Bioreactor, <https://en.wikipedia.org/wiki/bioreactor>, 10 Mayıs 2017.
- [194] Akil, K. ve Jayanthi, S., (2012). "Anaerobic Sequencing Batch Reactors and Its Influencing Factors: An Overview", Journal of Environmental Science and Engineering, 54: 317-322.
- [195] Batch Reactor, https://en.wikipedia.org/wiki/batch_reactor, 10 Mayıs 2017.
- [196] Abid, A., Saidane, F. ve Hamdi, M., (2017). "Feasibility of Carbon Dioxide Sequestration by Spongiochloris Sp Microalgae During Petroleum Wastewater Treatment in Airlift Bioreactor", Bioresource Technology, 234: 297-302.
- [197] Shariarbd-Fed Batch Bioreactor, <http://shariarbd.com/2011/02/mammalian-cell-expression-vector/>, 10 Mayıs 2017.
- [198] Stirred Bioreactor, <https://en.wikipedia.org/wiki/bioreactor>, 10 Mayıs 2017.
- [199] Sanchez-Vazquez, V., Shirai, K., Gonzalez, I. ve Gutierrez-Rojas, M., (2017). "Fungal Biocatalyst Activated by an Electric Field: Improved Mass Transfer and Non-Specificity for Hydrocarbon Degradation in an Airlift Bioreactor", Journal of Hazardous Materials, 337: 62-71.
- [200] Airlift Bioreactor,
https://www.researchgate.net/figure/229941118_fig6_figure-1-schematic-diagram-of-the-air-lift-bioreactors-a-annulus-sparged-internal, 10 Mayıs 2017.
- [201] Meuwly, F., Ruffieux, P.A., Kadouri, A. ve Von Stockar, U., (2007). "Packed-Bed Bioreactors for Mammalian Cell Culture: Bioprocess and Biomedical Applications", Biotechnology Advances, 25: 45-56.

- [202] Packed-Bed Bioreactors, <https://processdesign.mccormick.northwestern.edu/index.php/reactors>, 10 Mayis 2017.
- [203] Tisa, F., Abdul Raman, A.A. ve Wan Daud, W.M., (2014). "Applicability of Fluidized Bed Reactor in Recalcitrant Compound Degradation Through Advanced Oxidation Processes: A Review", Journal of Environmental Management, 146: 260-275.
- [204] Fluid-Bed Bioreactor, <http://www.tridentinno.com.my/technologies/anaerobic-treatment-systems/anaerobic-fluidized-bed/>, 10 Mayis 2017.
- [205] Schreiber, C., Behrendt, D., Huber, G., Pfaff, C., Widzgowski, J., Ackermann, B., Muller, A., Zachleder, V., Moudrikova, S., Mojzes, P., Schurr, U., Grobbelaar, J. ve Nedbal, L., (2017). "Growth of Algal Biomass in Laboratory and in Large-Scale Algal Photobioreactors in The Temperate Climate of Western Germany", Bioresource Technology, 234: 140-149.
- [206] Tubuler Photobioreactor, <http://bbi-biotech.com/en/produkte/fermenter-bioreaktoren/photobioreaktoren/>, 10 Mayis 2017.
- [207] Algae-Photobioreactor, <https://dir.indiamart.com/impcat/algae-photobioreactor.html>, 10 Mayis 2017.
- [208] Iorhemen, O.T., Hamza, R.A. Ve Tay, J.H., (2017). "Membrane Fouling Control in Membrane Bioreactors (Mbrs) Using Granular Materials", Bioresource Technology.
- [209] Prokop, A., (1988). "An Integration of Cultivation and Purification in Membrane Bioreactors: Production of Monoclonal Antibodies and Lymphokines by Microencapsulated Hybridomas", Molecular Biotherapy, 1: 61-73.
- [210] Membrane Bioreactor System, http://www.hitachi-infra.com.sg/services/environmental_systems/sewage_pretreatment/membrane_od.html, 10 Mayis 2017.
- [211] Rodriguez, L., Cerrillo, M.I., Garcia-Albiach, V. ve Villasenor, J., (2012). "Domestic Sewage Sludge Composting in a Rotary Drum Reactor: Optimizing The Thermophilic Stage", Journal of Environmental Management, 112: 284-291.
- [212] Rotary Drum Bioreactor, https://en.wikipedia.org/wiki/rotating_biological_contactor, 10 Mayis 2017.
- [213] Ceccarini, C. ve Eagle, H., (1971). "Ph as a Determinant of Cellular Growth and Contact Inhibition", Proceedings of the National Academy of Sciences U S A, 68: 229-233.
- [214] Surrao, D.C., Boon, K., Borys, B., Sinha, S., Kumar, R., Biernaskie, J. ve Kallos, M.S., (2016). "Large-Scale Expansion of Human Skin-Derived Precursor Cells (Hskps) in Stirred Suspension Bioreactors", Biotechnology Bioengineering, 113: 2725-2738.

