

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK (TIP) DOKTORA PROGRAMI**

**FOTODİNAMİK TEDAVİNİN *LEISHMANIA TROPICA*
ÜZERİNE OLAN *IN VITRO* ETKİSİ**

**Serçin ÖZLEM ÇALIŞKAN
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Hatice ERTABAKLAR**

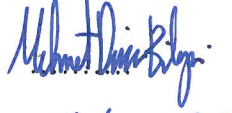




Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TPF-13015 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Serçin ÖZLEM ÇALIŞKAN tarafından hazırlanan “Fotodinamik Tedavinin *Leishmania tropica* üzerine olan *in vitro* etkisi ” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/11/2015

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN	ADÜ TIP FAKÜLTESİ	
Üye : Prof.Dr. Mehmet BİLGİN	ADÜ TIP FAKÜLTESİ	
Üye : Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY	PAÜ TIP FAKÜLTESİ	
Üye : Prof. Dr. Murat PEHLİVAN	EGE TIP FAKÜLTESİ	
Üye : Yard.Doç.Dr. Özlem BOZKURT	ADÜ TIP FAKÜLTESİ	

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca en iyi şekilde yetişmemi ve gelişmemi sağlayan her zaman desteğini hissettiğim tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN başta olmak üzere, hocalarım Prof. Dr. Hatice ERTABAKLAR ve Prof. Dr. Sema ERTUĞ'a, zaman ve yardımlarını esirgemeyen Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı ailesinin diğer üyelerine,

Doktora eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen mesai arkadaşlarım Kerim ÇOLAK, Erdoğan MALATYALI ve İbrahim YILDIZ'a

Doktora eğitimimde önemli pay sahibi olan başta eşim Metin ÇALIŞKAN olmak üzere sevgili annem Sevil ÖZLEM ve sevgili babam Prof. Dr. Mehmet Besim ÖZLEM'e

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği Bilimsel Araştırmalar Projesi aracılığıyla sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne, Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline ve bugünlere ulaşmamda katkıda bulunan herkese en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Tarihçe ve Sistematikteki Yeri	2
2.2. Morfolojisi.....	4
2.2.1 Amastigot	4
2.2.2. Promastigot.....	5
2.3. Yaşam Döngüsü.....	5
2.4. Leishmaniasis	7
2.4.1. Kutanöz Leishmaniasis.....	8
2.4.2. Mukakutanöz Leishmaniasis	8
2.4.3. Visseral Leishmaniasis	8
2.5. Epidemiyolojisi.....	9
2.6. Kutanöz leishmaniasisde Tanı	9
2.6.1. Klinik Tanı.....	9
2.6.2. Etkensel Tanı	10
2.6.2.1. Örneğin alınması	10
2.6.2.2. Direkt Boyalı Mikroskopik İnceleme	10
2.6.2.3. Kültür Yöntemi.....	11
2.6.2.4. Moleküler Tanı Yöntemi	11
2.7. Tedavi	11
2.8. Fotodinamik Tedavi.....	12
2.8.1. Fotodinamik Tedavi Etki Mekanizması	13

2.8.2. Fotosensitif Ajanlar	15
2.8.2.1. Porfirin Türevi Fotosensitif Ajanlar	15
2.8.2.2. Porfirin Olmayan Fotosensitif Ajanlar	16
2.8.3. Metilen Mavisi:	17
2.8.4. Kloralüminyum Ftalosiyanın:.....	18
2.8.5. Toluidin Mavisi :	19
2.8.6. Feoforbid a.....	21
2.8.7. Işık Kaynakları	22
2.8.8. Kutanöz Leishmaniasis Tedavisinde Fotodinamik Tedavi.....	22
2.8.9. Fotodinamik Tedavi Sonrası Parazitlerde Hücresel Mekanizma	24
2.9. Apoptozis.....	24
2.9.1. Apoptozisde Görülen Morfolojik Değişiklikler	24
2.9.2. Leishmania'da Apoptozis	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Gereç.....	27
3.1.1. Kimyasal Ajanlar.....	27
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	27
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler.....	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Parazitlerin Elde Edilmesi ve Besiyerinde Üretilmesi	28
3.2.2. Parazit Yoğunluğunun Ayarlanması.....	29
3.2.3. Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı.....	29
3.2.4. Kimyasal Ajanların Stok Solüsyonları ve Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....	29
3.2.4.1. Metilen Mavisi Konsantrasyonları	29
3.2.4.2. Toluidine Mavisi Konsantrasyonları	30
3.2.4.3. Kloralüminyum Ftalosiyanın Konsantrasyonları	31
3.2.4.4. Feoforbid a Konsantrasyonları	31
3.2.5. Kimyasal Ajan-besiyeri Karışımlarının Hazırlanması ve İnokülasyon İşlemi.....	32
3.2.6. İnkübasyon İşlemi	34
3.2.7. Fotodinamik Tedavinin in vitro Etkinliğinin Belirlenmesi	35
3.2.7.1. Deney Grupları	35
3.2.7.2. Deney Gruplarına Fotodinamik Tedavi Uygulama Yöntemi	36
3.3. Değerlendirme Yöntemleri.....	36

3.3.1. Mikroskopik Değerlendirme.....	37
3.3. XTT (2,3,-bis [2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolium-5-kaboksanilit tuzu) Testi	37
3.3.3. Hücresel Morfolojik Değerlendirme	38
3.3.3.1. Giemsa Boyama.....	38
3.3.3.2. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Boyama	39
3.3.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi ile DNA Fragmentasyon Testi	39
3.4. İstatistik	40
4. BULGULAR	42
4.1. Hücre Canlılığı Değerlendirme Bulguları	42
4.1.1. Grup 1: Metilen mavisi+FDT Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi.....	42
4.1.2. Grup 2: Metilen Mavisi Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi	43
4.1.3. Grup 3: Toluidin mavisi+FDT Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi.....	45
4.1.4. Grup 4: Toluidin Mavisi Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi.....	46
4.1.5. Grup 5: Kloralüminyum Ftalosiyonin+FDT Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi	47
4.1.6. Grup 6: Kloralüminyum Ftalosiyonin Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi	48
4.1.7. Grup 7: Feoforbid a +FDT Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi.....	50
4.1.8. Grup 8: Feoforbid a Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi.....	51
4.2. XTT Yöntemi ile Elde Edilen Sitotoksisite Sonuçları	53
4.3. Hücresel Morfolojik Değerlendirme Bulguları	59
4.3.1. Giemsa Boyama Bulguları	59
4.3.1.1. Grup 1: Metilen Mavisi+FDT Uygulamasının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi	59
4.3.1.2. Grup 2: Metilen Mavisi Uygulamasının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi	60

4.3.1.3. Grup 3: Toluidin Mavisi+FDT Uygulamasının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi	61
4.3.1.4. Grup 4: Toluidin Mavisi Uygulamasının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi	62
4.3.1.5. Grup 5: Kloralüminyum Ftalosiyanın + FDT Uygulamasının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi.....	63
4.3.1.6. Grup 6: Kloralüminyum Ftalosiyanın Uygulamasının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi	64
4.3.1.7. Grup 7: Feoforbid a +FDT Uygulamasının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi	65
4.3.1.8. Grup 8: Feoforbid a Uygulamasının <i>L.tropica</i> Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi	66
4.3.2. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Boyama	67
4.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi ile DNA Fragmentasyon Testi Bulguları	70
5. TARTIŞMA.....	72
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	79
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	91

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALA	: Amino-levulinic asit
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDT	: Fotodinamik Tedavi
<i>L.tropica</i>	: <i>Leishmania tropica</i>
MAL	: Methyl aminolevulinate
NNN	: Novy, Nicolle, Mac Neal
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
XTT tuzu	: 2,3,-bis [2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolium-5-kaboksanilit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Leishmanianın Yaşam döngüsü.	6
Şekil 2 FDT etki mekanizması.....	14
Şekil 3. Etanolde çözülmüş metilen mavisinin absorpsiyon spektrumu	17
Şekil 4. Metilen mavisinin moleküler yapısı.....	18
Şekil 5. Etanolde çözülmüş çinko ve kloralminyum ftalosiyoninin absorpsiyon spektrumu	19
Şekil 6. Kloralüminyum ftalosiyoninin moleküler yapısı	19
Şekil 7. Toluidin mavisinin etanolde metilen mavisi ile absorpsiyonlarının karşılaştırılması.....	20
Şekil 8. Toluidin mavisinin kimyasal yapısı	20
Şekil 9. Klorofilin parçalanması ile oluşan ürünler	21
Şekil 10. Feoforbid a kimyasal yapısı ve etanolde absorpsiyon spektrumu.....	21
Şekil 11. Işık kaynaklarının dalga boyu penetrasyonları.....	22
Şekil 12. Apoptozda oluşan morfolojik değişiklikler.....	25
Şekil 13. Erken ve geç apoptozu belirlemek için kullanılan yöntemler.....	25

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. <i>Leishmania tropica</i> 'nın amastigot formu	4
Resim 2. <i>Leishmania tropica</i> 'nın promastigot formu	5
Resim 3. Parazitin çoğaltılması	28
Resim 4. Metilen mavisinin PBS içindeki absorpsiyon spektrumu	30
Resim 5. Toluidin mavisinin PBS içindeki absorpsiyon spektrumu	30
Resim 6. Kloralüminyum ftalosiyanın PBS içindeki absorpsiyon spektrumu	31
Resim 7. Feoforbid a PBS içindeki absorpsiyon spektrumu	32
Resim 8. Metilen mavisi-besiyeri konsantrasyonlarının hazırlanması	32
Resim 9. Toluidin mavisi- besiyeri konsantrasyonlarının hazırlanması	33
Resim 10. Kloralüminyum ftalosiyanın- besiyeri konsantrasyonlarının hazırlanması ...	33
Resim 11. Feoforbid a- besiyeri konsantrasyonlarının hazırlanması	34
Resim 12. İnkübasyon işlemi.....	34
Resim 13. FDT uygulama düzeneği.....	36
Resim 14. Dört saat sonundaki inkübatörden çıkan XTT testi görüntüsü.....	38
Resim 15. Metilen mavisi+FDT uygulanan <i>L.tropica</i> promastigotların invert mikroskop görüntüsü.....	42
Resim 16. Metilen mavisi uygulanan <i>L.tropica</i> promastigotların invert mikroskop görüntüsü.....	43
Resim 17. Metilen mavisinin tek başına ve FDT ile birlikte kullanılmasının <i>L.tropica</i> promastigotları üzerindeki etkisi.....	44
Resim 18. Toluidin mavisi+FDT uygulanan <i>L.tropica</i> promastigotların invert mikroskop görüntüsü.....	45
Resim 19. Toluidin mavisi uygulanan <i>L.tropica</i> promastigotların invert mikroskop görüntüsü.....	46
Resim 20. Toluidin mavisinin tek başına ve FDT ile birlikte kullanılmasının <i>L.tropica</i> promastigotları üzerindeki etkisi.....	46
Resim 21. Kloralüminyum ftalosiyonin+FDT uygulanan <i>L.tropica</i> promastigotların invert mikroskop görüntüsü.....	48

Resim 22. Kloralüminyum ftalosiyonin uygulanan <i>L.tropica</i> promastigotların invert mikroskop görüntüsü.....	49
Resim 23. Kloralüminyum ftalosiyoninin tek başına ve FDT ile birlikte kullanılmasının <i>L.tropica</i> promastigotları üzerindeki etkisi.....	49
Resim 24. Feoforbid a +FDT uygulanan <i>L.tropica</i> promastigotların invert mikroskop görüntüsü (x20).....	50
Resim 25. Feoforbid a +FDT uygulanan <i>L.tropica</i> promastigotların invert mikroskop görüntüsü.....	51
Resim 26. Feoforbid a uygulanan <i>L.tropica</i> promastigotların invert mikroskop görüntüsü (x20).....	52
Resim 27. Feoforbid a'nin tek başına ve FDT ile birlikte kullanılmasının <i>L.tropica</i> promastigotları üzerindeki etkisi.....	52
Resim 28. Sadece metilen mavisi ve FDT ile birlikte kullanılmasının farklı konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> promastigotların canlılığına etkisi.....	54
Resim 29. Sadece toluidin mavisi ve FDT ile birlikte kullanılmasının farklı konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> promastigotların canlılığına etkisi.....	55
Resim 30. Sadece feoforbid a ve FDT ile birlikte kullanılmasının farklı konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> promastigotların canlılığına etkisi.....	57
Resim 31. Sadece Kloralüminyum ftalosiyonin ve FDT ile birlikte kullanılmasının farklı konsantrasyonlarının <i>L.tropica</i> promastigotların canlılığına etkisi.....	58
Resim 32. Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki metilen mavisi +FDT gruplarının Giemsa boyama ile mikroskopik görüntüsü (x100)	60
Resim 33. Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki metilen mavisi gruplarının Giemsa boyama ile mikroskopik görüntüsü (x100).....	61
Resim 34. Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki toluidin+FDT gruplarının Giemsa boyama ile mikroskopik görüntüsü (x100).....	62
Resim 35. Kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki toluidin gruplarının Giemsa boyaması ile mikroskopik görüntüsü.....	63
Resim 36. Kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki kloralüminyum ftalosiyonin + FDT gruplarının Giemsa boyaması ile mikroskopik görüntüsü.....	64
Resim 37. Kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki kloralüminyum ftalosiyonin gruplarının Giemsa boyaması ile mikroskopik görüntüsü.....	65

Resim 38. Kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki feoforbid a + FDT gruplarının Giemsa boyaması ile mikroskopik görüntüsü.....	66
Resim 39. Kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki feoforbid a gruplarının Giemsa boyaması ile mikroskopik görüntüsü.....	67
Resim 40. DAPI Boyamanın ardından kontrol ve deney gruplarının floresan mikroskop görüntüleri	69
Resim 41. Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi.	70

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Leishmaniasis kliniği ve etkenlerine göre sınıflandırılması	7
Tablo 2. Porfirin türevi birinci kuşak ajanlar	15
Tablo 3. Porfirin türevi ikinci kuşak ajanlar	16
Tablo 4. Porfirin türevi olmayan fotosensitif ajanlar	17
Tablo 5. Farklı konsantrasyonlarda metilen mavisi + FDT uygulaması ile farklı konsantrasyonlarda sadece metilen mavisi uygulamasının karşılaştırılması.....	45
Tablo 6. Farklı konsantrasyonlarda toluidin mavisi + FDT uygulaması ile farklı konsantrasyonlarda sadece toluidin mavisi uygulamasının karşılaştırılması.....	47
Tablo 7. Farklı konsantrasyonlarda kloralüminyum ftalosiyonin + FDT uygulaması ile farklı konsantrasyonlarda sadece kloralüminyum ftalosiyonin uygulamasının karşılaştırılması.....	50
Tablo 8. Farklı konsantrasyonlarda feoforbid a + FDT uygulaması ile farklı konsantrasyonlarda sadece feoforbid a uygulamasının karşılaştırılması.....	53
Tablo 9. Farklı konsantrasyonlarda metilen mavisi ve metilen mavisi + FDT uygulamasının kontrol grubu ile karşılaştırılması	54
Tablo 10. Farklı konsantrasyonlarda toluidin mavisi ve toluidin mavisi + FDT uygulaması ile kontrol grubunun karşılaştırılması	56
Tablo 11. Farklı konsantrasyonlarda feoforbid a ve feoforbid a + FDT uygulaması ile kontrol grubunun karşılaştırılması.....	57
Tablo 12. Farklı konsantrasyonlarda kloralüminyum ftalosiyanin ve kloralüminyum ftalosiyanin + FDT uygulamasının kontrol grubu ile karşılaştırılması	58

ÖZET

FOTODİNAMİK TEDAVİNİN *LEISHMANIA TROPICA* ÜZERİNE OLAN *İN VİTRO* ETKİSİ

Çalışkan Özlem S. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Programı Doktora Tezi, Aydın, 2015.

Phelebotomus türü sineklerle bulaştırılan ve “Şark Çıbanı” olarak adlandırılan kutanöz leishmaniasisin (KL), ülkemizde etkeni sıklıkla *Leishmania tropica*’dır. Fotodinamik tedavi (FDT) fotosensitif ajan ve görünür dalga boylarında ışığın birlikte kullanarak, moleküler oksijen varlığında başlıca singlet oksijen oluşturmasıyla hedef hücrelerde nekroz ve/veya apoptozise yol açan bir tedavi yöntemidir. Bu çalışmada KL enfeksiyonlarının etkeni olan *L.tropica* promastigotlarında metilen mavisi (MB), toluidin mavisi (TB), kloralimünyum ftalosiyenin (AICIPc) ve feoforbid a (Pa) kullanarak FDT’nin etkinliğinin *in vitro* olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Parazitler bir saat boyunca artan konsantrasyonlarda MB, TB, AICIPc ve Pa ile inkübe edildi. Ajanlar besiyerinden uzaklaştırılıp PBS ile yıkandı ve PBS eklenen parazitlere 30 dakika boyunca beyaz diyot ışık uygulandı. Metilen mavisi, toluidin mavisi, alüminyum ftalosiyenin ve feoforbid a konsantrasyonlarının fonksiyonlarının *L.tropica* promastigotları üzerine etkisi 26°C’de 18 saat inkübasyondan sonra; hücre canlılığı, morfolojik değişiklikler ve apoptotik deneyler ile değerlendirilmiştir. FDT etkinliği kontrol grubu, ışık + ajan veya yalnız ajan uygulaması ile yapılan tüm deneyler için değerlendirildi.

Metilen mavisi, toluidin mavisi ve feoforbid a + FDT uygulanan gruplarda canlı *L.tropica* promastigot sayısı sadece ajan uygulanan gruplar ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak sadece ajan uygulanan gruplara göre anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p<0,001$ $p<0,05$ $p<0,0001$). Kloralüminyum ftalosiyenin +FDT uygulaması ise sadece AICIPc’ye maruz kalan deney grubundaki hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,07$) olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca tüm fotosensitif ajanlar + FDT uygulamasının kontrol grubuna göre canlı parazit sayısında dikkat çekici azalma gözlenmiştir. Hücresel olarak apoptozun belirlenmesinde kullanılan DAPI boyama sonuçlarına göre MB, AICIPc, PA + FDT uygulamasının *L.tropica* promastigotları üzerinde etkili oldukları gözlenmiştir.

Aynı zamanda MB, AIClPc, Pa + FDT'ye maruz kalan gruplarda apoptozun belirteci olan apoptotik DNA merdiveni görüntüsüne rastlanır iken kontrol, MB, AIClPc, tek başına TB ve TB+FDT ile beraber uygulandığı gruplarda bu görüntüye rastlanmamıştır.

Bu çalışmada gösterilen sonuçlar bize parazitin sadece promastigot formunu kullanarak Leishmaniasis üzerine fotodinamik tedavinin etkileri hakkında fikir vermiş ve parazite karşı alternatif bir tedavi için yeni yaklaşım olabileceğini göstermiştir. *L.tropica* promastigotlarına metilen mavisi, kloralüminyum falosiyanın ve feoforbid a + FDT uygulandığında meydana gelen hücre ölümünün apoptoz ile destekler bulgular olduğu düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Leishmania tropica*, Fotodinamik Tedavi, Metilen mavisi, toluidin mavisi O, Kloralüminyum fitalosiyanın, feoforbid a

ABSTRACT

In Vitro Effect of Photodynamic Therapy on *Leishmania Tropica*

Çalışkan Özlem S. Adnan Menderes University, *Institute of Health Sciences, Department of Biophysics, PhD Thesis, Aydın, 2015.*

Leishmaniasis is a vectorborne disease transmitted by Phlebotomus species and the cutaneous form (CL) of disease is known as "Şark Çıbanı". *Leishmania tropica* is the most often agent of cutaneous leishmaniasis (CL) in Turkey. Photodynamic therapy (PDT) is a treatment which uses of a light-sensitive drug (a photosensitizer) in combination with light of a visible wavelength, to destroy target cells (cancerous and non-cancerous) by generating mainly singlet oxygen in the presence of molecular oxygen. In this study, we investigated the effects of PDT using different photosensitizers, namely methylene blue (MB), toluidine blue (TB), aluminum ftalosiyenin chlorid (AIClPc) and pheporbide a (Pa) in *L. tropica* promastigotes.

Parasites were incubated with increasing concentrations of TB, MB, AIClPc and Pa for one hour. After the media containing photosensitizers were removed, promastigotes were washed with PBS. Fresh PBS was added and parasites were illuminated with a white light source for 30 min. Following the irradiation of the cells, fresh growth medium was added. After incubation at 26°C for 18 h, the cell viability (analyzed using a hemocytometer and XTT colorimetric assay), morphological changes (staining with giemsa) and apoptotic assay (staining with DAPI and DNA fragmentation assay) of *Leishmania tropica* parasites were evaluated as a function of MB, TB, AIClPc and PPA concentration. The efficiency of PDT was investigated using irradiation+ photosensitizers, photosensitizers alone and in control group in all experiments.

Parasite viability was significantly different ($p < 0,001$ $p < 0,05$ $p < 0,0001$) between groups treated with MB, TB and PPA with or without irradiation. There were no statistically significant differences in cell viability between AIClPc treated *L. tropica* promastigotes with and without irradiation ($p = 0,07$). Viability of *L. tropica* promastigotes was significantly lower than control groups in all PDT groups including all photosensitizers.

Also, DAPI staining method, which is used to determine cellular changes in apoptotic cells, showed that MB, AIClPc and PA with irradiation affected on *L. tropica* promastigotes.

Furthermore, DNA ladder pattern defining the apoptosis, was observed in irradiated MB,AlClPc and PA groups and not observed in TB with irradiation, AlClPc, TB, MB and PA without irradiation.

The findings of this study promoted insight on the effects of PDT on *Leishmania* using the promastigote form of the parasite and has opened a new perspective for the alternative treatment of the parasites. The results also revealed that apoptosis induced cell death was observed in *L.tropica* promastigotes after the application of photosensitizers in combination with light irradiation

Key Words: *Leishmania tropica*, Photodynamic therapy, Metyhlene blue, toluidine blue, aluminum phthalocyanine chloride, Feoforbid a

1. GİRİŞ

Leishmaniasis vektör Phlebotomuslar (tatarcık, yakarca vb.) tarafından bulaştırılan yirmiden fazla *Leishmania* türününün yol açtığı kendi kendine iyileşen deri lezyonlarından ölümcül iç organ tutulumuna varan değişik klinik tablolara yol açan 98 ülkede 4 kıtada görülen önemli bir paraziter enfeksiyon hastalığıdır. Dünyada 13 türün dermatropik olduğu bilinmektedir. Ülkemizde görülen kutanöz leishmaniasis etkeni sıklıkla *Leishmania tropica* olup, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yılda ortalama 2000 civarında olgunun saptandığı bilinmekte ve hastalık her geçen gün daha fazla bölgemize yayılmaktadır. Halk arasında “Şark çıbanı” adı ile bilinen kutanöz leishmaniasis, yüz el kol bacak gibi vücudun açıkta kalan bölgelerinde uzun süreli iyileşmeyen deri lezyonları ile karakterizedir. Kutanoz Leishmaniasis’in tedavisinde halen tüm kutanöz leishmaniasis lezyonlarında kabul edilmiş standart bir tedavi şeması bulunmamaktadır. Günümüzde uygulanan tedavi yöntemleri etken olan *Leishmania* türüne, hastadaki kutanöz leishmaniasis inik tabloya, kişinin immun sistemine vb göre değişmektedir. kutanöz leishmaniasis ’de yan etkileri az olan etkin bir tedavi şekli bulunmamaktadır ve tedavide yaşanan sıkıntılar nedeniyle her geçen gün yeni kimyasal, bitkisel ajan uygulamaları ve fotodinamik tedavi gibi yeni, ucuz, kolay uygulanabilen, yan etkisi az olan alternatif tedavi seçenekleri araştırılmaktadır.

Fotodinamik tedavi (FDT) fotosensitif ajan ve görünür dalga boylarında ışığın birlikte kullanarak, moleküler oksijen varlığında başlıca singlet oksijen oluşturmasıyla hedef hücreleri (kanser ve kanser dışı) yok eden bir tedavi şeklidir. FDT uygulamasının paraziter hastalıklardaki kullanımı çok yeni olup, son yıllarda fotodinamik tedavinin deneysel ve doğal kutanöz leishmaniasis üzerindeki etkinliği araştırılmaktadır.

Bu araştırmada *L. tropica* promastigotları üzerinde *in vitro* olarak dört değişik fotosensitif ajan kullanılarak fotodinamik tedavinin etkinliği araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın özgünlüğü ülkemizde en önemli kutanöz leishmaniasis etkeni olan *L. tropica* ile yapılacak ilk *in vitro* fototerapi çalışması olmasıdır. Tedavi için 4 farklı fotodinamik tedavi ajanı denenmiştir. Bunlardan metilen mavisi, kloralüminyum ftalosiyanın, toluidin mavisi diğer *Leishmania* türlerinde denenmiştir fakat *L.tropica*’da ilk kez bu çalışmayla etkisi araştırılmıştır. Diğer ajan feoforbid a ise daha önce hiçbir leishmania enfeksiyonunda denenmemiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Dünyada 98 ülkede endemik olduğu bildirilen leishmaniasis etkeni olan *Leishmania* parazitleri insanların yanı sıra vahşi ve evcil karnivorlar ve küçük memelileri enfekte etmekte ve kum sinekleri (*Phlebotomus*, yakarca, tatarcık) ile bulaştırılmaktadır. Her yıl dünyada 350 milyon kişinin risk altında olduğu ve 2 milyon yeni olgunun görüldüğü bildirilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün Leishmaniasis'in analizlerine göre en ciddi enfeksiyon hastalıkları sıralamasında dokuzuncu sırada yer aldığı bildirilmektedir (Hotez ve ark, 2007; WHO 2015).

Enfeksiyonun, *Leishmania* türüne, kişinin immun direncine göre değişmek üzere tedavi edilmediğinde ölümcül olabilen visseral tutulum olabileceği gibi kendi kendine iyileşen sadece derinin tutulduğu farklı klinik tablolara yol açtığı bilinmektedir. Türkiye'de visseral ve kutanöz leishmaniasis görülmektedir. Hastalık ülkemizde A grubu bildirim zorunlu hastalıklar içinde olup, tedavisi Sağlık Bakanlığı tarafından kurulan Şark Çıbanı Tanı ve Tedavi Merkezler'inde ücretsiz olarak uygulanmaktadır. Sağlık Bakanlığı hastalığın ülkemizden eradikasyonu amacı ile çalışmalar başlatmıştır. Türkiye'de olguların çoğunluğu Güneydoğu Anadolu bölgesinden olmak üzere yılda 2000'in üzerinde kutanöz leishmaniasisli olgu bildirilmektedir (Özbel ve Özensoy 2007; Ok ve ark, 2002). Aydın ili kutanöz leishmaniasis açısından endemik bölge olup batıdaki en önemli odaktır. Hastalığın hem visseral leishmaniasis formu, hem de kutanöz leishmaniasis formu ilimizde görülmektedir. Aydın ilinde 1996-2004 yılları arasında 159 kutanöz leishmaniasis olgusu bildirilmiştir (Ertabaklar ve ark, 2005).

2.1. Tarihçe ve Sistematikteki Yeri

Leishmania parazitleri ilk olarak 1900 yılında Hindistan'da dizanteriye yakalanan bir hastanın dalak preparatında William Leishman tarafından görülmüş ve bulgularını 1903 yılında yayınlamıştır. Aynı yıl Donovan visseral leishmaniasisli hastaların dalağında elde ettiği örneklerde paraziti tespit etmiş ve bulgularını yayınlamıştır. Parazite ilk önce 'Piroplasma donovani' adı verilmiş, sonraki yıllarda Ronald Ross paraziti *L. donovani* olarak adlandırmıştır. *Leishmania* promastigotları ilk kez 1904 yılında Rogers tarafından sıratlı hasta kanından üretilmiş ve 1908 yılında Nicolle tarafından Novy, Nicolle, Mac Neal (NNN)

besiyerinde *Leishmania tropica*'nın kültürünü yaptığı bildirilmiştir. Aynı yıl Nicolle ve Compte tarafından Tunus'ta köpeklerde *Leishmania* parazitleri tespit edilmiş ve Nicolle tarafından bu parazite *L. infantum* adı verilmiştir (Merdivenci, 1981; Altıntaş, 1993; Saygı, 1998). Yakimow 1913 yılında Şark Çıbanı'nın etkeninin iki şeklinin bulunduğunu isimlerinin *L.tropica* majör ve *L.tropica* minor olduğunu ileri sürmüştür. Adler ve Theoder 1925 yılında ise Phlebotomus'larda promastigotları tespit etmişler ve deneysel olarak Phlebotomus'dan insana Şark Çıbanı'nı geçirmişlerdir. Adler ve Ber 1941'de ise tatarcıkların sokması ile insandan insana Şark Çıbanı'nın kesin olarak geçtiği gösterilmiştir (Altıntaş, 1993; Özbel ve Özensoy, 2007).

Leishmania türlerinin ayırım ve sınıflandırmasında yaptığı hastalıklar, coğrafik yayılış, biyolojik, immünolojik, biokimyasal ve enzimatik özellikler gibi verilerden yararlanır. *Leishmania* türlerinin sınıflandırılmasında tam olarak ortak bir noktaya varılamasa da, Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan son çalışmalar doğrultusunda aşağıdaki sınıflandırmanın uygun olduğu bildirilmiştir (Özbel ve Özensoy, 2007).

Kingdom: Protista

Subkingdom: Protozoa

Phylum : Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Class: Zoomastigophora

Order : Kinetoplastida

Family : Trypanosomatidae

Genus: *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia*, , *Endotrypanum*, *Phytomonas*, *Leptomonas*

Genus: *Leishmania*

Subgenus: *Leishmania*

Species: *Leishmania tropica*, *Leishmania majör*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi*, , *Leishmania aethiopica*, *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*, *L.amazonensis*, *L. enrietti*, *L. pifanoi*)

Subgenus: *Viannia*

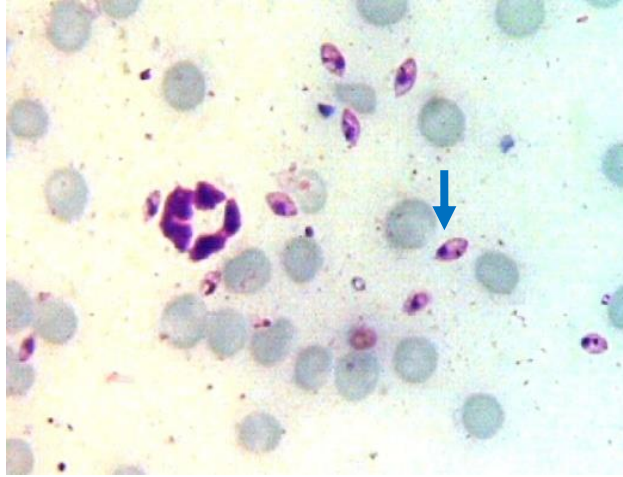
Species: *Leishmania braziliensis* kompleksi (*L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. equatorensis*, *L. colombiensi*), *Leishmania guyanensis* (*L. guyanensis*, *L. panamenensis*, *L. shawi*), *Leishmania lainsoni*, *Leishmania naiffi*.

2.2. Morfolojisi

Leishmania parazitlerinin insan ve diğer memelilerde amastigot, vektörlerde ise promastigot olmak üzere iki farklı morfolojik formu bulunmaktadır.

2.2.1. Amastigot

Parazitlerin amastigot formu, 1-3 µm eninde, 2-5 µm boyunda, yuvarlak veya oval, hareketsiz ve çoğalması 37°C'de uzunlamasına bölünerek gerçekleşir. Büyük bir nükleus sitoplazmanın arka ucuna yakın bir pozisyona yerleşmiştir ve nükleusa yakın kinetoplast bulunur. Giemsa ile boyanmış amastigotun sitoplazması mavi, çekirdeği pembe veya koyu kırmızı renkte görülür. Kinetoplast çekirdeğin yanında parlak kırmızı veya menekşe renginde boyanır (Resim 1).

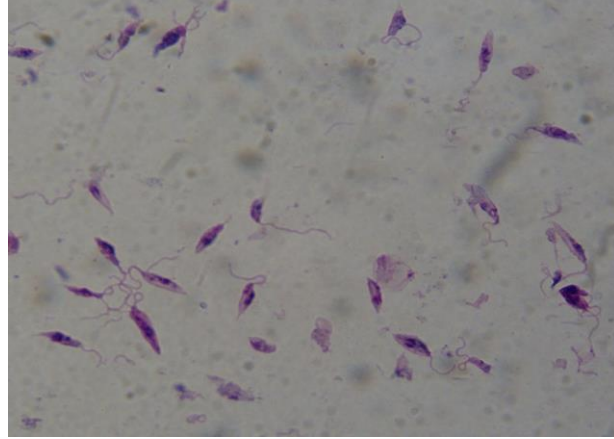


Resim 1. *Leishmania tropica* 'nın amastigot formu

Kinetoplasta yakın pozisyonda yerleşmiş, şekli noktaya benzer bir kamçı kökü (bleforablast) ve bleforablasttan çıkarak ön kısma kadar uzanan bir aksonem bulunmaktadır. Tüm *Leishmania* türlerinde sitoplazmada bir mitokondri yer almaktadır. Golgi aygıtı ve lizozomlar çeşitli enzim aktiviteleri ile parazitin beslenmesine yardımcı oldukları bildirilmiştir (Yaşarol, 1981).

2.2.2. Promastigot

Tatarcıkların bağırsaklarında ve *in vitro* kültür ortamlarında bulunan, boyları 15-20 µm ve genişlikleri 1,5-5 µm olan mekik şeklindeki promastigotlar ön uçlarından çıkan serbest bir kamçıya sahiptir ve 27°C 'de uzunlamasına bölünerek çoğalır (Resim 2) (Garcia, 2001; Özbel ve Özensoy, 2007).



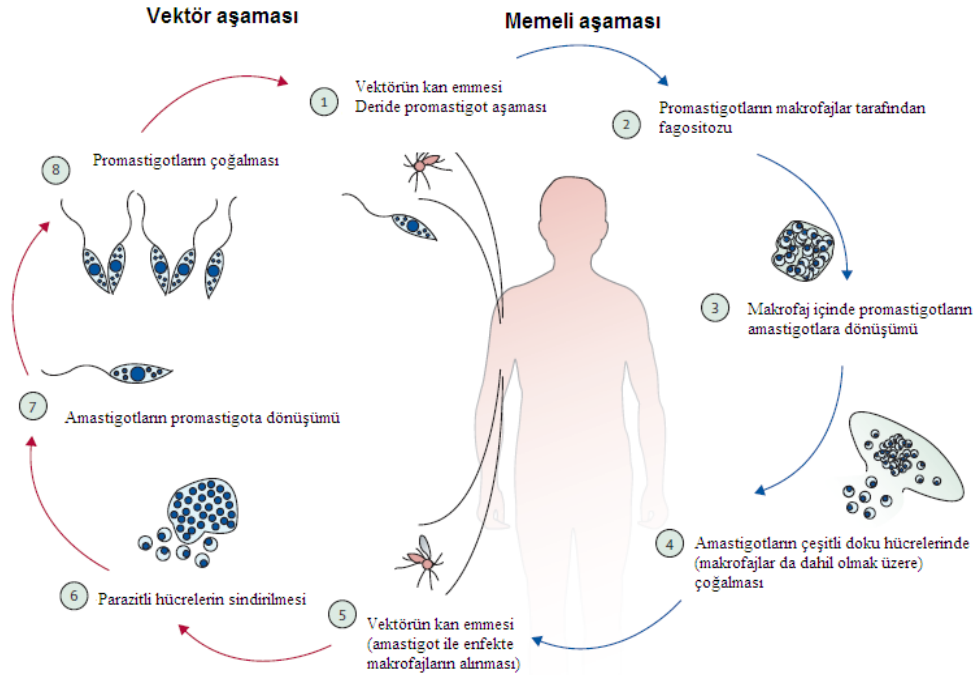
Resim 2. *Leishmania tropica* 'nın promastigot formu

Ön uçtan dışarı uzanan bleforoplasttan çıkan bir adet kamçısı vardır. Kamçının bir çift merkez ve dokuz çift periferik fibril çiftinden oluşan bir aksonemi ve ön uçta yuvarlak veya at nalı şeklinde kinetoplastı vardır. Nukleus merkezdedir. Sitoplazmada endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı gibi organeller bulunmaktadır (Bryceson, 1996).

