

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SITMA AŞISINDA ALTERNATİF KOMBİNASYON:
PLASMODIUM FALCIPARUM CIRCUMSPOROZOİTE PROTEİN
VE MF59**

**Hazırlayan
Dr. Yunus UYAR**

**Danışman
Prof. Dr. Salih KUK**

Doktora Tezi

**Ağustos 2015
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SITMA AŞISINDA ALTERNATİF KOMBİNASYON:
PLASMODIUM FALCIPARUM CIRCUMSPOROZOİTE
PROTEİN VE MF59**

**Hazırlayan
Yunus UYAR**

**Danışman
Prof. Dr. Salih KUK**

Doktora Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2014-5370 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2015
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Yunus UYAR

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Sıtma Aşısında Alternatif Kombinasyon: *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein ve MF59” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne Uygun Olarak Hazırlanmıştır.

Hazırlayan
Yunus UYAR

Danışman
Prof. Dr. Salih KUK

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Süleyman YAZAR

Prof.Dr. Salih KUK danışmanlığında **Yunus UYAR** tarafından hazırlanan “**Sıtma Aşısında Alternatif Kombinasyon: Plasmodium falciparum Circumsporoitoite Protein ve MF59**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

18/08/2015

İmza

JÜRİ

Danışman: Prof. Dr. Salih KUK (ERÜ Tıp Fak. Tıbbi Parazitoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Süleyman YAZAR (ERÜ Tıp Fak. Tıbbi Parazitoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Eser KILIÇ (ERÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AD)

Üye : Prof. Dr. Murat HÖKELEK (İÜ Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji AD)

Üye : Doç. Dr. Özlem MİMAN (DEÜ Tıp Fak. Tıbbi Parazitoloji AD)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tıbbi parazitoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimimin başlangıcından itibaren, zaman kısıtlaması olmadan her an değerli katkılarıyla bana destek olan tez danışmanım; değerli hocam, Prof. Dr. Salih KUK'a,

Doktora eğitimim boyunca tüm çalışmalarımda yakın ilgisi ve olumlu katkılarıyla beni destekleyen değerli hocam, Prof. Dr. Süleyman YAZAR'a

Eğitimim boyunca bilgi birikimi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan değerli hocam, Prof. Dr. İzzet ŞAHİN'e,

Eğitim hayatım boyunca hep yanımda olan değerli hocam, Doç. Dr. M.Fatih SÖNMEZ'e,

Doktora eğitimim süresince katkılarını esirgemeyen Yüksek Lisans ve Doktora Öğrencisi arkadaşlarıma ve ERÜ Tıp Fak. Tıbbi Parazitoloji Bölüm Personeline,

Çizimleri ve katkılarıyla tezime destek olan Yüksek Lisans Öğrencisi Şirin Sahra CEYLAN'a, laboratuvar çalışmalarımda önemli katkılarda bulunan Doktora Öğrencisi Abdüssamed AKŞİT'e, tezimin görsel bölümlerinin hazırlanmasında destek olan Doktora Öğrencisi Serkan KARACA'ya, genel laboratuvar çalışmalarım sırasında katkıda bulunan Dr. Ülfet ÇETİNKAYA, Doktora Öğrencisi Merve YÖRÜK ve Yüksek Lisans Öğrencisi Emrah ERDOĞAN'a,

ERÜ BAP birimi, DEKAM birimi ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü yönetici ve çalışanlarına,

Doktora eğitimim süresince beni destekleyen ve kolaylık sağlayan Türk Kızılayı Kayseri Kan Bağış Merkezi Müdürü Dr. Mustafa NARİN ve değerli mesai arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca desteklerini ve sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim kıymetli babam Ahmet UYAR ve kıymetli annem Ayşe UYAR'a ve sevgili kardeşlerim Erdem, Şule ve Sümeyra'ya,

Yoğun mesai ve eğitim sürecinde büyük fedakârlıkta bulunarak beni destekleyen biricik eşim Handan'a, hayatımıza anlam katan güzel çocuklarımız Serra Gülce ve Mustafa Hakkı'ya teşekkür ederim.

Yunus UYAR
KAYSERİ / 2015

SITMA AŞISINDA ALTERNATİF KOMBİNASYON: *PLASMODIUM FALCIPARUM* CIRCUMSPOROZOİTE PROTEİN VE MF59

Yunus UYAR

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Parazitoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Ağustos 2015

Danışman: Prof. Dr. Salih KUK

ÖZET

Sıtma, paraziter hastalıklar arasında en fazla ölüme neden olanıdır. Sıtmaya, *Plasmodium* cinsine ait protozoan parazitler sebep olmaktadır. Hastalık dişi Anofel sivrisineğin insanlardan kan emmesiyle bulaşmaktadır. Hızlı ve etkin bir biçimde teşhis ve tedavisi gerçekleştirildiğinde, sıtma iyileştirilebilir bir hastalıktır. Sıtmaya karşı kullanılan ilaçların hemen hepsine karşı direnç gelişmiş durumdadır ve günümüzde sıtmaya karşı etkili bir aşı henüz geliştirilememiştir. 40 yıl önce, radyasyon uygulanmış 1000 sivrisineğe maruz bırakılan kişilerde falciparum sıtmasına karşı steril immünite oluşturulmasıyla çalışmalar başlamıştır. *Plasmodium*'ların kompleks yapıları ve karmaşık hayat döngüleri aşı çalışmalarını zorlaştırmaktadır ve çok fazla antijenik yapıları bulunmaktadır. Üzerinde en fazla çalışılan Circumsporozoite Protein, günümüzde lisans almaya en yakın aday olan RTS,S'in de yapısında bulunmaktadır. Pre-eritrositer dönem aşıları daha fazla çalışılmıştır. Bunun yanında, günümüzde birçok protein ve DNA aşısı geliştirilmeye çalışılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre önümüzdeki 20 yıllık periyotta sıtma aşısının yapılabilmesi mümkündür. Bu çalışmada *P.falciparum* CSP'nin rekombinant olarak üretilmesi ve MF59 adjuvanı ile kombine edilmesi amaçlanmıştır. Öncelikle *P.falciparum* genomik DNA'sından 1.182 bp'lik CSP geni PCR ile çoğaltılmıştır. CSP geni pJET vektörüne klonlandı. Daha sonra pET100 protein ekspresyon vektörüne subklonlanarak rekombinant CSP (rCSP) eksprese edildi. Western Blot ile gösterilen rCSP, Probond Purification System kiti ile saflaştırılması sonrası endotoksinlerinden arındırılmış ve MF59 ile kombine edilmiştir.

Sıtmaya karşı aşı çalışmalarında yeni bir yaklaşım olan rCSP + MF59 formülasyonunun etkinliğinin sonraki çalışmalarda farklı deney hayvanlarında araştırılması ile bilimsel birikime katkı sağlanabilecektir.

Anahtar Sözcükler: Sıtma, Sıtma aşısı, CSP, Bağışıklık

AN ALTERNATIVE COMBINATION FOR MALARIA VACCINE: *PLASMODIUM FALCIPARUM* CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN AND MF59

Yunus UYAR

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Parasitology

Doctorate Thesis, August 2015

Supervisor: Prof. Dr. Salih KUK

ABSTRACT

Malaria is the leading cause of death, amongst the parasitic diseases. Malaria is caused by parasitic protozoans belonging to the genus *Plasmodium*. The disease is transmitted to the human by the biting of female Anopheles mosquitos. Malaria is a curable disease if diagnosed and treated promptly and correctly. Drug resistance has developed against almost all anti-malarial drugs and currently an effective vaccine against malaria has not yet been developed. Vaccine studies initiated 40 years ago by sterile immunity against falciparum malaria through immunization by exposure to 1000 irradiated mosquitoes. Complicated structures and complex life cycle of Plasmodium makes it difficult to vaccine studies and a lot of antigenic structure belonging to Plasmodium species. Most extensively studied circumsporozoite protein is also present in the structure of the vaccine candidate RTS,S which is currently closest to get licensing. Pre-erythrocytic stage vaccines were studied further. Furthermore, nowadays many DNA, RNA and protein vaccine candidates are being developed. According to the World Health Organization, in the next 20 year period, malaria vaccine can be made. In this study we aimed to produce recombinant CSP (rCSP), then combine it with MF59 adjuvant. Initially, 1.182bp *P.falciparum* CSP gene was amplified by PCR. CSP gene was cloned into the pJET cloning vector. And then subcloned to the pET100 protein expression vector and rCSP was expressed. rCSP was verified with Western Blot method. Once purified with Probond Purification System kit, endotoxin free rCSP was combined with MF59 adjuvant.

rCSP + MF59 formulation is a new approach to the vaccine against malaria, will be able to contribute to scientific knowledge by working subsequent studies in different animal experiments.

Key Words: Malaria, Malaria vaccine, CSP, Immunity

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. TARİHÇE.....	3
2.2. SINIFLANDIRMA	4
2.2.1. <i>P.falciparum</i>	4
2.3. MORFOLOJİ	5
2.4. HAYAT DÖNGÜSÜ	8
2.4.1. Şizogoni	8
2.4.2. Sporogoni	10
2.5. SITMA VEKTÖRÜ	11
2.6. PATOGENEZ.....	11
2.7. PATOLOJİ	12
2.8. EPİDEMİYOLOJİ	13
2.9. KLİNİK.....	15
2.10. TANI.....	16
2.11. TEDAVİ.....	17
2.12. KORUNMA VE KONTROL.....	18
2.13. İMMÜNOLOJİ.....	19
2.14. AŞI.....	21
2.14.1. Canlı-atenüe Aşılar	22
2.14.2. İnaktif Aşılar	22
2.14.3. Subünit Aşılar.....	22
2.14.4. Toksoid Aşılar	23
2.14.5. Konjuge Aşılar	23
2.14.5. DNA Aşıları.....	23
2.14.1. Rekombinant Vektör Aşıları	23
2.14.2. Rekombinant Protein Aşıları	24

	<u>Sayfa no</u>
2.14. SITMA AŞISI.....	24
2.14.1. Sıtma Aşısının Gerekliliği	24
2.14.2. Sıtma Aşısının Yapılabilirliği	25
2.14.3. <i>Plasmodium</i> Antijenleri.....	26
2.14.4. Circumsporozoite Protein (CSP)	27
2.14.5. Sıtma Aşıları.....	28
2.14.5.1. Pre-eritrositer Dönem Aşıları	29
2.14.5.2. Eritrositer (Aseksüel) Dönem Aşıları.....	30
2.14.5.3. Bulaşmayı Önleyici Aşılar	31
2.14.5.4. Kombine Aşılar.....	32
2.16. ADJUVANLAR	32
2.16.1. MF59®.....	33
2.17. ENDOTOKSİNLER	34
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar.....	36
3.1.1.Malzemeler	36
3.1.1.Cihazlar	37
3.2. YÖNTEM	38
3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	38
3.2.2. <i>P.falciparum</i> Circumsporozoite Geninin Klonlanması)	39
3.2.2.1. Yapışkan Uçlu Klonlama Protokolü	39
3.2.2.2. Ligasyon Reaksiyonu	39
3.2.2.3. Transformasyon	39
3.2.2.4. Kolonilerden PCR Screening	40
3.2.2.5. Klonlamanın Miniprep ile Doğrulanması	40
3.2.2.6. Rekombinant Plazmiddeki CSP Geni Varlığının PCR ve DNA Dizi Analizi ile Doğrulanması.....	41
3.2.3. pET100 vektörüne Subklonlama İçin PCR	41
3.2.4. <i>P.falciparum</i> CSP Geninin pET100 Vektörüne Ligasyon ve Transformasyonu	42
3.2.4.1. Kolonilerden PCR Screening	42
3.2.4.2. Kolonilerden Rekombinant Plazmidin Saflaştırılması	43
3.2.4.3. Rekombinant Plazmidin Miktar ve Saflığının Ölçümü	43
3.2.5. Rekombinant Plazmidin BL21 Star <i>E.coli</i> Hücrelerine Transformasyonu	43
3.2.6. rCSP Ekspresyonu	44
3.2.6.1. SDS-PAGE Yönteminin Uygulanması.....	44
3.2.6.2. rCSP Ekspresyonunun Western Blot ile Gösterilmesi	45
3.2.6.2.1. DAB Tablet ile Rekombinant Protein Analizi	45
3.2.6.2.2. ECL Yönteminin Uygulanması	46

	<u>Sayfa no</u>
3.2.8. rCSP'nin Saflaştırılması	46
3.2.8.1. Hücre Lizatı Hazırlanması	46
3.2.8.2. ProBond™ Kolumun Hazırlanması	47
3.2.8.3. Pürifikasyon Prosedürü	47
3.2.9. rCSP'den Endotoksin Eksiltilmesi	48
3.2.9.1. Saflaştırılmış rCSP'nin Endotoksin Seviyesinin Tespiti	48
3.2.10. rCSP ve MF59'un Kombinasyonu	49
3.2.11. rCSP Aminoasit Dizisi Analizi	49
3.2.11.1. rCSP 3 Boyutlu Yapısının Analizi	49
4.BULGULAR	50
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	61
6.KAYNAKLAR	69
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER	

ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. <i>Plasmodium</i> Türlerinin Gelişim Evreleri.....	7
Şekil 2.2. <i>Plasmodium</i> 'ların Hayat Döngüsü	9
Şekil 2.3. Dişi Anofel'de <i>Plasmodium</i> 'ların Gelişim Evreleri	10
Şekil 2.4. Sporozoitler	12
Şekil 2.5. Dünya Sıtma Haritası	14
Şekil 2.6. Eritrositler İçerisinde Trofozoitler.....	16
Şekil 2.7. Circumsporozoite Protein 3 Boyutlu İllüstrasyonu	28
Şekil 4.1. <i>P.falciparum</i> CSP Geninin PCR Ürünü.....	50
Şekil 4.2. Transformasyon Sonucunda Oluşan Koloniler	51
Şekil 4.3. Transformasyon Kolonilerinin Tek Nokta Ekimi Sonucu Oluşan Yeni Koloniler	51
Şekil 4.4. PCR Screening.....	52
Şekil 4.5. <i>P.falciparum</i> CSP Geni Miniprep PCR Ürünü	53
Şekil 4.6. DNA Dizi Analizi Yapılan PfCSP Gen Dizisi.....	54
Şekil 4.7. Pfu DNA Polimeraz ile Elde Edilen PCR Ürünü	55
Şekil 4.8. rCSP Western Blot Sonucu.....	56
Şekil 4.9. ECL Yöntemi ile rCSP Bantlarının Görüntülenmesi.....	57
Şekil 4.10. Saflaştırma Sonrası rCSP Western Blot Sonucu	58
Şekil 4.11. rCSP Aminoasit Dizisi	59
Şekil 4.12. rCSP 3 Boyutlu Yapısı	59
Şekil 4.13. rCSP + MF59 Kombinasyonu.....	60
Tablo 2.1. Farklı Aşılar İçin Endotoksin Seviyeleri	35
Tablo 3.1. PCR Döngüsü Şartları	38
Tablo 3.2. Pfu DNA Polimeraz PCR Döngüsü Şartları.....	41

KISALTMALAR

P.falciparum: *Plasmodium falciparum*

CSP: Circumsporozoite Protein

rCSP: rekombinant Circumsporozoite Protein

DNA: Deoksiribonükleik Asit

RNA: Ribonükleik Asit

P.malariae: *Plasmodium malariae*

P.ovale: *Plasmodium ovale*

P.vivax: *Plasmodium vivax*

P.knowlesi: *Plasmodium knowlesi*

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

HIV: Human Immunodeficiency Virus

AIDS: Acquired Immuno Deficiency Syndrom

RDT: Rapid Diagnostic Test

HRP-2: Histidinden Zengin Protein-2

pLDH: *Plasmodium*'la ilişkili Laktat Dehidrogenaz

QBC: Kantitatif Buffy Coat

IFAT: Indirekt Floresan Antikor Testi

PCR: Polimeraz Chain Reaksiyonu

rtPCR: Real Time Polimeraz Chain Reaksiyonu

IgG: Immunoglobulin G

IgM: Immunoglobulin M

BCG: Bacille Calmette-Guérin

OPV: Oral Polio Vaccine

MMR: Measles Mumps Rubella

IPV: Inactivated Polio Vaccine

HPV: Human Papilloma Virus

HIB: Haemophilus influenzae type B

SSP2: Sporozoite surface protein 2

LSA-1: Liver stage-specific antigen 1

MSA-1 ve 2: Merozoite surface protein 1 ve 2

EBA-175: Erythrocyte binding antigen 175

SERA: Serine repeat antigen

AMA-1: Apical merozoite antigen

Pfs25: *P.falciparum* surface antigen 25

PBS: Phosphate Buffered Saline

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

bp: Baz Pair

kDa: Kilo Dalton

NANP: N-asetil Nöraminik Asit Fosfataz

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sıtma, halen dünyada en fazla morbidite ve mortaliteye neden olan paraziter enfeksiyondur. Kısa inkübasyon periyodu sonrası günler içerisinde ölümler sonuçlanabilen bir hastalıktır. Sıtmaya karşı etkin tedaviler günümüzde kullanılmakta olup, henüz hastalıktan koruyucu bir aşı mevcut değildir (1-3).

Sıtmaya neden olan *Plasmodium*’lar; Sporozoa sınıfından olup Apicomplexa şubesine ait protozoon parazitlerdir. *Plasmodium* türlerinin insanda enfeksiyona neden olan dört ana türü mevcuttur. Bunlar *P.falciparum*, *P.ovale*, *P.malaria* ve *P.vivax*’tır. İnsanlarda enfeksiyona neden olan beşinci bir tür olan *P.knowlesi* aslında primatların sıtma etkeni olup insanlarda da zoonoz şeklinde sıtmaya neden olmaktadır. İki veya daha fazla *Plasmodium* türüyle kombine enfeksiyonlar da görülebilmektedir. Sıtma etkenleri arasında en ağır klinik tabloyu oluşturan ve en fazla ölüme neden olan tür *P.falciparum*’dur (1-6).

Milyonlarla ifade edilen sıtma vakaları ve yüzbinlerle ifade edilen sıtma kaynaklı ölümler günümüzde de devam etmektedir. Sıtma özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerde görülmektedir. Dünyada *P.falciparum* sıtması daha fazla görülmekteyken Türkiye’de ise *P.vivax* etkindir. Ülkemizde Cumhuriyet’in kuruluşundan itibaren yoğun bir şekilde yürütölen mücadele neticesinde yerli sıtma vakası son yıllarda nadirdir (1, 2). Fakat uluslararası seyahatin kolaylaşması sonucu ölkemizde ve bölgemizde etkenin

P.falciparum olduğu importe sıtma vakaları son yıllarda sıklıkla görülebilmektedir (7-16).

Hastalığa karşı mevcut ilaçların az olmasının yanı sıra, var olan ilaçların da direnç gelişimi ve ilaç yan etkileri nedeniyle kullanımının kısıtlanması; böyle önemli bir hastalık için neden halen etkili bir aşı olmadığı sorusunu akla getirmektedir. 1970’lerde attenüe sporozoitlerin aşı olarak denenmesiyle başlayan çalışmalar, şimdilerde DNA aşıları ve protein aşılarının geliştirilmeye çalışılmasıyla devam etmektedir (17).