- [215] Razzak, S.A., Ilyas, M., Ali, S.A. ve Hossain, M.M., (2015). "Effects of Co(2) Concentration and Ph on Mixotrophic Growth of *Nannochloropsis Oculata*", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176: 1290-1302.
- [216] Darvishi, F., Moradi, M., Madzak, C. ve Jolival, C., (2017). "Production of Laccase by Recombinant *Yarrowia Lipolytica* from Molasses: Bioprocess Development Using Statistical Modeling and Increase Productivity in Shake-Flask and Bioreactor Cultures", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181: 1228-1239.
- [217] Agabalyan, N.A., Borys, B.S., Sparks, H.D., Boon, K., Raharjo, E.W., Abbasi, S., Kallos, M.S. ve Biernaskie, J., (2017). "Enhanced Expansion and Sustained Inductive Function of Skin-Derived Precursor Cells in Computer-Controlled Stirred Suspension Bioreactors", *Stem Cells Translational Medicine*, 6: 434-443.
- [218] Tang, Y.J., Li, H.M. ve Hamel, J.F., (2009). "Significances of Ph and Temperature on The Production of Heat-Shock Protein Glycoprotein 96 by Metha Tumor Cell Suspension Culture in Stirred-Tank Bioreactors", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32: 267-276.
- [219] Olmer, R., Lange, A., Selzer, S., Kasper, C., Haverich, A., Martin, U. ve Zweigerdt, R., (2012). "Suspension Culture of Human Pluripotent Stem Cells in Controlled, Stirred Bioreactors", *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18: 772-784.
- [220] Van Hellemond, J.J., Opperdoes, F.R. ve Tielens, A.G., (1998). "Trypanosomatidae Produce Acetate via a Mitochondrial Acetate:Succinate Coa Transferase", *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 95: 3036-3041.
- [221] Campos-Neto, A., Porrozz, R., Greeson, K., Coler, R.N., Webb, J.R., Seiky, Y.A., Reed, S.G. ve Grimaldi, G., (2001). "Protection Against Cutaneous Leishmaniasis Induced by Recombinant Antigens in Murine and Nonhuman Primate Models of The Human Disease", *Infection and Immunity*, 69: 4103-4108.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mehmet Aydoğdu
Doğum Tarihi ve Yeri : 05.03.1991, Fatih
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : mmt166@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2017
Lisans	Genetik ve Biyomühendislik	Fatih Üniversitesi	2014

YAYINLARI

Makale

1. Bağirova, M., Allahverdiyev, A. M., Abamor, E. S., Ullah, I., Coşar, G., Aydoğdu, M., Şentürk, H., Ergenoğlu, B. (2016). "Overview of dendritic cell-based vaccine development for leishmaniasis", Parasite Immunology, 38(11): 651-662.

Bildiri

1. Dilek Demircan, Mehmet Aydoğdu, Abdullah Yılmaz, Aydın Karabulut, Günnur Deniz (2013). "Farklı Monosit Kökenli Dendritik Hücre Farklılaştırma Protokollerinin Karşılaştırılması" 22. Ulusal İmmünoloji Kongresi, Türkiye.