2.3. Yaşam Döngüsü

Dişi tatarcıklar enfekte konaktan kan emme sırasında alınan amastigotlar ile enfekte olurlar. Kan ile alınan amastigotların bir kısmı sindirilirken, bir kısmı da orta bağırsakta bölünüp kamçı oluşturur ve kamçı gelişimi ile amastigotlar promastigotlara dönüşürler. Çoğalan promastigotlar peritrofik membranı eriterek torasik mideye geçerler. Torasik midenin ön ucundaki stomadeal kapağa geldiklerinde kamçıları ile barsak epitel hücrelerinin mikrovilluslarına tutunurlar (Molyneux ve KIllick-Kendrick, 1987). Bu bölgelerde gelişen promastigotlar kemotaksis ile özafagus ve farinkse tutunurlar. Özafagustan ayrılan promastigot formlar daha küçük formlar halinde ağız parçalarına geçerler. Ağız kısmında

bulunan enfektif promastigotlar, tatarcıkların kan emmesini düzenleyen kardiak kapağa zarar vererek, kan akımının tersi yönünde tatarcığın vücudundan omurgalı konağa geçerler. Makrofajların promastigotlarla 4–8 saat içinde enfekte olduğu ve 24 saat sonra amastigotların görüldüğü belirlenmiştir (Garcia, 2001). Konağa geçen promastigotların bir kısmı, kan dolaşımına katılarak konak tarafından yok edilir. Ancak geri kalan promastigotlar makrofaja girip amastigot forma dönüştükten sonra bölünmeye ve çoğalmaya devam eder ve çoğalan parazit hücreyi patlatır. Hücreyi parçalayarak serbest hale geçen bu amastigotlar, yeniden makrofajları enfekte ederek dalak, karaciğer ve kemik iliği gibi organlara taşınırlar (Bryceson, 1996; Garcia, 2001). Tatarcık tekrar enfekte konaktan kan emdiğinde, enfekte olmuş konaklarda bulunan hem serbest amastigotları, hem de enfekte makrofajları alır. Amastigotlar tekrar tatarcığın mide kanalında gelişim sürecini geçirirerek promastigot forma dönüşürler. Bu döngü tatarcığın beslenmek için bir başka konak bulmasıyla devam eder (Despommier, 2000) (Şekil 1).



Şekil 1. Leishmanianın Yaşam döngüsü (Reithinger ve ark, 2007'den modifiye edilmiş)

2.4. Leishmaniasis

Leishmaniasisin visseral, kutanöz ve mukokütanöz olmak üzere üç farklı klinik formu bulunmaktadır (Tablo 1) (Herwaldt, 1999).

Tablo 1. Leishmaniasis kliniği ve etkenlerine göre sınıflandırılması

Klinik	Etkilediği Organ	Etkeni
Visseral Leishmaniasis	İç Organlar	<i>L.donovani</i> kompleksi <i>L.donovani</i> <i>L.amazonensis</i> <i>L.infantum</i> <i>L.tropica</i> <i>L.chagasi</i>
Kutanöz Leishmaniasis	Deri	<i>L.tropica</i> kompleksi <i>L.tropica</i> <i>L.major</i> <i>L.aethiopia</i> <i>L.mexicana</i> kompleksi <i>L.mexicana</i> <i>L.amazonensis</i> <i>L.pifanoi</i> <i>L.braziliensis</i> kompleksi <i>L.panamensis</i> <i>L.peruvianna</i> <i>L.guyanensis</i> <i>L.lainsoni</i> <i>L.columbiensis</i> <i>L.infantum</i> <i>L.chagasi</i>
Mukokutanöz Leishmaniasis	Deri ve Mukoz Membran	<i>L.braziliensis</i> kompleksi <i>L.braziliensis</i> <i>L.panamensis</i> <i>L.guyanensis</i> <i>L.mexicana</i> <i>L.tropica</i> <i>L.major</i>

2.4.1. Kutanöz Leishmaniasis

Kutanöz leishmaniasis ülkemizde daha çok *Leishmania tropica* parazitlerinin sebep olduğu Antep Çıbanı, Şark Çıbanı, Yıl Çıbanı, Halep Çıbanı gibi isimlerle anılan, açık yaralarla karakterize olan protozoon paraziter bir hastalıktır. Dünyada deri tutulumu yapan 13 dermatropik tür olduğu bilinmektedir. Bu türlerden *L. major*, *L. tropica*, *L. infantum* ve *L. aethiopica* Eski Dünya’da görülen kutanöz leishmania etkenleridir. Enfekte phlebotomuslar tarafından kan emerken bulaştırıldıktan 1-12 hafta sonra ısırılan bölgede ve ısırık sayısı kadar papül ile başlayıp 3-6 ay içerisinde yavaş yavaş ülserleşen ağrısız kabuklu deri lezyonu ile karakterizedir. Lezyonlar genellikle vücudun açıkta kalan bölümlerinde ve sıklıkla yüz, el, kol, bacaklarda görülmekte ve lezyon sayısı genellikle 1-20 arasında değişmektedir (Çulha ve Akçalı, 2006). Son yıllarda, *Leishmania infantum*’un da etken olduğu şark çıbanı olguları ülkemizde saptanmaya başlamıştır. Olguların büyük bir bölümünün Afganistan, İran, Suriye, Suudi Arabistan, Brezilya ve Peru gibi ülkelerde görüldüğü bildirilmektedir (Murray ve ark, 2005). Ayrıca hastalık Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika’da endemik bölgelere değişik amaçlarla gelen (turist, asker, işçi vb) kişilerde de görülebilmektedir (Herwaldt ve ark, 1993). Dolayısı ile hastalık tüm halk kitlelerini tehdit edebilmektedir

2.4.2. Mukakutanöz Leishmaniasis

Latin Amerika’da Espundia olarak da adlandırılan mukakutanöz leishmaniasis etkeni *L. braziliensis* kompleksi içerisinde yer alır. Enfekte olan kişilerde burun, ağız ve farinks mukozasında kan ve lenf yoluyla yayılma sonucu granümatöz nodüller halinde sekonder lezyonlar oluşur. Lenfadenopati sonrasında ciltte lezyonlar ortaya çıkmaya başlar. Burun, üst dudak ve alt göz kapağında doku harabiyeti sonucunda ciddi patolojik değişiklikler gelişir (Gontijo ve De Carvalho, 2003; Desjeux, 2004).

2.4.3. Visseral Leishmaniasis

Visseral leishmaniasis karaciğer, dalak, kemik iliği gibi organların intrasellüler *Leishmania* parazitleri tarafından enfekte edilmesi sonucunda ortaya çıkan Kala-azar olarak da bilinen bir hastalıktır (Murray, 1981; Singh ve ark, 2006). *Leishmania. infantum*, *L.donovani*, *L.chagasi* parazitleri bu hastalığın oluşmasına neden olmaktadır. Visseral leishmaniasis özellikle HIV virusu ile enfekte olmuş veya organ transplantasyonunun

ardından bağışıklık sistemi baskılanmış insanlar için giderek artan potansiyel bir problem olarak tanınmaktadır. Visseral leishmaniasis hastalığının esas belirtileri yüksek ateş, kilo kaybı, hepatomegali, splenomegali, lenfomegali, pansitopeni ve hipergammaglobulinemi olarak belirtilmektedir (Pintado ve ark, 2001). Gastrointestinal sistemi de içeren tüm organların retikuloendotelyal hücreleri enfekte olabilir. Visseral leishmaniasis eğer tedavi edilmezse yüksek oranda hastayı öldürme potansiyeline sahiptir (di Martino ve ark, 1992).

2.5. Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü tarafından toplam 98 ülkede Leishmaniasisin endemik olduğu bildirilmekle birlikte, her yıl 500.000 insanın visseral leishmaniasisye 1-1,5 milyon insanın kutanöz leishmaniasis 'ye yakalandığı ve toplam 12 milyon insanın enfeksiyona maruz kaldığı, risk altındaki insan sayısının 350 milyon olabileceği öngörülmektedir (Desjeux 2001).

Dünya verilerine bakıldığında visseral leishmaniasis olgularının %90 gibi büyük bir çoğunluğunun Hindistan, Bangladeş, Brezilya, Sudan ve Nepal'de görüldüğü bildirilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü 2008 yılı verilerine göre kutanöz leishmaniasis ise 82 ülkede görülmektedir. Dünya'daki olguların %90'ından fazlası Sudan, Afganistan, Irak, İran, Suudi Arabistan, Suriye, Peru, Cezayir, Kolombiya, Brezilya ve Bolivya'da görüldüğü bildirilmektedir (Herwaldt, 1999; Murray ve ark, 2005; Alvar ve ark, 2006b).

Ülkemizde ise 1990-2010 yılları arasında, %96'sı Adana, Şanlıurfa, Hatay, Osmaniye, Kahramanmaraş, Diyarbakır ve İçel illerinde olmak üzere toplam 46.003 yeni kutanöz leishmaniasisli olgu bildirilmiştir. Son yıllarda Antalya, Aydın, Hatay illerinde olgu sayısında artış gözlenirken Diyarbakır, Şanlıurfa, Kahramanmaraş, Mersin, Osmaniye ve Adana illerinde olgu sayısında azalma eğilimi gözlenmektedir (Gürel ve ark, 2012).

2.6. Kutanöz Leishmaniasisde Tanı

2.6.1. Klinik Tanı

Vücudun açıkta kalan bölgelerinde eritemli bir papül olarak başlayan kutanöz leishmaniasis lezyonları daha sonra yumuşak veya üzeri krutlu nodül olarak devam eder. Bu

krutlu bölgelerin üzeri kaldırıldığında çiviye benzeyen çıkıntılar gözlenir. Bu çıkıntılar Hulusi Behçet'in "Çivi belirtisi" olarak adlandırılır (Gürel ve ark, 2012).

Kutanöz leishmania pek çok deri lezyonu (deri tüberkülozları, bakteriyel deri enfeksiyonları, böcek ısırılmaları, malign deri tümörleri, derin mikotik enfeksiyonları, miyazis yabancı cisim granülomları, sarkoidoz, tropikal ülser, sporotrikoz, şarbon vs) ile karışabilmektedir ve tanı için çok değişik teknikler kullanılmaktadır (Vega, 2003). Tanının doğru konması, uygun tedavinin seçilmesi ve komplikasyonların azaltılması açısından önem taşımaktadır (Alvar ve ark, 2006a).

2.6.2. Etkensel Tanı

Parazitolojik tanı, lezyonun sağlam deri ile birleşme kenarından örnek alınıp boyanan preparatta *Leishmania*'nın amastigot formunun gösterilmesi ile konur. Parazitin izolasyonu ve tanımlanması için alınan örneklerin besiyerlerine ekilmesi gerekmektedir. Son yıllarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemler de kutanöz leishmaniasis 'nin tanısı için kullanılmaktadır (Özcel ve Altıntaş, 1997).

2.6.2.1. Örneğin Alınması

Türkiye Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma grubunun oluşturduğu Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından onaylanan (2015) internet sayfası verilerine göre; Kutanöz Leishmaniasisin kazıntı yöntemi ile örnek alma prosedüründe lezyon kabuğunun bir kısmı veya tamamı alınıp; steril bir tüpte kuru şekilde muhafaza edilir ve laboratuvara gönderilir. İnce iğne aspirasyonu ile örnek alınmasında ise sağlam deriden lezyon kenarına doğru içinde 0,3 mL steril serum fizyolojik içeren enjektör ile girilip; deri içine 0,1-0,3 mL serum fizyolojik verilir İğne hafifçe öne arkaya ve içerde döndürerek ve pompalanarak hareket ettirilir ve daha sonra aspire ederek en az 0,1 mL örnek alınır (Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, 2015).

2.6.2.2. Direkt Boyalı Mikroskopik İnceleme

Alınan materyalin lama yayıldıktan sonra Giemsa ile boyanması ardından mikroskopta amastigot varlığının gözlemlenmesi ile tanı konur. Giemsa ile boyanan yaymalarda sitoplâzma soluk mavi, çekirdek ve kinetoplast ise pembe-mor renkte boyanır (Singh, 2006).

2.6.2.3. Kültür Yöntemi

Kutanöz leishmanianın kesin tanısında parazitin promastigot formunun kültür ortamında ürediğini göstermek önemlidir. *Leishmania*'ların *in vitro* kültürü için NNN olarak bilinen klasik besiyeri, bu besiyerinin çeşitlemeleri ve ticari olarak satın alınabilen RPMI-1640, Schneider's Drosophyla Medium, Minimal Essential Medium (MEM) ve Medium-199 gibi diğer besiyerleri kullanılmaktadır. NNN besiyerinde promastigotların üremesi 22-26 °C sıcaklıkta inkübasyonla birkaç gün ile 4 hafta arasında değiştiği bildirilmiştir (Özçelik ark, 1996; Değerli, 1998).

2.6.2.4. Moleküler Tanı Yöntemi

Son yıllarda pek çok hastalıkta olduğu gibi kutanöz leishmaniasis tanısında da ribozomal, miniexon veya mini/maxicircle kinetoplast DNA ya da sık tekrar eden farklı bölgeleri hedefleyen PCR çalışmaları gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Parafinize materyal, kan, deri biyopsisi, kemik iliği aspiratı ve giemsa boyalı preparatlar gibi değişik klinik örneklerdeki az miktardaki *Leishmania* DNA'sını saptayabilmesi moleküler yöntemlerin avantajı olarak bildirilmektedir. Doğru tanı konmasının, uygun tedavi seçimi ve prognoz değerlendirmesinde çok önemli olduğu belirtilmektedir (Blum ve ark, 2004; Bensoussan ve ark, 2006).

2.7. Tedavi

Kutanöz leishmaniasis de tedavi iyileşmeyi hızlandırmak, özellikle kozmetik açıdan istenmeyen skar gelişimini, mukozal olgularda özellikle etkenin disseminasyonunu azaltmak relapsları engellemek ve olgunun kaynaklık yapmasını önlemek amacı ile yapılmaktadır (Murray ve ark, 2005). kutanöz leishmaniasis tedavisinde, leishmania türü, lezyonun yeri, şiddeti, sayısı ve kişinin immün durumuna bağlı olarak, intralezyoner tedavi, topikal tedavi, sistemik ilaç tedavisi veya fiziksel yöntemlerden herhangi biri ya da birkaçı birlikte uygulanır (Hepburn, 2000).

Hastalığın tedavisinin seçiminde diğer önemli faktörler, lezyonun özellikleri ile ilgilidir. Tedavide çoklu, yaygın, dirençli, lenfanjitle birlikte seyreden veya mukozal tutulumun olduğu lezyonlarda sistemik ilaç tedavisi tercih edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Alrajhi ve ark, 2002). Fiziksel yöntemler içerisinde en yaygın kullanılanların küretaj, cerrahi eksizyon, kriyoterapi

ve sıcak uygulama, radyoterapi, lazer olduğu belirtilmekte ve bu yöntemlerle tedavi sonrasında relapsların görüldüğü belirtilmektedir (Alkhawajah, 1998). İntralezyoner tedavide son 50 yıldır pentavalan antimon bileşikleri olan sodium stibogluconate (Pentostam™) ve meglumine antimonate (Glucantime™) tedavide ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçların sistemik uygulanması gerektiğinde parenteral verilmesi gerekir ve belli dozun üzerinde toksik etki göstermektedir. Ayrıca son yıllarda bu ilaçlara karşı dirençli olgularda artma saptandığı bildirilmiştir (Croft ve Yardley, 2002). Ülkemizde de ilk tercih olarak pentavalan antimon bileşikleri hastalara Sağlık Bakanlığı tarafından ücretsiz olarak verilmektedir.

Tedavi de özellikle endemik bölgelerde yapılan çalışmalarda değişik ilaçların denendiği (topikal paromomisin, oral miltefosin, ketokonazol, rifampin ve çinko gibi) ve değişik oranlarda tedaviye yanıt alındığı bildirilmektedir (Berman, 2003). Günümüzde alternatif tedavi arayışları devam etmektedir ve bu amaçla pek çok araştırma yapılmaktadır.

Kutanöz leishmaniasis de çok az yan etkisi olan bir etkin tedavi şekli bulunmamaktadır ve tedavide yaşanan sıkıntılar nedeniyle her geçen gün yeni kimyasal veya bitkisel ajan uygulamaları ve fotodinamik tedavi gibi yeni, ucuz, kolay uygulanabilen, yan etkisi az olan yöntemler yoğun olarak araştırılmaktadır.

2.8. Fotodinamik Tedavi

Fotodinamik tedavi (FDT), selektif olarak lokalize hedef doku tarafından alınan fotosensitif ajanın ortamda moleküler oksijen varlığında, uygun dalga boyunda görünür ışığa maruz bırakılmasıyla, başlıca singlet oksijen oluşumuna neden olan fotokimyasal reaksiyonları başlatılmasıyla sonucunda direkt ve dolaylı mekanizmalarla hücrelerde ölüme kadar giden reaksiyonlara neden olan alternatif bir tedavi yöntemidir (Grossweiner ve ark, 2005).

Fotodinamik tedavi 19. yüzyılın sonlarında Dr. Oscar Raab'ın akridin boyası ve ışığı birlikte kullanılmasının tek hücreli organizma olan *Paramecium caudatum*'u öldürdüğünü göstermesi ile başladığı kabul edilmektedir. Tappaneiner ve Jesionek üç deri kanserli hastaya verdikleri topikal eozin boyasını güneş ışığı ile aktive ederek FDT'nin bilinen ilk kanser uygulamasını 1903 yılında gerçekleştirmişlerdir. Fakat 1960'lı yıllara kadar fotodinamik

tedavi uygulamaları ilgi çekmemiştir. Lipson ve arkadaşları bir porfirin karışımı olan hematoporfirin türevini tekrarlayan meme kanserli hastada terapötik amaçla kullandıklarını 1966 yılında 9. Uluslararası Kanser Kongresin’de yayınlamışlardır. 1978 yılında Dougherty ve arkadaşları malign tümörlü hastaları, hematoporfirin türevi injeksiyonundan 24-72 saat sonra kuvvetli kırmızı ışık vererek başarı ile tedavi etmişlerdir ve bu işlemi fotodinamik tedavi olarak adlandırmışlardır (Macdonald ve ark, 2001). Yıllarca yapılan saflaştırma çalışmaları sonunda ilk FDT ilacı Photofrin® geliştirilmiştir. Ark lambası ile başlayan çalışmalar lazer, LED veya fiber optik sistemlerin kullanılması ile hedef dokular için yeterli ışın dozunun sağlanmasını sağlamıştır.

Kanada Sağlık Bakanlığı 1993 yılında mesane kanserinde Photofrin® kullanılarak FDT uygulamasını onaylamıştır. Bu Photofrin®-FDT’nin ilk resmi onayı olmasına karşın, gerçek ivmelenme 1995 Aralık ayında Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) Food and Drug Administration örgütünün paliyatif özefagus kanser tedavisinde Photofrin®’ni FDT ilacı olarak onaylamasıyla gerçekleşmiştir (Dougherty ve ark, 1998). Takip eden yıllarda ABD, Kanada, Fransa, Japonya, Hollanda, İtalya’da Photofrin®-FDT ilgili sağlık kurumlarca; özefagus maligniteleri, gastrik kanser, erken ve geç safhada akciğer kanserleri, mesane kanseri, jinekolojik maligniteler gibi patolojik durumların bir veya birkaçı için onaylanmıştır (Dolmans ve ark, 2003). Photofrin®-FDT resmi bir durum kazanmasıyla bir çok yeni fotosensitif ajanlar ile hem çeşitli kanserlerin hem de aterosklerotik plakların uzaklaştırılması, makular dejenerasyon, aktinik keratoz gibi malign olmayan hastalıkların tedavisinde klinik FDT uygulamaları artmaktadır (Fayter ve ark, 2010).

2.8.1. Fotodinamik Tedavi Etki Mekanizması

Fotosensitizasyon reaksiyonlarında, ışığın fotosensitizer tarafından soğrulması ile daha yüksek enerji seviyesine çıkan fotosensitizer, bu enerjisini sistemdeki başka bir moleküle vererek o molekülde kimyasal değişime yol açar ve tekrar temel enerji seviyesine döner.

Fotodinamik tedavinin bu etki mekanizması:

- (1) FDT ajanının alınımını takiben hedef dokuda ışına maruz bırakılıp uyarılması ile bu seviyeden sistemler arası geçiş yaparak bu ajanın triplet enerji duruma geçmesi,
- (2) Triplet durumdaki FDT ajanı elektron uyarma enerjisini ortamdaki moleküler

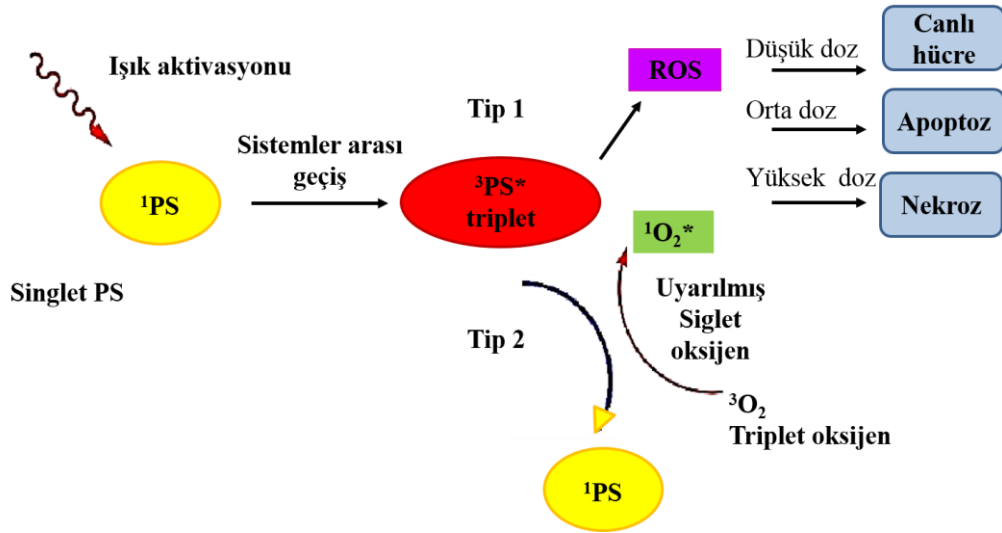
oksijene aktarması sonucu singlet moleküler oksijen (1O_2) oluşması,

(3) 1O_2 hedef doku ile reaksiyonuna girmesiyle hedef dokudaki patolojik durumu (kanser, vb) ortadan kaldıracak olayları başlatılması şeklindedir (Bilgin, 1999).

Fotodinamik terapide bu ajanlar uygun dalga boyundaki ışıkla uyarıldığında yüksek reaktif hidroksil radikal türlerini (Tip-1) veya singlet oksijen üretirler (Tip-2). Tip I reaksiyonda, uyarılmış fotosensitif ajan ve substrat arasında elektron transferi veya hidrojen atomunun ayrılmasıyla gerçekleşmekte, bu da serbest radikal ve radikal iyonları ile sonlanmaktadır. Bu serbest radikaller moleküler oksijen ile etkileşime girerek reaktif oksijen türleri oluşumuna (süperoksit anyonu (O_2^-) veya hidroksil radikali (OH^-) gibi) ya da biyokimyasal olayları başlatarak biyolojik hasar meydana gelmesine sebep olmaktadır (Salvador, 2008).

Tip II reaksiyonda ise enerjisini temel düzeyde triplet oksijene (3O_2) aktararak radikal olmayan fakat yüksek oranda reaktif uyarılmış düzeyde singlet oksijen (1O_2) oluşmaktadır. (Şekil 2).

In vitro olarak FDT ajanı tarafından oluşturulan 1O_2 üretimi, FDT etkinliği için önemli bir göstergedir. Sonuçta direkt ve dolaylı mekanizmalarla hücrelerde ölüme kadar giden reaksiyonlara neden olmaktadır.



Şekil 2. FDT etki mekanizması (Vandenbogaerde 1998'den modifiye edilmiştir.)

Fotodinamik tedavinin etkinliği uygulanan fotosensitif ajana, ışık kaynağına ve tedavi şekline bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Lilge ve ark, 1997). Fototoksik etkinin şiddeti, ilacın ve ışının dozu ile doğrudan orantılıdır. Özellikle klinik uygulamalarda kullanılacak olan ideal ajana bağlı yan etkilerin ortaya çıkmaması için uygulanan ilacın dozunun olabildiğince azaltılmış, fakat aynı etkiyi sağlamak için daha uzun süreli ışın tedavisi gerektirmeyen, yüksek etkinliği olan ancak düşük cilt toksisitesine sahip fotosensitif ajanlar kullanılması gerektiği bildirilmektedir (Treatment of Age-related Macular Degeneration With Photodynamic Therapy Study Group 1999).

2.8.2. Fotosensitif Ajanlar

Porfirin ve porfirin olmayanlar şeklinde fotosensitif ajanlar sınıflandırılırlar.

2.8.2.1. Porfirin Türevi Fotosensitif Ajanlar

Porfirin türevi fotosensitif ajanlar birinci ve ikinci kuşak fotosensitif ajanlar şeklinde sınıflandırılırlar. Tablo 2’de birinci kuşak fotosensitif ajanlar gösterilmektedir.

Tablo 2. Porfirin türevi birinci kuşak ajanlar

Birinci Kuşak Fotosensitif Ajanlar
Hematoporfirin
Hematoporfirin türevi- Photofrin® (porfimer sodyum)

Birinci kuşak ışığa duyarlı ilaçların ilk örneği olan hematoporfirin türevi (HPD) FDT ile ilgili ilk çalışmalarda kullanılmıştır. HPD’nin kısmen saflaştırılmış bir komponenti porfimer sodyum (dihematoporfirin eterleri-DHE) da FDT amaçlı kullanılmıştır. Porfimer sodyum’un (Photofrin®) sınırlı doku penetrasyonu sağladığı, deride uzun süreli ışık hassasiyeti gibi dezavantajları olduğu bildirilmiştir (Nayak, 2005).

Tablo 3. Porfirin türevi ikinci kuşak ajanlar (Nayak, 2005)

İkinci Kuşak Fotosensitif Ajanlar	
Metalloporfirinler:	Lutrin
Klorinler:	N-aspartil klorin e6 (Npe6) Benzoporfirin derivesi- BPD
Porfisinler:	N-propil porfisin
Ftalosiyoninler:	Kloralüminyum fitalosiyanin (AlPcCl) Kloralüminyum terasulfon fitolasiyanin-CASpC Çinko ftalosiyonin Silikon naftalosiyonin (Pc4)
Protoporfirin:	Levulan, Metvix
Purpurinler:	Tin etiopurpurin-SnET2 Purlytin
Klorofil deriveleri:	Feoforbida

İkinci kuşak fotosensitif ajanlar daha düşük yarılanma ömrüne sahip ve ciltte daha az yan etkiye neden olan, kimyasal olarak daha saf olduklarından daha güvenli ve etkili bir FDT sağlamak amacıyla üretilmeye başlanmıştır (O'Conner ve ark, 2009). Tablo 3'te ikinci kuşak fotosensitif ajanlar gösterilmektedir.

2.8.2.2. Porfirin Türevi Olmayan Fotosensitif Ajanlar

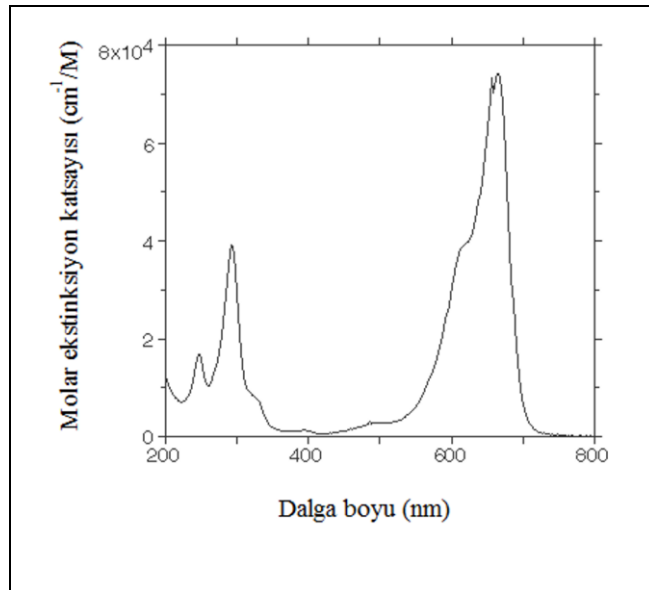
Tablo 4'te porfirin türevi olmayan fotosensitif ajanlar gösterilmiştir. Çalışmalar porfirin türevi ajanlara yoğunlaşmış olmasına rağmen porfirin türevi olmayan fotosensitif ajanlar da bulunmaktadır (O'Conner ve ark, 2009).

Tablo 4. Porfirin türevi olmayan fotosensitif ajanlar (O'Conner ve ark, 2009)

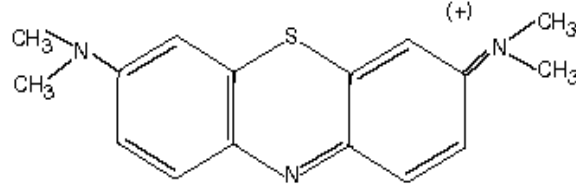
Porfirin türevi olmayan Fotosensitif Ajanlar	
Siyaninler	Merosiyanın540 Kationik siyanin
Fenotiyazin boyası	Metilen mavisi Toludin mavisi Nil mavisi
Azadipirometen (ADPM)	ADPM türevleri
Psoreleans	Dimetilaminobenzoik asitfurocoumarinler
Antrasiklinler	Daunorubisin, Doksorubisin

2.8.3. Metilen Mavisi

Metilen mavisi 550-700 nm, maksimum 664 nm de kuvvetli bir soğrulma tepe değeri bulunan, güçlü bir fotodinamik etkinliği olan ucuz ve non toksik fenotiyazin bir boyadır. Şekil 3'te metilen mavisinin etanol ile hazırlanmış absorpsiyon spektrumu verilmiştir Bazik bir boya olan metilen mavisi tetra metil tiyonin olarak da bilinir (Şekil 4).



Şekil 3. Etanolde çözülmüş metilen mavisinin absorpsiyon spektrumu



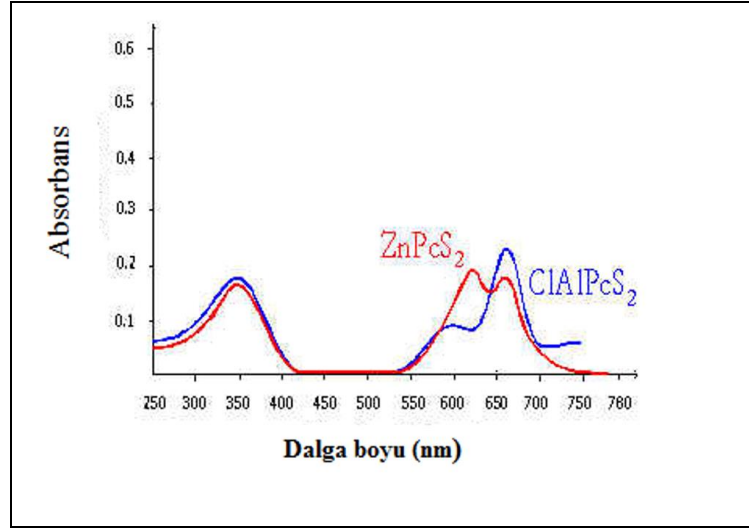
Şekil 4. Metilen mavisinin moleküler yapısı

Fotokimyasal özellikleri iyi bilinen bir fotosensitif ajan olan metilen mavisinin intersistem geçişi ve singlet oksijen oluşumunu gösteren yüksek kuantum toplamı vardır. Sulu ortamlarda singlet oksijen kuantum toplamı 0.52 olarak belirlenmiştir (Usui ve Kamagawa, 1974), ve çeşitli FDT ajanların singlet oksijen kuantum toplamlarının dolaylı yoldan ölçüldüğü çalışmalarda standart ölçeklendirme fotosensitif ajan olarak kullanılmaktadır (Fernandez ve ark, 1997; Grossweiner ve ark, 1999). Metilen mavisi hedef hücrede mitokondri zarına bağlandıktan sonra FDT ile uyarılması, mitokondrial işlev kaybına bağlı olarak olan apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır. Ayrıca mitokondrial matrikste negatif elektrokimyasal çevre ile bağlanması sonucu metilen mavisi-FDT tümör hücrelerinde küçülmeyi de uyarmaktadır (Gabrielli ve ark, 2004). Metilen mavisi-FDT mitokondriye bağlı yollar tarafından apoptozisin indüklenmesine aracılık ettiği bildirilmiştir (Chen ve ark, 2008).

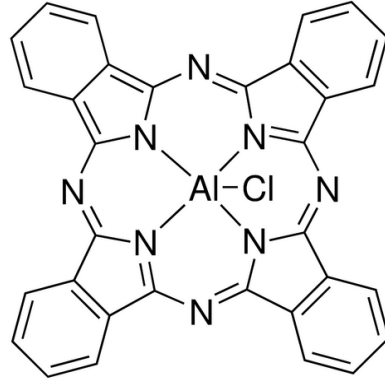
2.8.4. Kloralüminyum Ftalosiyanın

Ftalosiyanınlar 650-680 nm dalga boyunda güçlü absorpsiyon özellikleri olan yapılarında merkezi yerleşimli çinko ya da alüminyum gibi metaller bulunan, uygun fotofiziksel özelliklere sahip fotodinamik tedavi için yeni jenerasyon fotosensitif ajanlardır (Rosenthal ve Ben-Hur, 1995; Cahn ve ark, 2001; Urizi ve ark, 2001; Nunes ve ark, 2004). Şekil 5’de etanolde çözünen çinko ve kloralüminyum ftalosiyanın maddelerinin absorpsiyon spektrum görüntüleri verilmiştir. Sağlıklı hücreler için toksik olmayan, triplet seviyesinde yüksek verim gösteren ve etkin bir biçimde hedef hücelere dahil olabildiklerinden bunlar FDT için iyi bir fotosensitif ajan adaylardır. Polarite ve çözünebilirlik ftalosiyanınların hücre içerisindeki lokalizasyonlarını belirler. Sitoplazma yerleşimli ftalosiyanınlar daha polardır ve hücre membranında daha az oranda bulunurlar. Kloralüminyum ftalosiyanın kompleksinin

fotodinamik tedavi uygulamaları için uygun özellikler gösterdiği bildirilmiştir (Nunes ve ark, 2004) (Şekil 6).