Günümüzde parazitin pre-eritrositer, eritrositer ve seksüel hayat evrelerine karşı etkili ve/veya bunların kombinasyonlarından oluşan aşılar geliştirilmeye çalışılmaktadır (18). Pre-eritrositer dönem antijenlerinden olan Circumsporozoite Protein (CSP), günümüzde lisans almaya en yakın aday olan RTS,S’in de yapısında bulunmaktadır.

Circumsporozoite protein parazitin hayat döngüsünde çok önemli bir role sahiptir. CSP daha önce tek başına ve diğer antijenlerle beraber birçok aşı çalışmasında kullanılmış, fakat MF59 adjuvanıyla birlikte uygulanmamıştır. MF59 adjuvanı literatürde etkili ve güvenilir bir adjuvan olarak bildirilmektedir. MF59, canlılarda bulunan skualenden elde edilen ve kuvvetli immünojen etki oluşturabilen bir adjuvandır (19).

Bu projede *P.falciparum* CSP geni klonlanıp, ekspresyon vektörüne yerleştirilerek, devamında rCSP proteini sentezlettirilecektir. Saflaştırılan ve endotoksinleri eksiltelen rCSP, güçlü ve etkin bir adjuvan olan MF59 ile kombine edilerek sıtmaya karşı aşı çalışmaları için yeni bir formülasyon meydana getirilecektir.

Çalışma, ülkemizde ilk olma özelliğini taşımaktadır ve protein aşısı alanında ülkemiz ve laboratuvarımızın bilgi havuzuna katkıları olacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

Sıtma, insanlık tarihi kadar eski bir hastalıktır. Antik dönemlerdeki el yazmalarının birçoğunda bu hastalıktan bahsedilmektedir. Milyonlarca yıllık fosil kalıntılarında sivrisinek varlığına rastlanması insanların, daha yazının icadından önce bile sıtmadan muzdarip olabileceklerinin işaretidir (20).

Milattan Önce 2700 yılında Çin Hükümdarı Huang Ti, Nei Ching adlı eserinde sıtmanın tipik semptomlarından bahsetmiştir. 1971’de Çinli bilim insanları tarafından izole edilen ve günümüzde halen sıtma tedavisinde kullanılan artemisin, MÖ 200’lü yıllardan beri Çin’de ateşli hastalıklara karşı kullanılmış olan ‘Qinghao’ bitkisinin etken maddesidir (20).

Hipokrat da bataklık bölgelerde, tekrarlayan ateş ve dalak büyüklüğü olan hastaların varlığına istinaden bu hastalıktan bahsetmiştir (21).

Sıtmanın bataklıktan veya bataklık etrafındaki kötü havadan kaynaklandığı düşünülerek bu hastalığa İtalyanca kökenli “mal” (kötü) ve “aria” (hava) sözcüklerinin birleşiminden meydana gelen “malaria” ismi verilmiştir. Türkçede bu hastalık için kullanılan sıtma adının ise “ısıtmak”tan geldiği düşünülmektedir (21).

Hastalığın henüz adı konulmamışken, 1600’lü yıllarda Yeni Dünya’yı keşfeden İspanyol Cizvit misyonerleri, Amerika yerlilerinden quina quina (kına kına) ağacının

kabukları ile ateşli hastalıkların tedavisinin yapıldığını öğrenmişlerdir. Peru valisinin eşi olan Chincón Kontesi, hastalığın neden olduğu ateşini bu ağacın kabuklarıyla tedavi etmeyi başarmıştır (20).

Hastalığın mikroorganizmalarla meydana geldiğini 1880’de ilk olarak ortaya koyan Fransız askeri hekim Charles Laveran daha sonra bu buluşu sayesinde Nobel ödülü kazanmıştır. 1897’de Hindistan’da görev yapan İngiliz hekim Ronald Ross dişi sivrisineklerin taşıdığı parazitin ookist formunu göstermiş ve o da meslektaşları gibi Nobel ödülü kazanmıştır (20).

Dünyanın büyük bir kısmında görülmekte olan sıtma, insanlık tarihi boyunca birçok medeniyetin sona ermesine neden olmuştur. Ülkemiz coğrafyasında da eski medeniyetlerden günümüze kadar sıtma her zaman önemli bir hastalık olarak varlığını sürdürmüştür. Cumhuriyet kurulmadan önceki zamanlara ait net veriler mevcut olmadığından vaka sayıları tam olarak bilinmemektedir. Cumhuriyet’ten sonra ise yoğun mücadele programlarına rağmen 1929-44, 1976-86 ve 1993-98 yılları arasında üç büyük sıtma salgını gözlenmiştir (1-3, 21).

2.2. SINIFLANDIRMA

Plasmodium parazitleri Protozoon’ların Apicomplexa şubesi, Eucoccidiida takımı ve *Plasmodidae* ailesi içinde sınıflandırılırlar. *Plasmodium* türlerinin insanda enfeksiyona neden olan dört ana türü mevcuttur. Bunlar *P.falciparum*, *P.ovale*, *P.malaria* ve *P.vivax* olup (20) enfeksiyona neden olan beşinci bir tür olan *P.knowlesi* aslında primatların sıtma etkeni olup insanlarda da zoonoz şeklinde sıtmaya neden olmaktadır (4-6). *Plasmodium*’ların sayılanlar dışında, primatlarda ve diğer hayvanlarda enfeksiyona neden olabilen çok sayıda türü mevcuttur (1-3).

Plasmodium vivax ülkemizde sıtmaya neden olan *Plasmodium* türüdür (1). İki veya daha fazla *Plasmodium* türüyle kombine enfeksiyonlar da görülebilmektedir (1-3).

2.2.1. *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum türü William H. Welch tarafından 1897’de tanımlanmıştır (20). Sıtma etkenleri arasında dünyada en sık karşılaşılan ve en ağır klinik tabloyu oluşturan

türdür. Ağırlıklı olarak tropikal ve subtropikal bölgelerde görülen *P.falciparum*, dört tür arasında morbidite-mortalitesi en yüksek olanıdır (1-3).

Eritrositlerin parçalanması sonucu ortaya çıkan kimyasallar nedeniyle bu hastalıkta görülen ateş, *P.falciparum* sıtmasında (Tersiyana Sıtması) her 48 saatte bir görülmektedir (1-3).

Gametosit gelişim süresi bu tür için ortalama olarak 10-12 gün civarındadır. *P.falciparum* trofozoitleri tarafından istila edilen eritrositler beyin kapillerlerini tıkayarak serebral sıtma tablosuna neden olabilmektedirler (2).

Boyalı kan preparatlarında görülen bu parazitin oluşturduğu büyük taneciklere “Maurer Lekeleri” denmektedir. *P.falciparum* retikülositlerden olgun eritrositlere kadar ayırım yapmaksızın her yaştaki kırmızı kan hücrelerini enfekte edebilmektedir. Enfekte eritrosit oranının %10’a ulaşmasıyla sıtma semptomları ortaya çıkmaktadır. Daha fazla eritrositin enfekte olduğu durumlarda ağır anemi tablosu ve diğer ciddi klinik bulgular, nihayetinde ölümle sonuçlanmaktadır (1-3).

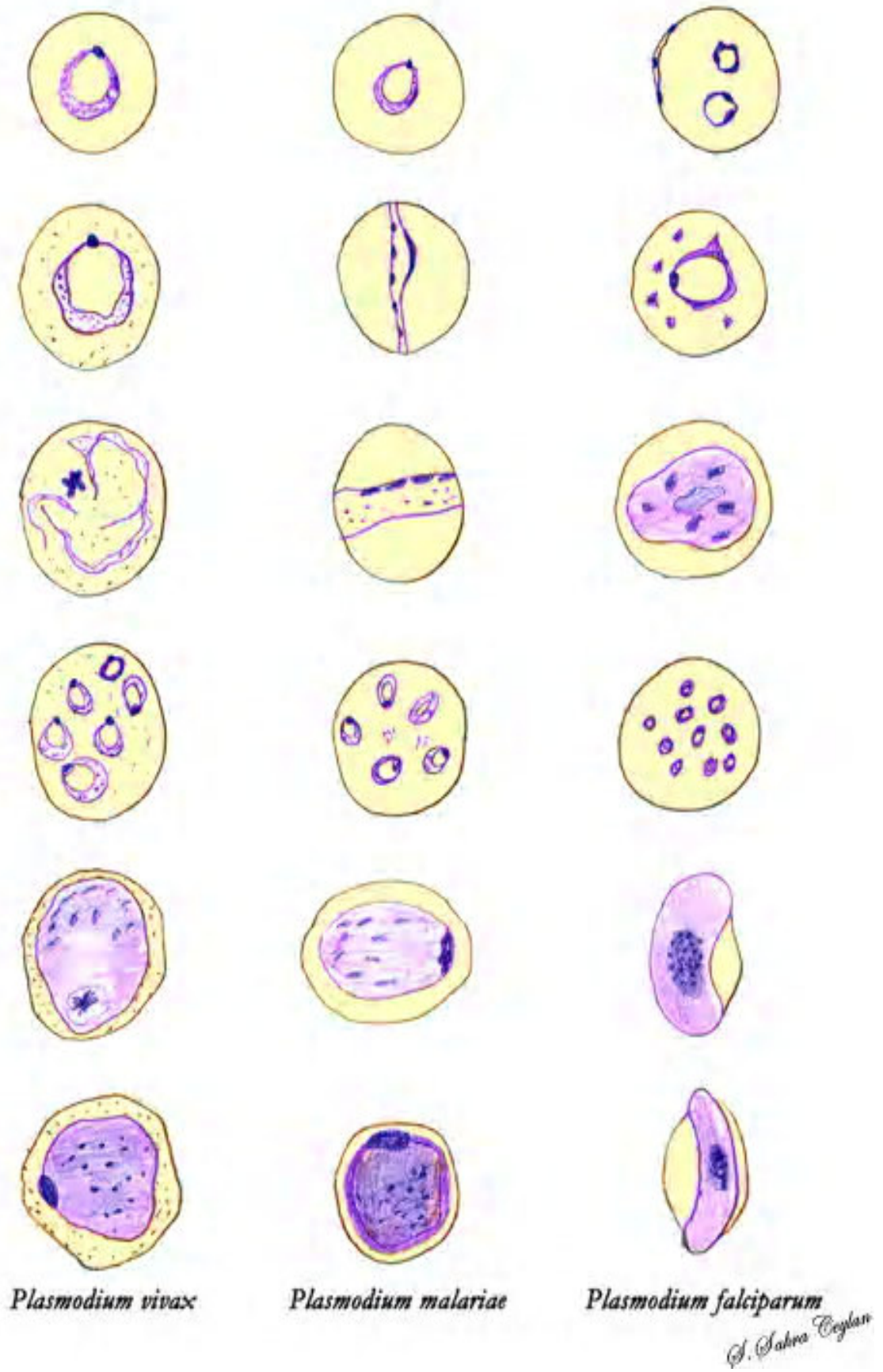
2.3. MORFOLOJİ

Plasmodium’ların sivrisinek vücudundaki evrim dönemlerinde zigot, ookinet, ookist, sporokist ve sporozoit şekilleri görülmektedir. İnsanda görülen üreme evresinde ise genç trofozoid, ameboid, genç şizont olgun şizont ve merozoit şekilleri izlenmektedir (**Şekil 2.1.**). *Plasmodium*’lar eritrositlerin içerisinde mevcut olan hemoglobinle beslenirler. Hemoglobin sindirildikten sonra geriye kalan kısım ise eritrosit sitoplazması içinde birikir (1-3).

Plasmodium vivax ve *P.ovale* sıtmasında, parazitin içinde bulunduğu eritrositlerin sitoplazmasındaki çok sayıda kırmızı, asidofilik yapılara “Schüffner Tanecikleri” denir. *P.falciparum* sıtmasında ise enfekte eritrositlerin sitoplazmasındaki az sayıda mavi, bazofilik yapılara da “Maurer Tanecikleri” denmektedir (1-3).

Eritrositik şizogoni sonucu oluşan merozoitler plazmaya dağılır ve bunların birçoğu immün sistem tarafından ortadan kaldırılır. 2-3 eritrosit döngüsünden sonra bilinmeyen bir mekanizmayla gametositleri meydana getirirler. Oluşan gametositlerin sitoplazması daha yoğundur ve kromatini bulunmamaktadır (2).

Plasmodium vivax ve *P.ovale* retikülositleri enfekte ederken, *P.malariae* ise olgun eritrositleri enfekte eder. *P.falciparum* ise ayırım yapmaksızın genç veya olgun eritrositleri enfekte etmektedir ve enfekte eritrosit oranı %10 civarında, hatta daha fazladır. Oysa diğer türlerle meydana gelen sıtma tablosunda total eritrositlerin %1'i bile enfekte olmamaktadır (1-3).



Şekil 2.1. *Plasmodium* Türlerinin Gelişim Evreleri

2.4. HAYAT DÖNGÜSÜ

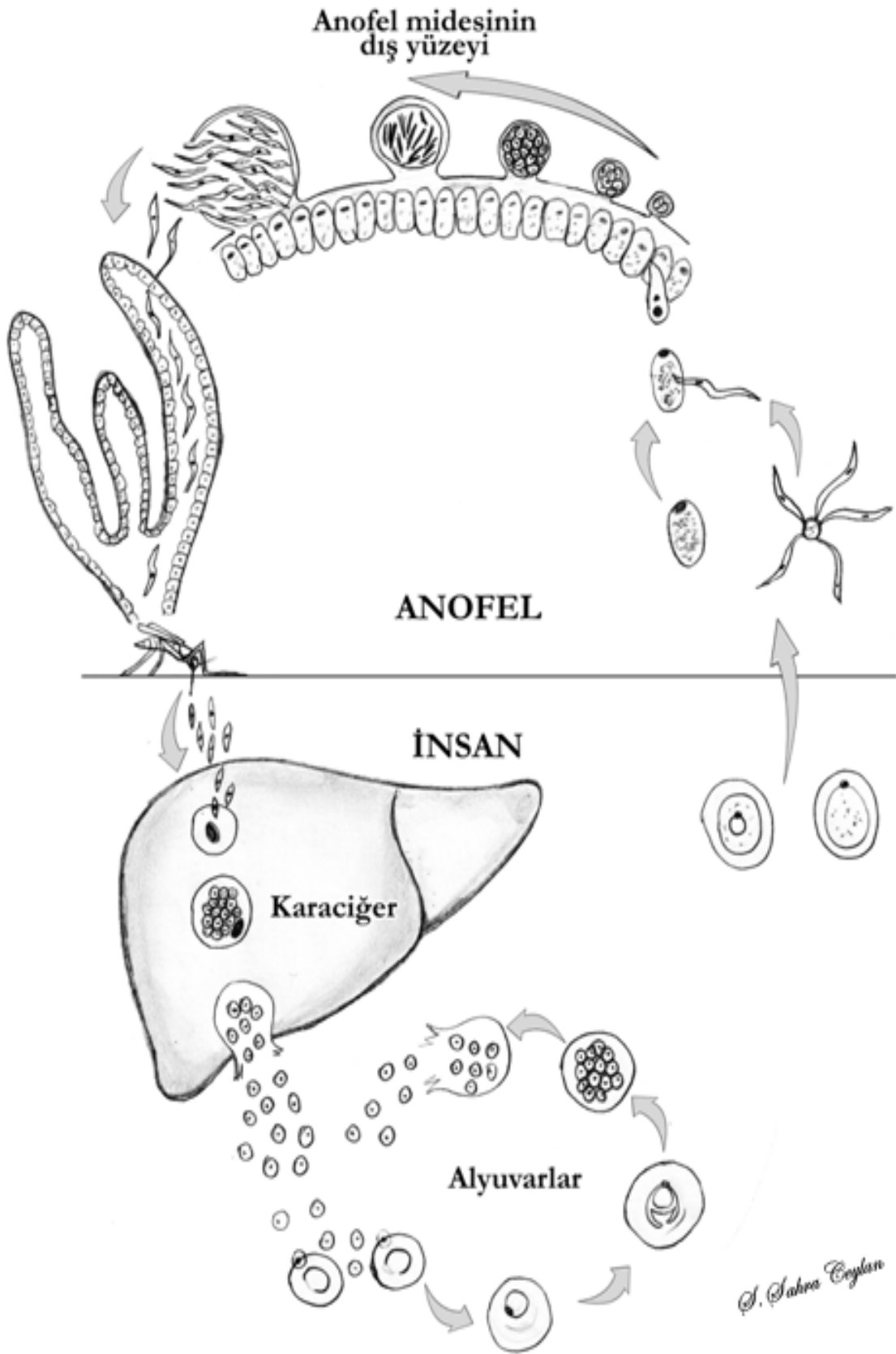
Plasmodium'ların hayat döngüsü aslında detaylı olarak aydınlatılmış olsa da halen gizemini koruyan kısımları bulunmaktadır. *Plasmodium* türlerinin sivrisinek ve insanda tamamlanan karmaşık bir hayat döngüsü vardır (**Şekil 2.2.**).

2.4.1. Şizogoni

Plasmodium'u taşıyan dişi anofelin insandan kan emerken hortumundan geçen sporozoitlerle hayat döngüsü başlamış olur. Kan emme esnasında yaklaşık 3000 sporozoitin deriye enjekte edildiği bilinmektedir. Sporozoitler, dermis üzerine veya epidermise inoküle edilmektedir. Bu sporozoitler, kan veya lenfatik sistemin endotelial hücrelerine ulaşana kadar aktif olarak hareket etmektedirler (22). Daha sonra kan dolaşımı sayesinde sporozoitler karaciğere doğru yolculuklarına başlarlar. Sporozoitlerin bir kısmı bu esnada dendritik hücreler tarafından fagosit edilir (23). Fagositozdan kurtulanlar ise karaciğere ulaştıklarında karaciğer hücrelerine giriş yaparlar ve burada hepatositler içerisinde çoğalırlar. Hepatositleri istila eden merozoitler, hücrelerin parçalanmasıyla kan dolaşımına geçerler. Kan dolaşımına katılan binlerce merozoitin bundan sonraki hedefleri eritrositlerdir.

Plasmodium vivax ve *P.ovale*'nin karaciğerde bazen yıllarca uykuda kalan ve bazen aylar-yıllar sonra aktif hale geçerek enfeksiyona neden olabilen hipnozoit formları mevcuttur (1-3).

Merozoitler eritrositleri istila ederek eritrosit içerisinde çoğalır ve şizontlara dönüşürler. Şizontlar parçalandığında serbest kalan her trofozoit yeni bir eritrositi enfekte eder. Eritrositer dönemdeki parazitler hastalığın klinik manifestasyonlarından sorumludur (1-3).