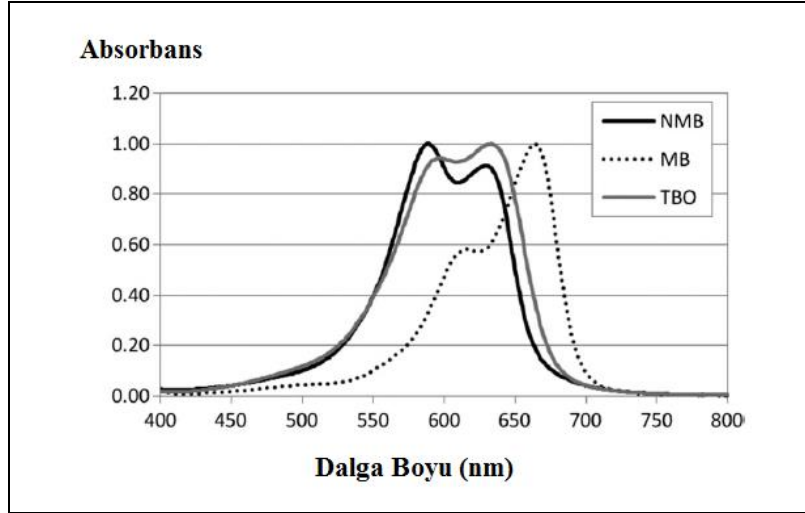
Şekil 5. Etanolde çözülmüş çinko ve kloralminyum ftalosiyoninin absorpsiyon spektrumu



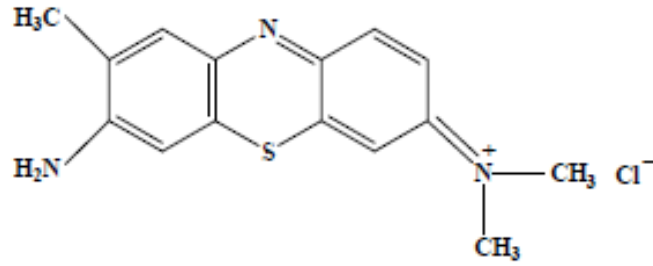
Şekil 6. Kloralmünyum ftalosiyoninin moleküler yapısı

2.8.5. Toluidin Mavisi

Toluidin mavisi su veya alkolde kısmen çözünen 626 nm dalga boyunda güçlü absorpsiyon özellikleri olan, minimal yapısal farkları ile metilen mavisine benzer bir fenotiyazin boya maddesidir (Şekil 7, Şekil 8).



Şekil 7. Toluidin mavisinin etanolde metilen mavisini ile absorpsiyonlarının karşılaştırılması

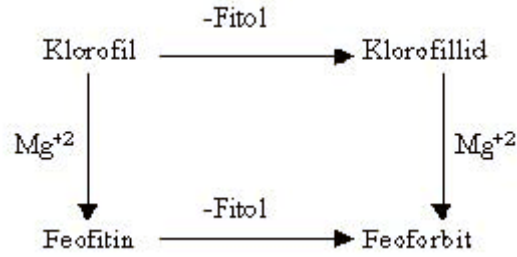


Şekil 8. Toluidin mavisinin kimyasal yapısı

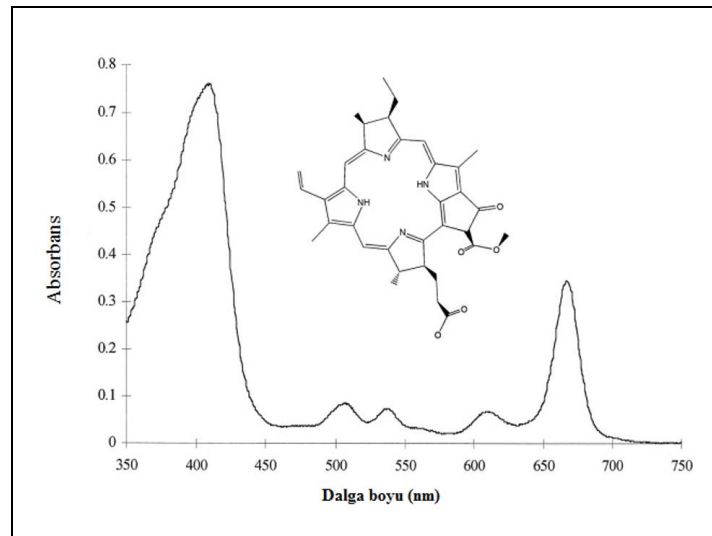
Toluidin mavisi patojenik organizmaları inaktive eden güçlü bir fotosensitif ajan olup çözelti içinde ışık aracılığı ile hücreleri öldürmede aktif rol oynar. Bu gözlem için olası iki şekilde açıklanmaktadır. İlk olarak ışık etkisiyle hücre dışında oluşan reaktif oksijen türlerinin (özellikle singlet oksijenin) hücre içerisine diffüzyonu ile hücreyi hasarlandırarak öldürmesidir. İkinci ise fotodinamik inaktivasyonun ilk aşamasının hücre zarında hasar yaparak solüsyonda bulunan toluidin mavisi moleküllerinin hücreye daha çok bağlanması veya penetrasyonuna neden olması ve bu sayede fotodinamik tedavi etkinliğinin artması olarak açıklanmaktadır (Demidova ve Hamblin, 2005).

2.8.6. Feoforbid a

Klorofilin parçalanması sonucu oluşan Feoforbid a ışığa duyarlı bir ajandır. Yeşil yaprakların ve bazı ham meyvelerin yeşil rengini veren klorofil pigmenti, klorofil a (mavi-yeşil) ve klorofil b (sarı-yeşil) olarak iki gruba ayrılmaktadır ve fotosentetik porfirin pigmentinin tüm sınıflarını kapsamaktadır. Klorofillerin renkleri ve absorpsiyon spektrumları üzerinde moleküllerin ortasında bulunan magnezyum çok etkilidir. Yapısında bulunan magnezyumun parçalanması sonucu klorofil a ve b, feofitin a ve b ye dönüşür. Enzimatik olarak Feofitinlerin parçalanması durumunda ise feoforbid a ile feoforbid b oluşmaktadır (Şekil 9). Şekil 10'da etanolde çözülmüş feoforbid a'nın absorpsiyon spektrumu gösterilmiştir.



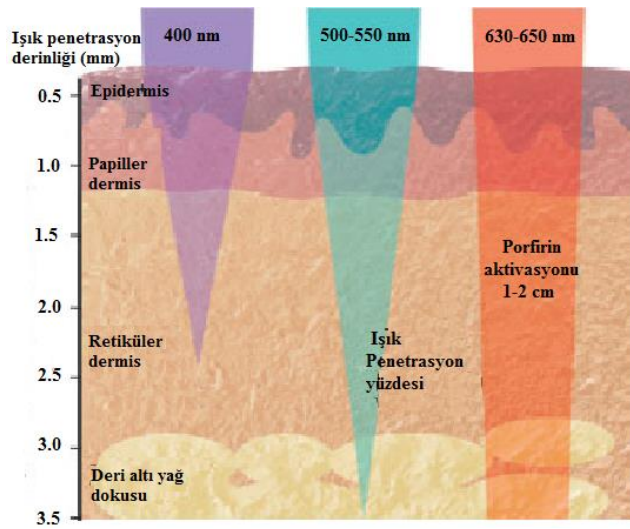
Şekil 9. Klorofilin parçalanması ile oluşan ürünler



Şekil 10. Feoforbid a kimyasal yapısı ve etanolde absorpsiyon spektrumu

2.8.7. Işık Kaynakları

Fotodinamik tedavide, monokromatik dalga boyundaki argon iyon pompalı lazer, katı faz diot lazer, altın buhar lazer ve benzeri lazer ışık kaynakları ile polikromatik ark lambaları, halojen ve akkor lambaları gibi lazer olmayan ışık kaynakları ve LED (Light Emmiting Diodes) kullanılabilir. Görünür bölge dalga boyundaki ışık aralığı (400-700nm) FDT kullanımı için uygundur ama pratikte 600-900 nm dalga boyundaki ışık aralığı kullanılmaktadır. Pratikte kullanılan ışık kaynakları yaklaşık 3 mm'lik bir penetrasyon derinliğine sahiptirler (Şekil 11). Dalga boyu arttıkça ışığın dokuya girme özelliğide artmaktadır (Häder ve Jori, 2003).



Şekil 11. Işık kaynaklarının dalga boyu penetrasyonları (Hader ve Jori 2003'den modifiye edilmiştir.)

2.8.8. Kutanöz Leishmaniasis Tedavisinde Fotodinamik Tedavi

Kutanöz leishmaniasis tedavisinde FDT ilk kez Enk ve ark (2003) tarafından İsrail'de *L. major*'un etken olduğu kutanöz leishmaniasis tedavisinde amino-levulinic asit (ALA) kullanarak 32 lezyonda uygulanmıştır. Bu çalışmada fotodinamik tedavinin iyi tolere edildiğini, 1-2 dozdan sonra lezyon çapında anlamlı azalma görüldüğünü, tedavi sonunda yan etki saptanmadığını ve sadece bir lezyonda tedaviye yanıt alınmadığını bildirilmişlerdir. Gardlo ve ark.'nın yaptıkları çalışmada Libya'lı bir olguda bulunan 10 adet kutanöz leishmaniasis lezyonunun beş tanesine topikal MAL (Methyl aminolevulinate) + 20 seans FDT, diğer beş lezyona ise topikal paramomisin sulfat uygulandığını ve FDT uygulanan

lezyonların tamamında iyileşme saptanır iken diğer grupta sadece iki lezyonda iyileşme görülmesi üzerine diğer lezyonlara da FDT uygulandığı ve tam iyileşme saptandığı bildirilmiştir (Gardlo ve ark, 2003). EM van der Snoek ve ark (2008) bildirdiğine göre yine aynı araştırmacının yaptığı bir diğer çalışmada bir olguda tek bir kutanöz leishmaniasis lezyonunda MAL ile FDT beş seans uygulandığı ve tam iyileşme sağlandığı yan etki olarak uygulanan bölgede kıl dökülmesi ve hipopigmentasyon görüldüğü bildirilmiştir. (Van der Snoek ve ark, 2008). Sohl ve ark (2007) Almanya'dan yaptıkları bir olgu sunumunda endemik bölgeye seyahat sonrası *L.tropica* 'ya bağlı olarak yüzde gelişen kutanöz leishmaniasis tedavisinde topikal paramomisin, kriyoterapi tedavisine yanıt alınamaması üzerine fotodinamik ajan olarak MAL kullanılarak üç seans fotodinamik tedavi uygulanmış ve olguda tam iyileşme sağlandığı bildirilmiştir (Sohl ve ark, 2007). Birçok araştırmada non toksik, uygulaması kolay bir teknik olan fotodinamik tedavinin araştırıldığı, her geçen gün umut verici sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir (Ghaffarifar ark, 2006; Asilian ve Davami, 2006; Evangelou ve ark, 2011). Akilov ve ark (2007) yaptığı çalışmada, farelerin kulaklarında *L.major* ile oluşturulan deneysel lezyonlarda fotosensitizer ajan olarak ALA (δ -Aminolevulinic acid) kullanılarak gerçekleştirdikleri FDT uygulaması sonucunda parazit yükünde ve doku hasarında anlamlı azalma saptadıklarını belirtmişlerdir (Akilov ve ark, 2007). Latorre-Esteves ve ark (2010) yaptığı çalışmada *gfp* geni ile transfekte *L. major* ile farelerin kulaklarında geliştirilen deneysel kutanöz leishmaniasis lezyonlarında PPA-904 (3,7-Bis(N,N-dibutylamino) phenothiazinium bromide) topikal krem olarak uygulanmış. Bir saat karanlıkta bekletildikten sonra fotosensitizer ajan kullanarak fotodinamik tedavi uygulanan çalışmada tedavinin izlemi bir görüntüleme sistemi ile değerlendirildiği belirtilmiştir. Çalışmanın sonucunda FDT tedavisi ile parazit yükünde %80 azalma saptadıklarını bildirmişlerdir (Latorre-Esteves ve ark, 2011). Dutta ve ark (2012a) yaptıkları bir çalışmada hem-biyosentezi aşamasındaki 2. ve 3. aşama enzimler ile çifte transfekte leishmaniaların aşı taşıyıcı molekül olarak fotodinamik immunoterapi/profilakside kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Dutta ve ark, 2012a). Akilov ve ark 2007 yılında yaptığı *in vitro* çalışmada, *L. majör* amastigotları bir saat karanlıkta fotosensitizer ajan olarak ALA ile inkübe edip, gerçekleştirdikleri FDT uygulaması sonucunda parazitik etki saptamadıklarını bildirmişlerdir (Akilov ve ark, 2007). Morgenthaler ve ark (2008) *in vitro* çalışmada *L. tarentolae* promastigotları üzerinde fotosensitif ajan olan dimetil ve dietil carbaporphyrin ketallerinin büyüme baskılayıcı etkisinin olduğunu ve bu bileşiklerin fotodinamik tedavide

kullanılabilecek umut vaat eden moleküller olduğunu bildirmişlerdir (Morgenthaler ve ark, 2008).

2.8.9. Fotodinamik Tedavi Sonrası Parazitlerde Hücresel Mekanizma

Fotodinamik tedavi sonrası parazit inhibasyonu ile ilişkili 2 tip mekanizma bulunmaktadır. Tip 1 mekanizması hidroksil radikallerin ve diğer aktif oksijen türlerinin üretimi ile *in situ* biyomolekülleri ile reaksiyona girmesinin ardından sitotoksik sonuçların ortaya çıkmasıdır. Tip 2 mekanizmasının sebebi ise singet oksijen ile hücre membranında bulunan fosfolipidler, peptidler ve steroller gibi yapıların korunmasında rol oynayan moleküller arasındaki reaksiyonlardır. *Leishmania* promastigotlarında reaktif oksijen türlerine karşı çok hassas olduğu bilinmektedir (Murray, 1981; Channon ve Blackwell, 1985; Gantt ve ark 2001).

Fotodinamik tedavi uygulamalarının büyük çoğunluğunda ilk hedef istenmeyen hücrelerin öldürülmesidir. Hücre ölümü mekanizmaları genel olarak apoptoz ve nekroz olarak sınıflandırılmaktadır. Fotodinamik tedavide hem apoptoz, hem de nekroz ya da her iki mekanizma da oluşabilmekle birlikte sıklıkla apoptozun oluşumunda etkin olduğu belirtilmektedir (Oleinick ve Evans, 1998).

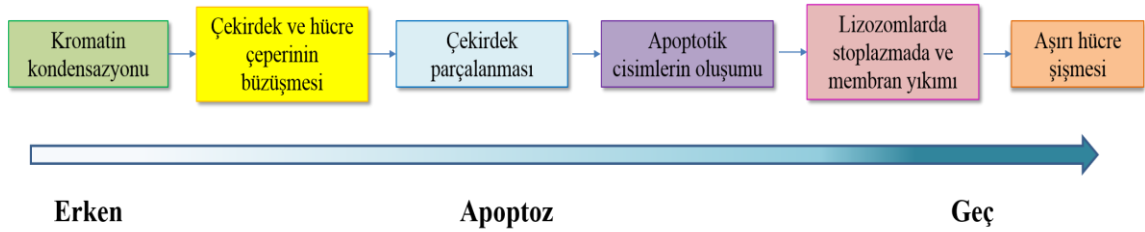
2.9. Apoptozis

Fizyolojik bir olay olan apoptozis hücre intiharı veya programlanmış hücre ölümü olarak da bilinir (Juhengel ve ark, 1993; Hsueh ve ark, 1994; Gürsoy ve ark, 2008). Apoptotik hücrelerin stoplazmalarında kromatin yoğunlaşması, hücre membranına yakın çekirdek kalıntılarının toplanması görülür. Ancak, apoptotik kalıntılarının küçüklüğü dolayısıyla bunların tespitinin ışık mikroskopunda yapılması oldukça zordur. (Zhang ve ark, 1997).

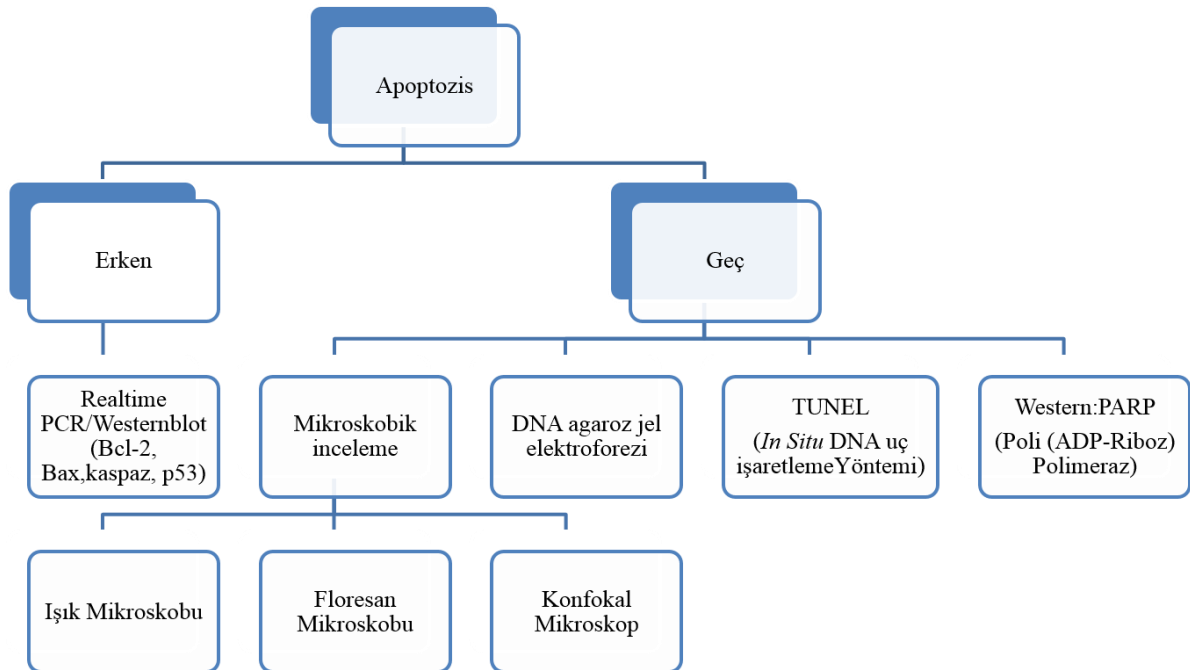
2.9.1. Apoptozisde Görülen Morfolojik Değişiklikler

Apoptozisde görülen morfolojik değişiklikleri yüzey organellerinin kaybı, kromatin yoğunlaşması, hücre büzülmesi, sitoplazmik baloncuklar ve apoptotik cisimlerin oluşması olarak sıralanabilir. Apoptoza uğrayan hücreler tek tek etkilenir, komşu hücrelerle olan temasını kaybeder ve yuvarlaklaşır (Wyllie, 1980). Hücreden hücreye değişmekle birlikte

genellikle çekirdek büzülür, düzensizleşir. Kromatin yoğunlaşır ve parçalar halinde bir araya toplanır (Geoffey ve Robert, 2004). Hücreler birleşme bölgesinden apoptozun erken evresinde ayrılır ve belirgin bir şekilde büzülür. Bunun nedeni Na, K, Cl pompalarında ve iyon kanallarındaki aktivasyon sisteminin durması sonucu hücre dışı ve içi arasındaki sıvı hareketinin gerçekleşmemesidir. Aynı anda hücrede değişik yüzey çıkıntıları ve kıvrıntılarının oluştuğu, bunların membranla çevrili olarak hücreden ayrılmasıyla apoptotik cisimlerin meydana geldiği bildirilmektedir (Elmore, 2007) (Şekil 12). Erken ve geç apoptozu belirlemek için kullanılan yöntemler Şekil 13'te belirtilmiştir (Huerta, 2007).



Şekil 12. Apoptozda oluşan morfolojik değişiklikler (Huerta 2007'dan modifiye edilmiş).



Şekil 13. Erken ve geç apoptozu belirlemek için kullanılan yöntemler (Huerta, 2007'dan modifiye edilmiş).

Geç apoptozu belirlemek için kullanılan kalitatif yöntemlerden biri DNA agaroz jel elektroforezidir. Biyokimyasal yolla saptanan bu yöntem kromozomal DNA'nın hücrede morfolojik değişimlerle birlikte görülmesi ile saptanır. DNA'da yaklaşık 180-200 baz çifti boyutunda parçalanmalar oluşur. Bu parçalanma kalıbı apoptoz için tipiktir ve agaroz jel elektroforezinde merdiven biçiminde "ladder pattern" olarak adlandırılmaktadır (Bortner ve ark, 1995; Sereno ve ark, 2001)

2.9.2. *Leishmania*'da Apoptozis

Çok hücreli canlılardaki hücreleri programlanmış hücre ölümüne götüren moleküler mekanizmalar çok karmaşık ve çeşitlilik arz etmektedir. Tek hücreli canlılar yaşamlarını bağımsız olarak sürdürdüklerinden bu hücrelerdeki apoptozis mekanizması çok hücreliler ile benzerlikler sergileyebileceği gibi farklılıklar bulunabilir. Burada, parazitin kendi içinden indüklenen bir sinyalin rolü olabileceği gibi konakçı hücrenin gönderdiği bir sinyal de parazitlerin yaşamlarının sonlandırılmasında etkili olabileceği göz ardı edilmemelidir. Hücre içi bir parazit olan *leishmania*'da konakçı hücrenin aktivitelerini etkileyebilir. Bazı *Leishmania* türlerinde promastigotların konakçı hücreleri apoptozise karşı dirençli hale getirdikleri bildirilmiştir (Ruhland ve ark, 2007). *Leishmania spp.* üzerine ilaç direnci çalışmaları programlanmış hücre ölümü mekanizmasına ışık tutmuştur. *Leishmania* paraziti için hücre ölümü fenotipi özellikleri hücre bölünmesi, mitokondri membran potansiyelinin ($\Delta\psi_m$) azalması, sitokrom c salınımı, çekirdek yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, peptidaz aktivasyonu olarak bildirilmiştir (Sereno ve ark, 2001; Lee ve ark, 2002; Arnoult, 2002). Dolayısıyla promastigotların apoptozisde rolü olduğu düşünülen tüm moleküllerin araştırılması önem arz etmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışmada kullanılan kimyasal ajanlar, solüsyonlar ve cihazlar hakkında bilgiler aşağıda verilmiştir.

3.1.1. Kimyasal Ajanlar

Çalışmada kullanılan, metilen mavisi HIMEDIA® (Mumbai, India), toluidin mavisi Applichem (Germany), kloralüminyum ftalosiyanın ve feoforbida kimyasalları Sigma Aldrich (Usa) firmasından satın alınmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'nda bulunan Laminar-hava akışlı kabin (Tez-San), ELISA okuyucusu (Bio-Tek, ELx800), Invert mikroskop (Nikon), etüv (Mettler), soğutmalı santrifüj (Nüve), pipetler (Eppendorf 10-100 µl, eppendorf 100-1000µl); Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik laboratuvarında bulunan spektrofotometre (Optima SP 3000, Japonya), ışık kaynağı (Epistar, Tayvan), ve güç kaynağı kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

Bir litre için PBS (Phosphate Buffer Saline) tamponu hazırlanması:

K ₂ HPO ₄	1,20 gr
Na ₂ HPO ₄	0,22 gr
NaCl	8,5 gr

Hazırlanan PBS' nin pH'ı, pH metre cihazı (WTW 340, Almanya) ile pH 7,0'ye ayarlandı. Daha sonra bu PBS otoklavda steril edildi.

RPMI-1640 besiyeri hazırlanması:

RPMI 1640	950 ml
Inaktive steril fetal bovine serum	50 ml

Ticari olarak satın alınan RPMI- 1640 (Sigma, USA) besiyeri üzerine % 10 oranında inaktive edilmiş steril fetal bovine serum (Biological Industries) ilave edildi. Kullanılıncaya kadar +4°C’de saklandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Parazitlerin Elde Edilmesi ve Besiyerinde Üretilmesi

Çalışmanın tüm aşamaları laminar-hava akışlı kabin içerisinde gerçekleştirildi. Çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı’na *Leishmania* şüphesi ile başvuran ve tanı alan bir hastadan izole edilen ve DNA dizi analizi sonucu *L.tropica* olduğu belirlenen bir *Leishmania* paraziti kullanıldı. Krioda muhafaza edilen bu parazitler çalışma öncesi 56 °C’ de bir iki dakika içinde çözüldü ve taze hazırlanmış RPMI 1640 besiyerine ekilip, 26 °C’de logaritmik faza kadar üretilen parazitler çalışma için kullanıldı.



Resim 3. Parazitin çoğaltılması

3.2.2. Parazit Yoğunluğunun Ayarlanması

Kültür kabında logaritmik faza kadar üretilen olan promastigotlar 50 ml'lik konik tabanlı steril falcon tüplerine alınarak üzerlerine promastigot içeren sıvının 2 katı kadar steril PBS ilave edildi. Bu tüpler 1500 devirde, 10 dakika santrifüj cihazında (Nüve, Türkiye) santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökeltinin üstünde kalan süpernatant dökülüp, pelletin üzerine tekrar aynı oranda PBS eklenerek parazitler yıkandı. Bu işlem 3 kez aynı şekilde tekrarlandı. En son elde edilen yıkanmış parazit süspansiyonu üzerine taze RPMI 1640 besiyeri ilave edildi.

3.2.3. Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı

Öncelikle % 2'lik formol-PBS çözeltisi hazırlandı. RPMI 1640 besiyerindeki parazit kültüründen ve hazırlanan % 2'lik formol- PBS çözeltisinden eşit miktarda alınarak bir eppendorf tüpünde (Eppendorf AG, Almanya) karıştırıldı. Böylelikle parazit sayımı için promastigotların hareketsizleşmeleri sağlandı. Bu karışımdan bir miktar alınarak Thoma lamına aktarıldı ve üzeri lamelle kapatılarak ışık mikroskopunda 40'lık büyütme ile incelendi. Bölünme aşamasında olan parazitlerin sayımı etkilememesi için birbirine yapışık 2-3 parazit varsa "1" sayıldı, daha fazla ise hepsi sayıldı.

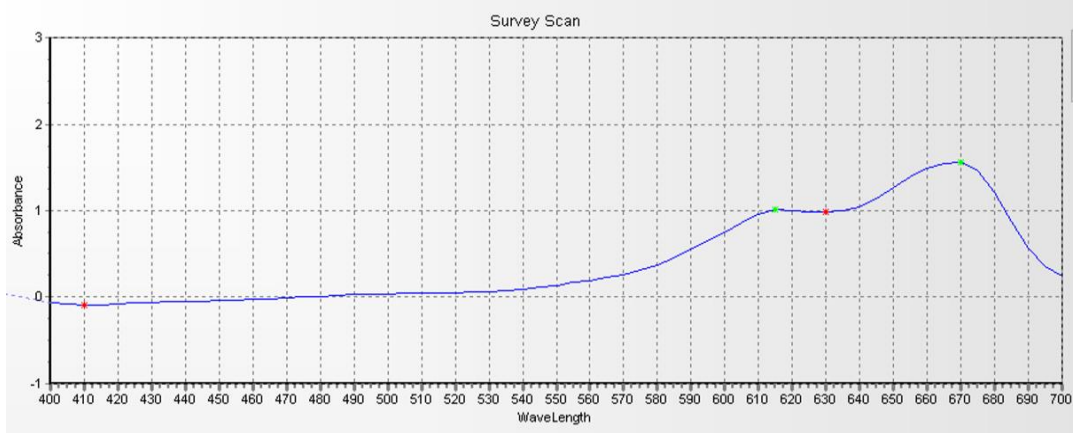
Thoma lamında 16 büyük kare ve bu büyük karelerin içerisinde 16 küçük kare bulunmaktadır. Tüm bu karelerdeki promastigotlar sayıldığında $0,1 \text{ mm}^3$ deki parazit sayısı bulunmuş olur. Çünkü Thoma lamının esası, $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde sayım yapılmasına dayanır. 1 ml'deki parazit sayısını bulmak ve standart sonuç için $0,1 \text{ mm}^3$ hacimdeki sayım sonucunun 10.000 ile çarpılması gerekmektedir. '1 ml'deki parazit sayısı = 16 büyük karedeki promastigot sayısı x 2 x 10000' formülü ile hesaplandı. İki ile çarpılmasının sebebi % 2'lik formol- PBS çözeltisi ile parazit kültürünün eşit miktarda karıştırılmasından dolayıdır.

3.2.4. Kimyasal Ajanların Stok Solüsyonları ve Konsantrasyonlarının Hazırlanması

3.2.4.1. Metilen Mavisi Konsantrasyonları

PBS ile metilen mavisi stok konsantrasyonu $400 \mu\text{M}$ olarak hazırlanmıştır. Çalışma konsantrasyonları 12,5 25 50 ve $100 \mu\text{M}$ olacak şekilde ayarlanmıştır. Her konsantrasyon için

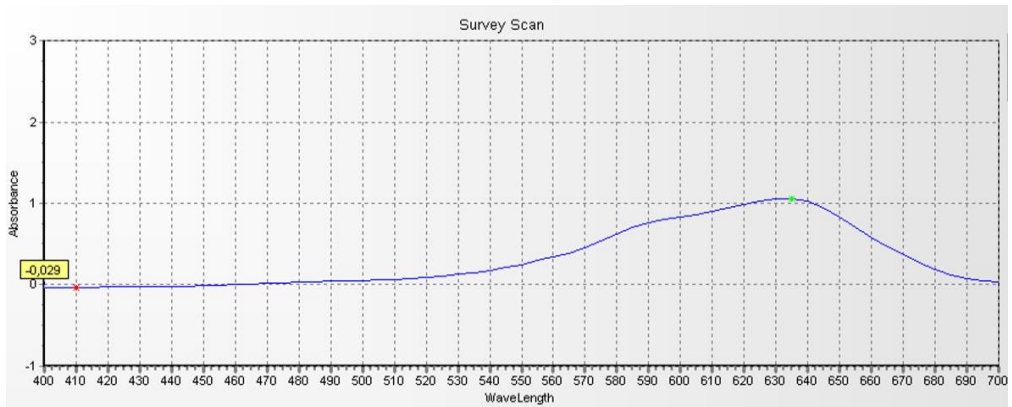
24'lü hücre kültürü plaklarında üçer kuyu çalışıldı. Konsantrasyonların absorpsiyon spektrumları spektrofotometrede ölçüldü. Resim 4'de 25 µM konsantrasyondaki metilen mavisi absorpsiyon spektrumu verilmiştir.



Resim 4. Metilen mavisinin PBS içindeki absorpsiyon spektrumu

3.2.4.2. Toluidine Mavisi Konsantrasyonları

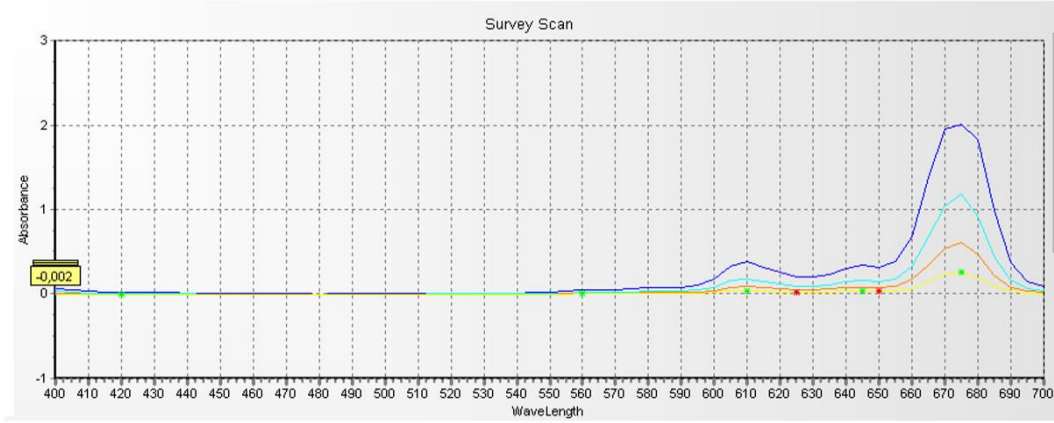
PBS ile toluidine mavisi stok konsantrasyonu 400 µM olarak hazırlanmıştır. Çalışma konsantrasyonları 12,5 25 50 ve 100 µM olacak şekilde ayarlanmıştır. Her konsantrasyon için 24'lü hücre kültürü plaklarında üçer kuyu çalışıldı. Resim 5'de 12,5 µM konsantrasyondaki toluidin mavisi absorpsiyon spektrumu verilmiştir.



Resim 5. Toluidin mavisinin PBS içindeki absorpsiyon spektrumu

3.2.4.3. Kloralüminyum Ftalosiyanın Konsantrasyonları

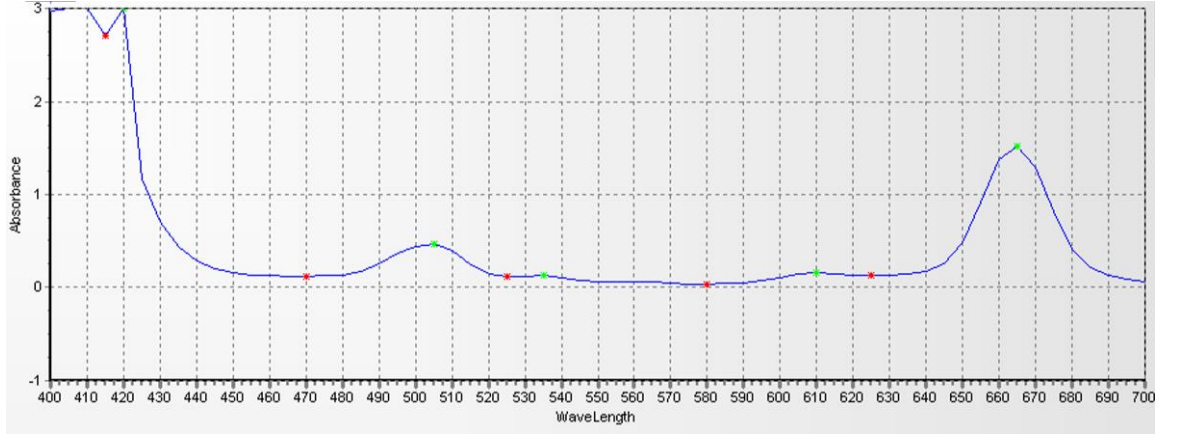
Dimetil formamide-PBS çözeltisi ile kloralüminyum ftalosiyanın parazitler için toksik olmayacak miktarda stok konsantrasyonu 60 μM olarak hazırlanmıştır. Konsantrasyonlar 1,875 3,75 7,5 ve 15 μM şekilde ayarlanmıştır. Her konsantrasyon için 24'lü hücre kültürü plaklarında üçer kuyu çalışıldı. Resim 6'da kloralüminyum ftalosiyanın 1,875 3,75 7,5 ve 15 μM konsantrasyonlardaki absorpsiyon spektrumu verilmiştir.