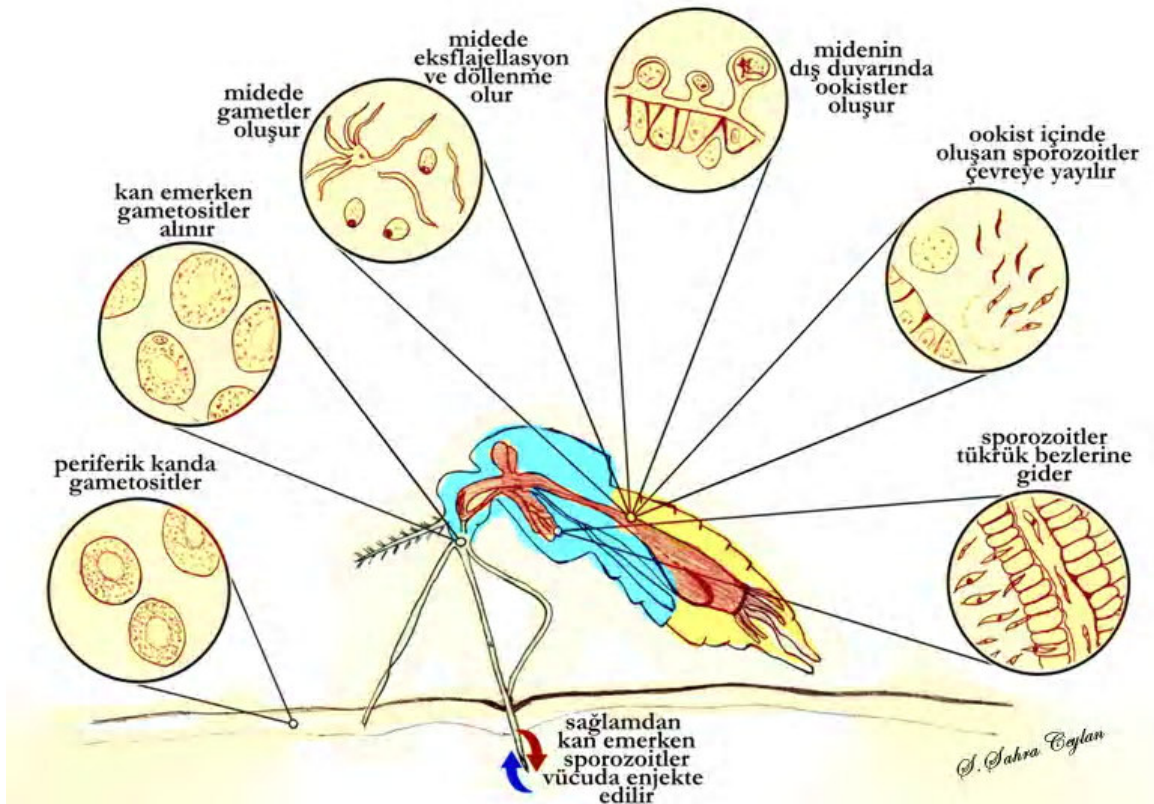


Şekil 2.2. *Plasmodium*'ların Hayat Döngüsü

2.4.2. Sporogoni

Bu döngü bu şekilde devam ederken bir kısım trofozoitler, 2 veya 3 eritrositer döngüden sonra bilinmeyen bir nedenle makro ve mikrogametositlere dönüşür. Sivrisinek kan emerken parazitin bu formlarını da almaktadır. Daha sonra sivrisineğin orta bağırsağında olgunlaşan makro ve mikrogametositler birleşerek zigotu oluştururlar. Zigot, sivrisineğin vücuduna girişten yaklaşık 18-20 saat sonra hareketli ve uzamış olan ookinite ve ardından ookiste dönüşür. Ookist gelişimi 27°C sıcaklıkta ve yaklaşık 2 hafta gibi oldukça uzun sayılabilecek bir sürede gerçekleşmektedir (1-3).

Ookistin rüptüre olmasıyla, türler arasında farklılıklar görülmekle birlikte ortalama 10-15 µm boyundaki sporozoitler ortaya çıkar. Sporozoitler henüz sebebi bilinmeyen özel bir tropizm sayesinde dişi *Anofel*'in tükrük bezlerine gelirler. Sivrisineğin sağlıklı bir insandan kan emmesi esnasında tükrük bezinde bulunan bu sporozoitler de enjekte edilirler ve sıtma parazitinin hayat döngüsü bu şekilde devam eder (1-3).



Şekil 2.3. Dişi Anofel’de *Plasmodium*’ların Gelişim Evreleri

2.5. SITMA VEKTÖRÜ

Sıtmanın vektörü *Anopheles* cinsi sivrisineklerdir. Dişi *Anopheles*, yumurtalarının olgunlaşabilmesi için insanlardan kan emerken *Plasmodium*'ları da insan vücuduna inoküle eder. *Plasmodium*'lar insanda eşeysiz, vektörü olan dişi sivrisineğin vücudunda ise eşeyli olarak ürerler (1).

Sıtmanın vektörü olan dişi *Anopheles*'lerin yaşaması için uygun olan 45° kuzey ile 40° güney arasındaki enlemlerde hastalık doğal olarak daha sık görülür. Dişi *Anopheles*'ler 15°C'nin altında yaşayamadıkları için, bu sıcaklık derecesinin üstüne çıkmayan bölgelerde sıtma görülmemektedir (2).

Anopheles cinsi sivrisinekler yumurtalarını genellikle su yüzeyine bırakırlar. Yumurtalarda bulunan yüzgeçler suyun dibine batmalarını engellemektedir. Yumurtadan sonra larva, pupa ve son olarak da ergin dönemi olmak üzere hayat döngüsünde dört dönem geçirirler. Yumurtaların gelişimi için en uygun sıcaklık olan 23-25°C'de 2-3 gün geçirmeleri yeterlidir (2).

Anopheles'lerin doğada çok fazla sayıda türü mevcut ise de hepsi *Plasmodium*'lar için vektörlük yapmamaktadır. Ülkemizde vektör olarak en sık saptanan türler: *Anopheles sacharovi*, *A. maculipennis*, *A. claviger* ve *A. superpictus*'tur. Bunların dışında vektörlük yapan 9 *Anopheles* türü daha mevcuttur (1-3).

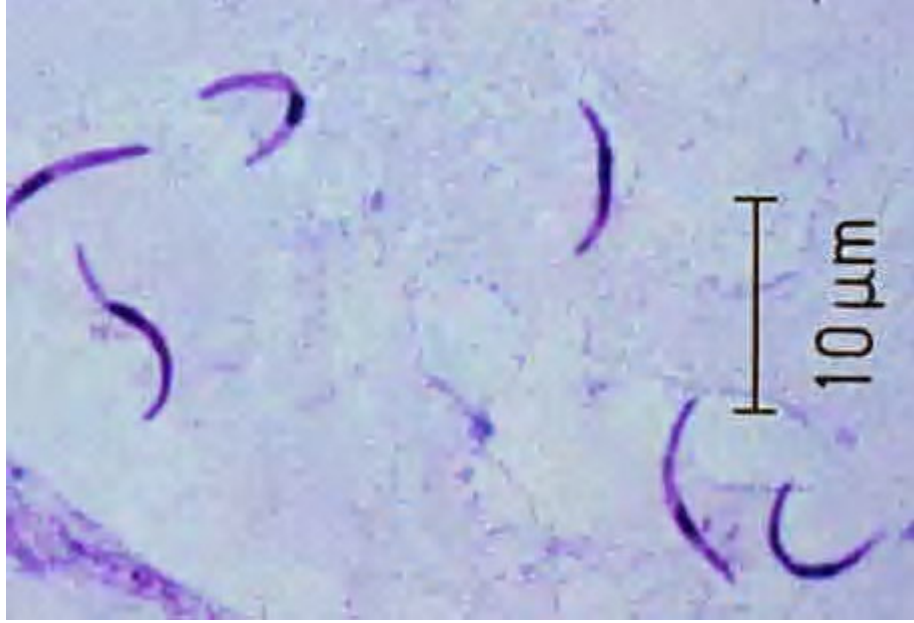
Sivrisinekler dışında hastalık kan transfüzyonu, transplasental (doğum esnasında veya anne karnında) yolla, organ transplantasyonu ve kontamine enjektör ve/veya cerrahi malzemelerle de bulaşabilmektedir (24).

2.6. PATOGENEZ

Plasmodium vivax ve *P. ovale* türleri ile meydana gelen sıtmada sporozoitlerden bir kısmı hepatositler içerisinde çoğalmadan, latent halde kalmakta ve oldukça uzun bir süre sonra bile yeniden aktive olarak enfeksiyona neden olabilmektedirler (1-3).

Klinik bulgular ortaya çıkmadan önce sıtma türüne göre 7 ila 30 gün arasında değişen bir inkübasyon periyodu izlenmektedir. En kısa inkübasyon süresi 7 gün ile *P. falciparum* sıtmasında görülürken en uzun inkübasyon süresi de *P. malariae*'da görülmektedir (24).

Plasmodium'lar zorunlu hücre içi parazitlerdir. Parazitin hücre içerisine girme yeteneği olan sporozoit (Şekil 2.4.), merozoit ve ookinet formları bulunmaktadır. *Plasmodium*'ların, iyi bilinen ve aşı çalışmalarında da kullanılan Merozoit Yüzey Proteini (MSP) sayesinde kanda bulunan merozoitler, sadece eritrositleri enfekte edebilmektedir (25).



Şekil 2.4. Sporozoitler (26)

Parazit konak hücreye invazyon yaparken mikronem ve daha sonra roptiri salgıları gerçekleşmekte; hücre invazyonundan sonra ise yoğun granül salgıları gerçekleşmektedir.

2.7. PATOLOJİ

Sivrisineğin insandan kan emerken dermis ve epidermise inoküle ettiği sporozoitler konağın savunma mekanizmasından kurtulmak için kısa sürede dolaşım sistemi aracılığıyla karaciğere ulaşmaya çalışmaktadır (22). Bu esnada fagositer sisteme ait hücreler tarafından sporozoitlerin büyük kısmı elimine edilmektedir (23). Geriye kalan parazitler ise hepatositlere ulaşarak burada pre-eritrositik çoğalma dönemini başlatmaktadır. Karaciğerde parazitlerin sayısının hızla arttığı bu dönemde mikro

boyutta histopatolojik değişiklikler izlense de herhangi bir klinik semptom görülmemektedir (2).

Karaciğer dönemi sonrası kana ulaşan ve eritrosit içine giren parazitlerden, eritrositlerin parçalanarak yıkılmasıyla ortaya çıkan pigmentler fagositoza uğramakta ve bunlar retiküloendotelyal sistem hücrelerinde depo edilmektedir. Başta beyin olmak üzere tüm iç organlar konjesyon, ödem ve pigment birikimi nedeniyle koyu renkli olarak izlenirler. Parazitin hasar verdiği eritrositler kapiller damarlarda tıkanmalara neden olur. Buna bağlı olarak böbrekte glomerulonefrit, kalpte miyokard trombozu, akciğerde interstisyel pnömoni ve diğer iç organlarda da tromboz ve sonuç olarak da nekroz ve hemoraji tablosu izlenebilmektedir. Splenomegali ve hepatomegali de sıtmada görülen patolojik değişikliklerdendir (1-3).

2.8. EPİDEMİYOLOJİ

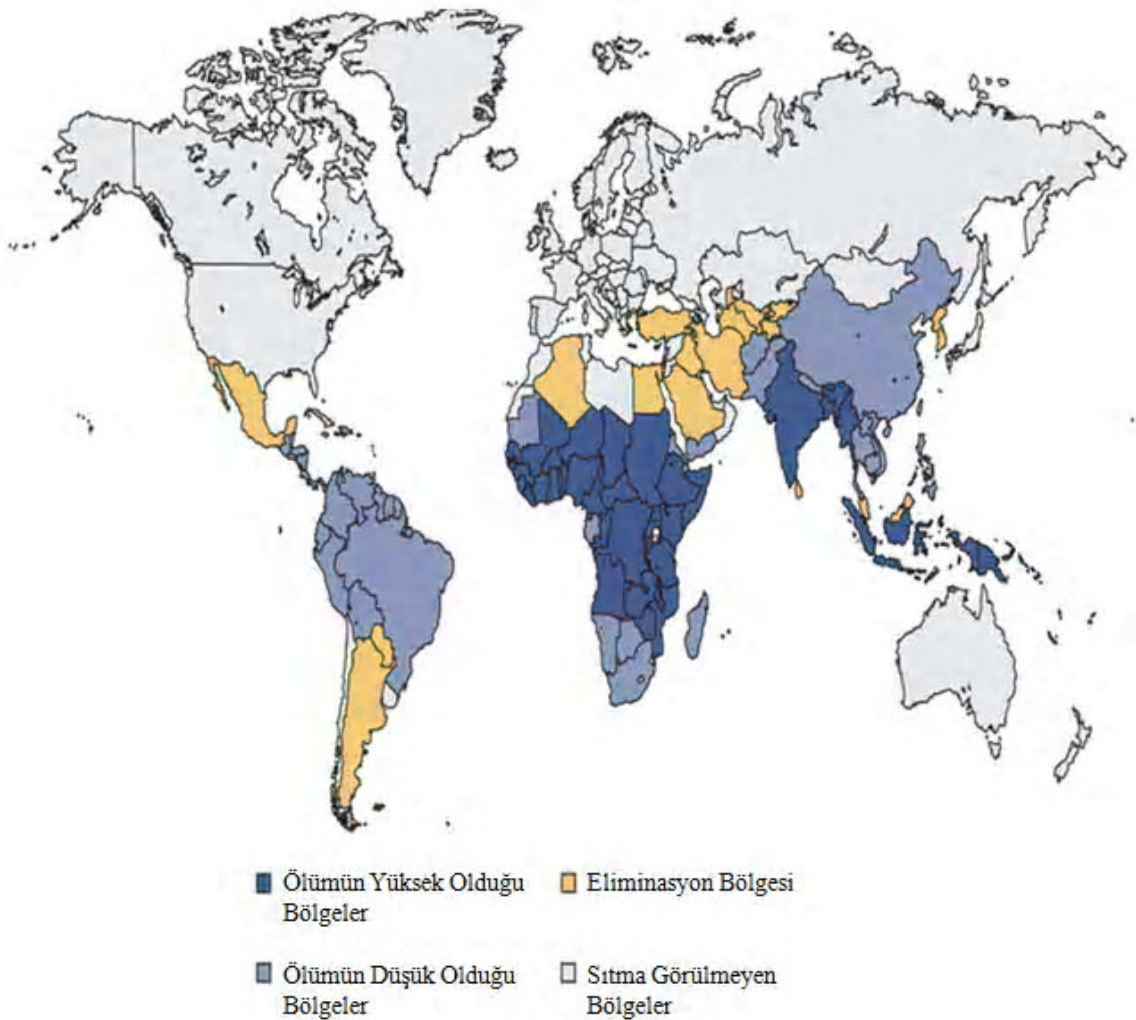
Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 2014'te yayınlanan Dünya Sıtma Raporu'na göre 2013 yılında 198 milyon sıtma vakası görülmüş ve bunun sonucunda 584 bin ölüm gerçekleşmiştir. Sıtmaya bağlı ölümlerin %90'ı Afrika'da gerçekleşmektedir ve bu ölümlerin %78'ini 5 yaşı altı çocuklar oluşturmaktadır. Hastalığa karşı yürütölen yoğun mücadele programları neticesinde 2000 ila 2013 yılları arasında sıtmaya bağlı ölüm tüm yaşı gruplarında %47 azalmıştır (27).

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, düşük gelirli ölkelerde gerçekleşen ölümlerin sebepleri arasında 6. sırada sıtma yer almaktadır. Bu ölkelerde meydana gelen her 100.000 ölüm vakasından 35 kişinin ölüm sebebinin sıtma olduğu belirlenmiştir. Düşük-alt gelir seviyesine sahip ölkelerde alt solunum yolları enfeksiyonları, HIV/AIDS ve diareten sonra dördüncü sıradaki en sık enfeksiyona bağlı ölüm sebebi sıtmadır (28).

Dünyanın birçok bölgesinde yaygın olarak görölmekle birlikte; Sahra-altı Afrika sıtmanın en fazla ölüme neden olduğu ve en sık göröldüğü bölge olmaya devam etmektedir. Sıtma bütün yaşı gruplarında görölebilir fakat en sık ölüme neden olduğu popölasyon da 5 yaşı altı çocuklardır. Sıtma, Sahra-altı Afrika'da beşı yaşı altındaki çocukların ölüm sebepleri arasında hâlâ %15 gibi ciddi bir oranda bulunmaktadır (27).

Plasmodium vivax sıtması ülkemiz de dahil olmak üzere dünyanın hemen her yerinde görülebilirken *P. falciparum*'un neden olduğu sıtma ise daha çok tropikal iklimin hakim olduğu bölgelerde görülmektedir.

Sıtmanın bir bölgede görülmesi için; bu bölgenin vektör olan sivrisineklerin yaşayabilmesi açısından uygun özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu nedenden dolayı sıtmaya ılıman ve tropikal bölgelerde daha çok rastlanmaktadır. Günümüzde birçok ülkede eradikasyon programları sayesinde sıtma görülmemektedir (Şekil 2.5.)



Şekil 2.5. Dünya Sıtma Haritası (29)

Globalleşen dünyada sınırların kalkması ve uluslararası seyahatin yaygınlaşmasıyla sıtmanın importe vakalar şeklinde dünyanın her yerinde görülebileceği de olasılık dâhilindedir. Gelişmiş ülkelerde de yerli sıtma vakaları görülmemekteyse de son 30 yıldır artan sayılarda importe vakalar şeklinde sıtmaya rastlanmaktadır (30-33).

Ülkemizde Çukurova ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri, sıtmanın ortaya çıkması en muhtemel bölgeler olarak değerlendirilmektedir. Ülkemizde uzun yıllar süren sıtma mücadelesi neticesinde sıtma vakalarının sayısı azalmış olsa da, hâlen epidemiler şeklinde yeni yerli olgular görülebilmektedir (34). Sıtma hâlen ülkemizde bildirimi zorunlu hastalıklar kapsamında yer almaktadır. Ayrıca, Türkiye'nin farklı bölgelerinde son yıllarda yapılan çalışmalarda importe sıtma vakalarının arttığına dair birçok epidemiyolojik veri ortaya konmuştur (7-16).

2.9. KLİNİK

Sıtmada türe göre bazı farklılıklar olabilmekle birlikte genel olarak benzer klinik tablo ortaya çıkmaktadır. Hastalığın başlangıcında nonspesifik; grip benzeri bir tablo görülür. Klinik tablo oturmaya başladığında ise sıtma nöbeti denilen üşüme, titreme, ateş yükselmesi ve en sonunda terlemeden oluşan tipik semptomlar ortaya çıkar. Bu tablo genellikle 6-10 saat civarında sürer. Ateş 40°C ve üzerine kadar çıkabilir. Sıtmada genellikle, yukarıda anılan bulguların yanı sıra bulantı-kusma, kırınglık, baş ağrısı ve miyalji gibi semptomlar da sıklıkla gözlenmektedir (1-3, 24).

Sıtma nöbetleri *P.vivax* ve *P.ovale*'de 48 ve *P.falciparum*'da her 48 saatte bir görülür ve bu yüzden "Tersiyana Sıtması" olarak adlandırılırlar. *P.malariae*'da ise 72 saatte bir görülmektedir ve "Kuartana Sıtması" olarak adlandırılmaktadır (2, 24).