Resim 6. Kloralüminyum ftalosiyanın PBS içindeki absorpsiyon spektrumu

3.2.4.4. Feoforbid a Konsantrasyonları

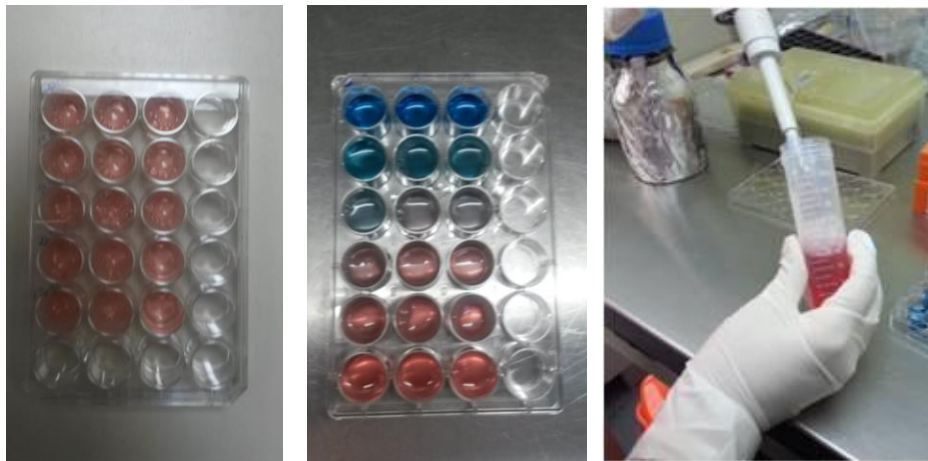
Feoforbid a daha önce *Leishmania* parazitlerinde denenmediğinden önce konsantrasyon denemeleri yapılmıştır. Feoforbid a parazitler için toksik olmayacak miktarda %1 DMSO-PBS karışımı ile çözülüp stok konsantrasyonu 64 μM olarak hazırlanmıştır. Konsantrasyonlar 16 8 4 2 1 0,5 ve 0,25 μM olarak denenmiş ve çalışma için 0,25 0,5 1 ve 2 μM konsantrasyonları seçilmiştir. Her konsantrasyon için 24'lü hücre kültürü plaklarında üçer kuyu çalışıldı. Resim 7'de 16 μM konsantrasyondaki feoforbid a absorpsiyon spektrumu verilmiştir.



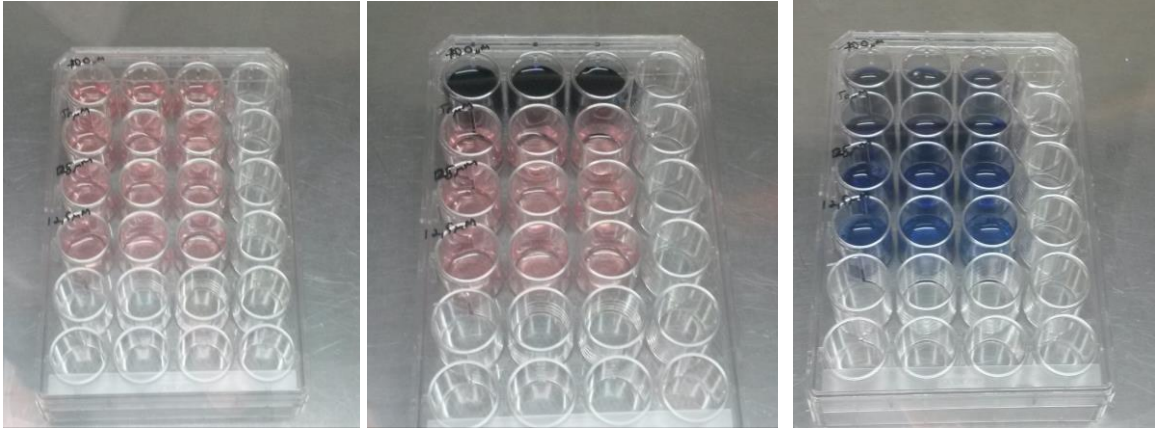
Resim 7. Feoforbid a PBS içindeki absorpsiyon spektrumu

3.2.5. Kimyasal Ajan-besiyeri Karışımlarının Hazırlanması ve İnokülasyon İşlemi

Stok 400 μM metilen mavisi solüsyonunun RPMI 1640 hücre kültür solüsyonu ile 24'lü hücre kültürü kuyuları olan plaklarda $\frac{1}{2}$ seri dilüsyon olacak şekilde hazırlandı. Dilüsyonlar hazırlandıktan sonra kimyasal ajanların konsantrasyonlarının bulunduğu bütün kuyucuklara Thoma lamında sayım yapılarak belirlenmiş promastigotlardan 1×10^7 hücre olacak şekilde inoküle edilmiştir ve 100 50 25 ve 12,5 μM 'lık metilen mavisi konsantrasyonları oluşturulmuştur (Resim 8). Toluidin mavisi konsantrasyonları da aynı şekilde hazırlanmıştır (Resim 9)

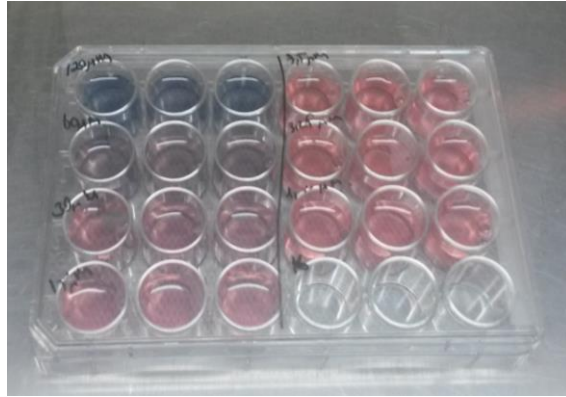


Resim 8. Metilen mavisi-besiyeri konsantrasyonlarının hazırlanması



Resim 9 Toluidin mavisi- besiyeri konsantrasyonlarının hazırlanması

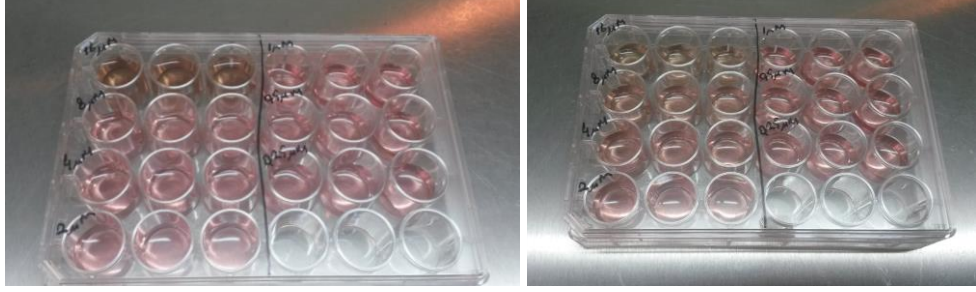
Stok 60 μM kloralüminyum ftalosiyonin solüsyonunun RPMI 1640 hücre kültür solüsyonu ile 24'lü hücre kültürü kuyuları olan plaklarda $\frac{1}{2}$ seri dilüsyon olacak şekilde hazırlandı. Dilüsyonlar hazırlandıktan sonra kimyasal ajanların konsantrasyonlarının bulunduğu bütün kuyucuklara Thoma lamında sayım yapılarak belirlenmiş promastigotlardan 1×10^7 hücre olacak şekilde inoküle edilmiştir ve 15 7,5 3,75 ve 1,87 μM 'lık kloralüminyum ftalosiyonin konsantrasyonları oluşturulmuştur (Resim 10).



Resim 10. Kloralüminyum ftalosiyonin- besiyeri konsantrasyonlarının hazırlanması

Stok 64 μM Feoforbid a solüsyonunun RPMI 1640 hücre kültür solüsyonu ile 24'lü hücre kültürü kuyuları olan plaklarda $\frac{1}{2}$ seri dilüsyon olacak şekilde hazırlandı. Dilüsyonlar hazırlandıktan sonra kimyasal ajanların konsantrasyonlarının bulunduğu bütün kuyucuklara Thoma lamında sayım yapılarak belirlenmiş promastigotlardan 1×10^7 hücre olacak şekilde

inoküle edilmiştir ve 16 8 4 2 1 0,50 ve 0,25 μM 'lık feoforbid a konsantrasyonları oluşturulmuştur (Resim 11).



Resim 11. Feoforbid a-besiyeri konsantrasyonlarının hazırlanması

3.2.6. İnkübasyon İşlemi

İnoküle edilen plakların tümü soğutmalı etüvde 26-26,5 $^{\circ}\text{C}$ 'de yatay olarak 1 saat süreyle karanlıkta inkübe edildi.



Resim 12. İnkübasyon işlemi

3.2.7. Fotodinamik Tedavinin *in vitro* Etkinliğinin belirlenmesi

3.2.7.1. Deney Grupları

Grup 1: 1×10^7 promastigot/ml olan parazit örnekleri 12,5 25 50 ve 100 μM dozlarda bir saat boyunca karanlıkta metilen mavisine maruz bırakıldı ve daha sonra serbest metilen mavisini ortamdaki uzaklaştırılıp, örneklere 30 dakika boyunca 10 cm mesafeden polikromatik ışık uygulandı.

Grup 2: 1×10^7 promastigot/ml olan parazit örnekleri 12,5 25 50 ve 100 μM dozlarda bir saat boyunca karanlıkta toluidin mavisine maruz bırakıldı ve daha sonra serbest toluidin mavisini ortamdaki uzaklaştırılıp, örneklere 30 dakika boyunca 10 cm mesafeden polikromatik ışık uygulandı.

Grup 3: 1×10^7 promastigot/ml olan parazit örnekleri 1,87 3,75 7,5 ve 15 μM dozlarda bir saat boyunca karanlıkta kloralüminyum ftalosiyanine maruz bırakıldı ve daha sonra serbest alüminyum ftalosiyanın ortamdaki uzaklaştırılıp, örneklere 30 dakika boyunca 10 cm mesafeden polikromatik ışık uygulandı.

Grup 4: 1×10^7 promastigot/ml olan parazit örnekleri 0,25 0,5 1 ve 2 μM dozlarda bir saat boyunca karanlıkta feoforbid a'ya maruz bırakıldı ve daha sonra serbest feoforbid a ortamdaki uzaklaştırılıp, örneklere 30 dakika boyunca 10 cm mesafeden polikromatik ışık uygulandı

Grup 5: 1×10^7 promastigot/ml olan parazit örnekleri 12,5 25 50 ve 100 μM dozlarda bir saat boyunca karanlıkta metilen mavisine maruz bırakıldı ve ışık uygulanmadı.

Grup 6: 1×10^7 promastigot/ml olan parazit örnekleri 12,5 25 50 ve 100 μM dozlarda bir saat boyunca karanlıkta toluidin mavisine maruz bırakıldı ve ışık uygulanmadı.

Grup 7: 1×10^7 promastigot/ml olan parazit örnekleri 1,87 3,75 7,5 ve 15 μM dozlarda bir saat boyunca karanlıkta kloralüminyum ftalosiyanine maruz bırakıldı ve ışık uygulanmadı.

Grup 8: 1×10^7 promastigot/ml olan parazit örnekleri 0,25 0,5 1 ve 2 μM dozlarda bir saat boyunca karanlıkta feoforbid a'ya maruz bırakıldı ve ışık uygulanmadı

Grup 9: Kontrol grubu herhangi bir ajan ya da ışık uygulanmadı.

3.2.7.2. DeneY Gruplarına Fotodinamik Tedavi Uygulama Yöntemi

1×10^7 promastigot/ml olan parazit örnekleri hücre toksitesini belirlemek için değişik dozlarda 1 saat boyunca fotosensitif ajanlara maruz bırakıldıktan sonra parazit örnekleri 1500 devirde 10 dakika boyunca santrifüjlenip, dipte kalan çökelti steril PBS ile 3 kez yıkandı ve ajanlar uzaklaştırılarak üzerine steril PBS eklendi. Parazitler 24'lü hücre kültürü plaklarına aktararak 10 cm mesafeden 30 dakika boyunca beyaz diyot ışığa maruz bırakıldı. LED downlight (Epistar, Tayvan) ışık kaynağı (20 W), 1650 lümen, 3000 K beyaz ışığa sahiptir. Bu ışık kaynağının seçilmesinin nedeni beyaz ışık 400-700 nm dalga boylarında bütün görünür ışık spektrumunu içermektedir. Aynı zamanda ışık kaynağı büyüklüğü nedeniyle 24'lü ve 96'lı kuyucuklu plate'lerin tamamına ışık verebilmekte ve LED olması nedeniyle çalışması sırasında çok az ısı açığa çıkarmaktadır. Böylece ışık kaynaklı ısı problemi oluşmamaktadır (Resim 13).



Resim 13. FDT uygulama düzeneği

3.3. Değerlendirme Yöntemleri

Fotodinamik tedavi uygulamasını takiben parazit örnekleri üzerine RPMI-1640 besiyeri eklenip, 18 saat 26 °C'lik etüvde inkübe edilerek hücre canlılığı analizi hem mikroskopik olarak, hem de XTT Cell Viability Kit (Cell Signaling) ile fotodinamik uygulamanın apoptotik etkisi ise giemsa, DAPI boyama ve DNA fragmentasyon testi ile belirlendi.

3.3.1. Mikroskopik Değerlendirme

On sekiz saatin sonunda etüvden çıkarılan plaklar Thoma lamına aktarılarak parazit sayımı yapıldı. Promastigotların % 50'sini inhibe eden konsantrasyon değerleri (IC₅₀) hesaplandı. Mikroskopik gözlemde hareketlilik, morfoloji ve yoğunluk değerlendirmesi yapıldı.

3.3.2. XTT (2,3,-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolium-5-kaboksanilit tuzu) Testi

XTT yöntemi kullanılarak fotosensitif ajanların sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Canlı hücre mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimi ile parçalanması durumunda çözülebilir formazana dönüşen XTT suda çözünen bir tetrazolium tuzudur. Formazanın oluşturduğu turuncu renk yoğunluğu metabolik olarak faal hücrelerin sayısı ile orantılıdır. Örnekler 96'lık mikroplâtelere XTT (2,3,-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolium-5-kaboksanilit tuzu) solüsyonu kullanılarak spektrofotometrik ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre Canlılığı\%} = (\text{Örneğin OD değeri} / \text{Kontrol OD değeri}) \times 100$$

Kit İçeriği;

XTT ayracı (2x25 ml)

XTT ayracı dondurularak karanlıkta saklandı.

Aktivasyon solüsyonu (2x0,5 ml)

Aktivasyon solüsyonu PBS içeren steril bir solüsyondur. Bu solüsyon dondurularak ışık görmeden saklandı.

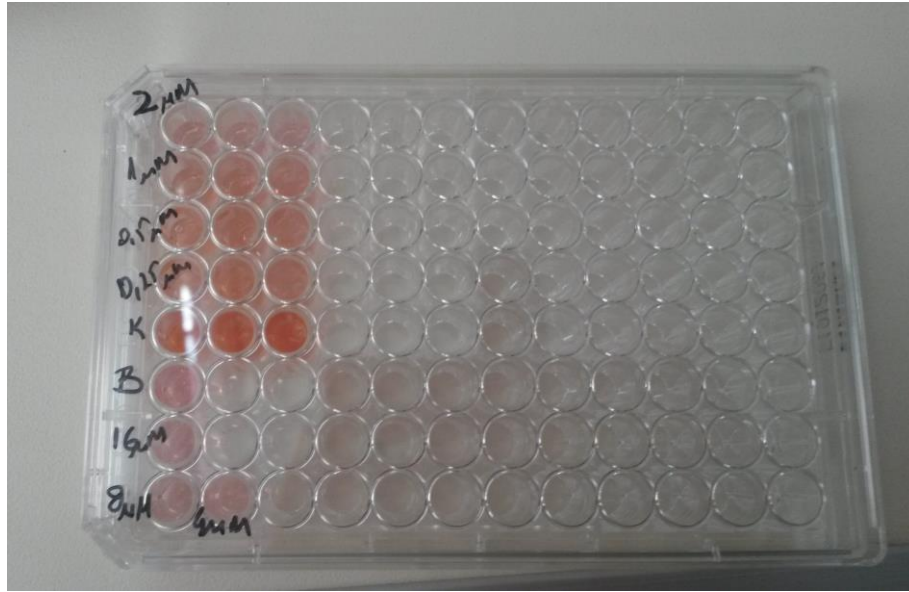
Kit Yöntemi:

Kullanımdan hemen önce XTT ayracı ve aktivasyon solüsyonu 37°C'lik su banyosunda çözüldü. Berrak solüsyon oluşana dek hafifçe karıştırıldı.

Reaksiyon solüsyonunu oluşturmak için 0,1 ml aktivasyon solüsyonu + 5 ml XTT ayracına eklendi (1/50,taze hazırlandı).

Kuyucuklara 100 µl tüm deney gruplarındaki hücrelerden pipetlendi. Daha sonra hücrelerin üzerine 50 µl reaksiyon solüsyonu eklendi ve inkübatörde 4 saat bekletildi.

Oluşan turuncu renkli formazan kristallerinin her bir kuyucuğun absorbands değeri (OD) mikropate okuyucuda 450 nm de okundu.



Resim 14. Dört saat sonundaki inkübatörden çıkan XTT testi görüntüsü

3.3.3. Hücresel Morfolojik Değerlendirme

3.3.3.1. Giemsa Boyama

Bütün kimyasal ajanlardan her konsantrasyon için üçer preparat hazırlandı. Her bir gruptan bir miktar *Leishmania* örneği alınıp lamel üzerine yayılıp kuruması beklendi. Kuruyan hücrelerin lamellere tam olarak fiske edilmesi için metanol lamellerin üzerine eklendi ve yaklaşık 120 preparat için 600 ml distile suya 600 damla Giemsa boyası eklenip oluşturulan boya solüsyonu lamlara damlatıldı ve 20 dakika boyunca beklendi. Bu sürenin

ardından çeşme suyu altında yıkandı. Lamlar kuruduktan sonra üzerine immersiyon yağı damlatılıp ışık mikroskobunda x100 büyütme ile hücre morfolojileri incelendi.

3.3.3.2. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile Boyama

Tedavi ve kontrol gruplarındaki apoptatik hücreleri değerlendirmek için DAPI boyama solüsyonu ile (Boster AR1177) boyama yapılmıştır. Bunun için tüm gruplara ait hücre süspansiyonları mikroskop lamına alınıp etanol ile beş dakika fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından DAPI ile 30 dakika boyunca 26 °C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Inkübasyonun ardından hücreler PBS ile yıkanmış ve hemen ardından Olympus BX51 floresan mikroskop altında DAPI exitasyon ve emisyon filtresi ile *Leishmania* morfolojileri incelenmişlerdir.

3.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi ile DNA Fragmentasyon Testi

Kontrol ve deney gruplarındaki hücre süspansiyonlarının DNA izolasyonları üretici firmanın önerileri doğrultusunda Apoptotic DNA Ladder Detection Kit (Millipore, USA&Canada) kullanılarak yapılmıştır.

Kit içeriği

- TE Lysis buffer 1,8 ml
- Enzyme A solution 0,25 ml
- Enzyme B 1 şişe (liyofilize)
- Ammonium acetate solution 0,25 ml
- DNA suspension buffer 2 ml
- *Enzyme B kullanılmadan önce 275 µL ultra distile su ile çözülmüştür.

Kit yöntemi

- Kontrol ve deney gruplarına ait pelletler 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve 500xg'de 5 dakika santrifüjlendi
- Pipet kullanarak süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Pelletlerin üzerine lysis bufferdan 35µl eklendi ve nazikçe pipetlendi. (*Bu aşamada sıvı vizkoz olmalı)
- Üzerine enzyme A (RNase A) solüsyonundan 5 µl eklendi ve nazikçe pipetlendi 37°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi.
- 5µl enzyme B (Proteinase K) solüsyonundan eklenip nazikçe karıştırıldı 30 dakika boyunca 50°C'de inkübe edildi.
- Ammonium acetate solüsyonundan her örneğe 5 µl eklenerek iyice karıştırıldı. Örneklerin üstüne 50 µl isopropanol eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra 10 dakika boyunca -20°C'de bekletildi.
- Daha sonra örnekler 16000xg 'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Örnekler %70'lik 500 µl etanol ile yıkandı.
- Oda sıcaklığında 10 dakika boyunca kurumaya bırakıldı.(* Pelletlerin çözülmesi için bu aşamada iyice kuruması gerekli)
- DNA pelletleri 30 µl DNA süspansiyon solüsyonunda çözüldü.

İzolasyonun ardından %1 agaroz jelde 50 V'da 2 saat boyunca 1 kb marker kullanılarak örnekler yürütülmüş ve agaroz jel görüntüleme sistemi (Infinity, Vilber Lourmat) ile görüntülenmiştir.

3.4. İstatistiksel Yöntemler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 6 (San Diego,CA,USA) hazır paket programı kullanıldı. IC₅₀ değerleri nonlinear regresyon analizine göre belirlenmiştir. Gruplara tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar ortalama±standart hata

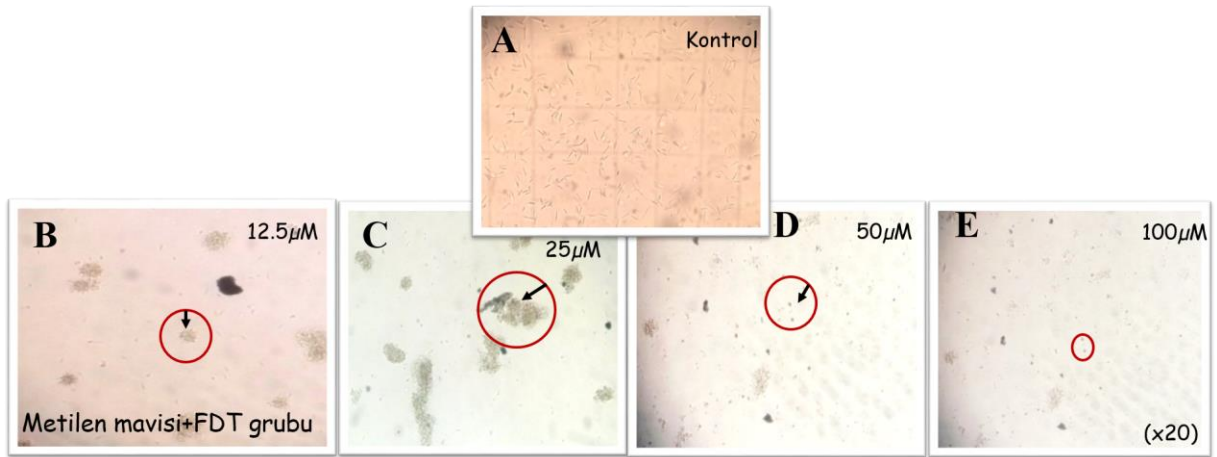
olarak verilmiştir. İstatistiksel açıdan anlamlı F değerleri veren parametreler için ileri (post hoc) testler uygulanmıştır ve eşit örneklem büyüklüğüne dayalı Tukey testi kullanılmıştır. Varyans analizi uygulanmadan önce, çalışmadaki parametrelerin normal dağılıp dağılmadıkları Kolmogorov-Smirnov parametrik-olmayan (non-parametric) testi ile incelenmiştir. Aynı zamanda farklı konsantrasyonlardaki fotosensitif ajanların sitotoksitesini belirlenmesinde Student-t testi kullanılıp veriler birbirinden bağımsız üç tekrar sonucunda gerçekleştirilmiştir ve $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı Değerlendirme Bulguları

4.1.1. Grup 1: Metilen mavisi+FDT Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının *L.tropica* Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

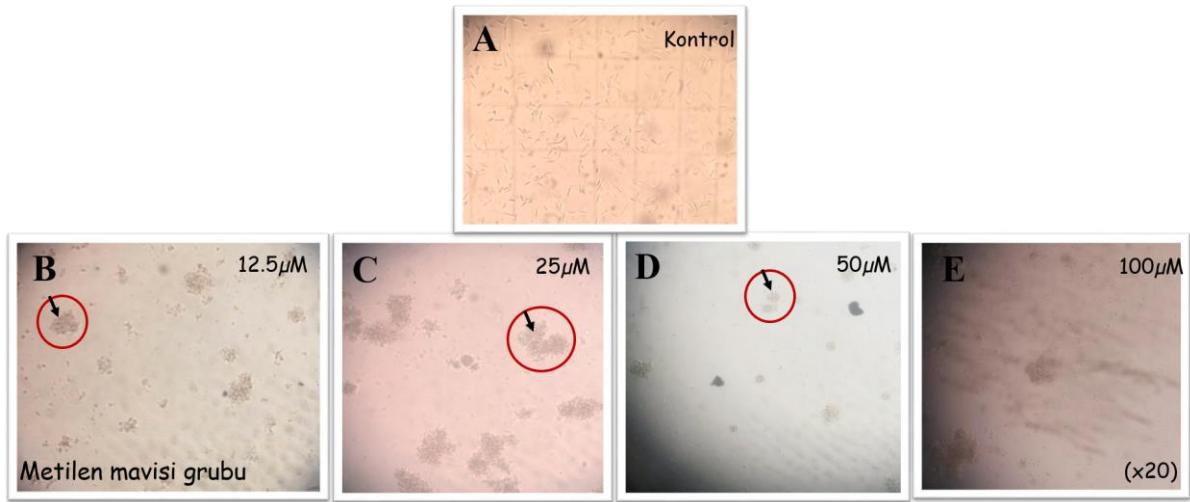
Farklı konsantrasyonlardaki metilen mavisi+FDT uygulamasının 18 saatlik inkübasyon sonrası mikroskopik gözlem sonuçlarına göre; kontrol grubundaki parazitlerin, farklı konsantrasyonlarındaki metilen mavisi + FDT uygulanan gruplara göre daha aktif ve hareketli olduğu tespit edildi. Metilen mavisinin 12,5 ve 25 μM konsantrasyonlarında orta yoğunlukta, hareketli, az miktarda yuvarlak, normal morfolojide parazitler gözlemlendi. 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda yavaş hareketli ve ara ara hareketsiz, atipik şekilli parazitlere rastlandı. 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda yuvarlak şekilli hareketsiz parazit sayısında da belirgin artış gözlemlendi. Özellikle 100 μM konsantrasyonda az yoğunlukta *L.tropica* promastigotları gözlemlendi. Sonuç olarak metilen mavisi konsantrasyonu azaldıkça canlı ve aktif parazitler görüldüğü saptanmıştır (Resim 15).



Resim 15. Metilen mavisi+FDT uygulanan *L.tropica* promastigotlarının invert mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 12,5 μM metilen mavisi + FDT, C. 25 μM metilen mavisi + FDT, D. 50 μM metilen mavisi + FDT, E. 100 μM metilen mavisi + FDT grubu (x20).

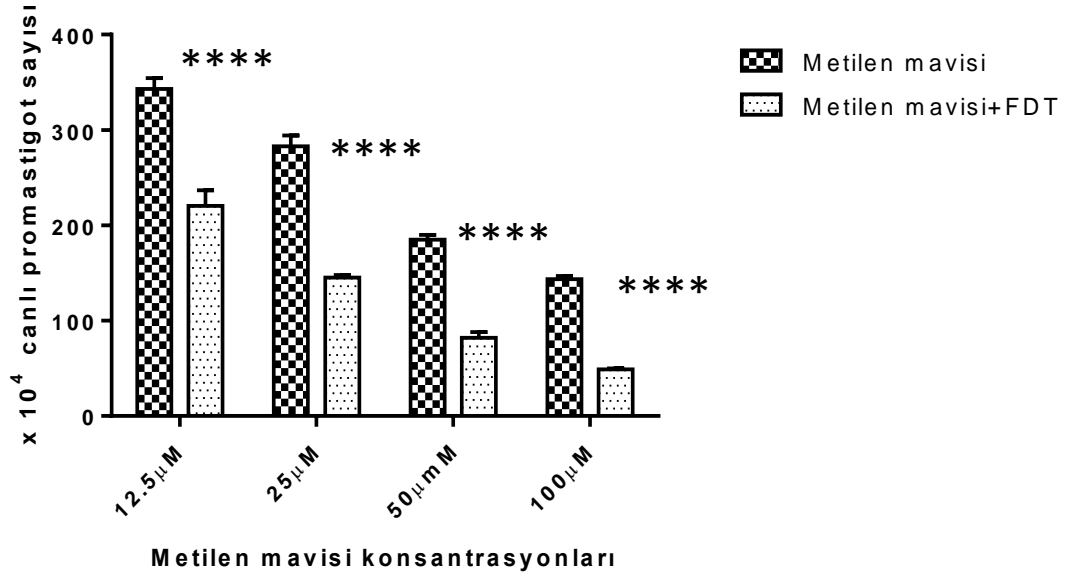
4.1.2. Grup 2: Metilen Mavisi Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının *L.tropica* Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

Resim 16'da farklı konsantrasyonlardaki metilen mavisi uygulamasının mikroskopik gözlem sonuçları verilmiştir. Metilen mavisinin 12,5 μ M konsantrasyonunda orta yoğunlukta, hareketli, az miktarda yuvarlak, normal morfolojide parazitler gözlemlendi. 25 ve 50 μ M konsantrasyonlarında; az yoğunlukta, yavaş hareketli ve hareketsiz yuvarlak şekilli parazitlerden oluşan kümeler gözlemlendi. 100 μ M konsantrasyonunda da az yoğunlukta, hareketsiz parazitlere rastlandı. Hareketsiz yuvarlak şekilli parazitlerden oluşan kümeler gözlemlendi.



Resim 16. Metilen mavisi uygulanan *L.tropica* promastigotların invert mikroskop görüntüsü.

A. Kontrol, B. 12,5 μ M metilen mavisi, C. 25 μ M metilen mavisi, D. 50 μ M metilen mavisi, E. 100 μ M metilen mavisi grubu (x20).



****: Işık uygulanmayan grup ile anlamlı farklılık $p < 0,0001$

Resim 17. Metilen mavisinin tek başına ve FDT ile birlikte kullanılmasının *L.tropica* promastigotları üzerindeki etkisi.

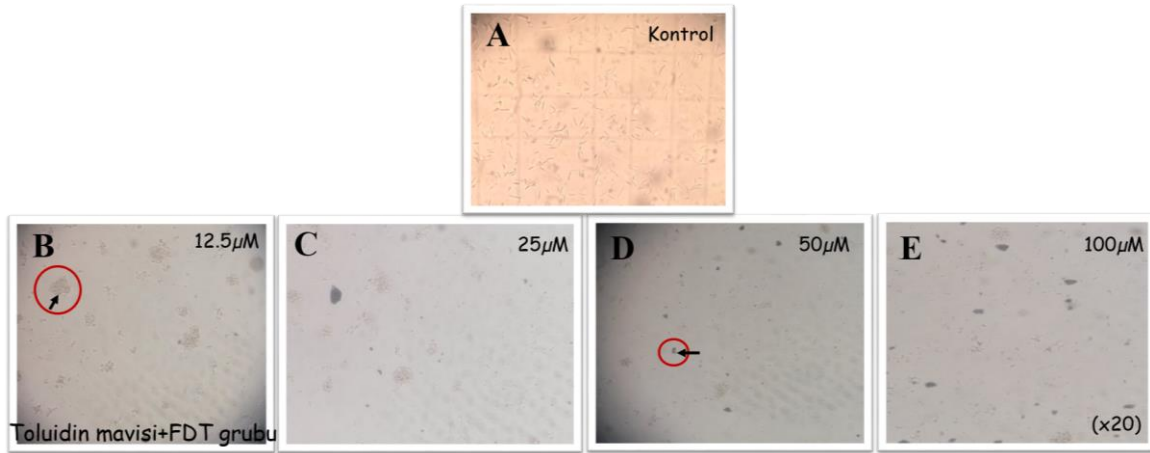
Sadece metilen mavisi ve metilen mavisi+FDT uygulamasının farklı konsantrasyonlarının *L.tropica* promastigotlarının proliferasyonuna etkisi kantitatif olarak incelendi. Resim 17’de ve Tablo 5 *L.tropica* promastigotlarına metilen mavisinin tek başına uygulanması ve *L.tropica* promastigotları üzerine metilen mavisi ile birlikte FDT uygulanması sonucu hücre canlılığındaki değişimler görülmektedir. Veriler birbirinden bağımsız üç tekrar sonucunda gerçekleştirildi. Hata barları ortalamanın standart hatasını (SEM) belirtmektedir. FDT ve metilen mavisinin birlikte kullanılmasının metilen mavisi konsantrasyonu arttıkça canlı promastigot sayısının azaldığı görülmektedir. Özellikle 25 μM’den yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığının kayda değer oranlarda azaldığı gözlenmiştir. Metilen mavisinin artan konsantrasyonlarda tek başına uygulanmasının canlı promastigot sayısında azalma gösterse de FDT ile birlikte uygulanmasına göre hücre canlılığındaki değişim daha sınırlı kalmıştır. Farklı konsantrasyonlarda metilen mavisi + FDT uygulamasına maruz kalan deney grubundaki parazit sayısının, farklı konsantrasyonlarda sadece metilen mavisine maruz kalan deney grubuna göre daha az olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,0024$) ölçüde azaldığı tespit edilmiştir .

Tablo 5. Farklı konsantrasyonlarda metilen mavisi + FDT uygulaması ile farklı konsantrasyonlarda sadece metilen mavisi uygulamasının karşılaştırılması

<i>Konsantrasyon</i>	<i>Metilen mavisi Grubu Canlı Parazit Sayısı x10⁴ (Ort±sds)</i>	<i>Metilen mavisi FDT Grubu Canlı Parazit Sayısı x10⁴ (Ort±sds)</i>
12,5 µM	343,00±11,26	220,33±16,5
25 µM	283,00±11,26	145,33±2,51
50 µM	185,00±5,00	82,00±6,00
100 µM	143,60±3,21	49,00±1,00
P degeri	P=0,0024	

4.1.3. Grup 3: Toluidin mavisi + FDT Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının *L.tropica* Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

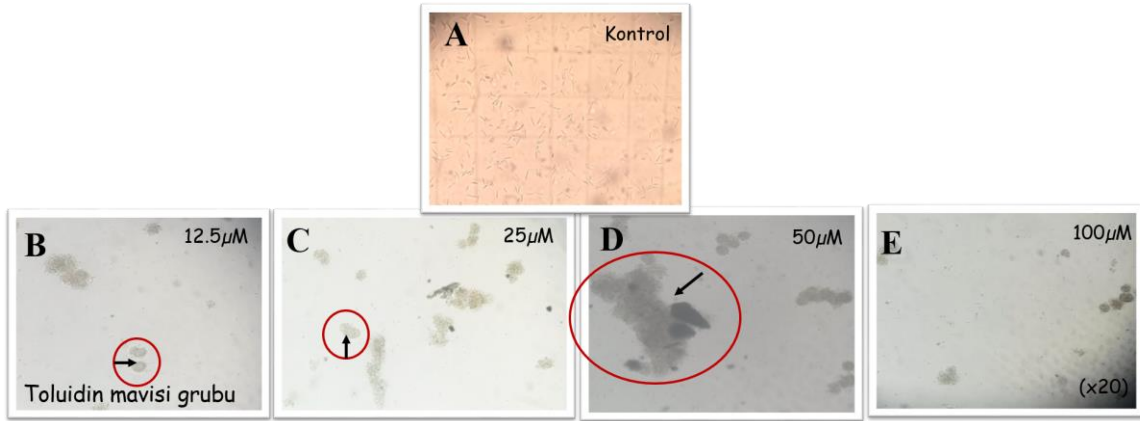
Resim 18’de farklı konsantrasyonlardaki toluidin mavisi + FDT uygulamasının 18 saatlik inkübasyon sonrası mikroskopik gözlem sonuçları verilmiştir. 12,5 ve 25 µM konsantrasyonlarda + FDT uygulaması sonucu orta yoğunlukta, hareketli, yuvarlak şekilli parazitler gözlemlenir iken, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda + FDT uygulaması sonucu hücreler atipik forma dönüşmüş, büzülüp küçülmüş, yüzey uzantılarını kaybetmiş ve hücreler arası alanda boşluklar oluşmuştur. Düşük konsantrasyonlar morfolojik olarak kontrole göre önemli bir değişiklik göstermemiştir.