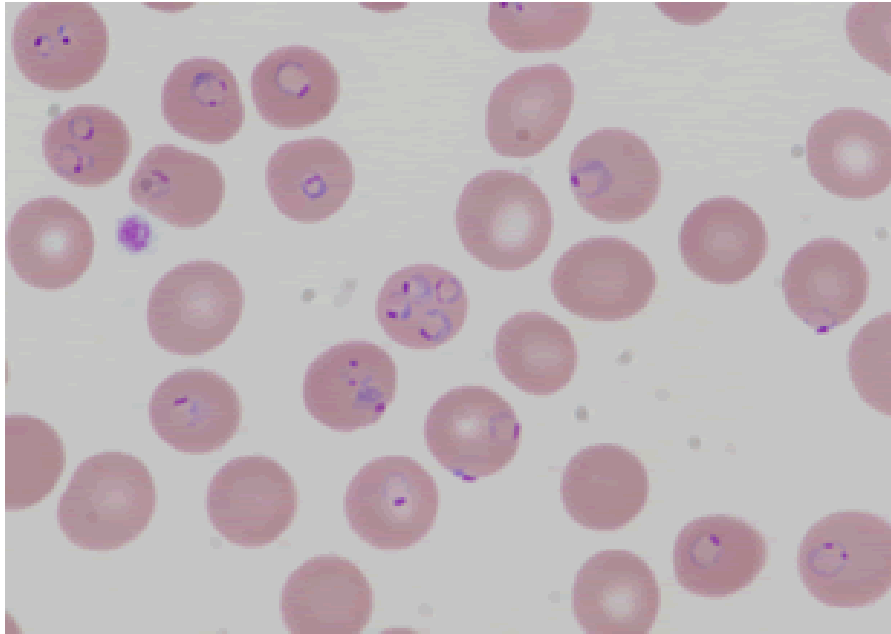
Hastaların fizik muayenesinde yüksek ateş, güçsüzlük, aşırı terleme, hafif sarılık, hepatomegali, splenomegali bulguları saptanabilmektedir (24).

Daha ciddi kliniğin izlendiği hastalarda, ağır hemolize bağlı olarak anemi ve hemoglobinüri, pıhtılaşma bozuklukları, hipotansiyon, akut böbrek yetmezliği, akut respiratuar distress sendromu, metabolik asidoz ve hipoglisemi gibi bulgular izlenebilmektedir. Splenomegali, dört *Plasmodium* türüyle oluşan sıtmada da görülebilmektedir. Böbreklerde glomerül hasarı, karaciğerde sinüzoidlerin hasarı, gastrointestinal sistem, kalp, akciğerler ve beyinde ise peteşiyal kanamalar şeklinde

kllinik tablo ortaya çıkabilmektedir. *P.falciparum*'un neden olduğu sıtmada serebral malarya görülebilir. Serebral sıtmada duygudurum bozuklukları, şuurda bulanıklık, nöbetler ve koma gibi önemli nörolojik bulgular görülmektedir (2).

2.10. TANI

Önemli klinik semptomlardan ölüme kadar uzanan bir klinik tabloya neden olan sıtma tanısında kullanılan en iyi, en ucuz ve en hızlı yöntem direk mikroskopidir. Mikroskopide eritrositler içerisindeki parazitlerin görülmesiyle tanı konur. Tanıda en yaygın olarak kullanılan yöntemler kalın damla ve ince yayma preparatların hazırlanmasıdır. Preparatlar hazırlanırken Wright, Giemsa veya Wright-Giemsa boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Giemsa parazite ait bazı morfolojik yapıların görülmesinde diğer boyama yöntemlerinden daha üstündür. Hazırlanan bu preparatlarda *Plasmodium*'ların trofozoit (Şekil 2.6.), şizont ve gametosit şekilleri görülerek tanı konulabilir (1-3).



Şekil 2.6. Eritrositler İçerisinde Trofozoitler (35)

Şu anda DSÖ ve diğer kuruluşların işbirliği ile geliştirme aşamasında olan birçok hızlı diagnostik test (RDT) endemik bölgelerde yoğun olarak kullanılmaktadır (36-38). RDT'ler parazite ait Histidinden Zengin Protein-2 (HRP-2), *Plasmodium* spesifik aldolaz ve *Plasmodium*'la ilişkili laktat dehidrogenazı (pLDH) tespit etmek üzere tasarlanmış testlerdir (39-41).

Kantitatif Buffy Coat (QBC) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gibi diğer tanı yöntemleri de mevcut olmakla beraber bu yöntemler için yeterli laboratuvar olanakları olmalıdır ve endemik bölgelerde rutin kullanım için bir seçenek değildirler (42, 43).

Sıtma tanısında kullanılabilecek bir diğer yöntem kanda parazite karşı oluşan antikorların tespitine dayanan Indirekt Florasan Antikor (IFAT) testidir. Diğer parazitlerle çapraz reaksiyon verebilmesi olumsuz bir özelliğidir. Rutin kullanımda başvurulanan yöntemlerden birisi değildir. Yine de serolojik sıtma tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir (43).

Mikroskopik olarak parazite ait yapıların tespit edilmesiyle tanı konulabilmesi mümkün iken, tür ayrımında bazen mikroskopi yetersiz kalabilmektedir. Bu durumda tür ayrımı için en iyi seçenek PCR gibi moleküler tanı yöntemleridir (43). *Plasmodium*'lar için tür ayrımının yapılması gereken durumlarda hasta kanından parazitin DNA'sı elde edilerek, PCR ve Nested PCR yapılmaktadır (44, 45). Günümüzde PCR ve Real time PCR (rtPCR) gibi moleküler bazlı tanı yöntemleri, laboratuvarlarda yaygın bir şekilde araştırma çalışmalarında ve rutin tanı amaçlı kullanılmaktadır (46-48).

2.11. TEDAVİ

Tanısı konusunda çok fazla zorluk yaşanmayan sıtma, henüz etkeni tanımlanmamışken tedavi edilmiş olan bir hastalıktır. Sıtma tedavisinde ilk olarak kullanılan ilaç olan kinin; yani kına kına ağacının özüdür (1-3)

Günümüzde tedavide kullanılan ilaçlar kinin türevleri, folat antagonistleri, artemisin türevleri ve diğer bazı antibiyotiklerdir. Sıtma tedavisinde kullanılan tüm ilaçlara karşı direnç gelişimi bildirilmiştir. DSÖ, sıtma tedavisinde direnç gelişimine engel olabilmek için kombinasyon tedavilerini önermektedir (27).

Güncel tedavi algoritmasında Komplike olmayan *P.falciparum* sıtmasında Atovakuon-Proguanil (250 mg Atovakuon ve 100 mg Proguanil) ardışık 3 gün boyunca 4 tablet şeklinde uygulanır. Ayrıca Artemether-Lumefantrin (20 mg Artemether ve 120 mg

Lumefantrin) 3 günde toplam 6 oral doz şeklinde uygulanır. Bunlar dışında Kinin sülfat, Doksisiklin, Tetrasiklin ve Klindamisin de tedavide kullanılmaktadır. Klorokine dirençli *P.falciparum* sıtmasında ise Meflokin kullanılmaktadır. *P.vivax* sıtmasında Klorokin ve Primakin (150 mg Klorokin ilk 2 gün 4 tablet, 3. Gün 2 tablet ve 15 mg Primakin ilk gün 2 tablet) kullanılabilir (49).

Proflakside; eğer endemik bölgeye kısa süreliğine gidilecekse Atovakuon-Proguanil tercih edilebilir. Çünkü seyahatten 1-2 gün önce başlanılabilir ve sadece 1 hafta süreyle kullanımı yeterli olmaktadır. Eğer uzun bir seyahat söz konusuysa haftada bir alınan Klorokin veya o bölgede direnç varsa Meflokin kullanılabilir (2, 49).

Antimalaryal ilaçların proflaksi amacıyla alınması sıtma bulgularının ortaya çıkmasını geciktirebilmektedir. Özellikle *P.vivax* ve *P.ovale*'nin etken olduğu durumlarda, seyahat bölgesinden ayrıldıktan aylar sonra bile sıtma, latent kalan parazitler tarafından ortaya çıkarılabilmektedir. Bu da teşhis sürecinde gecikmelere neden olarak hayati tehlikelere neden olabilmektedir. Hastaların klinik bulguları dikkatle değerlendirilmeli; bunun yanında endemik bölgelere seyahatle ilgili bir anamnez bilgisi de gözden kaçırılmamalıdır (24).

2.12. KORUNMA VE KONTROL

Sıtmadan korunmada vektör sivrisineklerle mücadele en etkin yöntemdir. Sivrisineklerden korunmak için koruyucu spreylere (repellant) mevcuttur Endemik bölgelerde cibinlik kullanmak da faydalı olabilir (50, 51).

Sivrisineklerin üremesi için uygun ortam oluşturan bataklıklar ve su birikintilerinin yok edilmesi önemlidir. Dişi *Anofel* yumurtlarını temiz su yüzeylerine bıraktığından doğal olarak bütün üreme alanlarının yok edilmesi mümkün değildir. Yüzme havuzu ve süs havuzlarının düzenli olarak bakımlarının yapılması ve altyapı olanaklarının geliştirilmesiyle, su birikintileri ve bataklık alanların oluşmasına müsaade edilmemelidir (1, 52).

Sivrisineklerle mücadelede en önemli bölüm larva mücadelesidir. Sivrisineklerin yaşayabilmesi için 15°C ve üzeri sıcaklık gerektiğinden 15°C'nin altına düşmediği durumlarda mutlaka mücadele yapılmalıdır. Sivrisineklerin üreme alanları tespit edilerek haritalandırılmalıdır. Bu harita üzerinden sivrisineklerin fiziksel olarak yok edilemediği bölgelere larvasit uygulanmalıdır. Larva mücadelesinde toksikolojik olarak

güvenliği kanıtlanmış ürünler kullanılmalıdır. Kullanılan ürünlerin farmakolojik Lc50 değeri yüksek olmalıdır. Larva mücadelesi gün boyu uygulanabilmesiyle ve sorunun kökenine yönelik olmasıyla uçkun mücadelesine göre daha etkilidir (1-3, 53) Sivrisineklerle mücadelede biyolojik larvasid yöntemler de kullanılmaktadır ve ekolojik dengeye zarar vermediği için tercih sebebidir (54).

Uçkun mücadelesi, sivrisinek yoğunluğunun arttığı dönemlerde uygulanabilir. Uçkun mücadelesinde doğru zaman akşam 19:00-22:00 ve sabah 05:00-07:00 saatleri arasındır. Ağırlıklı olarak iki yöntemden bahsedilebilir: Ultra Low Volume yönteminde elde edilen insektisit konsantrasyonu 25-30 mikron büyüklüğündeki partiküller halinde kısıtlı bölgeye uygulanır. Seyreltici olarak su kullanılır. DSÖ önerisine göre hektara 0.5 litre konsantrasyonda uygulanır. Thermal Fog yönteminde ise petrol ürünleri ve insektisit karışımından elde edilen konsantre çözelti, dumanlama yöntemi ile geniş alanlara uygulanır. DSÖ'ne göre hektara 5 litre konsantrasyonda uygulanması önerilmektedir (1-3).

Sivrisineği besin olarak kullanan doğal predatörlerden faydalanılabilir. Genetik mühendisliğiyle vektör özelliği azaltılmış veya kısırlaştırılmış sivrisineklerin doğaya salınması korunma tedbiri olarak kullanılan yöntemlerdir (55).

Sıtmal bir hastanın tedavisinin tam olarak yapılması da hastalıktan korunmada önemli bir noktadır.

2.13. İMMÜNOLOJİ

Plasmodium'lara karşı bireyden bireye ve bölgeden bölgeye değişen bir immünite gözlenmektedir. Sıtmayla ilk kez karşılaşan insanlar istisnasız bu hastalığa yakalanmaktadır. Çocuklar hastalığa karşı daha savunmasız olduklarından özellikle beş yaş altında ölüm nedenleri arasında sıtma ilk sıralarda yer almaktadır. Bireyin geliştirdiği immünite nedeniyle ergen ve yetişkin yaş gruplarında ağır klinik ve ölüm daha az olsa da hiçbir zaman tam anlamıyla bir bağışıklık gelişmesi söz konusu değildir. Endemik bölgelerde bireyler birçok defa *Plasmodium*'lar tarafından enfekte edildiklerinden zamanla hastalığa karşı kısmi bir immünite geliştirmektedirler (2, 27, 56).

Duffy kan grubunu taşıyan siyahi bireyler *P.vivax*'a karşı dirençlidirler. Orak hücreli anemi hastalığı olan bireylerde ise *P.falciparum*'a karşı direnç görülmektedir.

Hastalığın endemik olduğu bölgelerde *Plasmodium* türlerine karşı doğal direnç görülebilmektedir. Sıtmaya yakalanan bireylerde IgM ve IgG tipinde antikorlar oluşmaktadır ve bu antikorlar serolojik tanı yöntemleriyle tespit edilebilmektedir (1-3).

Doğuştan veya sonradan kazanılan immün sistemin baskılandığı kişilerde, sağlıklı bireylere göre sıtmaya yakalanma ihtimali çok daha kolay hale gelmektedir. İmmüsupresif bireylerde sıtma kliniği de normalden daha ağır seyredebilmektedir. Sıtmanın en fazla ölüme neden olduğu grup; bağışıklık sisteminin tam olarak gelişmediği beş yaş altı çocuklar ve yine immün sistemin stabil olmadığı gebelerdir (27, 56).

Dişi anofelin dermise inoküle ettiği sporozoitlerin büyük çoğunluğu dendritik hücreler tarafından fagosit edilmektedir, fakat sporozoitlerden karaciğere ulaşabilen bir tanesi bile enfeksiyonun başlamasına neden olabilmektedir (22, 23).

Sıtma immünitesinde T ve B lenfositlerin her ikisi de rol oynamaktadır. Antikorların mevcut olmadığı durumlarda monosit, makrofaj, polimorfonükleer lökositler ve NK hücreleri sıtma parazitinin intraeritrositer dönem formunu yok etme kapasitesindedirler (2, 23).

Yetmişli yıllarda yapılan çalışmalarda gamma radyasyon uygulanan (irradiye-atenüe) sporozoitleri taşıyan sivrisineklere maruz bırakılan bireylerde sıtmaya karşı kısa süreli immünite sağlandığı tespit edilmiştir. Bu çalışmalar daha sonra bağışıklık mekanizmasının detaylı olarak anlaşılabilmesi için fare modelleri üzerinde daha detaylı çalışılmıştır (58-60).

CD8⁺ T lenfositler *Plasmodium*'lara karşı oluşturulan bağışıklık yanıtında önemli rol oynamaktadırlar. CD8⁺ T lenfositler bu görevlerini yerine getirirken CD4⁺ T lenfositler ve IL-2, IL-4, IL-7 ve IL-15 ile birlikte hareket etmektedirler. Aşı çalışmalarında etkin ve uzun süreli bir immün yanıt oluşması için T lenfositlerle birlikte B lenfositlerin de uyarılması önemlidir. CD4⁺ T lenfositler, B lenfositlerin etkin bir şekilde uyarılmasını sağlayarak *Plasmodium*'ların savunma sistemi tarafından eliminasyonunu sağlamakta ve böylece de CD8⁺ T lenfositlerin enfeksiyona karşı yanıtını artırmaktadırlar. Bununla beraber bu hücrelerin sitokin salgısıyla da sıtmaya karşı etkili oldukları bilinmektedir (61-63).

2.14. AŞI

İmmün sistem vücudu hastalıklardan ve enfeksiyonlardan korur. Kemik iliği ve timus primer lenfoid organlar olarak bilinirken dalak, tonsiller, lenf nodları ve lenfatik damarlar immün sistemin diğer bileşenlerini oluşturmaktadır. Bu organ ve organlarda bulunan hücreler, bakteri, virüs ve parazit gibi antijenik uyaranlar immün sistem tarafından meydana getirilen bir cevaba yol açarlar. İmmünite aktif ve pasif olmak üzere iki şekilde kazanılabilir. Aktif immünite aşılarda veya hastalığı geçirmekle kazanılmaktadır. Pasif immünite ise immünoglobulinler sayesinde kazanılır. Aktif immünizasyonda bağışıklık daha uzun süreli olarak sağlanır.

Aşı, mikropların toksinleri ve antijenik proteinleri gibi yapılarını, zayıflatılmış veya ölü formlarını içeren; hastalığa karşı immüniteyi güçlendiren biyolojik preparatlara verilen genel isimdir. Aşılar, bulaşıcı hastalıklara karşı insanları koruyan, bulaşıcı hastalıkların toplum içinde yayılmasını engelleyen ve epidemik hastalıkların eradikasyonunu amaçlayan en önemli halk sağlığı aracıdır.

Edward Jenner'in 1796'da cowpox püstüllerinden aldığı yara materyalini başarılı bir şekilde aşı olarak uygulamasından çok önce; MÖ 1000'li yıllarda Çin'de çiçek hastalığı mikrobi inoküle edilerek aşı çalışmalarında ilk adım atılmıştır. Bu uygulamanın Afrika ve Türkiye'de de yapıldığına dair veriler mevcuttur (64).

1885'te Louis Pastör'ün kuduz aşısını keşfetmesiyle aşı alanında yeni bir çıkış açılmıştır. Bu önemli gelişmeden sonra 1930'lu yıllarda difteri, tetanoz, şarbon, kolera ve veba gibi hastalıklara karşı toksoit ve aşı geliştirilmiştir. 20. yüzyılda aşı çalışmaları daha da hızlanmış ve virüslerin laboratuvar ortamında üretilebilmeleri sayesinde polio, kızamık ve kızamıkçık gibi birçok aşı kullanıma girmiştir (65).

Genom teknolojisinde meydana gelen ilerlemeler sayesinde 20. yy'ın ikinci yarısından günümüze kadar ilgi bu yöne kaymıştır. Aşı alanındaki çalışmalar, rekombinant DNA ve protein aşılarda geliştirmeye odaklanarak devam etmiştir. Günümüzde bazı kronik hastalıklar, kanser, bağımlılık ve alerji gibi durumlara karşı da aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir (66-68).

Aşı çalışmalarında, günümüze dek birçok farklı yaklaşımla aşılarda üretilmiş ve sınıflanmışsa da hâlihazırda aşılarda gruplanması şu şekildedir:

1. Canlı-atenüe aşılar
2. İnaktive aşılar
3. Subünit aşıları
4. Toksoid aşılar
5. Konjuge aşılar
6. DNA aşıları
7. Rekombinant vektör aşıları
8. Rekombinant protein aşıları

2.14.1. Canlı-atenüe Aşılar

1950’li yıllardan bu yana mevcut olan bu aşılar canlı mikrobun zayıflatılmış formunu içerirler. Dolayısıyla gerçek enfeksiyona en yakın durum bu aşılarla görülmektedir ki bundan dolayı mükemmel derecede immün yanıt oluşturma potansiyeline sahiptirler. Olumsuz bir özellik olarak canlı-atenüe aşı uygulanan bireylerde her zaman mikrobun aktive olarak gerçek enfeksiyona neden olma tehlikesi mevcuttur. Bu yüzden immünosupresif bireylere uygulama konusunda dikkatli olmak gerekmektedir. Yine nakil esnasında da soğuk zincire dikkat edilmesi gerekmektedir. Günümüzde lisans almış canlı-atenüe aşılar Varicella, BCG, OPV, MMR, Rotavirüs ve Sarı Humma aşılarıdır (69).

2.14.2. İnaktive Aşılar

Fiziksel ve kimyasal işlemlerle enfeksiyona neden olan mikrobun öldürülmesiyle üretilen aşılardır. Canlı-atenüe aşılarından farklı olarak inaktive aşıların hiçbir zaman enfeksiyon oluşturma potansiyelleri bulunmaz. Kuru buz formunda kolaylıkla taşınabildiklerinden soğuk zincir gerektirmezler. İstenilen düzeyde immün yanıt tek dozda oluşmadığından tekrarlayan dozlarda yapılmaları gereklidir. Boğmaca aşısı, Hepatit A aşısı ve IPV lisanslanmış inaktive aşılarıdır (70, 71).

2.14.3. Subünit Aşılar

Subünit aşılar mikrobun tamamı yerine sadece immün sistemi uyarma yeteneğine sahip antijenleri içerirler. Uygun immünizasyon için doğru antijenik yapıların seçilmesi uzun

zaman ve emek gerektirir. Sadece antijenik yapıları içerdiklerinden yan etki ortaya çıkma ihtimali daha düşüktür. Hepatit B ve HPV aşıları virüse ait antijenleri taşıyan bir subünit aşısıdır (70, 71).

2.14.4. Toksoid Aşılar

Bakteriler tarafından üretilen toksinlerin aşısı olarak uygulanmasıdır. Hastalardaki enfeksiyon tablosundan ağırlıklı olarak üretilen toksinler sorumludur. İmmün yanıtı artırmak amacıyla toksoid aşılar alüminyum veya kalsiyum tuzları ilave edilir. İstenilen immün cevap için tekrarlayan dozlar gerekebilir. Tetanoz ve difteri aşıları kullanımdaki toksoid aşılarıdır (70, 71).

2.14.5. Konjuge Aşılar

Polisakkarit kapsül antijeni taşıyan bakterilere karşı üretilen aşılarıdır. Bu yüzden konjuge aşılar, bir çeşit subünit aşısı olarak adlandırılabilirler. Polisakkarit kapsül yapısı bakterinin antijenik yapılarını gizleyebilme özelliğinde olduğundan immün sistemin henüz tam anlamıyla gelişmediği küçük çocuklarda bu bakterilere karşı yeterli bağışıklık yanıtı gözlenmemektedir. Konjuge aşılar sayesinde çocuklarda da kapsüllü bakterilere karşı immün yanıt oluşmaktadır. HIB, Meningokok ve Pnömonokok aşıları lisanslanmış konjuge aşılarıdır (70, 71).

2.14.6. DNA Aşıları

Mikroorganizmaların genetik yapılarının keşfedilmeye başlamasından sonra DNA aşılarıyla ilgili çalışmalar da hız kazanmıştır. DNA aşılarında mikroorganizmanın genetik materyalinin tamamı veya bir kısmı kullanılmaktadır. Özellikle, mikroorganizmanın virülansında önemli antijenik yapıları kodlayan gen bölgeleri seçilmektedir. DNA aşılarının enfeksiyona neden olma potansiyelleri yoktur. Günümüzde İnfluenza ve Herpes için DNA aşısı çalışmaları devam etmektedir (72).

2.14.7. Rekombinant Vektör Aşıları

Mikrobiyal DNA'yı taşıyan zayıflatılmış virüs veya bakterilerden oluşturulan aşılarıdır. Taşıyıcı virüs enfeksiyona neden olan mikrobun DNA'sını hücrelere ulaştırarak bir enfeksiyon simülasyonuna neden olmakta, bu da immün yanıtın uyarılmasını sağlamaktadır. Aynı şekilde taşıyıcı bakteriler de yüzeylerinde yerleştirilen genetik

materyali taşıyarak bağışıklık yanıtını uyarmaktadır. HIV, kuduz ve kızamık üzerinde aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir (73).

2.14.8. Rekombinant Protein Aşıları

Rekombinant protein aşıları da DNA aşıları ve rekombinant vektör aşıları gibi genom teknolojisindeki gelişmelerin bir neticesi olarak enfeksiyon etkenlerinin üretilen proteinlerinin aşı olarak kullanılmasını amaçlamaktadır (73).

Rekombinant protein üretimi için bakteri, veya mantarlar kullanılmakta, bunun yanında patojen organizmadan yüksek miktarlarda rekombinant protein elde edilebilmektedir. Bunun yanı sıra yaklaşık 30 yıl önce keşfedilen “Baculovirus-insect cell” ekspresyon sistemi rekombinant proteinlerin üretimi için optimize edilmiş bir diğer sistemdir (74).

Rekombinant protein aşıları, antijenlerin yüzeyindeki epitop olarak bilinen lokalize bölgeleri hedefleyen humoral immün cevabı artırmayı amaçlamaktadır. Rekombinant protein üretildikten sonra immün yanıtı artırmak amacıyla bir adjuvanla kombine edilerek uygulanmaktadır (73).

Patojen organizmaya karşı hedeflenen immün yanıtın oluşması için antijenik proteinlerden bir veya birkaç tanesi rekombinant olarak üretilmektedir. Bu aşıların enfeksiyon oluşturma kabiliyetlerinin olmaması da bir avantajdır. Günümüzde sıtma, AIDS ve mevsimsel grip gibi hastalıklara karşı yürütülen rekombinant protein aşı çalışmaları devam etmektedir (75-77).

Virüs ve bakterilere göre parazitlerin daha kompleks olan yapıları aşı geliştirilmesinin önünde önemli bir handikaptır. Parazitlere karşı aşı çalışmalarında kayda değer gelişmeler sağlanabilmesi için parazitlerin kompleks yapıları ve konakla olan ilişkilerinin detaylı olarak aydınlatılması gereklidir. Yaklaşık yarım asırdır eden yoğun çalışmalara rağmen günümüzde sadece bir aşı adayı dışında parazitlere karşı etkili herhangi bir aşı mevcut değildir (78).

2.15. SİTMA AŞISI

2.15.1. Sıtma Aşısının Gerekliliği

Milyonlarla ifade edilen sıtma vakaları ve yüzbinlerle ifade edilen sıtma kaynaklı ölümler günümüzde de maalesef devam etmektedir. Mevcut ilaçların az olmasının yanı

sıra, var olan ilaçların da direnç gelişimi ve ilaç yan etkileri nedeniyle kullanımının kısıtlanması ve hastalığın ekonomik seviyesi düşük bölgelerde görülmesi nedeniyle ilaç temin edilememesinden dolayı böyle önemli bir hastalık için neden halen etkili bir aşı olmadığı sorusunu akla getirmektedir. 1975’de yayınlanan; attenüe sporozoitlerin aşı olarak denenmesiyle başlayan çalışmalar (17), şimdilerde DNA aşıları ve protein aşılarının geliştirilmeye çalışılmasıyla devam etmektedir (78).

Dünya Sağlık Örgütü, 2015 yılı itibariyle ciddi sıtmadan kaynaklanan morbidite-mortaliteyi %50 azaltacak ve en azından bir yıl koruyuculuk özelliği bulunan ilk nesil sıtma aşısının üretilip, lisans alabileceğini öngörmektedir. 2020 yılı itibariyle ise %75 veya daha fazla etkili bir aşı geliştirilmesi ümit edilmektedir (79). Günümüze kadar elde edilen bilgilere dayanarak, sıtmanın veya onun vektörü olan sivrisineklerin, bilinen koruyucu tedbirler ve/veya mücadele yöntemleriyle elimine edilmesinin mümkün olmadığını söyleyebiliriz.

Toplum sağlığının korunması adına tıbbın en önemli görevi “Koruyucu Hekimlik”tir. Günümüze kadar üretilen aşılar da koruyucu hekimliğin en önemli öğelerindendir. Çünkü aşı, birey daha hastalıkla karşılaşmadan onu hastalıktan ve komplikasyonlarından korumaktadır. Sıtmanın en fazla morbidite-mortaliteye neden olduğu grup 5 yaş altı çocuklar ve gebelerdir ki; koruyucu hekimlik kapsamında en fazla bakıma ihtiyacı olan şüphesiz yine aynı gruptur (27). Sıtmanın endemik olarak görüldüğü ve en fazla ölüme neden olduğu bölge olan Afrika kıtası aynı zamanda dünyanın en fakir ülkelerine de ev sahipliği yapmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü’nün bu konudaki vizyonu: “*P.falciparum* ve *P.vivax*’ın transmisyonunu ve morbidite-mortalitesini ortadan kaldıracak güvenli ve etkili aşılar geliştirilmesidir.” Şimdiye kadar aşılarla eradike edilen birçok hastalık arasında sıtma da şüphesiz bir gün yerini alacaktır (79).

2.15.2. Sıtma Aşısının Yapılabilirliği

Sıtma aşısının yapılabilirliği konusunda ümitler gittikçe artmaktadır. Yapılan gözlem ve deneyler yakın ve orta bir gelecekte etkin bir sıtma aşısının yapılabileceğini göstermektedir. Bu kanaatin oluşmasına en önemli faktör, sıtmanın endemik olduğu bölgelerde hastalığı geçirenlerde koruyuculuğun oluşmasıdır. Bu gözlem, etkin bir stma aşısının yapılabilirliğine en önemli katkıyı sağlamaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü, sıtma aşıları (gökkuşağı) tablosunun güncellenmiş haline göre şu anda 27 adet sıtma aşısı adayı çalışılmaktadır. Bunlardan 7 tanesi Faz Ia, 10 tanesi Faz IIa, 6 tanesi Faz Ib, 3 tanesi Faz IIb ve 1 tanesi de Faz III (RTS,S-ASO1/A) aşamasındadır (80).

Hayvan deneyleri ve insanlar üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları, bu aşısı adaylarının sıtmaya karşı ılımlı derecede koruma sağladığını göstermiştir. Fakat sıtma aşısında bahsedilen hedeflere ulaşmak için daha çok yol alınması gerekmektedir.

Sıtmaya karşı immün sistemin yetersiz kalmasında en önemli etkenler, parazitin kompleks yapısı ve bu yapının konakla olan karmaşık ilişkisidir. Endemik bölgelerde sıtmaya karşı gelişen immünitede çok geniş bir cevap skalası görülmektedir. Genetik olarak değişik derecelerde sıtmaya karşı direnç görülebilmektedir. Hemoglobinopatilerde ve diğer bazı eritrosit defektlerinde de doğal bağışıklık durumu söz konusu olabilmektedir. *Plasmodium*'larla daha önce karşılaşmış bazı bireylerde de bağışıklık oluştuğu bildirilmiştir (81).

Günümüzde *Plasmodium* antijenik yapılarının daha detaylı öğrenilmiş olması ve daha güçlü-etkili adjuvanların keşfedilmesi de gelecekte yapılacak olan aşısı çalışmaları için umut verici gelişmelerdir.

2.15.3. *Plasmodium* Antijenleri

Sıtmaya karşı etkili bir aşısı geliştirebilmek için her şeyden önce parazitin hayat döngüsü ve hayat döngüsündeki farklı antijenik yapıların özellikleri ayrıntılı bilinmelidir. *Plasmodium*'ların pre-eritrositer dönem, eritrositer dönem ve seksüel dönem antijenleri şeklinde birçok farklı protein yapıları mevcuttur. Bunlardan üzerinde en çok çalışılanlara örnek olarak pre-eritrositer döneme ait antijenler Circumsporozoite protein (CSP), Sporozoite surface protein 2 (SSP2), Liver stage-specific antigen 1 (LSA-1), eritrositer döneme ait olan antijenler Merozoite surface protein 1 ve 2 (MSA-1 ve 2), Erythrocyte binding antigen 175 (EBA-175), Serine repeat antigen (SERA), Apical merozoite antigen (AMA-1), Histidine rich protein 2 (HRP-2) ve seksüel dönem antijeni olarak *P.falciparum* surface antigen 25 (Pfs25) mevcuttur. Bunlar dışında daha birçok antijenik yapıda protein moleküller bulunmaktadır. Bu moleküller parazit-konak ilişkisinde önemli roller oynamaktadır (82, 83).

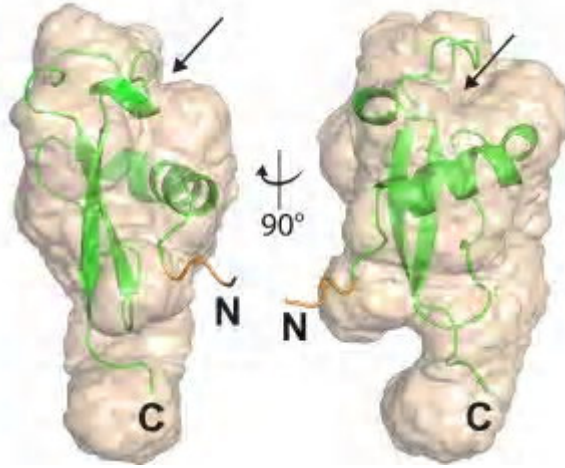
2.15.4. Circumsporozoite Protein (CSP)

Bu moleküller içerisinde ilk tanımlananı olan CSP, parazit-konak etkileşiminde ilk basamakta etkin olduğundan ve aşı çalışmalarında yoğun olarak kullanıldığından dolayı detaylı olarak incelenmiştir. CSP, DSÖ’nden lisans almaya en yakın aşı adayı olan RTS,S yapısında da bulunmaktadır. Pre-eritrositer dönem proteini olan CSP, sporozoitin esas manto proteinidir. İrradie-atenüe sporozoitlerle yapılan aşı çalışmalarında başarı gözlenmesi üzerine pre-eritrositer dönem aşı çalışmaları ve bu evrenin en önemli antijeni olan CSP ilgi odağı olmuştur (84-86).

Circumsporozoite protein, çözünebilir bir proteindir ve rekombinant formu *E.coli* içerisinde üretilmektedir. *P.falciparum* CSP’i 397 amino asitten oluşmaktadır. CSP heparine bağlanma özelliğine sahip bir proteindir (87).

Circumsporozoite protein, ilk olarak enfekte sivrisineklerin orta bağırsak duvarlarında bulunan ookistler içerisindeki sporozoitlerde tespit edilmiştir. CSP’in, sporozoit gelişiminde rol oynadığı ve parazitin deriyle temasından karaciğere uzanan yolculuğunda farklı görevlerinin olduğu tespit edilmiştir. Sporozoitlerin sivrisinekte tükrük bezine migrasyonunda da bu proteinin önemli rol oynadığı bilinmektedir (88, 89).

Circumsporozoite protein, üç bölümden (**Şekil 2.7.**) oluşur. Bunlar: heparin sülfat proteoglikanları bağlayan bir N terminali (1.bölge), dört aminoasitlik bir tekrar bölgesi olan “N-asetil Nöraminik Asit Fosfataz (NANP)” ve memelilerdeki trombospondin proteini benzeri tip-1 tekrar bölgesi içeren bir C terminalidir (2.bölge). Merkezi tekrar bölgesi, konak antikorlarının hedefidir (87).



Şekil 2.7. Circumsporozoite Protein 3 boyutlu İllüstrasyonu (90)

Proteinin C terminalinde hücreye bağlanmayı sağlayan bir yapışkan bölge ve N terminalinde de bunu maskeleyen bir bölgenin olduğu tespit edilmiştir. Bu yapışkan bölgenin sporozoit gelişiminde ve hepatosit invazyonunda görevleri olduğu bilinmektedir. CSP'nin proteolitik yarığı, yapışkan formasyonun oluşumunda rol oynamaktadır. Eğer, yapışkan bölgede gerçekleşen yapısal bir bozukluk sonucu CSP'nin yapısı değişirse, sporozoitlerin büyük çoğunluğunun hedef organlara ulaşamadıkları; direk olarak inokülasyon bölgesinde, kan evresine benzer bir enfeksiyon meydana getirdikleri gözlenmiştir (87-89).

Kemirgenler, primatlar ve insanları enfekte eden *Plasmodium* türleri arasında CSP yapısının yüksek oranda korunduğu gözlenmiştir.

Gen içerisinde tekrar eden dizilerin (NANP) merkezi bölgesidir. Kültür ortamında antikorları bloke eden sporozoitlerin üretimine neden olarak, kuvvetli B hücre cevabı ortaya çıkarır. Farelerde $CD4^+$ T ve $CD8^+$ T hücre cevabı oluşturma yeteneğinde bir moleküldür. CSP'nin parazitin yaşamındaki hayati fonksiyonlarına rağmen hâlihazırda hakkında bilinenlerin çok fazla olduğu söylenilemez (2, 87-89).

2.15.5. Sıtma Aşıları

Günümüze kadar çok sayıda deneysel sıtma aşısı yapılmış ve halen de yapılmaya devam etmektedir. Bu aşıları üç ana başlık altında toplamak mümkündür (91):

1. Pre-eritrositer dönem aşıları,
2. Eritrositer (aseksüel) dönem aşıları,
3. Bulaşmayı önleyici aşılar.

2.15.5.1. Pre-eritrositer Dönem Aşıları

Pre-eritrositer dönem aşıları; dişi anofel tarafından enjekte edilen sporozoit antijenlerine karşı bağışıklığı indükleyerek, hepatositlerin invazyonunu veya hepatositlerde parazitin çoğalmasını engellemeyi hedeflemektedirler. Etkili bir pre-eritrositer dönem aşısı hastalığın klinik manifestasyonlarını ve aynı zamanda hastalığın bulaşmasını da engelleyebilmelidir. Bu aşının etkinliği kısmi olsa bile vücuda giren sporozoit yükünü ve karaciğeri istila eden parazit yoğunluğunu azaltarak hastalığın sıklığını ve kliniğin daha hafif geçirilmesini sağlayabilmelidir (2, 91).

Günümüze kadar sayıları çok fazla olmasa da pre-eritrositer aşı adayları dizayn edilmiştir ve bunların etkinlikleri halen test edilmektedir. En çok bilinenleri ise CS-NANP, CS102, RTS,S ve ME-TRAP'tır (2, 91).

1980'lerde CS-NANP bazlı pre-eritrositer dönem aşıları ilk olarak test edilmişlerdir. *P.falciparum*'un sporozoitlerinin manto proteini olan CSP'de birden fazla tekrar gösteren ve bir B lenfosit epitopu olan dört amino asitli NANP'ın 3 farklı kombinasyonu ilk aşı çalışmalarında kullanılmıştır. Bu aşılarıdaki NANP tekrarlarının sayısı 3 ila 19 arasında değişmektedir ve üç farklı taşıyıcı protein kullanılmıştır (91, 92).

CS102 aşısı da CSP bazlı bir aşıdır, fakat NANP epitopu içermemektedir. Bunun yerine molekülün sonundaki C terminalinden T epitopları taşıyan 102 amino asitlik bir sentetik peptid içermektedir. Aşı adayı ilk olarak Afrika'da değerlendirildikten sonra Avrupa'da Faz I/II deneylerinin yapılması planlanmaktadır (92).

Rekombinant RTS,S aşısı da NANP epitopu içerir. 19 NANP tekrarına ilaveten Hepatit B yüzey antijenine bağlanmış olan CSP'nin C terminalini de içerir. AS01E adjuvanıyla da birleştirilerek nihai yapısı oluşmaktadır. RTS,S günümüzde Faz III çalışmalarına ulaşabilmiş tek sıtma aşısı olma özelliği taşımaktadır ve onaylanma aşamasına gelmiştir (2, 93). 2012'de yayınlanan bir çalışmanın sonuçlarına göre Afrika'nın değişik bölgelerinde 6 ila 12 haftalık 6537 infant aşılanmış ve aşı sıtmaya karşı %30 civarında bir koruma sağlamıştır (94). Yine Afrika'nın 11 farklı bölgesinde gerçekleştirilen ve

4453 katılımcının olduğu bir diğer araştırmada düşük transmisyonun olduğu bölgelerde %60 koruma, orta derecede transmisyonun olduğu bölgelerde %41 koruma ve yüksek transmisyonun olduğu bölgelerde ise %4 koruma gözlenmiştir (95). 2013'te yayınlanan başka bir araştırmanın sonuçlarında RTS,S'in 4 yıllık periyottaki koruma oranı olarak %16.8 verilmiştir (96). Mevcut sonuçlar ışığında RTS,S'in sınırlı da olsa sıtmaya karşı koruma sağladığını söyleyebiliriz; fakat yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre RTS,S henüz istenilen yerde değildir.