Resim 18. Toluidin mavisi + FDT uygulanan *L.tropica* promastigotların invert mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 12,5 µM toluidin mavisi + FDT, C. 25 µM toluidin mavisi + FDT, D. 50 µM toluidin mavisi + FDT, E. 100 µM toluidin mavisi + FDT grubu (x20).

4.1.4. Grup 4: Toluidin mavisi Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının *L.tropica* Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

Resim 19'da görüldüğü gibi toluidin mavisi konsantrasyonu arttıkça *L.tropica* promastigotların canlılığı azalmıştır. 12,5 25 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında bulunan parazitler kontrol grubundaki parazitlere göre aktif ve hareketliliğini yitirmişlerdir. Tüm konsantrasyonlarda hareketsiz yuvarlak şekilli parazitlerden oluşan kümeler gözlemlendi.



Resim 19. Toluidin mavisi uygulanan *L.tropica* promastigotların invert mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 12,5 μM toluidin mavisi, C. 25 μM toluidin mavisi, D. 50 μM toluidin mavisi, E. 100 μM toluidin mavisi grubu (x20).



****: Işık uygulanmayan grup ile anlamlı farklılık $p < 0,0001$

Resim 20. Toluidin mavisinin tek başına ve FDT ile birlikte kullanılmasının *L.tropica* promastigotları üzerindeki etkisi.

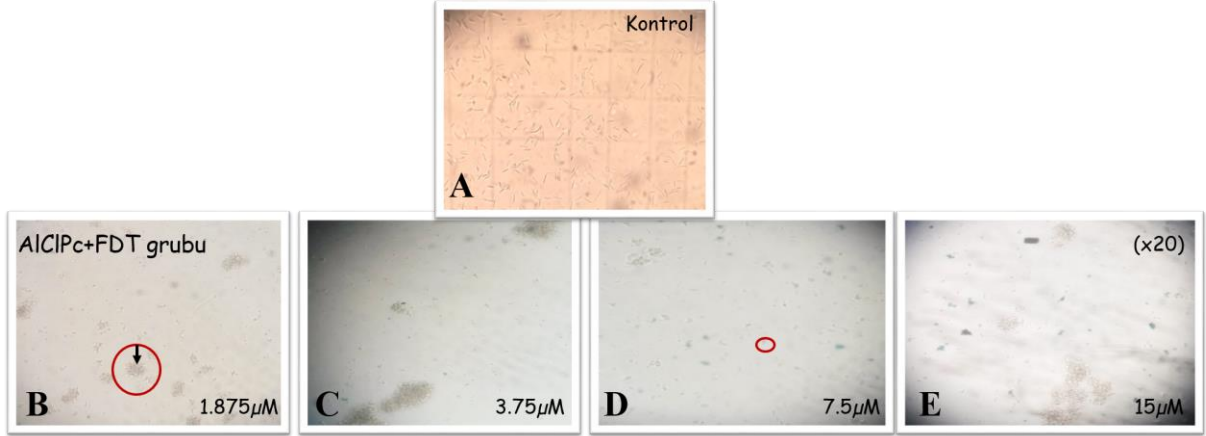
Resim 20 ve Tablo 6'da *L.tropica* promastigotlarına toluidin mavisinin tek başına uygulanması ve toluidin mavisini ile birlikte FDT uygulanması sonucu hücre canlılığındaki değişimler görülmektedir. FDT ve toluidin mavisinin birlikte kullanılmasıyla konsantrasyon artışı ile canlı promastigot sayısının anlamlı olarak azaldığı gözlenmektedir. Toluidin mavisini ile birlikte FDT uygulanması ile en yüksek konsantrasyonda (100 µM) canlılığın büyük bir bölümü ortadan kalkmıştır. Farklı konsantrasyonlarda toluidin mavisini+FDT uygulamasına maruz kalan deney grubundaki parazit sayısının, farklı konsantrasyonlarda sadece toluidin mavisine maruz kalan deney grubuna göre daha az olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı (p=0,018) ölçüde azaldığı tespit edilmiştir.

Tablo 6. Farklı konsantrasyonlarda toluidin mavisini + FDT uygulaması ile farklı konsantrasyonlarda sadece toluidin mavisini uygulamasının karşılaştırılması

Konsantrasyon	Toluidin mavisini grubu canlı Parazit Sayısı x10⁴ (Ort±sds)	Toluidin mavisini FDT grubu canlı Parazit Sayısı x10⁴ (Ort±sds)
12,5 µM	405,00±5,00	221,66±3,51
25 µM	345,00±5,00	162,66±2,08
50 µM	205,33±4,04	101,00±1,00
100 µM	120,66±3,05	52,00±2,00
P değeri	P=0,0018	

4.1.5. Grup 5: Kloralüminyum Ftalosiyonin + FDT Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının *L.tropica* Promastigotlarının Proliferasiyonuna Etkisinin İncelenmesi

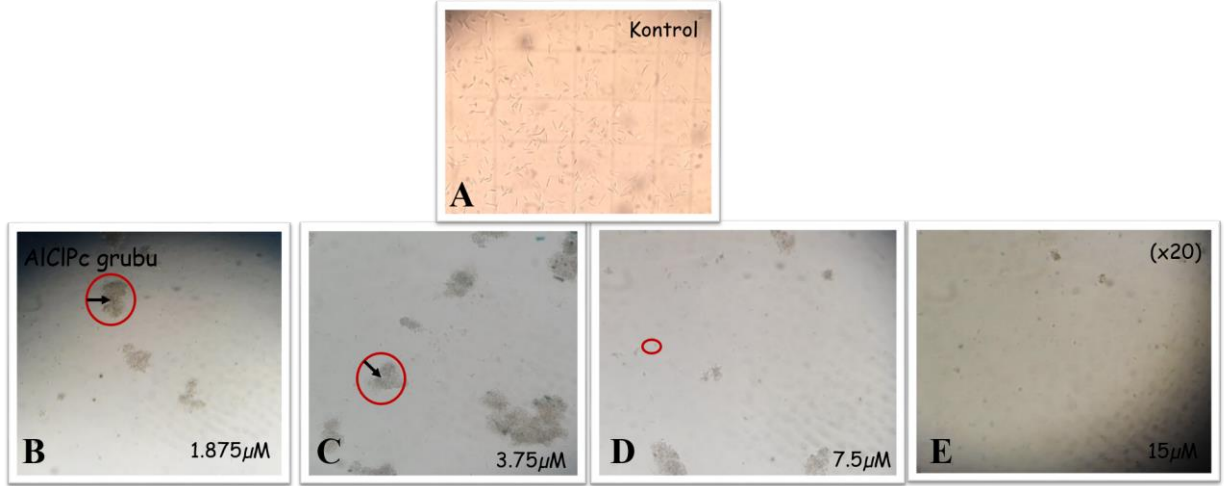
Resim 21'de kloralüminyum ftalosiyonin + FDT uygulamasının mikroskopik gözlem sonuçları gösterilmiştir. 1,875 µM konsantrasyonda parazitler kontrol grubundaki parazitler gibi aktif, normal morfolojide ve hareketlidir. Konsantrasyon artıka hücrelerde yuvarlaklaşma, küçülme, uzantılarını kaybetme, kümeleşme gibi değişiklikler geliştiği saptanmıştır.



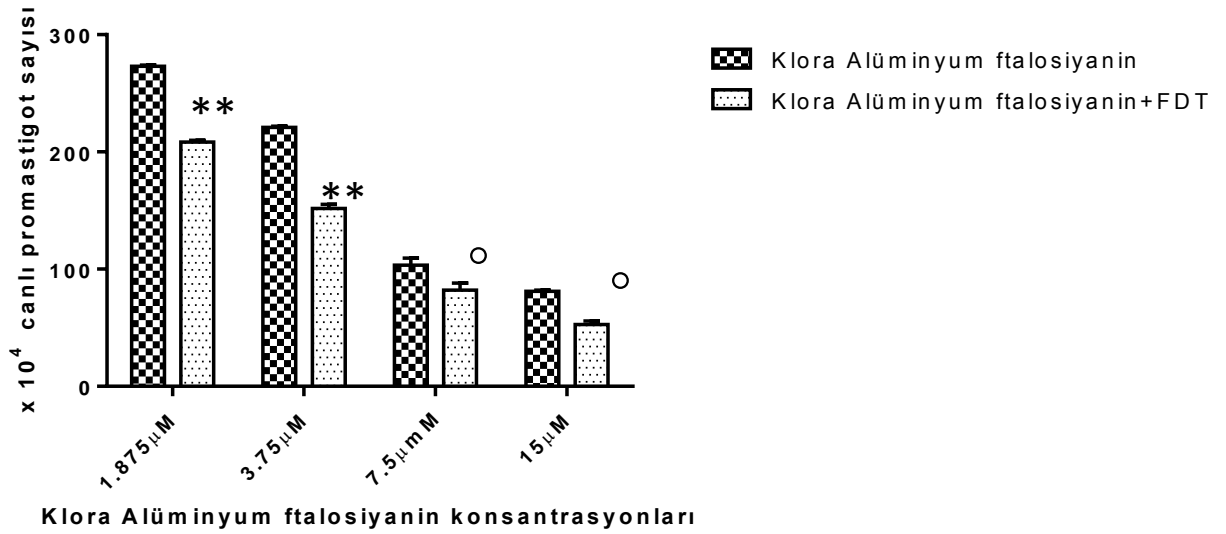
Resim 21. Kloralüminyum ftalosiyonin + FDT uygulanan *L.tropica* promastigotların invert mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 1,875 µM kloralüminyum ftalosiyonin + FDT, C. 3,75 µM kloralüminyum ftalosiyonin + FDT, D. 7,5 µM kloralüminyum ftalosiyonin + FDT, E. 15 µM kloralüminyum ftalosiyonin + FDT (x20).

4.1.6. Grup 6: Kloralüminyum Ftalosiyonin Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının *L.tropica* Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

Kloralüminyum ftalosiyoninin farklı konsantrasyonlarının (1,875 µM 3,75 µM 7,5 µM 15 µM) uygulamasının 18 saat inkübasyondan sonra etkisi morfolojik ve sayısal olarak incelendi. 15 µM'lık konsantrasyonda az yoğunlukta, parazitler arası alanda boşluklar, atipik formda *L.tropica* promastigotları tespit edilmiştir. Konsantrasyon azaldıkça yoğunluğu artan, normal morfolojide, yavaş hareketli, ara ara hareketsiz parazitler olduğu gözlemlendi (Resim 22).



Resim 22. Kloralüminyum ftalosiyonin uygulanan *L.tropica* promastigotların invert mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 1,875 µM kloralüminyum ftalosiyonin, C. 3,75 µM kloralüminyum ftalosiyonin, D. 7,5 µM kloralüminyum ftalosiyonin, E. 15 µM kloralüminyum ftalosiyonin (x20).



** : $p < 0.05$

^o : Işık uygulanmayan grup ile anlamlı farklılık yok $p > 0.05$

Resim 23. Kloralüminyum ftalosiyoninin tek başına ve FDT ile birlikte kullanılmasının *L.tropica* promastigotları üzerindeki etkisi.

Resim 23 ve Tablo 7'de kloralüminyum ftalosiyonin + FDT uygulamasının ve tek başına kloralüminyum ftalosiyoninin farklı konsantrasyonlarının *L.tropica* promastigotlarına

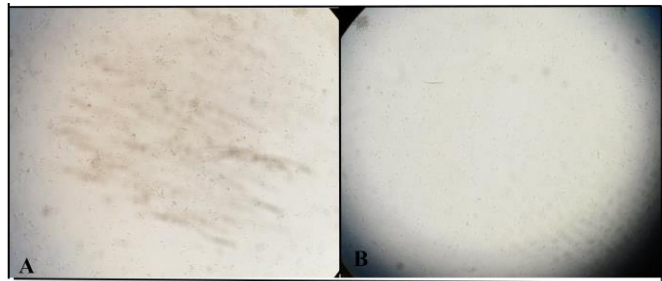
uygulanması sonucu hücre canlılığındaki değişimler kantitatif olarak görülmektedir. Farklı konsantrasyonlarda kloralüminyum ftalosiyonin + FDT uygulamasına maruz kalan deney grubundaki parazit sayısının, farklı konsantrasyonlarda sadece kloralüminyum ftalosiyonine maruz kalan deney grubundaki parazit sayısına göre daha az olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,07$) olmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 7. Farklı konsantrasyonlarda kloralüminyum ftalosiyonin + FDT uygulaması ile farklı konsantrasyonlarda sadece kloralüminyum ftalosiyonin uygulamasının karşılaştırılması

<i>Konsantrasyon</i>	<i>AlClPc grubu canlı Parazit Sayısı $\times 10^4$ (Ort\pmsds)</i>	<i>AlClPc FDT grubu canlı Parazit Sayısı $\times 10^4$ (Ort\pmsds)</i>
1,875 μM	273,00 \pm 1,00	208,33 \pm 1,52
3,75 μM	221,00 \pm 1,00	151,66 \pm 3,51
7,5 μM	103,33 \pm 6,11	82,00 \pm 6,00
15 μM	81,00 \pm 1,00	52,66 \pm 3,05
P değeri	P=0,07	

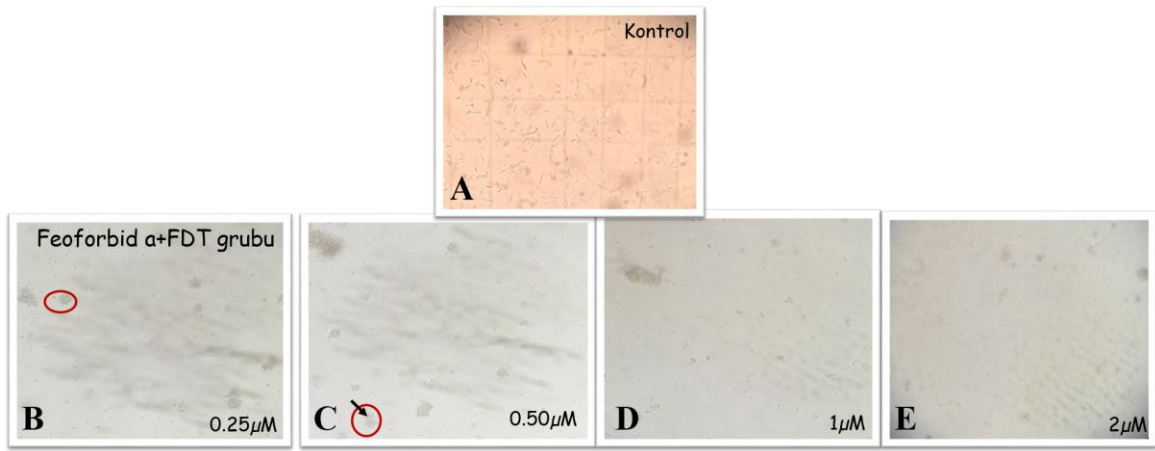
4.1.7. Grup 7: Feoforbid a + FDT Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

Feoforbid a daha önce *Leishmania* parazitlerinde denenmediğinden önce konsantrasyon denemeleri yapılmıştır. Konsantrasyonlar 16 8 4 2 1 0,5 ve 0,25 μ M olarak denenmiştir. Feoforbid a'nin 4 8 ve 16 μ M konsantrasyonlarında hiçbir hareketli parazite rastlanmadığından çalışmaya dahil edilmemiştir (Resim 24).



Resim 24. Feoforbid a + FDT uygulanan *L.tropica* promastigotların invert mikroskop görüntüsü. A. 16 μ M feoforbid a + FDT, B. 8 μ M feoforbid a + FDT grubu (x20)

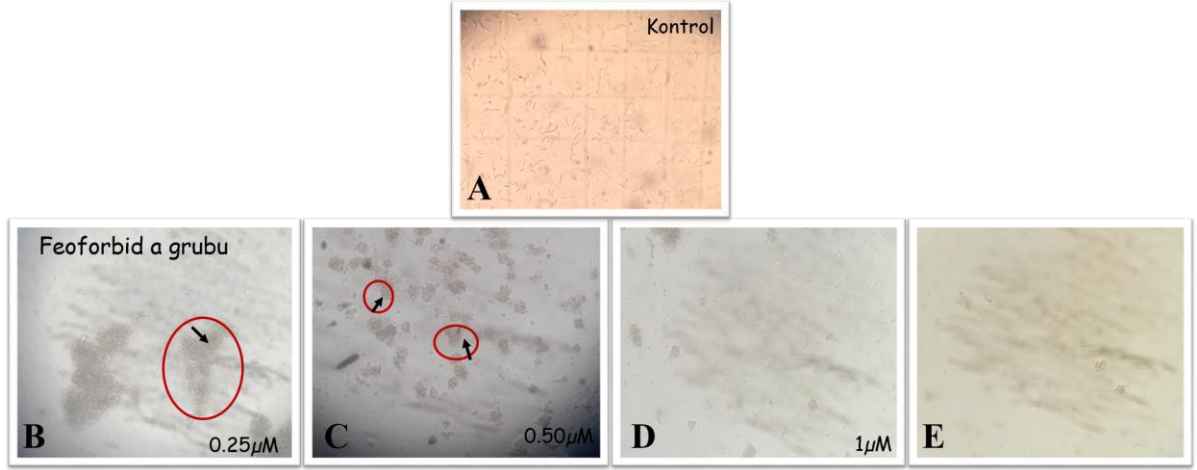
Resim 25’de feoforbid a + FDT uygulamasının 2 1 0,5 ve 0,25 μM konsantrasyonlarda mikroskopik gözlem sonuçları verilmiştir. 2 μM konsantrasyonda feoforbid a + FDT uygulamasında hareketli parazitler görülmeye başlanmıştır. Ancak parazitler yavaş hareketli ve ara ara hareketsiz, atipik, yuvarlak şekillidir. Kontrol grubuna göre canlı parazit sayısının belirgin derecede azaldığı gözlemlenmiştir. 1 ve 0,50 μM konsantrasyonlarında orta yoğunlukta, hareketli, az miktarda yuvarlak, ara ara kümeli parazitler gözlemlendi. 0,25 μM konsantrasyonlarda orta yoğunlukta, yuvarlak şekilli, hareketli aynı zamanda kontrol grubundaki parazitler gibi normal morfolojide aktif parazitler de gözlemlendi.



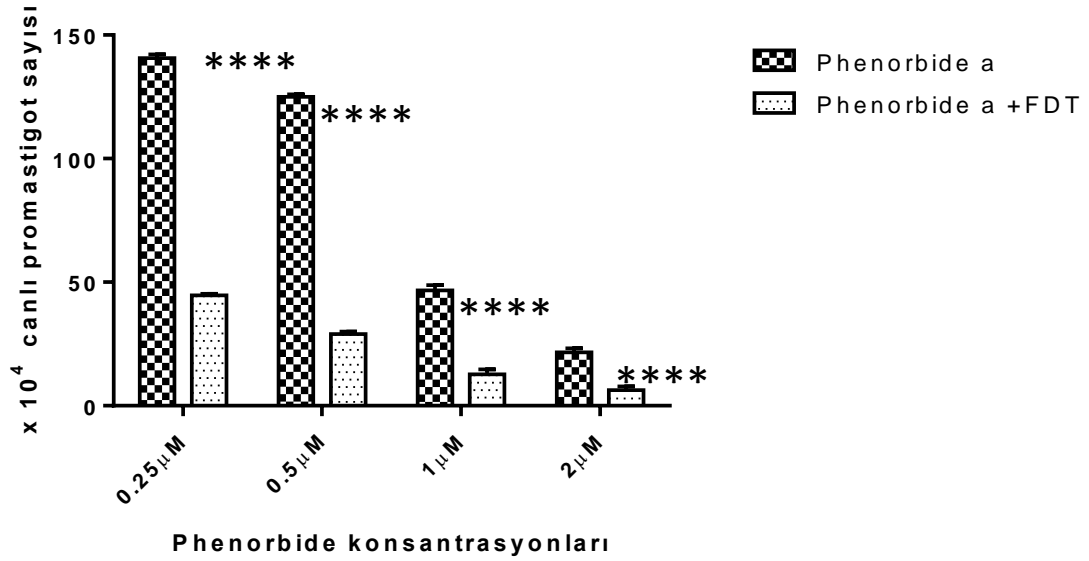
Resim 25. Feoforbid a + FDT uygulanan *L.tropica* promastigotlarının invert mikroskop görüntüsü. A. Kontrol. B. 0,25 μM feoforbid a + FDT, C. 0,50 μM feoforbid a + FDT, D. 1 μM feoforbid a + FDT, E. 2 μM feoforbid a + FDT grubu (x20).

4.1.8. Grup 8: Feoforbid a Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının *L.tropica* Promastigotlarının Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

Feoforbid a'nin farklı konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra etkisi mikroskopik olarak gözlemlenmiştir (Resim 26). En yüksek konsantrasyon olan 2 μM 'da az yoğunlukta, ara ara hareketli parazitler tespit edildi. 1 0,50 ve 0,25 μM konsantrasyonda orta yoğunlukta, hareketsizli ve hareketsiz, yuvarlak şekilli parazit kümelerine rastlandı.



Resim 26. Feoforbid a uygulanan *L.tropica* promastigotların invert mikroskop görüntüsü. A. Kontrol. B.0,25 µM feoforbid a, C. 0,50 µM feoforbid a, D. 1 µM feoforbid a, E. 2 µM feoforbid a grubu (x20).



****: Işık uygulanmayan grup ile anlamlı farklılık p<0,0001

Resim 27. Feoforbid a'nin tek başına ve FDT ile birlikte kullanılmasının *L.tropica* promastigotları üzerindeki etkisi.

Şekil 27 ve Tablo 8'de feoforbid a'nın tek başına ve FDT ile birlikte uygulanmasının farklı konsantrasyonlarda *L.tropica* promastigotları üzerine etkisi mikroskobik olarak incelenmiş ve her iki grupta konsantrasyon arttıkça canlı promastigot sayısında azalma

gözlemlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda feoforbid a + FDT uygulamasına maruz kalan deney grubundaki parazit sayısının, farklı konsantrasyonlarda sadece feoforbid a'ya maruz kalan deney grubuna göre daha az olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,0001$) ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Feoforbid a + FDT uygulamasında en yüksek konsantrasyon olan 2 μM hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir.

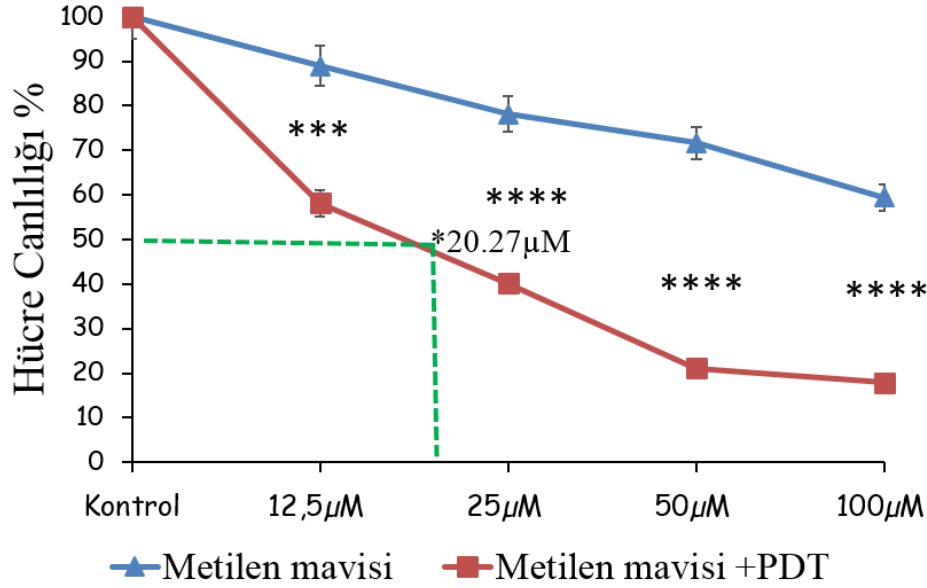
Tablo 8. Farklı konsantrasyonlarda feoforbid a + FDT uygulaması ile farklı konsantrasyonlarda sadece feoforbid a uygulamasının karşılaştırılması

<i>Konsantrasyon</i>	<i>Feoforbid a grubu canlı Parazit Sayısı $\times 10^4$ (Ort\pmsds)</i>	<i>Feoforbid a FDT grubu canlı Parazit Sayısı $\times 10^4$ (Ort\pmsds)</i>
0,25 μM	140,66 \pm 1.52	44,66 \pm 0,57
0.50 μM	125,00 \pm 1.00	29,00 \pm 1,00
1 μM	46,66 \pm 2.08	12,66 \pm 2,08
2 μM	21,66 \pm 1.52	6,33 \pm 1,52
P değeri	P<0,0001	

4.2. XTT Yöntemiyle Elde edilen Sitotoksosite Sonuçları

Resim 28 ve Tablo 9'da farklı konsantrasyonlardaki metilen mavisi + FDT uygulaması ve sadece metilen mavisi uygulamasının *L.tropica* promastigotlarının sitotoksik etkileri üzerine etkisi görülmektedir. Kontrol grubunda promastigotların canlılığının yüksek olmasına bağlı olarak formazan kristali oluşumu oldukça yoğundur. Konsantrasyonun artması ile birlikte formazan kristali oluşumu da azalmıştır. Metilen mavisi + FDT 'ye maruz kalan *Leishmania* parazitlerinin hücre canlılığı kontrol grubuna göre konsantrasyon arttıkça azaldığı görülmektedir. 25 μM konsantrasyondan sonra metilen mavisinin kullanıldığı FDT uygulamalarında hücrelerin büyük bir bölümünün canlılığını yitirdiği gözlemlenmiştir. Hücre canlılığındaki azalma 12,5 μM 25 μM 50 μM ve 100 μM metilen mavisi + FDT gruplarında kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı bulunmuştur. Sadece metilen mavisi uygulanan 12,5 μM 25 μM 50 μM ve 100 μM gruplarında ise sitotoksosite kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır; ayrıca metilen mavisi + FDT uygulanan gruplardaki hücre canlılığı sadece metilen mavisi gruplarından farklı ($p=0,0024$) bulunmuştur.

Metilen mavisi + FDT 'ye maruz kalan *Leishmania* promastigotları için IC₅₀ değeri 20,27 μ M olarak belirlenmiştir.



****: Işık uygulanmayan grup ile anlamlı farklılık p<0,0001
 ***: p<0.001

Resim 28. Sadece metilen mavisi ve FDT ile birlikte kullanılmasının farklı konsantrasyonlarının *L.tropica* promastigotların canlılığına etkisi.

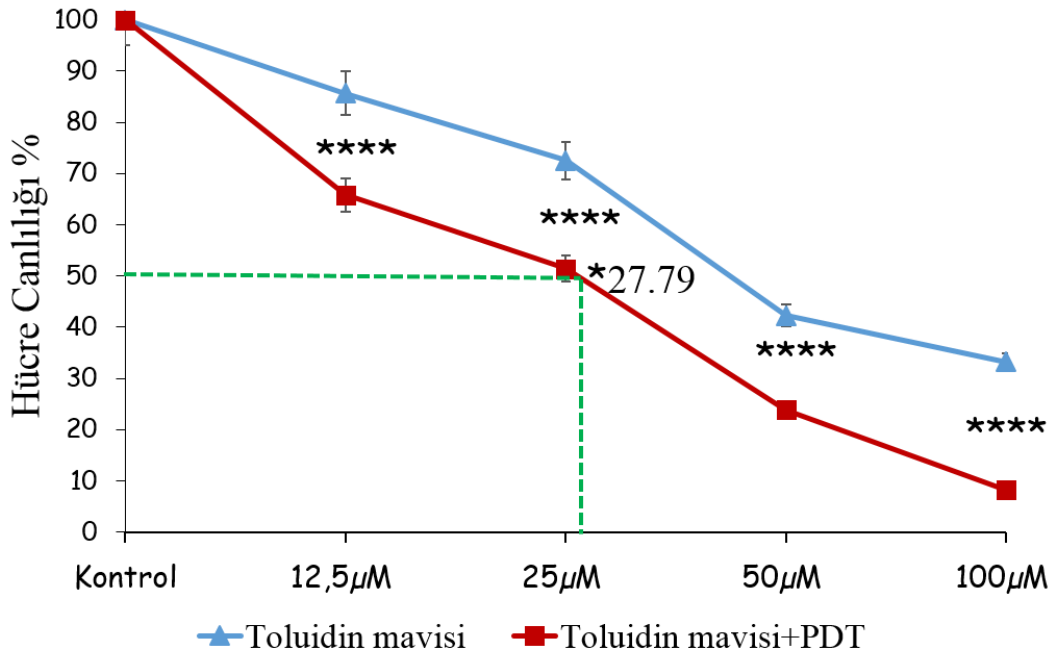
Tablo 9 Farklı konsantrasyonlarda metilen mavisi ile metilen mavisi+FDT uygulamasının kontrol grubu ile karşılaştırılması

Konsantrasyon	Metilen mavisi	Kontrol	P değeri	Metilen mavisi	Kontrol	P değeri
	Ortalama(%)			FDT Ortalama (%)		
12,5 μ M	88,603	100	0,0010	58,254	100	0,0001
25 μ M	78,138	100	0,0002	40,199	100	P<0,0001
50 μ M	71,326	100	0,0001	20,952	100	P<0,0001
100 μ M	58,913	100	0,0001	17,832	100	P<0,0001

Toluidin mavisinin tek başına ve FDT ile birlikte uygulanmasının *L.tropica* promastigotlarının sitotoksik etkileri üzerine etkisi XTT yöntemi ile incelenmiş ve optik yoğunluklar ölçülmüştür. Resim 29 ve Tablo 10'da kontrolün canlılığı %100 kabul edilerek

toluidin mavisinin tek başına ve FDT ile birlikte uygulanmasının farklı konsantrasyonlarda *L.tropica* promastigotları üzerine etkisi verilmiştir.

Hem toluidin mavisinin tek başına hem de FDT ile birlikte kullanılmasında en yüksek konsantrasyon olan 100 µM grubunda sitotoksosite en yüksek bulunmuştur. Hücre canlılığındaki azalma 12,5 µM 25 µM 50 µM ve 100 µM toluidin mavisi + FDT gruplarında kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı bulunmuştur. Sadece toluidin mavisi uygulanan 12,5 µM 25 µM 50 µM ve 100 µM gruplarında ise sitotoksosite kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır; ayrıca sadece toluidin mavisi uygulanan gruplardaki hücre canlılığı toluidin mavisi + FDT gruplarından da farklı ($P=0,021$) bulunmuştur. Toluidin mavisi + FDT 'ye maruz kalan *Leishmania* promastigotları için IC_{50} değeri 27,79 µM; toluidin mavisine maruz kalan *Leishmania* promastigotları için IC_{50} değeri 38,76 µM olarak belirlenmiştir.



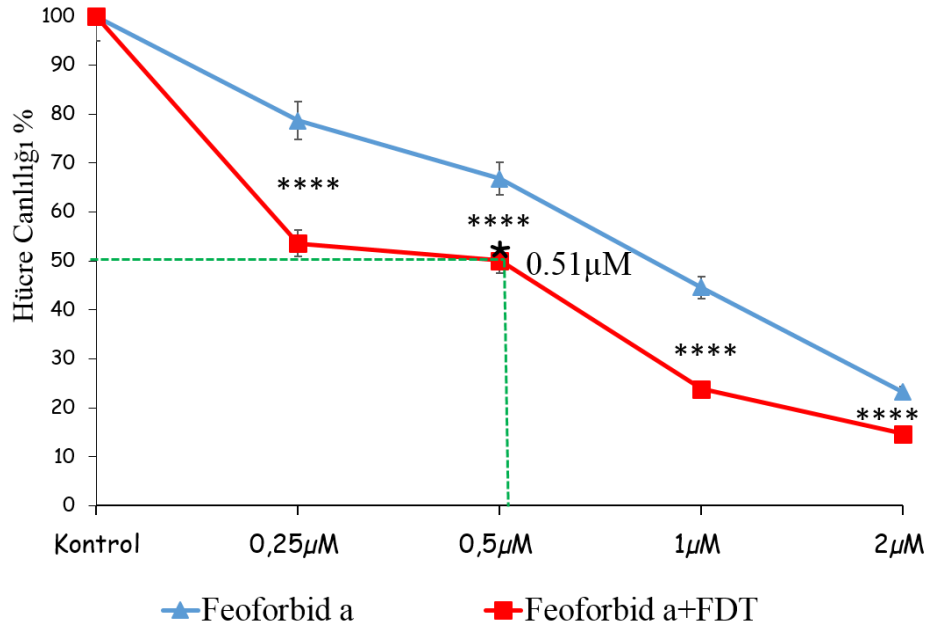
****: Işık uygulanmayan grup ile anlamlı farklılık $p<0,0001$

Resim 29. Sadece toluidin mavisi ve FDT ile birlikte kullanılmasının farklı konsantrasyonlarının *L.tropica* promastigotların canlılığına etkisi.

Tablo 10. Farklı konsantrasyonlarda toluidin mavisi ve toluidin mavisi+FDT uygulaması ile kontrol grubunun karşılaştırılması

<i>Konsantrasyon</i>	<i>Toluidin mavisi</i> <i>Ortalama(%)</i>	<i>Kontrol</i>	<i>P değeri</i>	<i>Toluidin mavisi</i> <i>FDT</i> <i>Ortalama(%)</i>	<i>Kontrol</i>	<i>P değeri</i>
12,5 µM	85,256	100	0,0164	65,568	100	0,0004
25 µM	73,110	100	0,0004	52,039	100	0,0002
50 µM	42,974	100	0,0002	24,035	100	P<0,0001
100 µM	32,837	100	0,0036	8,284	100	P<0,0001

Resim 30 ve Tablo 11’de kontrolün canlılığı %100 kabul edilerek feoforbid a’nin tek başına ve FDT ile birlikte uygulanmasının farklı konsantrasyonlarda *L.tropica* promastigotları üzerine etkisi verilmiştir. Hücre canlılığındaki azalma 0,25 µM 0,50 µM 1 µM ve 2 µM feoforbid a + FDT gruplarında kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı bulunmuştur. Sadece feoforbid a uygulanan 0,25 µm 0,50 µM 1 µM ve 2 µM gruplarında ise sitotoksosite kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır; ayrıca sadece feoforbid a uygulanan gruplardaki hücre canlılığı feoforbid a + FDT gruplarından farklı ($P=0,014$) bulunmuştur. Feoforbid a + FDT ‘ye maruz kalan *Leishmania* promastigotları için IC_{50} değeri 0,51 µM; feoforbid a’ye maruz kalan *Leishmania* promastigotları için IC_{50} değeri 0,75 µM olarak belirlenmiştir.



****: Işık uygulanmayan grup ile anlamlı farklılık $p < 0,0001$

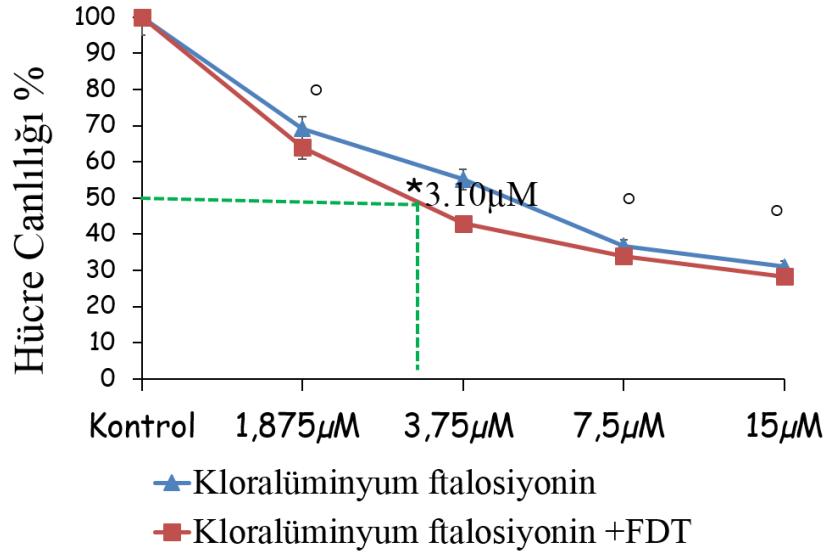
Resim 30. Sadece feoforbid a ve FDT ile birlikte kullanılmasının farklı konsantrasyonlarının *L.tropica* promastigotların canlılığına etkisi.

Tablo 11. Farklı konsantrasyonlarda feoforbid a ve feoforbid a+FDT uygulaması ile kontrol grubunun karşılaştırılması

Konsantrasyon	Feoforbid a	Kontrol	P değeri	Feoforbid a	Kontrol	P değeri
	Ortalama(%)			FDT		
				Ortalama(%)		
0,25 µM	78,459	100	0,0001	53,455	100	0,0002
0,50 µM	66,410	100	0,0002	50,742	100	$P < 0,0001$
1 µM	44,311	100	$P < 0,0001$	23,515	100	$P < 0,0001$
2 µM	23,597	100	$P < 0,0001$	14,770	100	$P < 0,0001$

Resim 31 ve Tablo 12' de kontrolün canlılığı %100 kabul edilerek kloralüminyum ftalosiyonin 'nin tek başına ve FDT ile birlikte uygulanmasının farklı konsantrasyonlarda *L.tropica* promastigotları üzerine etkisi verilmiştir. Hücre canlılığındaki azalma 1,875 µM 3,75 µM 7,5 µM ve 15 µM kloralüminyum ftalosiyonin + FDT gruplarında kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı bulunmuştur. Sadece kloralüminyum ftalosiyonin uygulanan 1,875 µM 3,75 µM 7,5 µM ve 15 µM gruplarında ise sitotoksisite kontrol grubuna

göre anlamlı derecede artmıştır. Kloralüminyum ftalosiyonini farklı konsantrasyonlarda FDT ile birlikte uygulanmasının tek başına uygulanması ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($P=0,07$) bulunmamıştır. Kloralüminyum ftalosiyonin + FDT 'ye maruz kalan *Leishmania promastigotları* için IC_{50} değeri $3,10 \mu M$; kloralüminyum ftalosiyonin'ye maruz kalan *Leishmania tropica* promastigotları için IC_{50} değeri $4,21 \mu M$ olarak belirlenmiştir.



°: Işık uygulanmayan grup ile anlamlı farklılık yok $p>0,05$

Resim 31. Sadece kloralüminyum ftalosiyonin ve FDT ile birlikte kullanılmasının farklı konsantrasyonlarının *L.tropica* promastigotların canlılığına etkisi.

Tablo 12. Farklı konsantrasyonlarda kloralüminyum ftalosiyonin ve kloralüminyum ftalosiyonin + FDT uygulamasının kontrol grubu ile karşılaştırılması

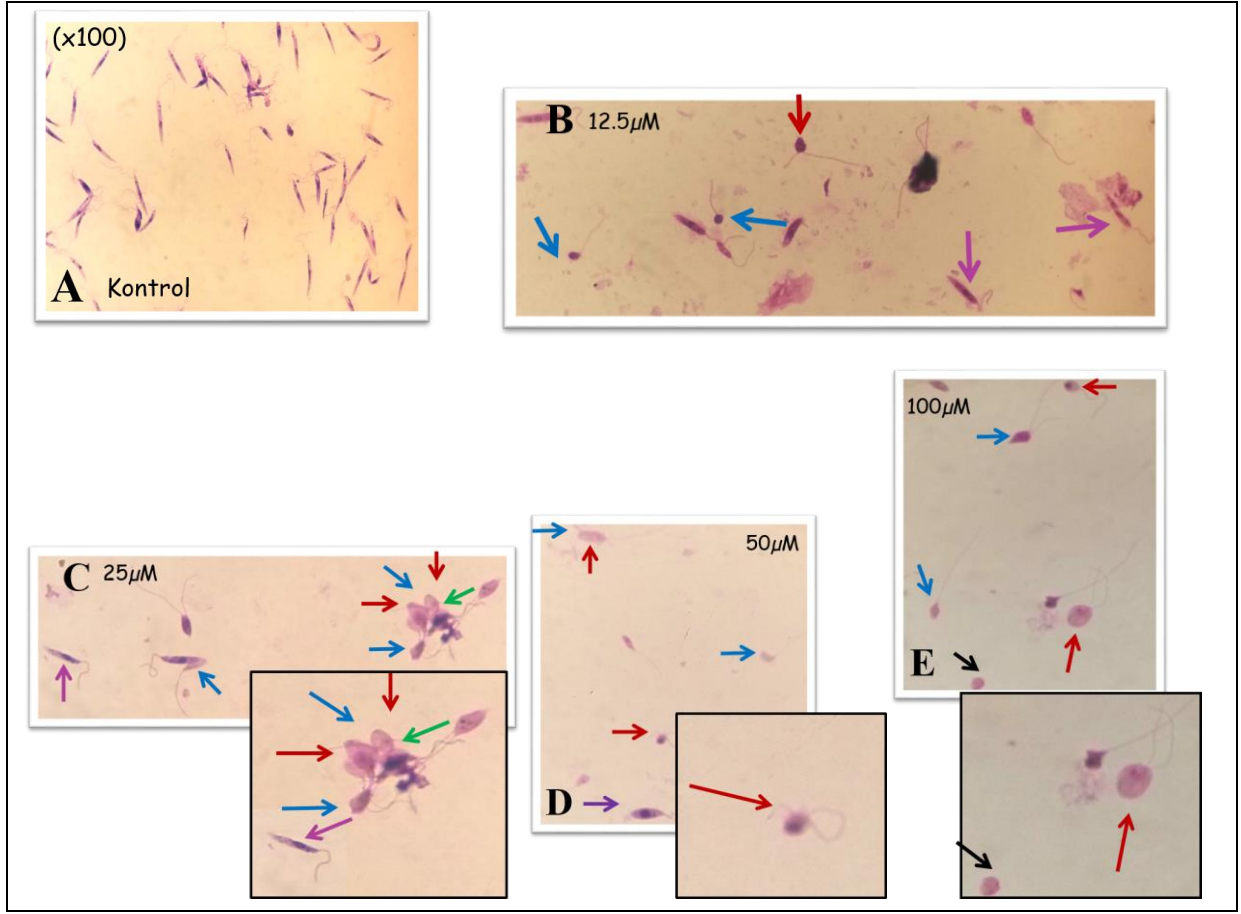
Konsantrasyon	ALCIPc	Kontrol	P değeri	ALCIPc FDT	Kontrol	P değeri
	Ortalama(%)			Ortalama(%)		
1,875 μM	68,681	100	0,0002	64,652	100	0,0004
3,75 μM	55,140	100	$P<0,0001$	42,337	100	0,0001
7,5 μM	36,350	100	$P<0,0001$	33,379	100	$P<0,0001$
15 μM	31,736	100	$P<0,0001$	28,022	100	$P<0,0001$

4.3. Hücresel Morfolojik Değerlendirme Bulguları

4.3.1. Giemsa Boyama Bulguları

4.3.1.1. Grup 1: Metilen Mavisi + FDT Uygulamasının *L.tropica* Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi

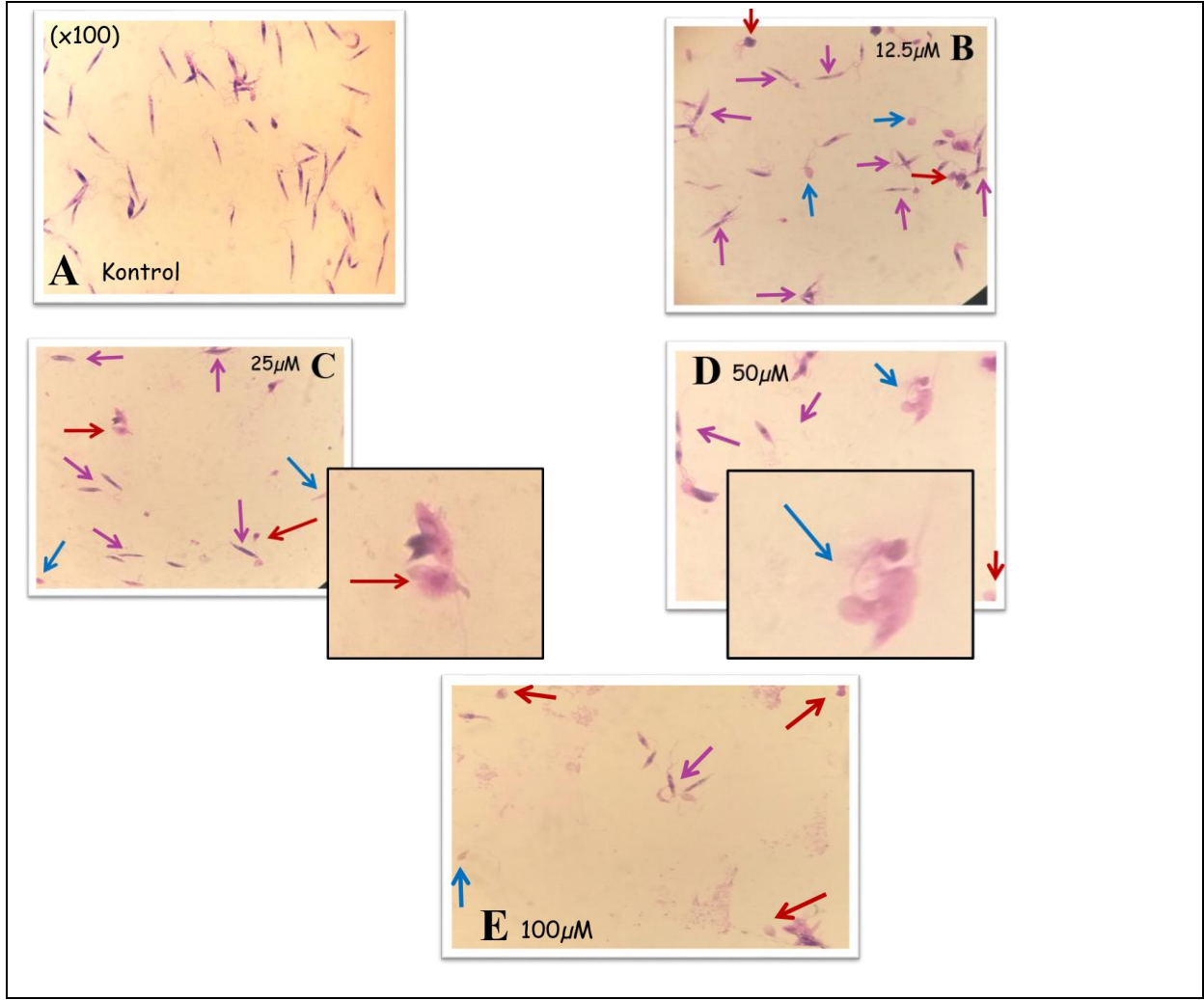
Resim 32’de herhangi bir fotosensitif ajan veya FDT’ye maruz bırakılmamış kontrol grubundaki parazitlerin ve metilen mavisi + FDT uygulanan parazitlerin Giemsa boyaması sonrası mikroskopik görüntüsü verilmiştir. Kontrol grubundaki parazitlerde dar hücre gövdesi, tek çekirdek, kinetoplast ve kamçısı ile tipik morfolojik özellikler görülmektedir. Farklı konsantrasyonlarındaki metilen mavisi ve FDT uygulana grupların hepsinde çekirdeği ve kinetoplastı olmayan, dairesel, geniş yapılar görülüp morfolojik yapılarını kaybettikleri belirlendi. Uygulanan bütün konsantrasyonlarda parazitlerin çekirdeklerinin ve kinetoplastlarının birbirinden ayırt edilemeyecek hale geldikleri ve hücre membranlarının bozulmasıyla parazitlerin atipik bir form aldıkları tespit edildi. Metilen mavisi konsantrasyonu azaldıkça özellikle 25 μM ve 12,5 μM konsantrasyonlarından itibaren parazitlerin atipik formları devam etmekle birlikte tipik morfolojik özelliklerde görülmeye başlanmıştır (x100 Giemsa boyama).



Resim 32. Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki metilen mavisi + FDT gruplarının Giemsa boyama ile mikroskopik görüntüsü (x100). A. Kontrol, B. 12,5 µM metilen mavisi+FDT grubu, C. 25 µM metilen mavisi+FDT, D. 50 µM metilen mavisi+FDT, E. 100 µM metilen mavisi+FDT. (→) çekirdeği ve kinetoplastı olmayan yapılar, (→) dairesel yapılar, (→) geniş yapılar, (→) tipik morfolojik yapılar, (→) çekirdek fragmentasyonu ile gösterilmiştir.

4.3.1.2. Grup 2: Metilen Mavisi Uygulamasının *L.tropica* Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda sadece metilen mavisi uygulanan parazitlerde çekirdeği ve kinetoplastı olmayan, dairesel, geniş, atipik özellikler görülmekle birlikte bütün konsantrasyonlarda kontrol grubundaki gibi tipik morfolojik özelliklerin korunduğu promastigotlar görülmektedir (Resim 33).

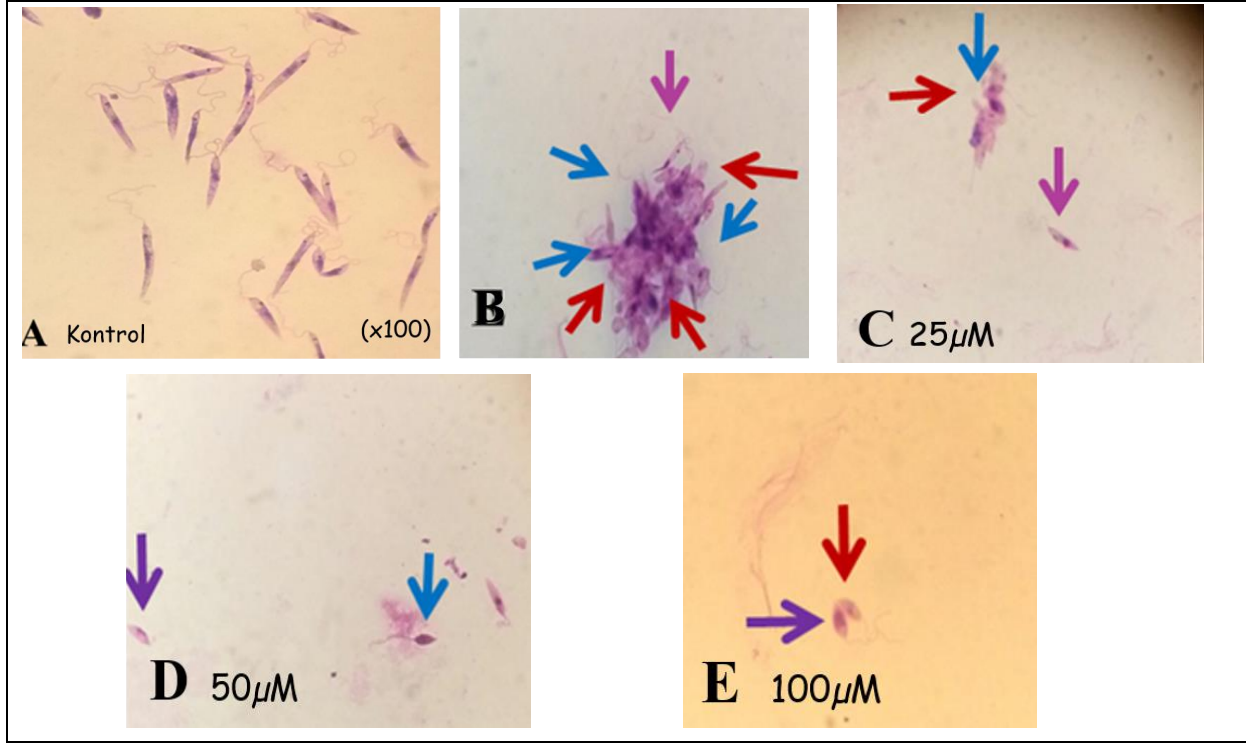


Resim 33. Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki metilen mavisi gruplarının Giemsa boyama ile mikroskopik görüntüsü (x100). A. Kontrol, B. 12,5 µM metilen mavisi grubu, C. 25µM metilen mavisi, D. 50µM metilen mavisi, E. 100 µM metilen mavisi. çekirdeği ve kinetoplastı olmayan yapılar (→), dairesel yapılar (→) tipik morfolojik yapılar (→) ile gösterilmiştir.

4.3.1.3. Grup 3: Toluidin Mavisi+FDT Uygulamasının *L.tropica* Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda toluidin mavisi+FDT uygulanan parazitler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 100 µM ve 50 µM toluidin mavisi+FDT uygulamasına maruz kalmış promastigotlar kontrole göre atipik olup morfolojik yapılarını kaybettiği görülmektedir (Resim 34). Konsantrasyon azaldıkça 25 µM ve 12,5 µM toluidin mavisi + FDT

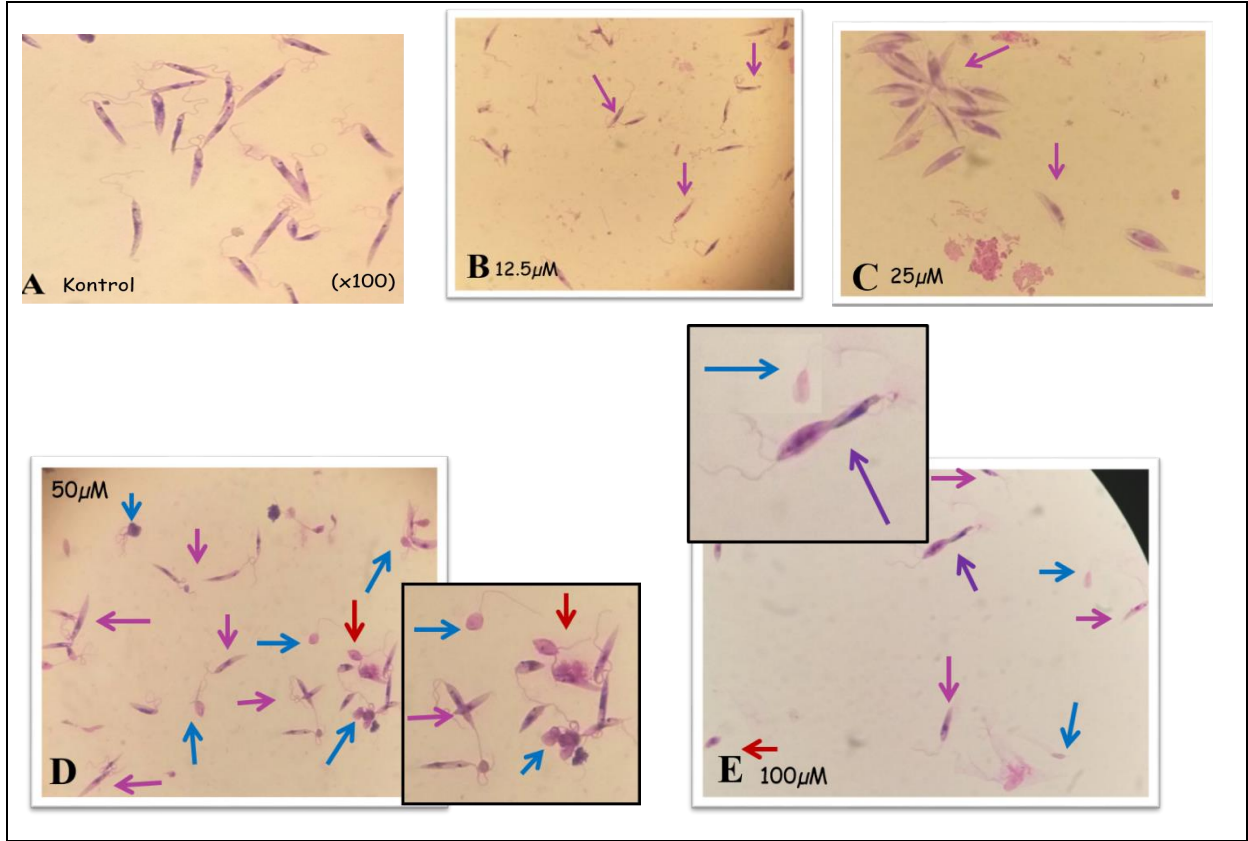
uygulamasında hücre içi yapıların ayırt edilebildiği tipik morfolojik yapıların görülmeye başlandığı tespit edildi.



Resim 34. Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki toluidin + FDT gruplarının Giemsa boyama ile mikroskopik görüntüsü (x100). A. Kontrol grubu, B. 12,5 µM toluidin + FDT grubu, C. 25 µM toluidin + FDT, D. 50 µM toluidin + FDT, E. 100µM toluidin + FDT. Çekirdeği ve kinetoplastı olmayan yapılar (→), dairesel yapılar (→), geniş yapılar (→) tipik morfolojik yapılar (→) ile gösterilmiştir.

4.3.1.4. Grup 4: Toluidin Mavisi Uygulamasının *L.tropica* Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi

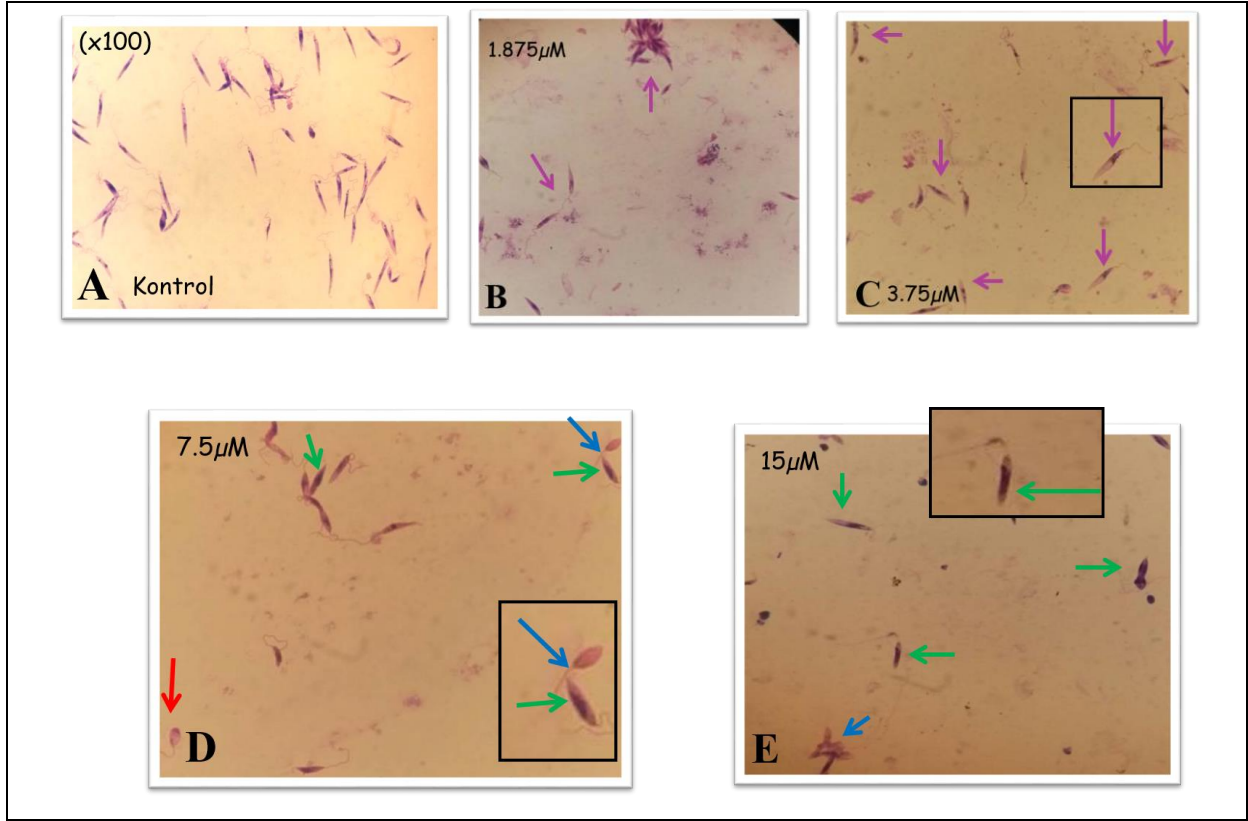
Toluidin mavisi konsantrasyonu azaltıkça parazitin tipik morfolojik özellikleri görülmeye başlanmıştır. 25 µM ve 12,5 µM toluidin mavisi uygulamasının kontrol grubundaki gibi promastigotların morfolojik yapıları normal olup, kinetoplast, çekirdek ve kamçıların oldukça belirgin olduğu gözlemlendi (Resim 35).



Resim 35. Kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki toluidin gruplarının Giemsa boyaması ile mikroskopik görüntüsü. A. Kontrol, B. 12,5 µM toluidin, C. 25 µM toluidin, D. 50 µM toluidin, E. 100 µM toluidin. Çekirdeği ve kinetoplastı olmayan yapılar (→), dairesel yapılar (→), tipik morfolojik yapılar (→) ile gösterilmiştir.

4.3.1.5. Grup 5: Kloralüminyum Ftalosiyanın + FDT Uygulamasının *L.tropica* Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi

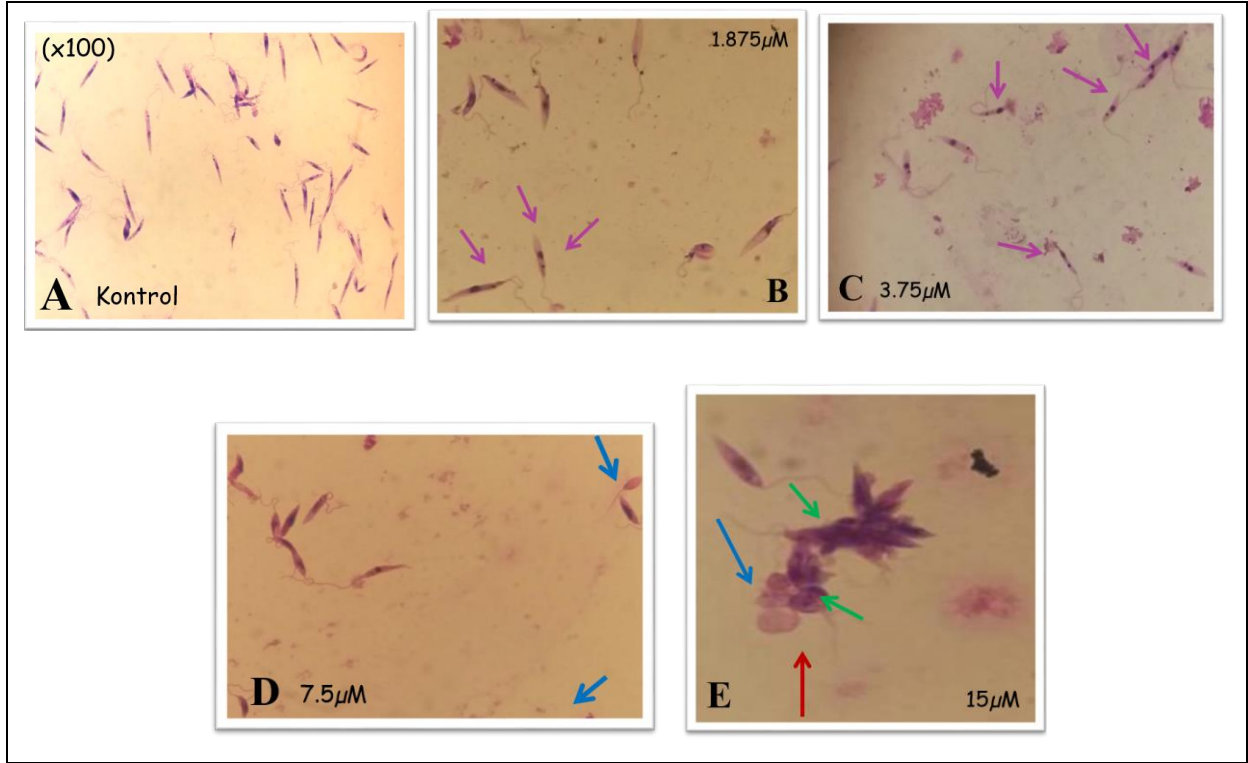
Resim 36'da farklı konsantrasyonlarda kloralüminyum ftalosiyonin + FDT uygulamasının ve herhangi bir fotosensitif ajan veya FDT'ye maruz bırakılmamış kontrol grubundaki parazitlerin Giemsa boyaması sonrası mikroskopik görüntüsü verilmiştir. 15 µM konsantrasyonda çekirdek yoğunlaşması ve fragmantasyonu belirirken parazitlerin atipik morfolojik özellikler görülmektedir. 7,5 µM konsantrasyonda çekirdeği ve kinetoplastı olmayan, dairesel yapılar görülürken; 3,75 ve 1,875 µM konsantrasyonlarda kontrol grubundaki gibi dar hücre gövdesi, tek çekirdek, kinetoplast ve kamçısı ile tipik morfolojik özellikler görülmektedir.



Resim 36. Kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki kloralüminyum ftalosiyonin + FDT gruplarının Giemsa boyaması ile mikroskopik görüntüsü. A. Kontrol, B. 1,875 µM kloralüminyum ftalosiyonin+FDT, C. 3,75 µM kloralüminyum ftalosiyonin+FDT, D. 7,5 µM kloralüminyum ftalosiyonin+FDT, E. 15 µM kloralüminyum ftalosiyonin + FDT grubu. çekirdeği ve kinetoplastı olmayan yapılar (.....→), dairesel yapılar (→...), tipik morfolojik yapılar (→...), çekirdek fragmentasyonu (→...→) ile gösterilmiştir.

4.3.1.6. Grup 6: Kloralüminyum Ftalosiyonin Uygulamasının *L.tropica* Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi

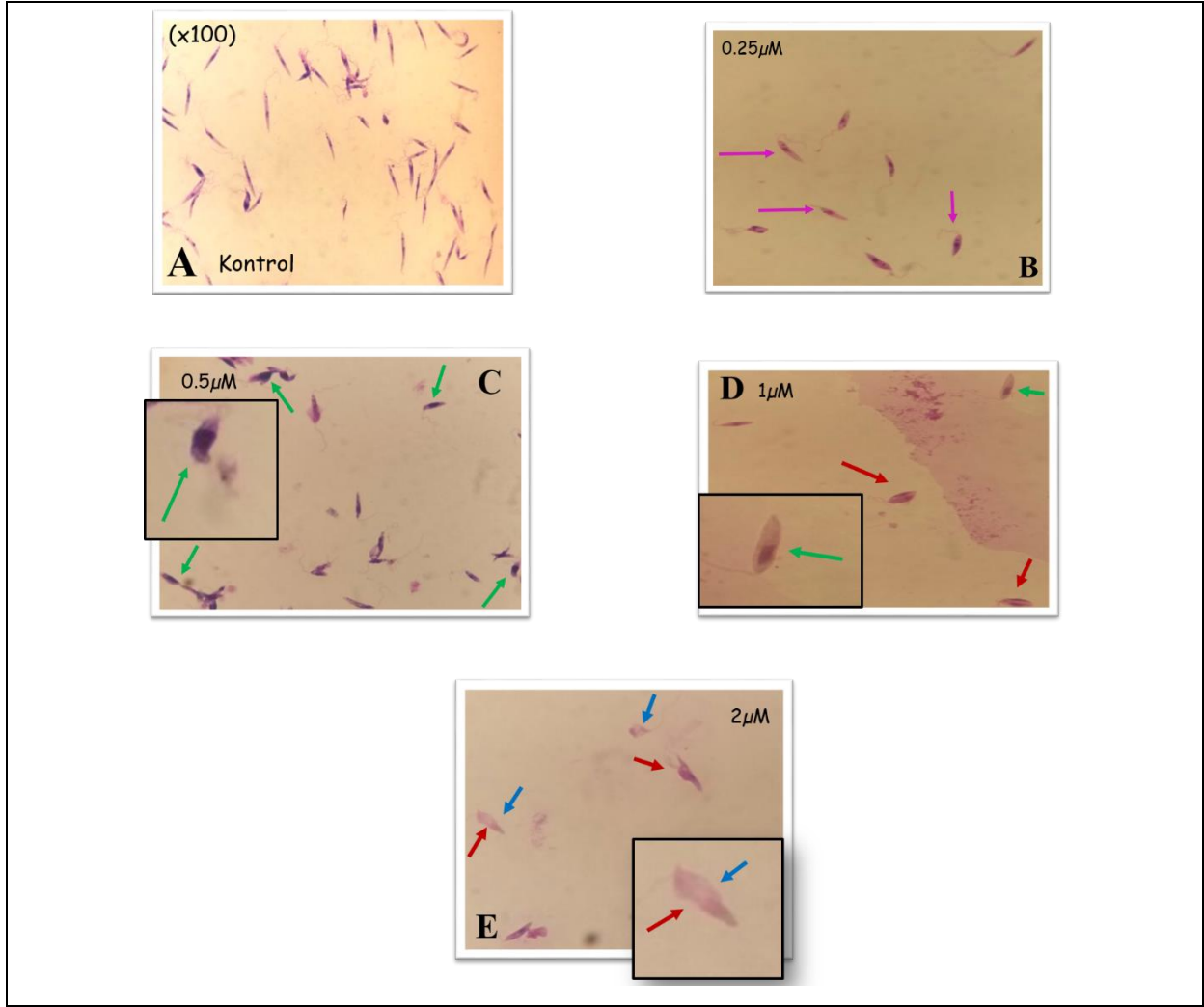
Çekirdek yoğunlaşması ve fragmentasyonu, çekirdeği ve kinetoplastı olmayan dairesel yapılar 7,5 ve 15 µM konsantrasyonlarda gözlenmektedir. 1,875 ve 3,75 µM konsantrasyonlarda kontrol grubundaki gibi dar hücre gövdesi, tek çekirdek, kinetoplast ve kamçısı ile tipik morfolojik özellikler görülmektedir (Resim 37).