ME-TRAP aşısı ise diğer pre-eritrositer aşılarından tamamen farklı yapıdadır. ME-TRAP bir DNA aşısıdır. ME (multipl epitop) ve TRAP (trombospondin ilişkili protein) olarak bilinen bir *Plasmodium* DNA dizisi içermektedir. ME zinciri 14 tane CD8⁺ T hücrelerini ve bir tanesi de CD4⁺ T hücrelerini uyaran 15 adet T hücre epitopu ve bunlara ilaveten *P.falciparum*'un 6 pre-eritrositer antijeninden B hücre epitopları içermektedir. Aynı zamanda TRAP dizisine bağlı olarak 2 tane CD4⁺ T hücre epitopu içerir. Gambiya'da 15-45 yaş arasında 372 erkek katılımcı ile yapılan bir çalışmanın sonucuna göre bu aşı güvenlidir ve T hücrelerini indükleyebilir yetenektedir. Fakat sıtmanın görülme sıklığını azaltmakta yetersiz kalmaktadır. Buna rağmen, aşının Faz I çalışmaları ümit vericidir (91, 92, 97).

Bunlara ilaveten ışınlanmış sporozoitlerin aşı amacıyla kullanımı da pre-eritrositer dönem aşıları içerisinde incelenebilir. Işınlanmış sporozoitlerle yapılan çalışmalar; kemirgenlerde, maymunlarda ve insanlarda kısmen korunma sağlandığını göstermiştir. Aşının uygulandığı insanların %90'ında koruma sağlanabilmesi için binden fazla ışınlanmış enfekte sivrisinek ısırığı gereklidir. Bu aşı adayıyla ilk yapılan çalışmalardaki umut vaat eden sonuçlar nedeniyle günümüzde tekrar ilgi odağı olmaya başlanmıştır (86, 98). Işınlanmış sporozoitlerle ilgili en büyük handikap, ticari olarak nasıl seri üretim yapılacağı konusudur.

2.15.5.2. Eritrositer (Aseksüel) Dönem Aşıları

Eritrositer dönem aşıları, aseksüel dönem aşıları veya kan dönemi aşıları olarak bilinmektedir. Bu gruptaki aşılar, parazitin eritrositleri enfekte ederek; eritrositler içerisinde çoğaldığı, yani klinik manifestasyonların izlendiği döneme etkili olması düşünülen aşılardır. Hastalığın bulaşması ile ilgili olmayıp sadece sıtma kliniğinin asemptomatik veya en azından daha hafif bulgularla geçirilmesini amaçlayan aşılardır (91).

Üzerinde çalışılan ilk eritrositer dönem aşısı “Kombinasyon B” olarak da bilinen MSP/RESA’dır. Bu aşı merozoit yüzey antijenleri (MSP1 ve MSP2) ile birlikte enfekte eritrosit membranının iç yüzeyinde bulunan ring-enfekte eritrosit yüzey proteini (RESA) olmak üzere üç eritrositer dönem antijeninin birleşmesi ile ortaya çıkan bir kombinasyondur. MSP/RESA üzerinde yapılan ilk çalışmaların sonuçları umut vericidir (99).

Yoğun olarak çalışılmış bir diğer eritrositer dönem aşısı SPf66’dır. SPf66, CSP’deki tekrarlayan dizilerle ilişkili; *P.falciparum*’un eritrositer dönemdeki üç antijeninden elde edilen amino asit dizileri içeren bir sentetik hibrid peptid polimeridir. Yani aslında bu aşı, teknik olarak birden fazla evre antijenlerinin birleşimiyle oluşturulmuş kombine bir aşıdır. Endemik bölgelerde denenmiş ilk aşılardandır. Aşının Afrika ve Asya’da etkili olmadığı, fakat Güney Amerika’da sıtma ataklarının sayısında önemli derecede azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir (100). Güney Amerika’da daha önceki umut vaat eden çalışmalar dolayısıyla önümüzdeki yıllarda bileşimi üzerinde değişiklikler yapılarak tekrar çalışılacağı öngörülebilir.

Bunlar dışında bir çok potansiyel eritrositer dönem aşısı günümüzde çalışılmaktadır.

2.15.5.3. Bulaşmayı Önleyici Aşılar

Bulaşmayı önleyici aşıların amacı düşük endemik bölgelerde bulaşmayı önlemek ve orta-yüksek endemik bölgelerde ise hastalığın yoğunluğunu azaltmaktır. Aseksüel dönem aşılarından farklı olarak bulaşmayı önleyici aşılar, sivrisineklerin enfekte olmasını önleyerek hastalığın eliminasyonunu amaçlamaktadır (91).

Plasmodium’ların bu evredeki antijenlerinden en çok bilinen ve deneysel olarak üretilenleri (*P.falciparum* yüzey antijeni=Pfs, *P.vivax* yüzey antijeni=Pvs) Pfs25/Pvs25, Pfs28/Pvs28, Pfs48/45 ve Pfs230’dır. Bu antijenler içerisinde aşı yapımında kullanılanlardan birisi Pfs25’tir. 2012 yılının sonlarında DSÖ tarafından güncellenen aşı şemasına göre Faz Ia aşamasında çalışmaları devam eden aşı, Pfs25-EPA/Alhydrogel’dır (16). Pfs25, *P.falciparum*’un sivrisinekteki ookinet formunun yüzey antijenidir. Aşı, rekombinant olarak üretilen Pfs25’in *Pseudomonas aeruginosa* ExoProtein A (EPA) ile konjuge edilip, daha sonra Alhydrogel adjuvanıyla birleştirilmesi sonucu oluşturulmaktadır. Faz evrelerine ait çalışmalar halen devam etmektedir (101).

2.15.5.4. Kombine Aşılar

Bunların dışında *Plasmodium*'ların farklı hayat dönemlerinden antijenlerin bir araya getirilmesiyle oluşturulan kombine aşılar da mevcuttur. Farklı dönemlerden antijenlerin bir araya gelmesiyle oluşturulacak bir aşı toplamsal veya sinerjistik bir etki oluşturma potansiyeline sahiptir. Ayrıca bu potansiyelin, dirençli parazitlerin gelişmesini önleyebileceği düşünülmektedir (2).

2.16. ADJUVANLAR

Adjuvanlar, vücudun bağışıklık cevabını artırmak için aşılarla ilave edilen maddelerdir. İyi bir adjuvan tarafından uyarılan B ve T lenfosit cevapları kalıcı bir immünite için mutlak gereklidir.

Adjuvanlar çok uzun süredir aşı yapımında kullanılmaktadır. Paris'te Pastör Enstitüsü'nde çalışan veteriner hekim Gaston Ramon tarafından 1920'de adjuvan özelliği olan maddelerin keşfedilmesi bu konuda önemli bir kilometre taşı olmuştur. Ramon, aşılarla bilinenlerin dışında bazı yeni maddeler eklendiğinde bunun immün yanıtı güçlü bir biçimde artırdığını gözlemlemiştir. Bunun ardından, birkaç yıl sonra Glenni yaptığı çalışmalarda alüminyum tuzlarının adjuvan olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ramon, daha sonra yaptığı çalışmalarda ise alüminyum tuzlarının insanlarda adjuvan olarak güvenli bir şekilde kullanılabileceğini, fakat her zaman istenen düzeyde immün yanıt oluşturmadağını keşfetmiştir (65).

İyi bilinen adjuvanlardan alüminyum fosfat, alüminyum hidroksit ve alüminyum potasyum sülfat gibi alüminyum tuzları 1920'li yıllardan başlayarak günümüze kadar difteri ve tetanos aşıları gibi birçok aşının yapısında yer almışlardır.

Kızamık, kızamıkçık, rubella ve rotavirüs gibi canlı virüs aşılarında adjuvan kullanılmamaktadır. Bunun yanında polio aşısı da inaktive bir aşı olmasına rağmen yapısında adjuvan bulunmamaktadır. Hepatit A, Hepatit B, Hib ve HPV aşılarında alüminyum tuzları herhangi bir yan etki veya toksisite göstermeksizin uzun yıllardır kullanılmaktadır (71).

Sıtma aşısında kullanılmak üzere onay almış adjuvanlar alüminyum tuzları, MF59, Monofosforil lipid A, virus benzeri partiküller, yapılandırılmış İnfluenza virozomları ve Kolera toksindir (102).

Plasmodium'lar kompleks bir hayat döngüsüne sahiptirler ve bu döngünün değişik evrelerinde sentezlenen birçok farklı antijen bulunmaktadır. Günümüze kadar yapılan aşı çalışmalarında bu kompleks yapıdan dolayı *Plasmodium*'lara karşı deneysel modellerde veya insanlarda istenilen immün yanıt ortaya çıkarılamamıştır.

2.16.1. MF59®

Skualen insan, bitki ve hayvanlarda doğal olarak bulunan bir maddedir. Bu madde insanlarda karaciğer tarafından sentezlenmekte ve kan dolaşımında bulunmaktadır. Özellikle köpek balığı yağı olmak üzere, ticari olarak satılan balık yağı preparatlarının çoğu skualen içermektedir. 1990'lı yıllarda ticari aşı çalışmaları yapan Ciba-Geigy ve Chiron firmalarındaki araştırmacılar güvenli ve etkin bir adjuvan geliştirmeyi amaçlamış ve bu çalışmalar esnasında MF59 (skualen) keşfedilmiştir. 1997'de lisans almış olan Novartis firması tarafından üretilen Fluad® adlı mevsimsel grip aşısının her dozunda 10 mg skualen bulunmaktadır. Skualenin kendisi immünojenik değildir fakat sürfaktanlarla birlikte emülsiyon formları bu özelliğe sahiptir (103).

MF59 içeren aşılar içermeyenlerle karşılaştırıldığında immün yanıtı bariz olarak artırdığı gösterilmiştir. MF59, Th2 aracılığıyla humoral immün yanıtı uyatarak etki etmektedir (104).

30.000'den fazla insan üzerinde MF59 ile 60'dan fazla çalışma yapılmış ve güvenilirliği ve etkinliği test edilmiştir. 12 yılda 45 milyonu aşkın dozda kullanılmış olan MF59'un çocuk, erişkin ve yaşlılarda güvenli bir şekilde kullanılabileceği ortaya çıkmıştır. Oil-in-water formunda kullanılan ilk ticari adjuvan olma özelliğini taşımaktadır. İlk nesil water-in-oil şeklinde olan adjuvanların kullanımından, istenmeyen etkilere neden olduklarından dolayı vazgeçilmiştir. Daha sonra saflaştırılarak çeşitli deneysel kanser aşılarında adjuvan olarak kullanılmıştır. MF59, alüminyum tuzları, Monofosforil lipid A, virus benzeri partiküller, yapılandırılmış İnfluenza virozomları ve Kolera toksin gibi adjuvanlar yanında sıtma aşısında kullanılmak üzere lisans alan adjuvanlardan bir tanesidir. MF59 gibi güçlü bir adjuvanın önümüzdeki yıllarda aşı çalışmalarında daha sık kullanılacağı kolayca öngörülebilir bir gerçektir (105, 106).

Güncel olarak MF59 adjuvanı ile deneysel bir prepandemik influenza aşısı olan Aflunov üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Çocuklardan yaşlılara kadar tüm yaş gruplarında H5N1 suşları ile şimdiye kadar yapılan çalışmalarda güçlü immün yanıt ortaya çıkardığı

gözlenmiştir. Bunun dışında yine deneysel bir influenza aşısı olan Focetria ve hücre kültürü yöntemiyle geliştirilmekte olan ve ilk çalışmalarda oldukça olumlu sonuçlar gözlenen Celtura adlı aşının bileşiminde de adjuvan olarak MF59 yer almaktadır (104).

2.17. ENDOTOKSİNLER

Günümüzde aşı çalışmalarında; aşılardan etkinliğini artırmak için adjuvanların kullanılması yanı sıra uygulanacak aşılardan yan etkilerinin azaltılması amacıyla da çalışmalar yapılmaktadır. Rekombinant proteinlerin *E.coli* ekspresyon sistemleriyle elde edilmesi sonucu bu bakterinin hücre duvar komponenti olan endotoksin adı verilen lipopolisakkaritlerin varlığı aşı çalışmalarında ilginin bu alana yönelmesine sebep olmuştur ve elde edilen rekombinant proteinlerde bulunan endotoksinlerin azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Endotoksinler, gram negatif bakterilerin hücre membranlarında bulunan lipopolisakkarit yapıda moleküllerdir. Bakterilerin hücre organizasyonu ve stabilitesinden sorumludurlar. Endotoksinler hücre duvarının yapısında bulunmalarına rağmen serbest halde de bulunabilirler. Endotoksin salınımı hücrenin ölümü sonucu olmakta fakat hücre büyümesi ve bölünmesi esnasında da gerçekleşebilmektedir.

İnsan vücudu aşırı miktarda lipopolisakkarite maruz kaldığı zaman sistemik inflamatuvar yanıt ortaya çıkmakta ve bir takım patofizyolojik süreçler başlamaktadır. Endotoksinler monosit ve makrofaj aktivasyonu ile immün sistemi uyarmaktadır. Çok düşük dozlardaki endotoksin uygulamasıyla bile endotoksik şok ortaya çıkabilmektedir. Bu yüzden gram negatif bakterilerin kullanılmasıyla elde edilen ürünlerin endotoksinlerden arındırılması gerekmektedir. Bu şekilde aşı uygulandığında endotoksinlere bağlı yan etkiler ortadan kaldırılmış olacaktır. Endotoksinler son derece dayanıklı moleküllerdir. Isıya ve pH değişikliklerine dirençlidirler.

Endotoksinleri uzaklaştırmak için birçok farklı prosedür geliştirilmiştir. Bu yöntemler; lipopolisakkarit afinite rezinleri, iki fazlı ekstraksiyon, ultrafiltrasyon, hidrofobik interaksiyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve membran absorpsiyonu şeklinde sıralanabilir. Farmasötik ve biyolojik ürünlerin intravenöz uygulanmasında maksimum endotoksin seviyesi 5 endotoksin ünitesi (EU)/kg/saat olması gerekmektedir. Yüksek saflıkta üretilen rekombinant subünit ve polisakkarit aşılardan için endotoksin seviyelerinin <20EU/ml olması tavsiye edilmektedir.

Aşı çalışmalarında kullanılacak olan rekombinant proteinlerdeki endotoksin seviyeleri önerilen; kabul edilebilir seviyelere çekilerek uygulanmalıdır. Farklı aşı tipleri için tavsiye edilen endotoksin seviyeleri **Tablo.2.1.**'de verilmiştir.

Tablo.2.1. Farklı Aşılar İçin Endotoksin Seviyeleri

Aşı Tipi	Endotoksin seviyesi
Gen vektörü	<10
Rekombinant subünit	<20
Polisakkarit	<20
Canlı atenüe	<200
İnaktif	<500
Toksoid	<200.000

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

Çalışmaya başlamadan önce sıtma aşısı çalışmaları ile ilgili detaylı literatür araştırması yapıldı. Çalışma aşamalarında kullanılacak sarf malzemeleri ve cihazlar tespit edilerek, mevcutta bulunmayanların proje kapsamına alınarak; temini için BAP projesi hazırlandı. Çalışmada geliştirilecek aşısı formülasyonuna karşı oluşacak immün yanıtın deney hayvanlarında tespitinin yapılabilmesi için, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındı (Ek: 1).

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji AD Laboratuvarı DNA Bankası'nda mevcut bulunan *P.falciparum* genomik DNA'sı kullanıldı.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

3.1.1.1. Malzemeler

Bu çalışmada aşağıda listelenen malzemeler kullanılmıştır:

Master mix (SolisBioDyne FIREPol, Estonya)

PfCSP F1 primeri

PfCSP R2 primeri

100 bp Marker (SolisBioDyneFIREPol, Estonya)

CloneJET PCR Clonning Kit (ThermoScientific, ABD)

Pfu DNA polimeraz (Promega, ABD)

Axyprep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, ABD)

LB katı besiyeri

LB sıvı besiyeri

SOC medium

OneShot TOP10 Chemically Competent *E.coli* hücreleri (Invitrogen, ABD)

BL21 Star (DE3) pLys *E.coli* hücreleri (Thermo Scientific, ABD)

Probond Purification System (Thermo Scientific, ABD)

ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (Genscript, ABD)

Protein ladder (Invitrogen, ABD)

Anti His GHRP (Invitrogen, ABD)

DAP tablet (Invitrogen, ABD)

3.1.1.2. Cihazlar

Bu çalışmada aşağıda listelenen cihazlar kullanılmıştır:

T100 Thermal Cycler (Carestream, ABD)

Gel Logic 212 Pro Görüntüleme Cihazı (Carestream, ABD)

Nanodrop 2000C (ThermoScientific, ABD)

Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems SDS-PAGE (Bio-Rad, ABD)

Trans-Blot® Turbo™ Transfer System Western Blot (Bio-Rad, ABD)

ChemiDoc MP System Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad, ABD)

Incubated Shaker SI-300 (Jeio Tech, Kore)

Dry Bath BSH1001-E (Benchmark, ABD)

HydroFlex™ Microplate Washer (TECAN, İsviçre)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Plasmodium falciparum total genomik DNA'sından *P.falciparum* CSP geni için spesifik primerler kullanılarak PCR reaksiyonu hazırlandı.

PfCSP F1 (5'- CACC ATG ATG AGA AAA TTA GCT AT -3')

PfCSP R2 (5'- TTA ATT AAA GAA TAC TAA TAC-3')

(Elde edilen gen dizisinin pET100 plazmidine yerleştirilebilmesi için F primerine CACC dizilimi eklendi.)

PCR reaksiyonu için, toplam 25µl olacak şekilde; 12.5µl Master mix (SolisBioDyne FIREPol, Estonya), 1µl *P.falciparum* genomik DNA'sı ve 1µl PfCSP F1 (20 pmol), 1µl PfCSP R2 (20 pmol) primerleri ve 10.5µl steril distile su içeren karışım hazırlandı.

Plasmodium falciparum CSP gen ürününü elde etmek için PCR'da kullanılan döngü şartları **Tablo 3.1.**'de verilmiştir.

Tablo.3.1. PCR Döngüsü Şartları

Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)	Siklus
94°C	5	1
94°C	1	25
58°C	1.15	25
72°C	1	25
72°C	30	1
+4°C	∞	

Elde edilen PCR ürünü %0.8 ethidium bromide içeren %1.5'luk agaroz jelde marker eşliğinde yürütüldü ve jel üzerindeki PCR ürünü, Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla görüntülendi (Carestream, ABD).

3.2.2. *Plasmodium falciparum* CSP Geninin pJET Vektörüne Klonlanması

Klonlama reaksiyonu, CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi.

3.2.2.1. Yapışkan Uçlu Klonlama Protokolü

- | | |
|----------------------------|--|
| 1. 2x Reaction Buffer | 10µl |
| PCR Ürünü | 2µl |
| Steril distile su | 4µl |
| <u>DNA Blunting Enzyme</u> | <u>1µl</u> |
| Toplam | 18µl olacak şekilde karışım hazırlandı. |
- Karışım hafifçe vortekslendi. 3-5 saniye santrifüj edildi.
 - Karışım 70°C'de 5 dk. süreyle inkübe edildi ve buz üzerine alındı.