Resim 37. Kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki Kloralüminyum ftalosiyonin gruplarının Giemsa boyaması ile mikroskopik görüntüsü. A. Kontrol, B. 1,875 µM kloralüminyum ftalosiyonin, C. 3,75 µM kloralüminyum ftalosiyonin, D. 7,5 µM kloralüminyum ftalosiyonin, E. 15 µM kloralüminyum ftalosiyonin grubu. çekirdeği ve kinetoplastı olmayan yapılar(--->.), dairesel yapılar (--->.), tipik morfolojik yapılar (--->.), çekirdek fragmentasyonu (--->.) ile gösterilmiştir.

4.3.1.7. Grup 7: Feoforbid a +FDT Uygulamasının *L.tropica* Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi

Resim 38'de Feoforbid a'nın FDT ile birlikte uygulanmasının farklı konsantrasyonlarda promastigotları üzerine etkisi Giemsa boyaması sonrası mikroskopik görüntüsü verilmiştir. 1 ve 2 µM konsantrasyonlarda çekirdeği ve kinetoplastı olmayan dairesel yapılar gözlemlenmiştir. Çekirdek fragmentasyonu 0,5 µM konsantrasyonda, 0,25 µM konsantrasyonda kontrol grubundaki parazitler gibi tipik morfolojik özellikler görülmektedir.

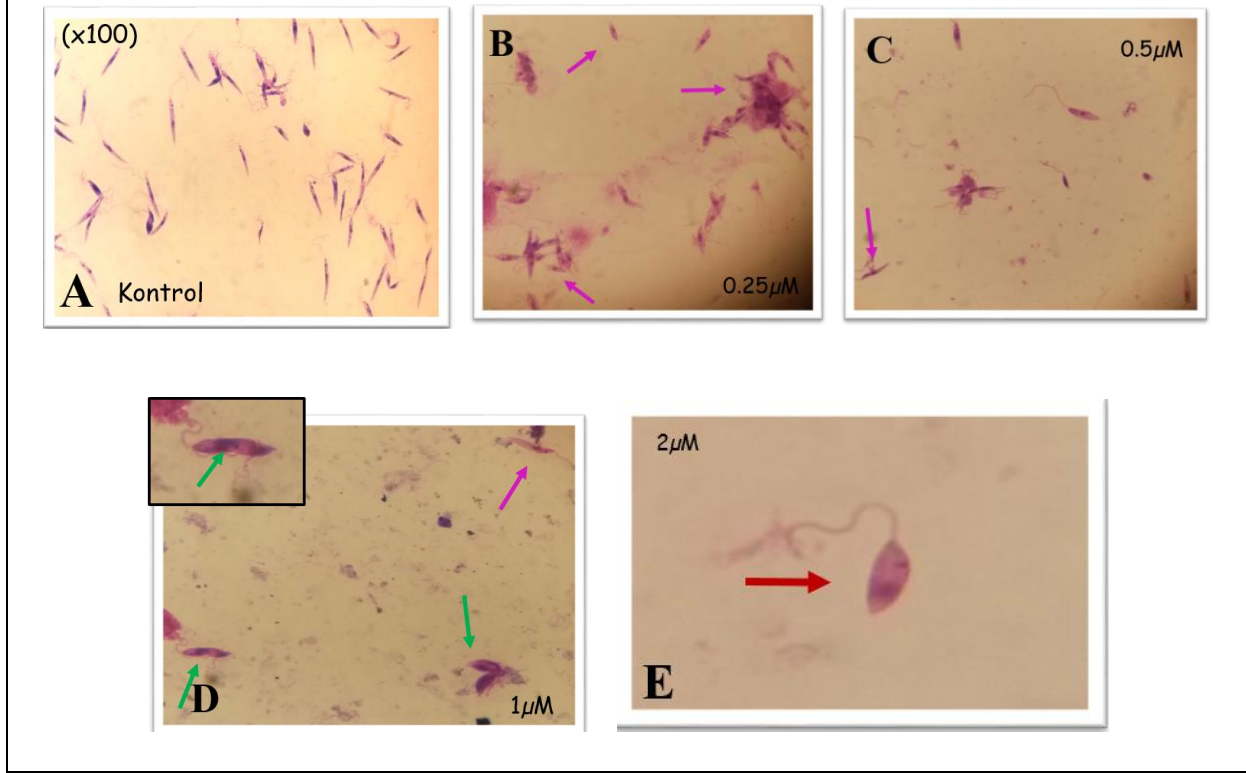


Resim 38. Kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki feoforbid a + FDT gruplarının Giemsa boyaması ile mikroskopik görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,25 µM feoforbid a + FDT, C. 0,5 µM feoforbid a + FDT, D. 1 µM feoforbid a + FDT, E. 2 µM feoforbid a + FDT grubu. çekirdeği ve kinetoplastı olmayan yapılar (→→), daireSEL yapılar (→→), tipik morfolojik yapılar (→→), çekirdek fragmentasyonu (→→) ile gösterilmiştir.

4.3.1.8. Grup 8: Feoforbid a Uygulamasının *L.tropica* Promastigotlarının Morfolojisine Etkisi

Resim 39’da feoforbid a’nın uygulanmasının farklı konsantrasyonlarda promastigotları üzerine etkisi Giemsa boyaması sonrası mikroskopik görüntüsü verilmiştir. 2 µM konsantrasyonda çekirdeği ve kinetoplastı olmayan daireSEL yapılar gözlemlenmiştir. 1 µM

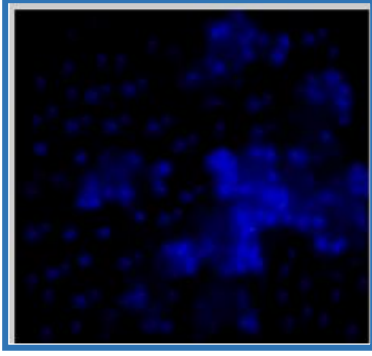
konsantrasyonda çekirdek fragmentasyonu, 0,25 ve 0,5 μM konsantrasyonlarda kontrol grubundaki parazitler gibi tipik morfolojik özellikler görülmektedir.



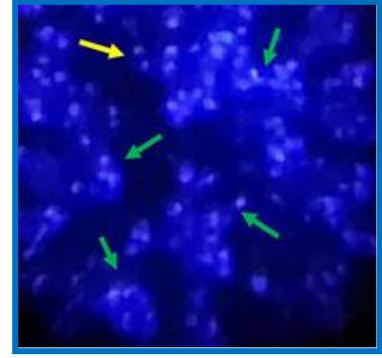
Resim 39. Kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki Feoforbid a gruplarının Giemsa boyaması ile mikroskopik görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,25 μM feoforbid a, C. 0,5 μM feoforbid a, D. 1 μM feoforbid a, E. 2 μM feoforbid a grubu. çekirdeği ve kinetoplastı olmayan yapılar (--->.), dairesel yapılar (.->.), tipik morfolojik yapılar (--->.), çekirdek fragmentasyonu (--->.) ile gösterilmiştir.

4.3.2. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Boyama

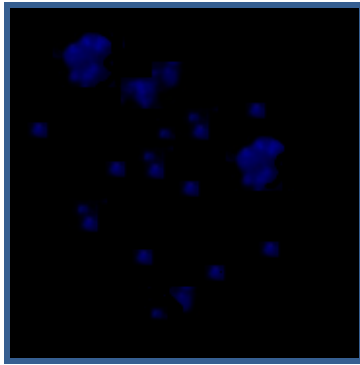
Fotosensitif ajan + FDT ya da sadece fotosensitif ajan uygulanan tedavi gruplarında ve kontrol grubunda morfolojik olarak apoptotik hücreleri saptamak için DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) boyası ile floresan mikroskopunda görüntüler alınmıştır .



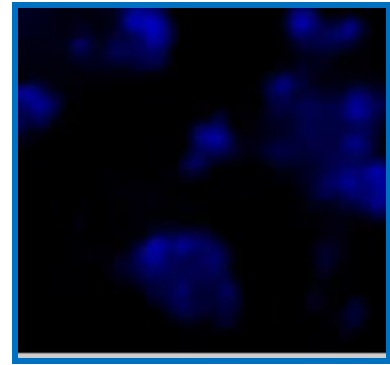
A.Kontrol grubu



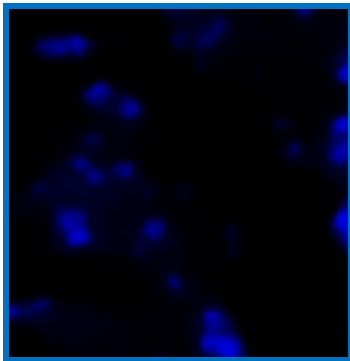
B.Metilen mavisi +FDT grubu



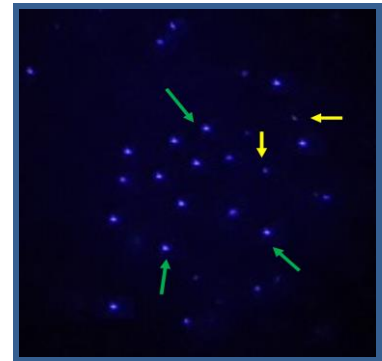
C.Metilen mavisi grubu



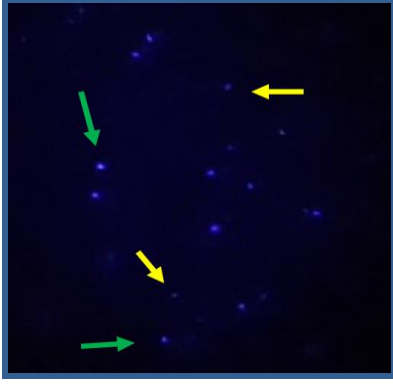
D.Toluidin mavisi+FDT grubu



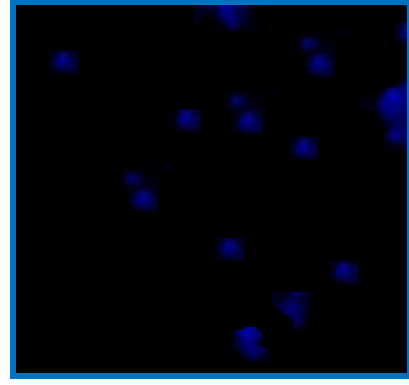
E. Toluidin mavisi grubu



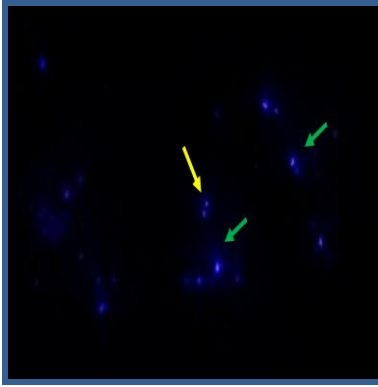
F. Kloralüminyum ftalosiyonin+FDT grubu(15μM)



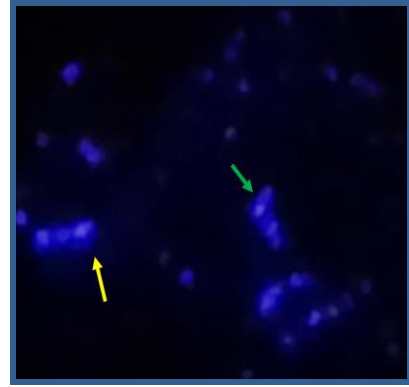
G. Kloralüminyum ftalosiyonin grubu+FDT(7.5µM)



H. Kloralüminyum ftalosiyonin grubu



I. Feoforbid a +FDT grubu



J. Feoforbid a grubu

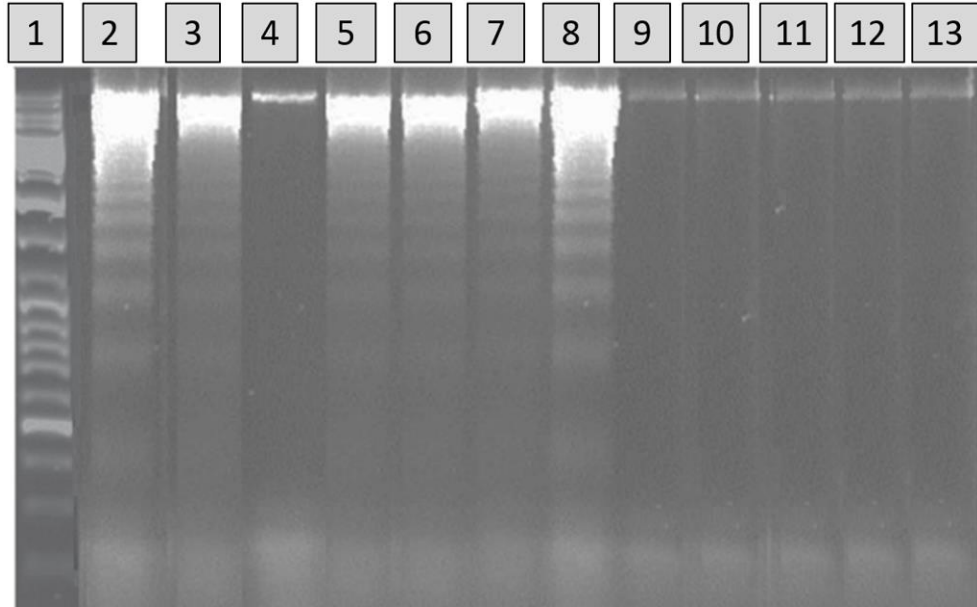
Resim 40. DAPI Boyamanın ardından kontrol ve tedavi gruplarının floresan mikroskop görüntüleri (x40). (→) Çekirdek yoğunlaşması, (→) çekirdek fragmentasyonu.

Resim 40'da görüldüğü gibi 18 saatlik inkübasyondan sonra kontrol ve tedavi gruplarında DAPI boyaması ile mavi boyanan apoptotik hücreler görülmektedir. Kontrol, metilen mavisinin, kloralimünyum ftalosiyoninin, toluidin mavisinin tek başına ve toluidin mavisinin FDT ile beraber uygulandığı gruplarda mavi boyandıkları, çekirdek değişimini gösteren yapıların bulunmadığı gözlenmiştir. 15 µM kloralüminyum ftalosiyonin + FDT grubunda çekirdek yoğunlaşması ile karakterize parlak mavi noktalar olan erken apoptotik hücreler çoğunluktadır. Benzer şekilde 7,5 µM kloralüminyum ftalosiyoninin + FDT uygulandığı grupta apoptotik özellik gösteren parlak mavi noktalar ve fragmente olmuş

çekirdeğin olduğu geç apoptotik hücrelerde görülmüştür. Feoforbid a + FDT grubunda erken apoptotik özellik gösteren hücrelere rastlanmıştır. Sadece feoforbid a uygulanan grupta az oranda apoptotik hücre belirlenmiştir. 25 µM metilen mavisinin + FDT ile uygulandığı grupta fragmente olmuş çekirdek ve apoptotik cisimlerde artışın olduğu geç apoptotik hücreler daha fazla görülmüştür.

4.4. Agaroz Jel Elektroforezi ile DNA Fragmentasyon Testi Bulguları

Resim 41'de fotosensitif ajanların FDT ile uygulamasının ardından genomik DNA'lar izole edilip agaroz jel elektroforezi sonuçları gösterilmiştir.



Resim 41. Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi. 1. Marker (1kb), 2. Miltofisine, 3. Metilen mavisi+FDT (25 µM), 4. Metilen mavisi, 5. Feoforbid a +FDT (0,5 µM), 6. Kloralüminyum ftalosiyanın +FDT (15 µM), 7. Kloralüminyum ftalosiyanın+FDT (7,5µM), 8. Glucantime, 9.Toluidin mavisi+FDT, 10. Toluidin, 11. Feoforbid a, 12. Kloralüminyum ftalosiyanın, 13. Kontrol.

Literatür göz önünde bulundurularak 40 µM konsantrasyonda 24 saat boyunca *L.tropica* promastigotlarına Miltofisine (SantaCruz Biotechnology J2009) uygulanmıştır ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Miltofisine apoptosis benzeri hücre ölümüne yol açtığı düşünülen *Leishmania* tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Aynı şekilde 50 µg/ml

konsantrasyonda 24 saat boyunca *L.tropica* promastigotlarına uygulanan *Leishmania* tedavisinde standart ilaç olarak kullanılan Glucantime de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Metilen mavisinin, feoforbid a 'nin, kloralüminyum ftalosiyoninin ve her iki toluidin mavisinin grubunda apoptotik DNA merdiveni görüntüsüne de rastlanmamıştır. 25 µM metilen mavisinin+FDT uygulanan tedavi grubunda, 15 µM kloralüminyum ftalosiyoninin + FDT uygulanan tedavi grubunda, 7,5 µM kloralüminyum ftalosiyoninin + FDT uygulanan tedavi grubunda, 0,5 µM Feoforbid a + FDT uygulanan tedavi grubunda apoptotik DNA merdiveni görüntüsü elde edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Leishmaniasis vektör Phelebotomus cinsi sinekler tarafından bulaştırılan *Leishmania* parazitlerinin neden olduğu bir enfeksiyon hastalığı olup hastalık Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı en önemli altı tropikal hastalığı içinde sıtmadan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Enfeksiyon deri, iç organ ve/veya mukoza tutulumu yaparak değişik klinik tablolara yol açtığı bilinmektedir. Ülkemizde hem deriyi tutan kutanöz leishmaniasis ve hemde iç organları tutan visceral leishmaniasis formu görülmektedir.

Kutanöz leishmaniasis tedavisinde intralezyoner tedavi, topikal tedavi, sistemik ilaç tedavisi veya fiziksel yöntemlerden (cerrahi eksizyon, kriyoterapi, radyoterapi vb.) herhangi biri ya da birkaçı birlikte uygulanmaktadır. Tedavinin başarısız olduğu veya tedaviye geç kalınan olgularda gelişen skar kozmetik ve psikolojik açıdan sorunlara yol açabilmektedir. Tedavide yaşanan sıkıntılar nedeniyle her geçen gün yeni kimyasal veya bitkisel ajan uygulamaları ve fotodinamik tedavi gibi yeni, ucuz, kolay uygulanabilen, yan etkisi az olan yöntemler yoğun olarak araştırılmaktadır (Hepburn, 2000).

Dünyada 13 türün dermatropik olduğu bilinmektedir ve kullanılan tedavi yöntemleri etken olan *Leishmania* türüne, hastadaki klinik tabloya, kişinin immun sistemine göre değişmektedir. Aynı zamanda *Leishmania* her türüne özel biyokimyasal ve moleküler özelliklere sahiptir. Dolayısıyla *Leishmania* türlerindeki bu farklılıkların ilaç duyarlılıklarına da yansıdığı bildirilmektedir (Grogg ve ark, 1992).

Paraziter hastalıkların tedavisinde FDT kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde az sayıda çalışma bulunduğu saptanmıştır. Mevcut çalışmalar incelendiğinde *Leishmania* üzerinde metilen mavisi kullanılarak yapılan FDT etkinliğinin araştırıldığı iki adet çalışmaya ulaşılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan leishmania türlerinin *L. amazonensis* olduğu görülmüştür. *Leishmania tropica* ile yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

Song ve ark (2011) yılında yaptığı çalışmada, *L. amazonensis* promastigotlarını bir saat karanlıkta metilen mavisi ile bekletildikten sonra metilen mavisi uzaklaştırılıp 30 dakika boyunca FDT uygulaması yapmışlardır aynı zamanda *L. amazonensis* promastigotlarına sadece bir saat karanlıkta metilen mavisi uygulayıp uzaklaştırmışlardır. Bu süreler sonunda hücreler yeni besiyerine aktarmışlardır. Yeni besiyerinde 18 saat sonunda hücre toksitesinin

metilen mavisi konsantrasyonunun artması ile arttığını ve metilen mavisinin yalnız kullanılması ile metilen mavisi + FDT uygulaması karşılaştırıldığında birlikte kullanıldığında daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca metilen mavisi + FDT uygulaması için IC₅₀ değerini 20 µM olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda ise aynı şekilde bir saat karanlıkta bekletilip uzaklaştırılan *L.tropica* promastigotlarına 30 dakika FDT uygulamasının ardından 18 saatlik inkübasyon sonucunda metilen mavisi konsantrasyonu artıka canlı promastigot sayısının azaldığı tespit edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda metilen mavisi + FDT uygulamasına maruz kalan deney grubundaki parazit sayısının, farklı konsantrasyonlarda sadece metilen mavisine maruz kalan deney grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca metilen mavisi + FDT uygulaması için metilen mavisinin IC₅₀:20,27µM olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar Song ve ark'nın çalışma sonuçları ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

Bir diğerk çalışmasında ise araştırmacılar hamsterların arka sağ ayağına *L. amazonensis* kullanılarak deneysel kutanöz leishmaniasis enfeksiyonu oluşturulmuş ve sol arka ayağın ise kontrol olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Ayaklardaki lezyonlar 12 hafta boyunca gözlenip ölçülmüş, enfeksiyonun 90. günü metilen mavisi topikal olarak uygulandıktan sonra fotodinamik tedavi 3 ay boyunca haftada 3 kez olarak uygulanmış. Kontrol grubuna sadece metilen mavisi uygulanmış. Sonuç olarak metilen mavisinin yalnız başına kullanıldığı lezyonlarda iyileşme saptanmazken metilen mavisi ve fotodinamik tedavinin birlikte uygulandığı grupta tedaviye anlamlı yanıt alındığı belirtilmiştir (Peloi ve ark, 2011).

Literatür incelendiğinde farklı hücre türlerinde (*Staphylococcus aureus*, *E. coli* ve *C. albicans* gibi bakteri suşlarında, meme ve akciğerkanseri gibi hücre hatlarında) metilen mavisi kullanılan çalışmalarda da metilen mavisinin + FDT ile birlikte kullanılmasının, metilen mavisin yalnız kullanılmasından daha etkin bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Wainwright ve ark, 1997; Peloi ve ark, 2008; Lim ve ark, 2013).

Daha önce yayınlanan metilen mavisi + FDT uygulamasının apoptotik etkisini inceleyen araştırmalar incelendiğinde akciğerkanseri hücreleri üzerinde Lim ve ark (2013) yılında metilen mavisi + FDT uygulamasının hücre canlılığına etkisinin yanısıra apoptotik etkisi olup olmadığını da araştırmışlar ve DAPI boyaması ile metilen mavisi + FDT uygulamasının hücrelerin çekirdeklerinde fragmentasyona işaret eden mavi parlak noktalar

içerdiğini, DNA fragmentasyon testi ile oligonükleozomal bantların oluşumuna bağlı olarak hücrelerin apoptotik özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer olarak “25 µM metilen mavisinin + FDT” uygulanan tedavi grubunda DAPI boyama sonucunda apoptotik bulgular (fragmente olmuş çekirdek yapılarına işaret eden parlak mavi noktalar) ve agaroz jel elektroforezi ile DNA fragmentasyonu tespit edilmiştir. Bu bilgilerin ışığında *in vitro Leishmania tropica* promastigotlarına metilen mavisinin + FDT uygulandığında meydana gelen hücre ölümünün apoptoz ile olduğunu destekler bulgular olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda kullandığımız fotodinamik ajanlardan bir diğeri olan toluidin mavisinin *Leishmania* üzerinde etkisinin araştırıldığı bir adet çalışmaya ulaşılmıştır. Barbosa ve ark. (2012) yılında yaptıkları çalışmada hem toluidin mavisini hem de metilen mavisini kullanarak *L.braziliensis* promastigotları ile beş dakika yada bir saat boyunca karanlıkta metilen ve toluidin mavisini uygulanan *L.braziliensis* promastigotlarına farklı uygulama sürelerinde ışık uyguladıklarını (4.2 J/cm²= 5 ve 2 dak, 60 ve 2 dak; 8.4 J/cm²=5 ve 4 dak; 60 ve 4 dak.) ve bu iki fotosensitif ajanı kontrol ile karşılaştırdıklarında birbirlerine benzeyen toksisite gösterdiklerini, konsantrasyon arttıkça hücre canlılığının azaldığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise farklı konsantrasyonlarda toluidin mavisini + FDT uygulamasına maruz kalan deney grubundaki parazit sayısının, farklı konsantrasyonlarda sadece toluidin mavisine maruz kalan deney grubuna göre daha az olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı (p=0,018) ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (p< 0,05). Hücre canlılığındaki azalma 12,5 µM 25 µM 50 µM ve 100 µM toluidin mavisini + FDT gruplarında kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı bulunmuştur. Sadece toluidin mavisini uygulanan 12,5 µM 25 µM 50 µM ve 100 µM gruplarında ise sitotoksosite kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Toluidin mavisini + FDT’ye maruz kalan *Leishmania* promastigotları için IC₅₀ değeri 27,79 µM olarak belirlenmiştir.

Farklı hücre türlerinde (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* ve *Vibrio vulnificus* gibi bakteri suşlarında, Jurkat hücre hatlarında vb.) yapılan çalışmalar incelendiğinde toluidin mavisini + FDT uygulamasının hücre canlılığını azaltarak etkili bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Tramblay ve ark, 2002; Wong ve ark, 2005; Vahabi ve ark, 2011, Tseng ve ark, 2015).

Aynı zamana Trambly ve ark (2002) Jurkat hücrelerinde bir saat boyunca toluidin mavisi inkübasyonunun ardından FDT (11 J/cm²) uygulamasının hücre canlılığının %97 azaldığını iki saat içerisinde DNA fragmentasyonunun tespit edildiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise toluidin + FDT uygulanan tedavi grubunda ve sadece toluidin a uygulanan tedavi grubunda apoptotik DNA merdiveni görüntüsüne de rastlanmamıştır. Bunun sebebinin kullanılan hücrenin farklı olması ve uygulanan fotosensitif ajanın konsantrasyon miktarının farklı olmasından dolayı olduğu düşünülmüştür.

Makaleler incelendiğinde bir diğer kullandığımız fotodinamik ajanlardan kloralüminyum ftalosiyoninin *Leishmania* nın farklı türlerinde araştırma yapıldığı, bizim kullandığımız *L.tropica* suşu ile ilgili çalışmanın olmadığı saptanmıştır.

Dutta ve ark (2012b) yaptıkları *in vitro* bir çalışmada hedef bölgesi ayrı olan iki fotosensitif ajanı (uroporfirin ve alüminyum ftalosiyonin) birlikte kullandıklarını ve promastigot ve amastigotlarda başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Bundan yola çıkarak düşük dozlarda birden fazla kullanılan sinerjik etkili fotosensitif ajanların fotodinamik tedavinin etkinliğini arttırabileceğini bildirmişlerdir. Escobar ve ark (2006) yaptıkları bir çalışmada *Leishmania chagasi* and *L.panamensis* promastigotlarında çinko ve kloralüminyum ftalosiyonin fotodinamik aktivitesini incelemişlerdir. Parazitler 24 saat boyunca çinko ve kloralüminyum ftalosiyonin ile inkübe edilip FDT uygulaması yapılmış, FDT'nin ardından promastigotların büyüme inhibisyonu mikroskopik olarak incelenmiştir. *L.chagasi* promastigotları kloralüminyum ftalosiyonin tedavisinden sonra. *L. panamensis* promastigotlarından 30-50 kat daha fotosensitif bulunmuştur. Çinko ve kloralüminyum ftalosiyonin tek başına uygulanmasının parazitlerin inhibasyonunda etkiye neden olmadığı rapor edilmiştir. Valdivieso ve ark (2008) *L.amozonensis* promastigotlarını 24 saat boyunca üç farklı dilüsyonda kloralüminyum ftalosiyonin ile inkübe edip 0 12 ve 24 saat boyunca FDT (17 J/cm²) uyguladıkları çalışmada doza bağımlı olarak büyümenin inhibe olduğunu, en büyük inhibasyonun 24 saat sonra gözleendiği (0,06 µM), sadece kloralüminyum ftalosiyonin uygulanan tedavi grubundaki parazit büyümesi ile kloralüminyum ftalosiyonin + FDT uygulanan tedavi grubu ile aynı bulduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca morfolojik değişiklikleri giemsa boyası ile tespit etmişler ve FDT uygulama zamanı arttıkça parçalanmış çekirdek yapıları, şişmeye başlayan yuvarlak, çekirdeği ve kinetoplastı olmayan yapılar tespit ettikleri bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise kloralüminyum ftalosiyonin'nin FDT ile birlikte uygulanmasının farklı konsantrasyonlarda (1,875 µM 3,75 µM 7,5 µM ve 15 µM) *L.tropica*

promastigotları hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Sadece kloralüminyum ftalosiyonin uygulanan 1,875 μM 3,75 μM 7,5 μM ve 15 μM gruplarında ise sitotoksosite kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Kloralüminyum ftalosiyonini farklı konsantrasyonlarda FDT ile birlikte uygulanmasının tek başına uygulanması ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,07$) bulunmamıştır. Kloralüminyum ftalosiyonin + FDT'ye maruz kalan *Leishmania* promastigotları için IC_{50} değeri 3,10 μM olarak tespit edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda kloralüminyum ftalosiyonin + FDT uygulamasına maruz kalan deney grubundaki parazit sayısının, farklı konsantrasyonlarda sadece Kloralüminyum ftalosiyonine maruz kalan deney grubundaki parazit sayısına göre daha az olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,07$) bulunmamıştır. Kloralüminyum ftalosiyonin + FDT'ye maruz kalan *Leishmania* promastigotları için IC_{50} değerini literatüre göre daha yüksek bulmamızın sebebi kullanılan konsantrasyon değerlerinin çok küçük olması, çalışılan ftalosiyonin inkübasyon süresinin ve uygulanan FDT zamanının daha uzun olması olarak açıklanabilir. Giemsa boyaması sonrası 15 μM konsantrasyonda çekirdek yoğunlaşması ve fragmentasyonu parazitlerin atipik morfolojik özellikler; 7,5 μM konsantrasyonda çekirdeği ve kinetoplastı olmayan, dairesel yapılar; 3,75 ve 1,875 μM konsantrasyonlarda kontrol grubundaki gibi dar hücre gövdesi, tek çekirdek, kinetoplast ve kamçısı ile tipik morfolojik özellikler tespit edilmiştir. DAPI boyaması ile kloralüminyum ftalosiyonin + FDT grubunda erken apoptotik özellik gösteren hücrelere rastlanmıştır

Literatüre bakıldığında *in vitro* olarak ftalosiyoninler ile birlikte uygulanan fotodinamik tedavinin genellikle kanser hücrelerinin tedavisi için kullanıldığı görülmektedir. Bu *in vitro* çalışmalar göstermiştir ki ftalosiyoninler tarafından uyarılan hücre toksisitesinin, bu hücrelerin tümör hücre tipine, ftalosiyoninin hücreye alınmasına, ftalosiyoninin inkübasyon süresine, ışık şiddeti veya ftalosiyonin lokalizasyonu gibi faktörlere bağlı olduğu bildirilmiştir (Paquette ve ark, 1988; Rosenthal ve Ben-Hur, 1995; Margaron ve ark, 1996; Gomes ve ark, 1996; Gijssens ve ark, 2002; Choi ve ark, 2004). Agarwal ve ark (1991) fare lenfoma hücreleri üzerinde 1 μM kloralüminyum ftalosiyonin eklenip 15 saat boyunca 500-W tungsten-halogen lamba ile FDT uyguladıkları çalışmalarında apoptosisi belirleyen parçalanmış DNA görüntüsünü kloralüminyum ftalosiyonin + FDT uygulamasından 2 saat sonra elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da DNA fragmentasyon testi ile kloralüminyum ftalosiyonin + FDT uygulanan tedavi grubunda tipik DNA ladder görüntüsü elde edilerek

desteklenmiştir. Sadece kloralüminyum ftalosiyonin uygulanan grupta ise DAPI boyaması ile çok az apoptotik hücre belirlense de DNA fragmentasyon testi ile sadece kloralüminyum ftalosiyonine uygulanan tedavi grubunda apoptotik DNA merdiveni görüntüsüne de rastlanmamıştır.

“Feoforbid a” fotodinamik tedavi ajanı olarak kutanöz leishmaniasisde kullanıldığı bir çalışma bulunamamıştır. Feoforbid a'nin fotodinamik tedavi ajanı olarak parazit enfeksiyonlarında kullanıldığı iki adet çalışmaya rastlanmıştır. Grellier ve ark (1997) yılında Plasmodium falciparum ve Babesia divergens ile enfekte olmuş eritrositleri ortadan kaldırmak için lipofilik feoforbid derivasyonları kullanarak fotosensitizasyon etkinliği değerlendirdiklerini ve başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Wohlbe ve ark (2008) sivrisinek larvalarını öldürmede klorofil derivasyonlarının metilen mavisi ve hematoporfirin gibi diğer fotosensitif ajanlardan daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Hajri ve ark (1999) pankreas kanser hücrelerinin üç farklı hücre hattında feoforbid a'nın farklı konsantrasyonlarını hem tek başına hemde FDT ile birlikte uyguladıkları çalışmalarında tümör hücrelerini önce dört saat boyunca feoforbid a'ya maruz bırakmış ve daha sonra fotosensitif ajan hücrelerden uzaklaştırılarak 2,5 dakika boyunca FDT uygulamışlardır. FDT uygulaması ardından 14-16 saat inkübasyondan sonra FDT'nin DNA bütünlüğünü etkileyerek tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini tek başına kullanılan feoforbid a'nin ise tümör hücrelerinin büyümesinde herhangi bir etki saptamadıklarını bildirmişlerdir. Üç farklı hücre hattı için IC₅₀ değerlerini 0,5 µM 0,7 µM ve 2 µM olarak belirlemişlerdir. Feoforbid a + FDT uygulaması ile tipik DNA fragmentasyon görüntüsünün elde edildiğini bildirmişlerdir. Aynı yazar ve arkadaşlarının kolon kanser hücrelerinde fotofirin ve feoforbid a'nin FDT ile birlikte etkisine baktıkları bir başka çalışmada feoforbid a ve fotofirin hücresel alımının doza bağımlı olduğu, feoforbid a'nin hücresel tutulumunun fotofirinden iki kat daha fazla olduğunu, iki fotosensitif ajanda da tipik DNA merdiven görüntüsünün gözlemlendiği bildirilmiştir (Hajri ve ark, 2002). Ahn ve ark (2012) yaptıkları *in vitro* çalışmada AT-84 hücrelerini 2 saat boyunca feoforbid a ile inkübe edip 24 ve 48 saat boyunca FDT'ye maruz bırakmışlardır. Feoforbid a'nin tek başına kullanılmasının hücre toksisitesinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığını, feoforbid a'nin FDT ile birlikte kullanılmasının hücre canlılığını azalttığını ve feoforbid a + FDT uygulanan hücrelerin IC₅₀ değerini 0,25 µM olarak bildirmişlerdir. Aynı zamanda DAPI

boyaması ile feoforbid a + FDT uygulamasının hücrelerin çekirdek fragmentasyonuna işaret eden mavi parlak noktalar içerdiği bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda ise hücre canlılığındaki azalma feoforbid a + FDT gruplarında konsantrasyon arttıkça kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı saptandı. Sadece feoforbid a uygulanan deney grubunda ise sitotoksosite kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır; ayrıca sadece Feoforbid a uygulanan gruplardaki hücre canlılığı Feoforbid a + FDT gruplarından farklı ($p=0,014$) bulunmuştur. Feoforbid a + FDT'ye maruz kalan *Leishmania* promastigotları için IC_{50} değeri $0,51 \mu M$ olarak belirlenmiştir. DAPI boyaması ile feoforbid a + FDT grubunda erken apoptotik özellik gösteren hücelere rastlanmıştır. Sadece feoforbid a uygulanan grupta da çok az apoptotik hücre belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde sadece feoforbid a uygulanmasının DAPI boyaması ile apoptotik hücre bulgularına rastlanmadığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise ön apoptotik bulguların sebebinin fotosensitif ajana bağlı olup olmadığına karar verilememiştir. Daha ileri araştırmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür. DNA fragmentasyon testi ile feoforbid a + FDT uygulanan tedavi grubunda tipik DNA ladder görüntüsü elde edilmiştir. Sadece feoforbid a uygulanan tedavi grubunda apoptotik DNA merdiveni görüntüsüne de rastlanmamıştır.