3.2.2.2. Ligasyon Reaksiyonu

- pJET Blunt Cloning Vector 1µl ve
T₄ DNA Ligase 1µl eklenerek
Toplam **20µl** yeni karışım elde edildi.
- Karışım hafifçe vortekslendi. 3-5 saniye santrifüj edildi.
- Karışım 22°C'de 5 dk. süreyle inkübe edildi. Buz üzerine alındı.

3.2.2.3. Transformasyon

- Karışım buz üzerine konulduktan sonra bu karışımdan 5µl alınarak yine buz üzerinde bekletilen One Shot® TOP10 *E.coli* hücreleri üzerine eklendi.
- Buz üzerinde 30 dk. inkübasyona bırakıldı.
- 42°C'de 45 sn. bekletildi.
- Karışım üzerine oda sıcaklığında olan 250µl SOC medium eklendi.
- Karıştırıcı üzerinde (250 rpm'de) 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Antibiyotikli katı LB agar üzerine bu karışımdan 100µl ekildi ve 37°C'de bir

gece inkübe edildi.

3.2.2.4. Kolonilerden PCR Screening

Transformasyon sonrasında oluşan kolonilerin, rekombinant plazmid içerip içermediğini anlamak için PCR screening yapıldı. Bunun için katı besiyerinden steril pipet ucuyla alınan her bir koloni 25µl'lik PCR screening reaksiyon karışımına (12.5µl Master mix, 1µl PfCSP F1 (20pmol), 1µl PfCSP R2 (20pmol) primerleri ve 10.5µl steril distile su) eklendi. PCR döğüsü ve PCR ürünün agaroz jelde yürütülmesi ve görüntülenmesi **Bölüm 3.2.1'**de belirtildiği gibi yapıldı.

3.2.2.5. Klonlamanın Miniprep ile Doğrulanması

PCR screening sonucu agaroz jelde pozitifliği doğrulanan koloniden miniprep işlemi Axygen™ Axyprep™ Plasmid MiniPrep Kit (Thermo Scientific, ABD) protokolüne uygun olarak yapıldı.

1. Transformasyon yapıldıktan sonra LB katı besiyerindeki koloniler antibiyotik içeren LB sıvı besiyerlerine ekim yapıldı. 1 gece boyunca 200 rpm'de 37°C'de çalkalayıcı üzerinde bir gece inkübe edildi.
2. LB besiyerinde üreyen koloniler 1.5ml'lik ependorflara bölüştürüldü. 12.000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Üst kısmı uzaklaştırıldı.
3. 250µl Buffer S1 eklendi. Kısa süre vortekslendi.
4. 250µl Buffer S2 eklendi. Tersyüz edilerek karıştırıldı.
5. 350µl Buffer S3 eklendi. Tersyüz edilerek karıştırıldı. 12.000 x g'de 10 dk. santrifüj edildi.
6. Üst kısmı kitle gelen kapaksız tüpe aktarıldı. Alt kısmına 2ml'lik ependorf takıldı. 12.000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.
7. Alt kısım atılarak yeni bir ependorf takıldı. Buffer W1'den 500µl eklenerek 12.000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.
8. Alt kısım atılarak yeni bir ependorf takıldı. Buffer W2'den 700µl eklenerek 12.000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.
9. Alt kısım atıldı. Yeni 1,5ml'lik ependorf takıldı. Membranın merkezine 60µl

Eluent eklendi. 1 dk. oda ısısında bekletildikten sonra 12.000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Elde edilen ürün -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.2.6. Rekombinant Plazmiddeki CSP Geni Varlığının PCR ve DNA Dizi Analizi ile Doğrulanması

Elde edilen üründen **Bölüm 3.2.1.**'de belirtildiği şekilde PCR yapıldı ve agaroz jelde görüntülenerek *P.falciparum* CSP geninin varlığı doğrulandı.

Ayrıca DNA dizi analizi yaptırılarak klonlamanın doğruluğu kesinleştirildi. Dizi analizi (ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer, ABD) yapıldı. DNA dizi analizi sonuçları, Chromas v.1.45 (ConorMcCarty School of Science Griffith University, Australia) programı ile <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> adresindeki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programıyla veri tabanında mevcut olan *P.falciparum* dizileri ile karşılaştırılarak incelendi.

3.2.3. pET100 Vektörüne Subklonlama İçin PCR

Genin Champion™ pET100 Directional TOPO® Expression Kit (Thermo Scientific, ABD) vektörüne yerleştirilebilmesi için Pfu DNA Polimeraz (Promega, ABD) kullanılarak PCR reaksiyonu hazırlandı. PCR reaksiyonu için, toplam 50µl olacak şekilde; 0.4µl Pfu DNA Polimeraz, 1.25µl PfCSP F1 (20 pmol) ve 1.25µl PfCSP R2 (20 pmol) primerleri, 5µl Buffer A, 0.5µl dNTP, 1µl plazmid DNA'sı, 2µl MgCl₂ ve 39.26µl steril distile su içeren karışım hazırlandı. *P.falciparum* CSP geninin pET100 vektörüne subklonlanması için kullanılan PCR döngü şartları **Tablo 3.2.**'de verilmiştir.

Tablo.3.2. Pfu DNA Pol. PCR Döngüsü Şartları

Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus
95°C	5 dk.	1
94°C	20 sn.	35
55.8°C	30 sn.	35
72°C	2 dk.	35
72°C	30 dk.	1
+4°C	∞	

Elde edilen PCR ürünü, **Bölüm 3.2.1.**'de belirtildiği gibi hazırlanan agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi.

3.2.4. *P.falciparum* CSP Geninin pET100 Vektörüne Ligasyon ve Transformasyonu

Protein ekspresyon ve pürifikasyonu için Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen, ABD) kullanıldı. *P.falciparum* CSP genini kit içeriğindeki pET100 vektörüne yerleştirmek için üretici firma önerisine göre aşağıdaki protokol uygulandı:

1. Taze PCR ürünü 1µl

Tuz solüsyonu 1µl

Steril su 3µl

TOPO® vektörü 1µl

Toplam 6µl olacak şekilde karışım hazırlandı.

2. Karışım birkaç defa hafifçe alt üst edildi ve oda ısısında 5 dk. inkübasyona bırakıldı.
3. Karışım buz üzerine konulduktan sonra bu karışımdan 3µl alınarak yine buz üzerinde bekletilen One Shot® TOP10 *E.coli* hücreleri üzerine eklendi.
4. Buz üzerinde 30 dk. inkübasyona bırakıldı.
5. 42°C'de 45 sn. bekletildi.
6. Karışım üzerine oda sıcaklığında olan 250µl SOC medium eklendi.
7. Karıştırıcı üzerinde (250 rpm'de) 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
8. Antibiyotikli katı LB agar üzerine bu karışımdan 100µl ekildi ve 37°C'de bir gece inkübe edildi.

3.2.4.1. Kolonilerden PCR Screening

Transformasyon sonrasında oluşan kolonilerin, rekombinant plazmid içerip içermediğini anlamak için PCR screening yapıldı. Bu işlem **Bölüm 3.2.2.4.**'te belirtilen şekilde yapıldı. PCR döngüsü ve PCR ürününün agaroz jelde yürütülmesi ve görüntülenmesi

Bölüm 3.2.1.'de belirtildiği gibi yapıldı.

3.2.4.2. Kolonilerden Rekombinant Plazmidin Saflaştırılması

Plasmodium falciparum CSP genini pET100 vektörüne transformasyon sonrası PCR screening ile pozitifliği belirlenen koloni LB sıvı besiyerine ekilerek **Bölüm 3.2.2.5.'deki** gibi miniprep prosedürü uygulandı. PCR yöntemi ile plazmid varlığı doğrulandı.

3.2.4.3. Rekombinant Plazmidin Miktar ve Saflığının Ölçümü

Plasmodium falciparum CSP geninin pET 100 vektörüne yerleştirilmesi sonrasında *E.coli* hücrelerinde miniprep ile saflaştırılan rekombinant plazmidin miktarı ve saflığı Nanodrop 2000C (ThermoScientific, ABD) cihazında A260 ve A280 değerleri ile ölçülerek değerlendirildi.

3.2.5. Rekombinant Plazmidin BL21 Star *E.coli* Hücrelerine Transformasyonu

DNA dizi analizi ile varlığı kesinleştirilen rekombinant plazmidin rCSP'i üretmesi için aşağıdaki transformasyon prosedürü uygulandı.

1. BL21 star *E.coli* hücreleri -80°C'den çıkarılıp buz üzerinde inkübe edildi.
2. 5µg volümdeki rekombinant plazmid ile 50µl'lik BL21 star *E.coli* hücreleri pipet ucuyla yavaşça karıştırıldı.
3. Karışım buz üzerinde 30 dk. inkübe edildi.
4. 42°C'de 45 saniye bekletildi.
5. Karışım buz üzerine transfer edildi ve burada tekrar 5 dk. inkübe edildi.
6. Transformasyon karışımı üzerine oda sıcaklığında olan 250µl SOC medium eklendi.
7. Karıştırıcı üzerinde (200 rpm'de) 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
8. Ampisilinli (%1 glukoz ilave edilmiş) LB sıvı besiyeri, 37°C'de shaker üzerinde 1 gece inkübe edildi.

3.2.6. rCSP Ekspresyonu

Transformasyon ürününün 500'er µl'si 50ml'lik 10 ml sıvı LB içeren 2 adet tüpe aktararak ikiye bölündü.

1. Sıvı besiyerleri 37°C'de OD₆₀₀ 0.5-0.8 olana kadar yaklaşık 3 saat inkübe edildi.
2. OD₆₀₀ 0.5-0.8 değeri yakalandığında 50ml'lik 4 her bir tüpte 5'er ml olacak şekilde bölüştürüldü.
3. Tüplerden birinden, 0. saat örneği (indüklenmemiş=negatif örnek) olarak 500µl alındı, 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilerek sıvı kısmı atıldı ve pellet -20°C'ye kaldırıldı.
4. Son konsantrasyon 1M, 0.5M, 0.1M ve 0.01M olacak şekilde IPTG tüplere eklendi.
5. Sıfırıncı dakikada, 2.5, 3.5 4.5 ve 5.5'uncu saatlerde her bir kültürden 500µl alındı ve bunlar mikrosantrifüj tüpüne konuldu, tüp buz üzerinde 10 dakika inkübe edildikten sonra 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi, üst sıvı atıldı ve çöküntü -20°C'ye kaldırıldı.
6. Sonuçta negatif örnekle birlikte, alınan diğer örnekler -20°C'ye kaldırıldı. Bu örnekler rCSP analizi aşamasında kullanıldı.

rCSP ekspresyonu sonucu elde edilen örnekler SDS-PAGE'de yürütüldü.

3.2.6.1. SDS-PAGE Yönteminin Uygulanması

SDS-PAGE analizi Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems (Bio-Rad, ABD) ile yapıldı.

1. Alt jeli (resolver) hazırlanmak için kitin Resolver A solüsyonundan 3ml ve B solüsyonundan 3ml Karışım hazırlandı.
2. Üzerine 3µl TEMED ve 30µl APS eklenerek aparatın içerisine döküldü ve jel katılaşmaya bırakıldı.
3. Üst jeli (stalker) hazırlamak için kitin Stalker A solüsyonundan 1ml ve B solüsyonundan 1ml Karışım hazırlandı.
4. Üzerine 2µl TEMED ve 10µl APS eklenerek aparatın içerisinde katılaşan resolver jel üzerine döküldü ve jel katılaşmaya bırakıldı.

5. Katılaşan jel aparatı ile birlikte elektroforez tankına yerleştirilerek üzerine 1X Tris-glisin solüsyonu eklendi.
6. -20°C'deki örnekler çıkarılarak erimeye bırakıldı. Eridikten sonra üzerine 100µl 2XSDS gel loading buffer eklendi. 10 sn. süreyle vortekslendi. 2 dk. kuru ısı bloğu içerisinde tutularak karışımın homojenize edilmesi sağlandı. Tekrar 10 sn. vortekslendi.
7. Marker ve örnekler kuyucuklara yüklenerek 300 V'ta 17 dk. yürütüldü.

3.2.6.2. rCSP Ekspresyonunun Western Blot ile Gösterilmesi

1. Elektroforezde yürütölen jel üzerindeki proteinler Trans-Blot® Turbo™ Transfer System Western Blot (Bio-Rad, ABD) içerisindeki nitrosellöloz membrana transfer edildi.
2. Blotlama sonrasında nitrosellöloz Membrane Blocking Buffer (500ml PBS, 250µl Tween20 ve 25gr. yağsız süt tozu) içerisinde atılarak 3 saat oda ısısında karıştırıcı üzerinde inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrasında membran 5 kez 5'er dakika yıkama solüsyonu (500ml PBS ve 250µl Tween20) ile yıkandı.
4. Yıkama sonrasında Membrane Blocking Buffer ile 1:5.000 oranında sulandırılan Anti-HisG-HRP antikorı (İnvitrogen, ABD) membran üzerine dökölerek 1 gece oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrasında membran 5 kez 5'er dakika yıkama solüsyonu ile yıkandı.

Yıkama sonrasında görüntöleme için DAB ve ECL yöntemi kullanıldı.

3.2.6.2.1. DAB Tablet ile rCSP Analizi

1. 15ml 50 mM pH:7.5 tris içerisinde 1 DAB tablet çözdürüldü.
2. Solüsyon 0.20µm porluk filtreden süzölerek 20µl 30'luk H₂O₂ eklendi.

Hazırlanan solüsyon membranın üzerine dökölerek proteine ait bantlar gözlemlendi.

3.2.6.2.2. ECL ile rCSP Analizi

ECL Western Blotting Substrate (Promega, ABD) prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi.

1. Kit içerisinde hazır bulunan Peroxide Solution ve Luminol Enhancer Solution'dan 3'er ml alınarak karıştırıldı.
2. Membran Chemidoc MP (Bio-Rad, ABD) cihazına konularak üzerine hazırlanan karışım döküldü.
3. Image Lab Software (Bio-Rad, ABD) programı ile protein bantlarının varlığı görüntülendi.

3.2.8. rCSP'nin Saflaştırılması

rCSP'nin saflaştırılması, Protein Purification System Kit (ProBond, ABD) prosedürü uygulanarak yapıldı.

En iyi rekombinant protein ekspresyonu 3.5 saatte alınan örnekte görüldüğünden, eksprese edilen protein miktarını artırmak için **Bölüm 3.2.6.'da 3. Basamak'ta** yapılan işlem bu kez 250ml'lik 2 adet balon jode bulunan 50ml'lik LB sıvı besiyerlerine, 2.5'ar ml gece üreyen besiyerinden aktarım yapılarak gerçekleştirildi.

Besiyerinden 3.5 saatte alınan 500µl örnek **Bölüm 3.2.7'te** belirtilen şekilde rekombinant protein ekspresyonu protokolü uygulanarak protein varlığı doğrulandı.

3.2.8.1. Hücre Lizatı Hazırlanması

1. Protein Purification System Kiti ile sağlanan Guanidium Lysis Buffer'ın pH'ı 7.8'e ayarlandı.
2. 50ml LB sıvı besiyerinde çoğalan hücreler 5.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve üst kısım atıldı.
3. Pellet üzerine Guanidium Lysis Buffer'dan 8ml eklenerek resüspanse edildi.
4. Karışım oda sıcaklığında 5-10 dk. yavaşça alt üst edilerek hücrelerin lizis olması sağlandı.
5. Hücre lizatına buz üzerinde sonikatörle 5 sn. süreli pulsasyonlar uygulandı.
6. Lizat 3.000 x g'de 5 dk. santrifüj edildi. Üst kısım yeni bir tüpe alındı.

7. Lizatın 5µl'si SDS-PAGE yapılmak üzere ayrılıp kalan kısım ile birlikte -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.8.2. ProBond™ Kolumun Hazırlanması

1. 10ml pürifikasyon kolumun içine 2ml resin döküldü. 800 x g'de 1 dk. santrifüj edilerek resinin çökmesi sağlandı.
2. Üzerine 6ml distile su eklendi ve resinle resüspanse edildi. 800 x g'de 1 dk. santrifüj edilerek resinin çökmesi sağlandı. Üst kısım hassasça pipetlenerek uzaklaştırıldı.
3. 6ml Denaturing Binding Buffer eklendi ve resinle resüspanse edildi. 800 x g'de 1 dk. santrifüj edilerek resinin çökmesi sağlandı. Üst kısım hassasça pipetlenerek uzaklaştırıldı. 3. basamak tekrar edildi.

3.2.8.3. Pürifikasyon Prosedürü

1. Hazırlanan ProBond koluma 8ml lizat eklendi.
2. Kolum, oda sıcaklığında 15–30 dk. alt üst edildi ve 800 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Üst kısım hassasça pipetlenerek uzaklaştırıldı.
3. Koluma 4ml Denaturing Binding Buffer eklendi. 800 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Üst kısım hassasça pipetlenerek SDS-PAGE analizi için +4°C'ye kaldırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.
4. Koluma 4ml Denaturing Washing Buffer (pH 6.0) eklendi. 800 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Üst kısım hassasça pipetlenerek SDS-PAGE analizi için +4°C'ye kaldırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.
5. Koluma 4ml Denaturing Washing Buffer (pH 5.3) eklendi. 800 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Üst kısım hassasça pipetlenerek SDS-PAGE analizi için +4°C'ye kaldırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.
6. Kolum klemlenerek sabitlendi. 5ml Denaturing Elution Buffer eklendi. Altına boş bir tüp konularak, yerçekimi etkisiyle rekombinant proteinin alttaki tüpe geçmesi beklendi.
7. Saflaştırılmış rekombinant proteinin varlığı Bölüm 3.2.5.'teki gibi SDS-PAGE'de yürütülerek gösterildi.

3.2.9. rCSP'den Endotoksin Eksiltilmesi

Saflaştırılan rCSP'den endotoksinlerin eksiltilmesi ToxinEraser™ Endotoxin Removal Kit (Genscript, ABD) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. Rekombinant protein örneğinin pH'ı 7.8'e ayarlandı.
2. ToxinEraser™ Endotoxin Removal Kit kolumu uygun bir standı sabitlendi.
3. Kolumun içindeki solüsyon uzaklaştırıldı.
4. Kolumun altına yeni bir tüp yerleştirildi. Koluma 5ml soğuk Regeneration Buffer eklendi. Akış hızı 0.25ml/dk. olacak şekilde ayarlandı. Bu basamak tekrarlandı.
5. Kolumun altına yeni bir tüp yerleştirildi. Koluma 5ml soğuk Equilibration Buffer eklendi. Akış hızı 0.5ml/dk. olacak şekilde ayarlandı. Bu basamak tekrarlandı.
6. Kolumun akış vanası kapatıldı. Saflaştırılmış rekombinant protein örneği koluma eklendi. Akış hızı 0.25ml/dk. olacak şekilde ayarlandı.
7. Kolumdan akarak tüpe dolan örneğe 1.5ml Equilibration Buffer eklendi.

3.2.9.1. Saflaştırılmış rCSP'nin Endotoksin Seviyesinin Tespiti

Saflaştırılan ve endotoksinleri eksiltelen rCSP'nin endotoksin seviyesi Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation (Thermo scientific, ABD) kiti kullanılarak ölçüldü.