Kanser tedavisinde FDT klinikte son 20 yıldır alternatif tedavi olarak kullanılmasına karşın mikroorganizma ve parazitlere karşı fotodinamik tedavi nispeten yeni bir araştırma alanıdır. *Leishmania* da bu yeni keşif alanlarından bir tanesidir. Yapılan çalışmalar dikkate alındığında konunun güncel ve üzerinde yoğunlaşmış olduğu ve her geçen gün yeni çalışmaların eklendiği görülmektedir. Dolayısı ile bu çalışma konusunun multidisipliner bir çalışma olup umut vaat eden yeni araştırma konularına vesile olacak orijinal bir araştırma olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada gösterilen sonuçlar bize parazitin sadece promastigot formunu kullanarak Leishmaniasis üzerine fotodinamik tedavinin etkileri hakkında fikir vermiş ve parazite karşı alternatif bir tedavi için yeni bir bakış açısı oluşturmuştur. DAPI boyama ve DNA fragmentasyon testi sonuçları ise bize *Leishmania tropica* promastigotlarında FDT uygulaması sonrası hücre ölümünde apoptozun etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *L. tropica* promastigotları üzerinde *in vitro* olarak metilen mavisi, toluidin mavisi, kloralüminyum ftalosiyonin ve feoforbid a gibi dört değişik fotosensitif ajan kullanılarak fotodinamik tedavinin etkinliği araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre;

1. *L. tropica* promastigotları üzerine farklı konsantrasyonlardaki (12,5 25 50 ve 100 μM) metilen mavisi + FDT, toluidin mavisi + FDT, kloralüminyum ftalosiyonin + FDT (1,875 3,75 7,5 ve 15 μM), feoforbid a + FDT (0,25 0,5 1 ve 2 μM) uygulamalarının 18 saatlik inkübasyon sonrası mikroskopik gözlem sonuçlarına göre; yüksek konsantrasyonlarda atipik, yuvarlak şekilli, hareketsiz parazit sayısında belirgin artış gözlenirken, düşük konsantrasyonlara inildikçe orta yoğunlukta, hareketli, az miktarda yuvarlak, normal morfolojide parazitler gözlemlendi. Kontrol grubunda parazitlerin aktif ve hareketli olduğu tespit edildi.
2. *L. tropica* promastigotları üzerine farklı konsantrasyonlarda metilen mavisi + FDT, toluidin mavisi + FDT, feoforbid a + FDT uygulanan tedavi gruplarıyla tek başına metilen mavisi, toluidin mavisi ve feoforbid a uygulanan gruplar arasında hemasitometre ile sayım sonrası canlı parazit sayısı bakımından sırasıyla istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,001$ $p < 0,05$ $p < 0,0001$). Kloralüminyum ftalosiyonin + FDT uygulaması ile sadece kloralüminyum ftalosiyonine maruz kalan deney grubundaki canlı parazit sayısında azalma gözlenmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0,07$) olmadığı tespit edilmiştir.
3. XTT testi ile bulunan sitotoksisite sonuçları hematosimetre ile bulununan sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur. Tüm gruplarda sitotoksisite kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır.
4. Morfolojik değişiklikleri tespit etmek için farklı konsantrasyonlarda metilen mavisi + FDT, toluidin mavisi + FDT, kloralüminyum ftalosiyonin + FDT, feoforbid a + FDT uygulamalarından sonra yapılan giemsa boyama sonuçlarına göre; yüksek konsantrasyonlarda grupların hepsinde çekirdeği ve kinetoplastı olmayan, dairesel, geniş yapılar görülüp morfolojik yapılarını kayb ettikleri belirlenirken, düşük konsantrasyonlara inildikçe tipik morfolojik özellikler görülmektedir. Kontrol

grubundaki parazitlerde ise dar hücre gövdesi, tek çekirdek, kinetoplast ve kamçısı ile tipik morfolojik özellikler tespit edilmiştir.

5. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan DAPI boyama sonuçlarına göre metilen mavisi + FDT, kloralüminyum ftalosiyanın + FDT, feoforbid a + FDT uygulanan gruplarda çekirdek yoğunlaşması, fragmente olmuş çekirdek ile karakterize parlak mavi noktalar tespit edilirken; kontrol, metilen mavisinin, kloralimünyum ftalosiyanın, toluidin mavisinin tek başına ve toluidin mavisinin FDT ile beraber uygulandığı gruplarda hücrelerin mavi boyandıkları, çekirdek değişimini gösteren yapıların bulunmadığı gözlenmiştir.
6. DNA fragmentasyon testi ile metilen mavisi+FDT, kloralüminyum ftalosiyanın + FDT, feoforbid a + FDT uygulanan deney gruplarında apoptozun belirteci olan apoptotik DNA merdiveni görüntüsüne rastlanırken, kontrol, metilen mavisinin, kloralimünyum ftalosiyanın, toluidin mavisinin tek başına ve toluidin mavisinin FDT ile beraber uygulandığı gruplarda rastlanmamıştır.
7. IC₅₀ değerlerine göre en etkili en umut vadeden fotosensitif ajanın feoforbid a olduğu düşünülmüştür.

Bu çalışmada *L. tropica* promastigotları üzerinde *in vitro* olarak dört değişik fotosensitif ajan kullanılarak fotodinamik tedavinin etkinliği araştırılmıştır. Parazitler üzerinde fotodinamik tedavi kullanılmasına yönelik çalışmalar olmasına karşın ülkemizde en yaygın etken olan *L. tropica* ile ilgili çalışmalar yapılmamıştır ve dünyada ilk kez bu çalışma ile *L. tropica* promastigotları üzerinde fotodinamik tedavinin etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmada fotodinamik tedavide kullanılan fotosensitif ajanlardan hiçbirisi daha önce *in vitro* olarak *L. tropica* üzerinde denenmemiştir.

Çalışmamızın kutanöz leishmaniasis tedavisinde, kutanöz leishmaniasis’li insan olguları üzerinde kullanılması hedeflenmektedir. Bunun için yeni fotosensitif ajanların geliştirilmesi ve değerlendirilmesi süreci iki ana değerlendirme basamağından oluşmaktadır. Daha önce denenmemiş veya yeni sentez edilen fotosensitif ajanların insanda hastalıkların tedavisinde kullanılmaları amacıyla öncelikle *in vitro* ortamlarda tarama testleri yapılabilir, ancak öngörülen etkinin özelliği nedeniyle bazı tarama testlerinin sadece *in vitro* ortamda yapılması yeterli olmayacaktır. Tarama testlerinde hastalığı temsil eden hayvan modelleri mutlaka

kullanılmalıdır. Bu sayede geliştirilme amacını oluşturan ve sahip olması öngörülen etki ya da etkileri gösteren fotosensitif ajanlar belirlenebilecektir. Böylece yeni kolay uygulanabilen bir alternatif tedavi şekli geliştirilebileceği düşünülmektedir. Bir diğer basamak ise Leishmaniasis tedavisinde fotodinamik tedavinin yararlı bir yöntem olduğunu göstermek amacıyla fotosensitif ajanların fotoaktifliğini test ederek deneysel hayvan modellerinde, aksenik amastigot ya da hücre içi amastigotlarda ve promastigotların apoptozisde rolü olduğu düşünülen (mitokondri membran potansiyeli, sitokrom c salınımı vb.) tüm moleküllerin araştırılarak bu çalışmaya devam etmenin gerekli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR, Oleinick NL.** Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in LSI78Y mouse lymphoma cells. *Cancer Research* 1991; 51(21): 5993-5996.
- Ahn MY, Kwon SM, Kim YC, Ahn SG, Yoon JH.** Feoforbid a-mediated photodynamic therapy induces apoptotic cell death in murine oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Oncology Reports* 2012; 27(6):1772-8.
- Akilov OE, Kosaka S, O'Riordan K, Hasan T.** Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Experimental Dermatology* 2007;16(8): 651-60.
- Alrajhi AA, İbrahim EA, De Vol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH.** Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania majör. *The New England Journal of Medicine* 2002; 346 (12): 891-895.
- Alkhawajah A.** Recent trends in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Annals of Saudi Medicine* 1998;18(5):412-6.
- Altıntaş N.** Leishmaniasis. Özcel MA (Eds). *Gap ve Parazit Hastalıkları*. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 1993. p. 89-120.
- Alvar J, Croft S, Olliaro P.** Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Advances in Parasitology* 2006; 61: 223-274 (a).
- Alvar J, Yactayo S, Bern C.** Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 2006; 22(12): 552-557 (b).
- Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen JC.** On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differentiation* 2002; 9(1):65–81.
- Asilian A, Davami M.** Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of old world cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *Clinical Experimental Dermatology* 2006; 31(5):634-7.
- Barbosa AF, Sangiorgi BB, Galdino SL, Barral-Netto M, Pitta IR, Pinheiro AL.** Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using phenothiazine derivatives as photosensitizers against *Leishmania braziliensis*. *Lasers in Surgery and Medicine* 2012;44(10):850-5.

- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur FL, Jaffe LC.** Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44:1435-1439.
- Berman J.** Current treatment approaches to leishmaniasis. *Current Opinian Infection Disease* 2003; 16 (5): 397-401.
- Bilgin MD 1999.** Biomedical application of photosensitization. Doktora Tezi. Illinois Institute of Technology, Chicago, IL, USA.
- Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C.** Treatment of cutaneous leishmaniasis among travelers. *Journal of Antimicrobiology Chemothepy* 2004;53:158-166.
- Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA.** The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biology* 1995; 5: 21–6.
- Bryceson ADM.** Leishmaniasis. In: Manson's tropical diseases. 20th ed. London: WB Saunders; 1996. p.1213–45.
- Cahn WS, Brasseur N, La Madeleine C, Quellet R, van Lier JE .** Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *European Journal of Cancer* 2001; 33: 1855-1860.
- Channon JY, Blackwell JM.** A study of the sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes to hydrogen peroxide. I. Differences in sensitivity correlate with parasite-mediated removal of hydrogen peroxide. *Parasitology* 1985;91(2):197-206.
- Chen Y, Zheng W, Li Y, Zhong J, Ji J, Shen P.** Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics, *Cancer Sci* 2008;99 (10): 2019-2027.
- Choi CF, Tsang PT, Huang JD, Chan EY, Ko WH, Fong WP, Ng DK.** Synthesis and in vitro photodynamic activity of new hexadeca-carboxy phthalocyanines. *Chemical communications* 2004;7(19):2236-7.
- Croft SL, Yardley V.** Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design* 2002; 8(4): 319-342.
- Çulha G, Akçalı C.** Hatay ve çevresinde saptanan kutanöz leishmaniasis olguları. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2006; 30 (4): 268-271.
- Değerli K.** Nutrient Broth, P-Y ve RPMI 1640 besiyerlerinde *Leishmania* türlerinin üretiminin karşılaştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1998; 22(4): 339-42.
- Demidova TV, Hamblin MR.** Effect of cell photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial agents Chemotherapy* 2005;49(6): 2329-2335.

- Desjeux P.** The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 2001; 95:239–43.
- Desjeux P.** “Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infections Disease* 2004; 27(5):305-18.
- Despommier DD.** Introduction to The Leishmania. Gwadz, Hotez, Knirsch. *Parasitic Diseases*, 5th. AppleTrees Corporation LLC. NY; 2000.p. 13-17.
- Di Martino L, Vajro P, Nocerino A, Scotti S, Napolitano G, Vegnente A.** Fulminant hepatitis in an Italian infant with visceral leishmaniasis. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. 1992; 86(1):34.
- Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK.** Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews. Cancer* 2003;3(5):380-7.
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q.** Photodynamic Therapy. *Journal of National Cancer Institute* 1998; 90(12) :889-905.
- Dutta S, Chang C, Kolli BK, Sassa S, Yousef M, Showe M, Showe L, Chang KP.** Delta-aminolevulinic acid-induced host-parasite porphyrin disparity for selective photolysis of transgenic *Leishmania* in the phagolysosomes of mononuclear phagocytes: A potential novel platform for vaccine delivery. *Eukaryot Cell* 2012; 11(4):430-441 (a).
- Dutta S, Waki K, Chang KP.** Combinational sensitization of leishmania with uroporphyrin and aluminum phthalocyanine synergistically enhances their photodynamic inactivation in vitro and in vivo. *Photochemistry Photobiology* 2012; 88(3):620-5 (b).
- Elmore S.** Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicology Pathology* 2007;35(4): 495-516.
- Enk CD, Fritsch C, Jonas F, Nasereddin A, Ingber A, Jaffe CL, Ruzicka T.** Treatment of cutaneous leishmaniasis with photodynamic therapy. *Archives of Dermatol* 2003(4):139:432-434.
- Ertabaklar H, Öncü S, Ertuğ S,** A new focus for cutaneous leishmaniasis in the West Coast of Turkey. *Tropical Doctor* 2005;35(3):189.
- Escobar P, Hernández IP, Rueda CM, Martínez F, Páez E.** Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in leishmania promastigotes. *Biomédica* 2006;26(1):49-56.
- Evangelou G, Krasagakis K, Giannikaki E, Kruger-Krasagakis S, Tosca A.** Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine* 2011; 27(5): 254-256.

- Fayter D, Corbett M, Heirs M, Fox D, Eastwood A.** A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of pre-cancerous skin conditions, Barrett's oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin. *Health Technology Assessment* 2010; 14(37):1-288.
- Fernandez JM, Bilgin MD, Grossweiner LI.** singlet oxygen generation by photodynamic agents. *Journal of Photochemistry Photobiology B, Biology* 1997; 37:131-140.
- Gabrielli D, Belisle E, Severino D.** Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochemistry Photobiology* 2004; 79: 227-32
- Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SM, Nascimento ET.** Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of leishmania chagasi. *Journal of immunology* 2001;167(2):893-901.
- Garcia LS.** Diagnostic Medical Parasitology. 4th Ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 2001.
- Gardlo K, Horska Z, Enk CD, Rauch L, Megahed M, Ruzicka T, Fritsch C.** Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *Journal of American Academia of Dermatology* 2003; 48(6):893-896.
- Geoffey MC, Robert EH.** The Cell a molecular Approach. Boston: ASM Press; 2004.
- Ghaffarifar F, Jorjani O, Mirshams M, Miranbaygi MH, Hosseini ZK,** Photodynamic therapy as a new treatment of cutaneous leishmaniasis. *Eastern Mediterranean Health Journal* 2006;12(6):902-8.
- Gomes ER, Cruz T, Lopes CF, Carvalho AP, Duarte CB.** Photosensitization of lymphoblastoid cells with phthalocyanines at different saturating incubation times. *Cell Biology Toxicology* 1999;15 (4):249-60.
- Gontijo B, de Carvalho ML.** American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003; 36(1): 71-80.
- Grellier P, Santus R, Mouray E, Agmon V, Maziere JC, Rigomier D,Dagan A, Gatt S Schrevel J.** Photosensitized inactivation of *Plasmodium falciparum*- and *Babesia divergens*-infected erythrocytes in whole blood by lipophilic pheophorbide derivatives. *Vox Sang* 1997;72(4): 211-220.
- Grogl M, Thomason TN, Franke ED.** Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Americal Journal of Tropical Medicine Hygiene* 1992;47(1):117-26.
- Grossweiner LI, Bilgin MD, Berdusis P, Mody TM.** Singlet oxygen generation by

metallotexaphyrins. *Photochemistry Photobiology* 1999; 70:138-145.

Grossweiner LI, Jones LR, Grossweiner JB, Rogers BHG. The science of phototherapy: An Introduction, The Netherlands Springer 2005.

Gürel MS, Yeşilova Y, Ölgün MK, Özbel Y. Türkiye’de kutanöz leishmaniasisin durumu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* 2012; 36: 121-9.

Gürsoy E, Ergin K, Başaloğlu H, Koca Y, Seyrek K. Expression and localisation of bcl-2 and bax-proteins in developing rat ovary. *Research in Veterinary Science* 2008; 84(1): 56-61.

Häder DP, Jori G. Photodynamic Therapy, Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences Volume:2, Chapter 1. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. ISBN 0-85404-306-3.

Hajri A, Coffy S, Vallat F, Evrard S, Marescaux J, Aprahamian M. Human pancreatic carcinoma cells are sensitive to photodynamic therapy in vitro and in vivo. *The British Journal of Surgery* 1999;86(7):899-906.

Hajri A, Wack S, Meyer C, Smith MK, Leberquier C, Keding M, Aprahamian M. In vitro and in vivo efficacy of photofrin and pheophorbide a, a bacteriochlorin, in photodynamic therapy of colonic cancer cells. *Photochemistry Photobiology* 2002;75(2):140-8.

Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clinical Experimental Dermatology* 2000; 25:363-370.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354: 1191-9.

Herwaldt BL, Stokes SL, Juraneck, DD. American cutaneous leishmaniasis in U.S. travellers. *Annals of Internal Medicine* 1993; 118(10): 779-784.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Savioli L. Control of neglected tropical diseases. *The New England Journal of Medicine* 2007; 357(10):1018-27.

Hsueh AJ, Billig H, Tsafirırı A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev* 1994; 15: 707-724.

Huerta S, Goulet EJ, Yopez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *Journal of Surgery Research* 2007; 139:143-156.

Juhengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS, Smith, MF. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 1993; 132:249-254.

Latorre-Esteves E, Akilov OE, Rai P, Beverley SM, Hasan T. Monitoring the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in a murine model of cutaneous leishmaniasis using L. major expressing GFP. *Journal of Biophotonics* 2010; 3(5-6):328-35.

- Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL.** Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death and Differentiation* 2002;9(1):53-64.
- Lilge L, O'Carroll C, Wilson B.** A solubilization technique for photosensitizer quantification in ex vivo tissue samples. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 1997; 39 (3): 229-235.
- Lim EJ, Oak CH, Heo J, Kim YH.** Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. *Oncology Reports* 2013;30(2): 856-862.
- Macdonald IJ, Dougherty TJ.** Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 2001; 5 (2):105-129.
- Margaron P, Madarnas P, Quellet R, van Lier JE.** Biological activities of phthalocyanines. XVII histopathologic evidence for different mechanisms of EMT-6 tumor necrosis induced by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or photofrin. *Anticancer Research* 1996;16(2):613-20.
- Merdivenci A.** Kanda, Retikulo-endotelial Sistem Hücrelerinde Parazitlenen Kamçılılar. *Medikal Protozooloji*'de. 2nd ed. İstanbul: Temel Matbaası; 1981. s. 134-54.
- Molneux DH, Killck-Kendrick R.** Morphology, ultrastructure and life cycles. Peters W, Killck Kendrick R eds. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. 1st eds. 1987. p.121-175.
- Morgenthaler JB, Peters SJ, Cedeño DL, Constantino MH, Edwards KA, Kamowski EM, Passini JC, Butkus BE, Young AM, Lash TD, Jones MA.** Carbaporphyrin ketals as potential agents for a new photodynamic therapy treatment of leishmaniasis. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 2008;16(14):7033-8.
- Murray HW.** Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 1981;153(5):1302-15.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG.** Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366(9496):1561-77.
- Nayak CS.** Photodynamic therapy in dermatology. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2005; 71: 155-160.
- Nunes SM, Sguilla FS, Tudesco AC.** Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminumphthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Brazilian Journal of Medical Biology Research* 2004;37(2):273-84.

- O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT.** Porphyrin and Nonporphyrin photosensitizers in Oncology: *Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy*. 2009;85: 1053-1074.
- Ok ÜZ, Balcıoğlu İC, Taylan ÖA, Özensoy S, Özbel Y.** Leishmaniasis in Turkey. *Acta Tropica* 2002; 84(1):43.
- Oleinick NL, Evans HH.** The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiation Research* 1998; 150:146-156.
- Özbel Y, Özensoy TS.** Leishmaniasis. Özcel MA eds. Özbel Y, Ak M, Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No 22. Bornova, İzmir: Meta Basım; 2007.s.199-241.
- Özbel Y, Turgay N, Özensoy S, Özbilgin A, Alkan MZ, Özcel MA, Jaffe CL, Schnur L, Oskam L, Abranches P.** Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1995;89(1): 89-93.
- Özcel MA, Altıntaş N.** Parazit Hastalıklarında Tanı. Ege Üniversitesi Basım evi.1997.
- Özçelik S, Çeliksoy A, Saygı G.** Farklı kültür ortamlarında Leishmania promastigotlarının in vitro kültürü. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1996; 20(2): 169-74.
- Paquette B, Ali H, Langlois R, van Lier JE.** Biological activities of phthalocyanines-VIII. Cellular distribution in V-79 Chinese hamster cells and phototoxicity of selectively sulfonated aluminum phthalocyanines. *Photochemistry Photobiology* 1988;47(2):215-20.
- Peloi LS, Soares RSS, Biondo CEG, Souza VR, Hioka N and Kimura E.** Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *Journal of Bioscience* 2008; 33(2): 231-237.
- Pintado V, Martín-Rabadán P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E.** Visceral Leishmaniasis in human immunodeficiency virus(HIV)-infected and non HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine* 2001; 80(1): 54-73.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S.** Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases*. 2007; 7(9):581-96.
- Rosenthal I, Ben-Hur E.** Role of oxygen in the phototoxicity of phthalocyanines. *International Journal of Radiation Biology* 1995;67(1):85-91.
- Ruhland, Leal N, Kima PE.** Leishmania promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cellular Microbiology* 2007; 9(1). 84-96.
- Salvador A.** Investigation about the mechanism of action of new antiproliferative compounds. PhD thesis. 2008 Università Degli Studi Di Padova.

- Saygı G.** Protozoonlar. Temel Tıbbi Parazitoloji. Sivas: Esnaf Ofset Matbaacılık; 1998.p.16-85.
- Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, Ouaisi A, Lemesre JL.** Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001;45(7):2064-9.
- Singh S.** New Developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research* 2006; 123: 330-41.
- Singh RK, Pandey HP, Sundar S.** Visceral leishmaniasis (kala-azar): Challenges ahead. *The Indian Journal of Medical Research* 2006;123(3):331-44.
- Sohl S, Kauer F, Paasch U, Simon JC.** Photodynamic treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of German Society Dermatology* 2007; 5(2):128-30.
- Song D, Lindoso JA, Oyafuso LK, Kanashiro EH, Cardoso JL, Uchoa AF, Tardivo JP, Baptista MS.** Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. *Photomedicine Laser Surgery* 2011; 29 (10): 711-5.
- Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group.** Photodynamic therapy of subfoveal chorioidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: One-year results of 2 randomized clinical trials-TAP Report 1. *Archives Ophthalmology* 1999; 117(10):1329-45.
- Tremblay JF, Dussault S, Viau G, Gad F, Boushira M, Bissonnette R.** Photodynamic therapy with toluidine blue in Jurkat cells: cytotoxicity, subcellular localization and apoptosis induction. *Photochemistry Photobiology* 2002;1(11): 852-856.
- Tseng SP, Hung WC, Chen HJ, Lin YT, Jiang HS, Chiu HC, Hsueh PR, Teng LJ, Tsai JC.** Effects of toluidine blue O (TBO)-photodynamic inactivation on community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Microbiology Immunology Infections* 2015 Jan 10. pii: S1684-1182(15)00020-1. doi: 10.1016/j.jmii.2014.12.007.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (2015).** <http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tanirehberi/parazitoloji/UMS-P-MT-05-Sark-cibani.pdf>. (15.10.2015).
- Urizzi P, Allen CM, Langlois R, Quillet R, La Madeleine C, van Lier JE .** Low density lipoprotein-bound aluminium sulphophthalocyanine:targeting tumor cells for photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 2001; 5: 154-160.
- Usui Y, Kamagawa K.** A Standard system to determine the quantum yield of singlet oxygen formation in aqueous solution. *Photochemistry Photobiology* 1974; 19:245-247.

- Vahabi S, Fekrazad R, Ayremlou S, Taheri S, Zangeneh N.** The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlorin and toluidine blue on streptococcus mutans: *An in Vitro Study. Journal of Dentistry* 2011; 8(2):48-54
- Valdivieso W, Hernández IP, Martínez F, Páez E, Escobar P.** Efecto fototóxico de la terapia fotodinámica en promastigotes de *Leishmania amazonensis*. *Salud UIS* 2008; 40(1):13-19.
- Vandenbogaerde AL, Kamuhabwa A, Delaey E, Himpens BE, Merlevede WJ, de Witte PA.** Photocytotoxic effect of pseudohypericin versus hypericin. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology* 1998; 45: 87-94.
- Van der Snoek EM, Robinson DJ, Van Hellemond JJ, Neumann HA.** A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology* 2008; 22(8):918-22.
- Vega LF.** Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16: 97–101.
- Wainwright M, Phoenix DA, Rice L, Burrow SM, Waring J.** Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1997;40 (3): 233-239.
- Wohllebe S, Richter R, Richter P, Häder DP.** Photodynamic control of human pathogenic parasites in aquatic ecosystems using chlorophyllin and pheophorbid as photodynamic substances. *Parasitology Research*. 2009 ;104(3):593-600.
- Wong TW, Wang YY, Sheu HM, Chuang YC.** Bactericidal effects of toluidine blue-mediated photodynamic action on *Vibrio vulnificus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005 Mar;49(3):895-902.
- World Health Organization** (2015) <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (08.09.2015).
- Wyllie AH.** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284: 555-556.
- Yaşarol Ş.** Leyişmaniyoz. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1981;30-31.
- Zhang W, Khanna P, Chan LL, Campbell G, Ansari NH.** Diabetes-induced apoptosis in rat kidney. *Biochemical and Molecular Medicine* 1997;61: 58-62.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Serçin ÖZLEM ÇALIŞKAN
Doğum yeri ve tarihi : Ankara 27.12.1983
Medeni Durumu : Evli
Telefon : 0 536 8591222
E-mail : srn.ozlem@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı	2006-2009
Lisans	Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik	2002-2006

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

Poster Bildiri Dalında Birincilik Ödülü	World Congress on Echinococcosis	2015
Poster Bildiri Dalında Üçüncülük Ödülü	Türk Biyofizik Derneği	2010
Tartışmalı Poster Bildiri Dalında Üçüncülük Ödülü	Türk Toraks Derneği	2009

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2010-	Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı	Teknisyen

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Ertabaklar H, **Caliskan Özlem S**, Boduc E, Ertug S. Comparison of direct microscopy, culture and polymerase chain reaction methods for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Mikrobiyoloji bülteni 2015, 49(1):77-84.

Ertug S, Malatyalı E, Ertabaklar H, **Caliskan Özlem S**, Bozdoğan B. Subtype Distribution of Blastocystis Isolates and Evaluation of Clinical Symptoms Detected in Aydın Province, Turkey. Mikrobiyoloji bülteni 2015, 49(1):98-104.

Karakaş S, Bilgin MD, Polatlı M, **Ozlem S**, Tas-Gulen S. Anthropometric methods in evaluation of chronic obstructive pulmonary disease. Collegium antropologicum 2014, 38(2):499-504.

Karakaş S, Dişçigil G, Bilgin MD, Tekin N, **Ozlem S**. Bir grup Türk yaşlısının antropometrik ölçümlerinin değerlendirilmesi. Turkish journal of geriatrics 2012, 15 (4):403-408.

Evcı-Kiraz ED, Bilgin MD, Karademir S, **Ozlem S**, Beşer E. Measurements and assessment of solar ultraviolet exposure in Aydın, Turkey. A pilot study. JEPE 2011, 12(4):1689-1699.

Karakaş S, **Özlem S**, Tellioglu Metin A, Ertabaklar H, Ertuğ S. Aydın İlinde Beta Talasemi Majorlü Olgularda Anti-Toxoplasma gondii IgG ve IgM Antikorlarının Araştırılması. Türkiye Parazitoloj Derg.2012, 36 (3)133-136.

2. PROJELER

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Fotodinamik tedavinin <i>Leishmania tropica</i> üzerine olan in vitro etkisi	Adnan Menderes Üniversitesi	15000	01.01.2014 01.09.2015	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP)
<i>Leishmania tropica</i> nın Green Fluorescent Protein Reporter (GFP) geni ile Transfeksiyonu ve in vitro ilaç etkisinin araştırılması modelinde kullanımı	Adnan Menderes Üniversitesi	24000	01.01.2014 01.06.2015	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP)
Kistik Ekinokokkozis Tanısında Hızlı Tanı Testinin Uygulanabilirliğinin Araştırılması ve Western Blotting Yöntemi ile Karşılaştırılması	Adnan Menderes Üniversitesi	22000	01.01.2014- 01.01.2015	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP)
Aydın ilinde elde edilen Blastocystis Hominis izolatlarının genetik	Adnan Menderes Üniversitesi	18000	20.01.2012- 20.01.2014	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP)

varyasyonlarının araştırılması					
Kutanöz leishmaniosisli olgularda lezyondan alınan yayma örneğinden PZR-RFLP ile leishmania türünün araştırılması	Adnan Menderes Üniversitesi	16000	01.04.2012-01.04.2014	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v)
Talasemi Majorlu hastaların cranifacial ölçümleri, bioimpedans ölçümleri ve gen mutasyon analizlerinin yapılarak incelenmesive ayrıca Toksoplazma gondii yönünden araştırılması	Adnan Menderes Üniversitesi	66000	23.03.2010-01.04.2013	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP)
<i>Toxoplasma gondii</i> üzerine darbeli ve sürekli elektromanyetik alanın etkilerinin incelemesi	Adnan Menderes Üniversitesi	5000	1.10.2007-1.10.2009	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP .)

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Bilgin MD, Zencirci ŞG, **Özlem S**, Başoğlu H, Karul AB, Şimşek NG. The possible neuroprotective effects of selenium treatments in Streptozotocin-induced diabetic rats, 2nd international biophysics congress and biotechnology at GAP & 21st National Biophysics Congress ,oral presentation 2009.

Karakaş S, Bilgin MD, Metin Tellioglu A, **Özlem S**, Akçanal B ."Craniofacial Measurements in Patients with β - thalassaemia major ", Anatomist 10th congress of European Association of Clinical Anatomy, September 2-5, İstanbul.2009.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Köken EC, **Çalışkan Özlem S**, Bilgin MD. Ehrlich Asit Tümör Hücreleri Üzerinde Kloraluminyum Ftalosiyanın Ve Dosekselin Sonodinamik Etkilerinin Araştırılması.Malatya, Sözlü Sunum 2015.

Çalışkan Özlem S, Ertabaklar H, Bilgin MD, Ertuğ S. Metilen Mavisi kullanarak Fotodinamik Tedavi Uygulamasının Leishmania tropica Promastigotları Üzerine In vitro Etkisinin Araştırılması: Bir Ön Çalışma, 25.Ulusal Biyofizik Kongresi,Trabzon , Poster.2013.

Çalışkan Özlem S, Bilgin MD, Karakaş S, Tellioglu Metin A. Beta-Talasemi Majorlu Hastalarda Biyoelektriksel Empedans Analizi (BIA) Ölçümlerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi, 25.Ulusal Biyofizik Kongresi,Trabzon, Poster,2013

Malatyalı E, **Çalışkan Özlem S.**, Ertabaklar H, Ertuğ S. Kistik Ekinokokkozis tanısında ticari bir hızlı tanı testinin değerlendirilmesi, ,18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Denizli,Poster.2013 .

Ertabaklar H, **Özlem S.**, Boduç E, Ertuğ S. Kutanöz Leishmaniasis Tanısında Boyalı Mikroskopik İnceleme, Kültür ve Moleküler Yöntemlerin Etkinliklerinin Karşılaştırılması,24.Ulusal Biyofizik Kongresi,Istanbul, Poster, 2012.

Ertuğ S, **Özlem S.**, Arı M ,Ertabaklar H . Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına 2005-2012 yılları arasında Kistik Ekinokokkozis Ön Tanısı ile Gönderilen Olguların Değerlendirilmesi.6. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, Gaziantep, Poster 26, 2012.

Ertuğ S, **Özlem S.**, Ertabaklar H, Bozdoğan B. Aydın ilinde insandan izole edilen Giardia intestinalis genotiplerinin tanımlanması, Ön çalışma, 7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara,Poster 64.2012.

Ertabaklar H, **Özlem S.**, Ertuğ S, Bozdoğan B. Trichomonas vaginalis suşları ITS bölgelerinin karşılaştırılarak tür içi farklılıkların ve Trichomonas vaginalis virusunun varlığının araştırılması, 7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, Poster 65. 2012.

Karakaş S, Bilgin MD, Dişçigil G, Tekin N, Tellioglu AM, **Özlem S.** Yaşlılarda Vucut Yağ ve Sıvı Dağılımlarının Biyoelektriksel Empedans Yöntemiyle Araştırılması, 22.Ulusal Biyofizik Kongresi, Aydın, Poster 49. 2010.

Özlem S., Ertabaklar H, Bilgin MD, Ertuğ S. Darbeli ve Sürekli Elektromanyetik Alan Uygulamalarının *Toxoplasma gondii* üzerine etkilerinin incelenmesi, 22.Ulusal Biyofizik Kongresi, Aydın, Poster.2010.

Özlem S., Ertabaklar H, Bilgin M.D, Ertuğ S. *Toxoplasma gondii* üzerine darbeli ve sürekli elektromanyetik alanın etkilerinin incelenmesi ,16. Ulusal Parazitoloji Kongresi/Adana , Poster, 2009.

Polatlı M, Bilgin MD, Gülen ŞT, Karakaş S, **Özlem S.**, Çildağ O. Kronik Obstruktif Akciğer Hastalarının Biyoelektriksel İmpedans Analiz Yöntemi Kullanılarak Değerlendirilmesi: Bir Ön Çalışma. Türk Toraks Derneği 12. Yıllık Kongresi, Antalya. 2009.

Bilgin MD, Zencirci ŞG, Birincioğlu M, **Özlem S.** Periferik Sinirdeki Ezme Hasarında Sitikolinin Nöroprotektif Etkisi;, VII. Ulusal Sinirbilim Kongresi. Poster 49, Neuroanatomy, Vol.7 (Supplement 1), 18, Adana. 2008.

Zencirci ŞG, Bilgin MD, **Özlem S.**, Başoğlu H. Deneysel Siyatik Sinir Hasarında Melatonin Etkisinin Elektrofizyolojik ve Fonksiyonel Olarak İncelenmesi. 19. Ulusal Biyofizik Kongresi, Sözlü Sunum 4, Program ve Özet Kitabı 10 Konya. 2007.

Özlem. S., Karakaş S, Polatlı M, Gülen S.T, Başoğlu H, Çildağ O, Bilgin M.D. " Kronik Obstruktif Akciğer Hastalarında Vücut Kompozisyonunun Analizi Ve Vücudun Biyoelektriksel Özelliğinin Tayini " , 19. Biyofizik Kongresi. Poster 46, Program ve Özet Kitabı, 71, Konya. 2007.