1. Kit içerisinde bulunan solüsyonlar belirtilen oranlarda sulandırılarak hazırlandı. Hazırlanan solüsyonlar oda ısısına dengelenmesi için çalışmadan 30 dk. önce oda ısısında bekletildi.
2. 96'lık mikropate'ler 37°C'de 10 dk. inkübe edilerek ısınması sağlandı.
3. Mikropate kuyucuklarına sırasıyla; kontrol için endotoksinsiz su, hazırlanan standard solüsyon 1 (1EU/ml), standard solüsyon 2 (0.5EU/ml), standard solüsyon 3 (0.25EU/ml), standard solüsyon 4 (0.1EU/ml) ve endotoksinlerinden arındırılmış rCSP proteininden 50'şer µl konularak, mikropate'in üstü kapatıldı.
4. Plate 37°C'de 5 dk. inkübe edildi.
5. Beş dakika sonra her kuyucuğa 50µl kit içerisinde bulunan LAL (Limulus

Amebocyte Lysate) eklenerek plate üstü kapatıldı.

6. Plate 10 sn. nazikçe karıştırılarak 37°C’de 10 dk. inkübe edildi.
7. Süre sonunda her kuyucuğa 100µl Chromogenic Substrate eklenerek plate’in üstü kapatıldı ve 10 sn. karıştırıldı.
8. Plate 37°C’de 6 dk. inkübe edildi ve reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 50µl stop reagent (%25 Asetik Asit) eklendi.
9. Plate 10 sn. karıştırıldı ve 405-410 nm.’de ölçüm yapıldı.

3.2.10. rCSP ve MF59’un Kombine Edilmesi

Saflaştırılmış ve endotoksinlerinden arındırılmış rCSP ve MF59 adjuvanı birebir oranda 3 yollu musluk içerisinde karıştırılarak aşı uygulaması için hazır hale getirildi.

3.2.6.1. rCSP Aminoasit Dizisi Analizi

DNA dizi analizi yapılarak ortaya çıkarılan *P.falciparum* CSP gen dizisi kullanılarak http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/ adresindeki program ile rCSP’nin aminoasit dizilimi elde edildi.

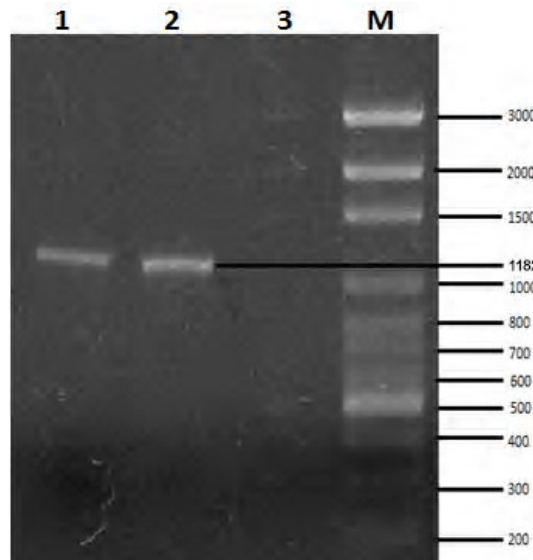
3.2.6.2. rCSP 3 Boyutlu Yapısının Analizi

<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> adresindeki **Jmol** 14.2.15_2015.07.09 programı kullanılarak elde ettiğimiz rCSP’nin 3 boyutlu şekli görüntülendi.

4. BULGULAR

4.1. *Plasmodium falciparum* CSP Geni

Erciyes üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji AD Laboratuvarı DNA Bankası'nda mevcut bulunan *P.falciparum* genomik DNA'sından CSP spesifik primerler ile PCR kurularak 1.182 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *P.falciparum* CSP geninin PCR ürünü.

1: Pozitif kontrol, 2: Örnek, 3: Negatif kontrol,

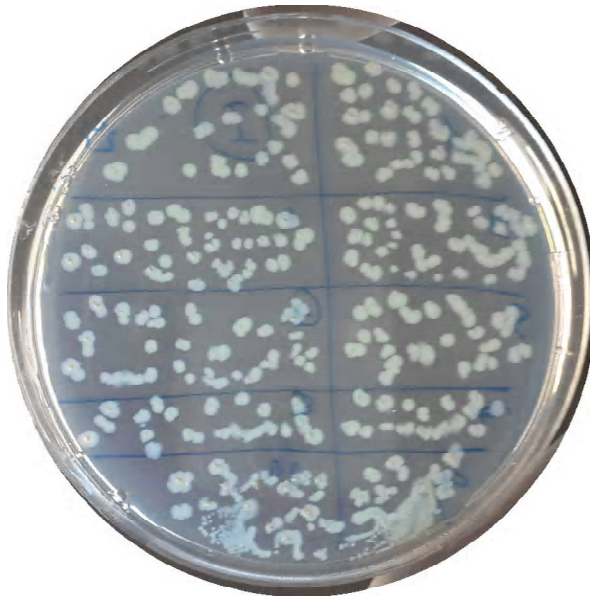
M: Marker

4.2. pET100/ Vektörüne Klonlanması ve Doğrulanması

Plasmodium falciparum CSP geni PCR ürünü, CloneJET PCR Clonning Kit ile pJET1.2/blunt klonlama vektörüne yerleştirildi. Elde edilen rekombinant plazmide pJETPfCSP adı verildi. Ligasyon ürünü OneShot TOP10 Chemically Competent *E.coli* hücrelerine transforme edildi. Katı besiyerinde gözlenen koloniler (Şekil 4.2.) garanti altına alınması için yeni bir plate'e ekilerek üretildi (Şekil 4.3).



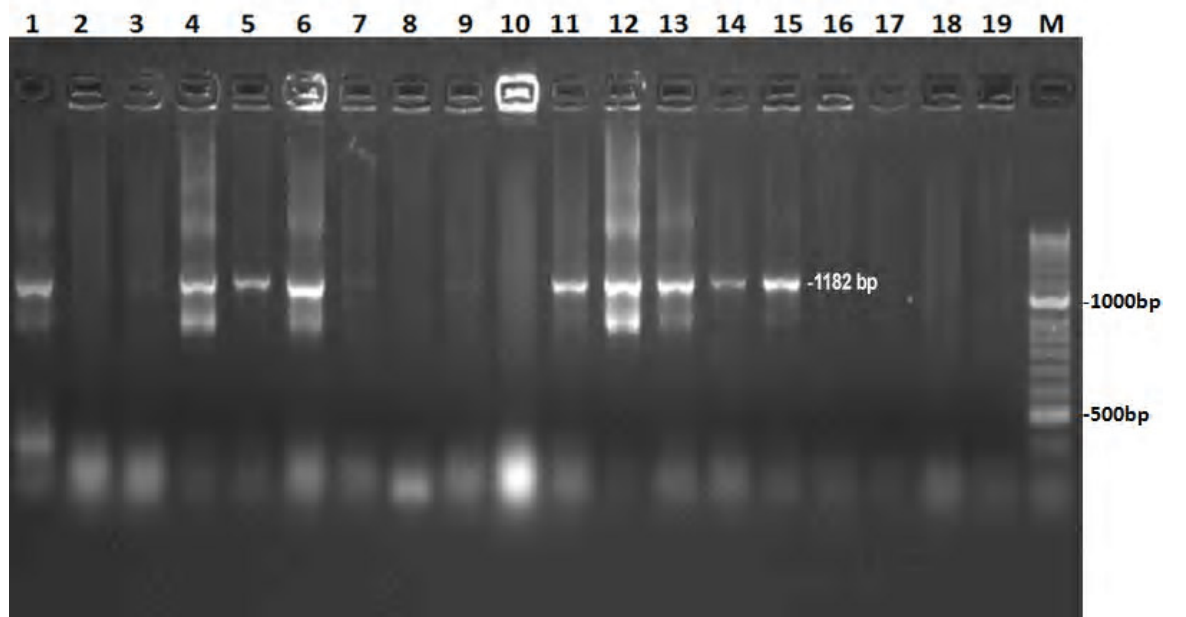
Şekil 4.2. Transformasyon sonucunda oluşan koloniler



Şekil 4.3. Transformasyon kolonilerinin tek nokta ekimi sonucu oluşan yeni koloniler

4.2.1. PCR Screening

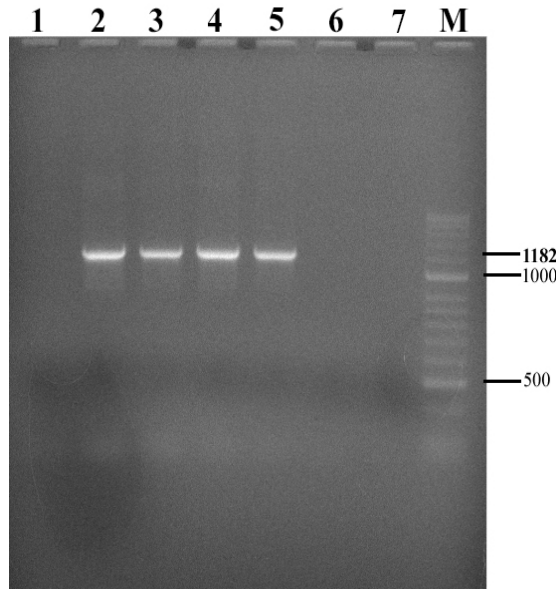
Yapılan transformasyon sonrası oluşan kolonilerde rekombinant plazmidin mevcut olup olmadığının tespiti için PCR screening yapıldı. LB katı besiyerinden alınan kolonilerden 11 tanesinin (3-7, 9, 11-15) rekombinant plazmidi içerdiği PCR screening ile tespit edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. PCR Screening. 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3-19: Örnekler, M: Marker

4.3. Örneklerden Miniprep Yapılması ve PCR ile Doğrulanması

Miniprep prosedürü uygulanırken rekombinant plazmidi içerdiği tespit edilen 4 koloniden miniprep yapılarak rekombinant plazmidler saflaştırılarak koruma altına alındı. Miniprep ürünlerinden PCR kurularak rekombinant plazmidin klonlanan geni içerdiği doğrulandı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *P.falciparum* CSP geni Miniprep PCR ürünü. 1: Negatif kontrol, 2: Pozitif kontrol, 3-5: Örnekler, M: Marker

4.4. DNA Dizi Analizi

Klonlamanın doğruluğunu göstermek amacıyla rekombinant plazmidin DNA dizi analizi yapıldı. DNA dizi analizi ile gen klonlamasının doğruluğu ve CSP geninin DNA dizisi tespit edildi (Şekil 4.6). Çalışmamızda kullanılan *P.falciparum* CSP geninin büyüklüğü 1.182 bp olup Genbank'a KT315396 kayıt no ile kaydedilmiştir.

```

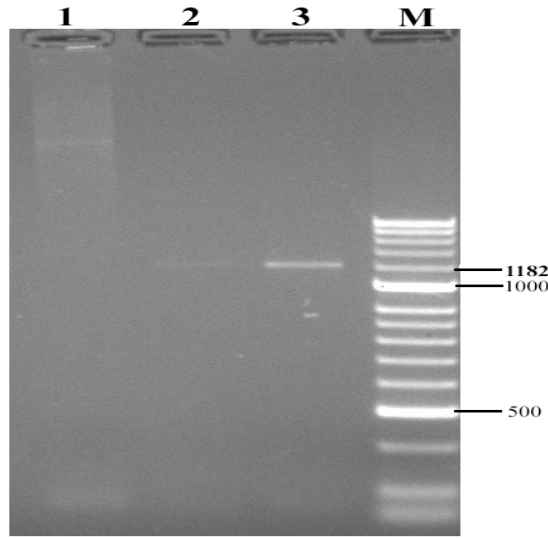
1 atgatgagaa aattagctat tttatctgtt tcttcctttt tatTTgttga ggccttattc
61 caggaatacc agtgctatgg aagttcgtca aacacaaggg ttctaaatga attaaattat
121 gataatgcag gactaatttt atataatgaa ttagaaatga attattatgg gaaacaggaa
181 aattggtata gtcttaaaaa aaatagtaga tcacttggag aaaatgatga tggaaataac
241 gaagacaacg agaaattaag gaaacccaaa cataaaaaat taaagcaacc agcggatggt
301 aatcctgatc caaatgcaaa cccaaatgta gatcccaatg ccaacccaaa tgtagatcca
361 aatgcaaacc caaatgtaga tccaaatgca aacccaaatg caaacccaaa tgcaaaccga
421 aatgcaaacc caaatgcaaa cccaaatgca aacccaaatg caaacccaaa tgcaaaccga
481 aatgcaaacc caaatgcaaa cccaaatgca aacccaaatg caaacccaaa tgcaaaccga
541 aatgcaaacc caaatgcaaa cccaaatgca aacccaaatg caaacccaaa tgcaaaccga
601 aatgcaaacc caaacgcaaa cccaaatgca aatcctaata caaacccaaa tgcaaaccga
661 aatgcaaacc ctaaatgcaa tccaaatgca aatccaaatg caaacccaaa cgcaaaccga
721 aatgcaaacc ctaaatgcaa tccaaatgca aatccaaatg caaacccaaa tgcaaaccga
781 aatgcaaacc ccaatgcaaa tcctaataaa aacaatcaag gtaatggaca aggtcacaat
841 atgccaaatg acccaaaccg aaatgtagat gaaaatgcta atgccaaaca tgctgtaaaa
901 aataataata acgaagaacc aagtgatcag cacatagaaa aatattttaa gataatacaa
961 aattctcttt caactgaatg gtcccatgt agtgtaactt gtggaaatgg tattcaagtt
1021 agaataaagc ctggctctgc taataaacct aaagaccaat tagattatgc aaatgatatt
1081 gaaaaaaaaa tttgtaaaat ggaaaaatgt tccagtgtgt ttaatgtcgt aaatagttca
1141 ataggattaa taatggtatt atccttcttg ttccttaatt ag

```

Şekil 4.6. DNA Dizi Analizi Yapılan PfCSP Gen Dizisi

4.5. pET100 vektörüne Subklonlama için Plazmidin Yerleştirilmesi

pET100 ekspresyon vektörüne plazmidin yerleştirilebilmesi için Pfu DNA polimeraz ile çoğaltılan 1.182 bp büyüklüğündeki CSP geni klonlama reaksiyonu ile pET100 plazmidine yerleştirildi (**Şekil 4.7**). Rekombinant plazmidin Nanodrop 2000C (ThermoScientific, ABD) cihazında A260 ve A280 değerlerinin ölçülmesi sonucu sırasıyla 8.571 ve 4.505 (A260/A280: 1.9) değerleri elde edildi.

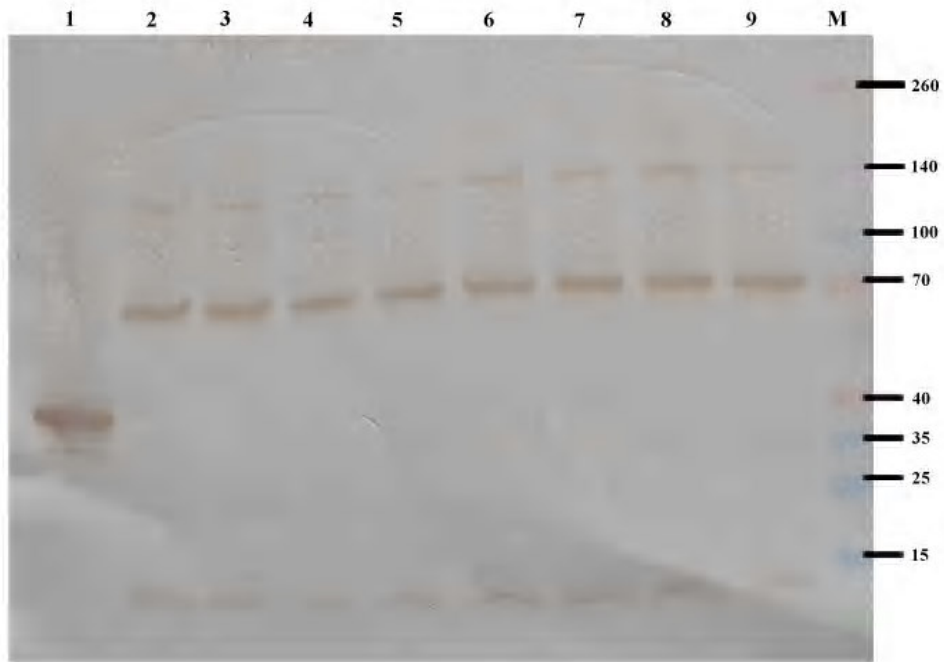


Şekil 4.7. Pfu DNA Polimeraz ile Elde Edilen PCR Ürünü. M: Marker

1: Negatif kontrol, 2: Pozitif kontrol, 3: Örnek

4.6. SDS PAGE Analizi

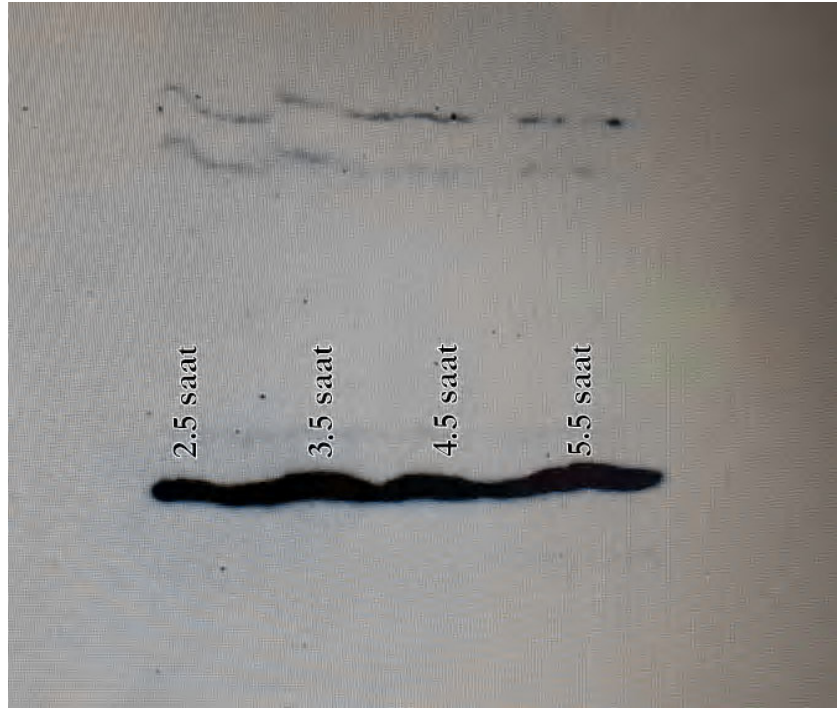
pET100 vektörüne bağlanan rekombinant plazmide pET100PfCSP adı verildi. Rekombinant plazmidin optimum protein ekspresyon şartlarını belirlemek için SDS PAGE analizi yapıldıktan sonra Western Blot yapıldı. Daha sonra DAP tablet ile rCSP bantları gözlemlendi (Şekil.4.8). En iyi rCSP üretiminin, 0.01 IPTG konsantrasyonu ile 3.5 saatte olduğu gözlemlendi.



Şekil.4.8. rCSP Western Blot Sonucu 1: Pozitif kontrol, 2-9: Örnekler (2: 0,1mM 5,5 saat, 3: 0.1mM 4,5 saat, 4: 0.1mM 3,5 saat, 5: 0.1mM 2,5 saat, 6: 0.01mM 5,5 saat, 7: 0.01mM 4,5 saat, 8: 0.01mM 3,5 saat, 9: 0.01mM 2,5 saat)
M: Marker

4.7. ECL Yöntemiyle rCSP'nin Görüntülenmesi

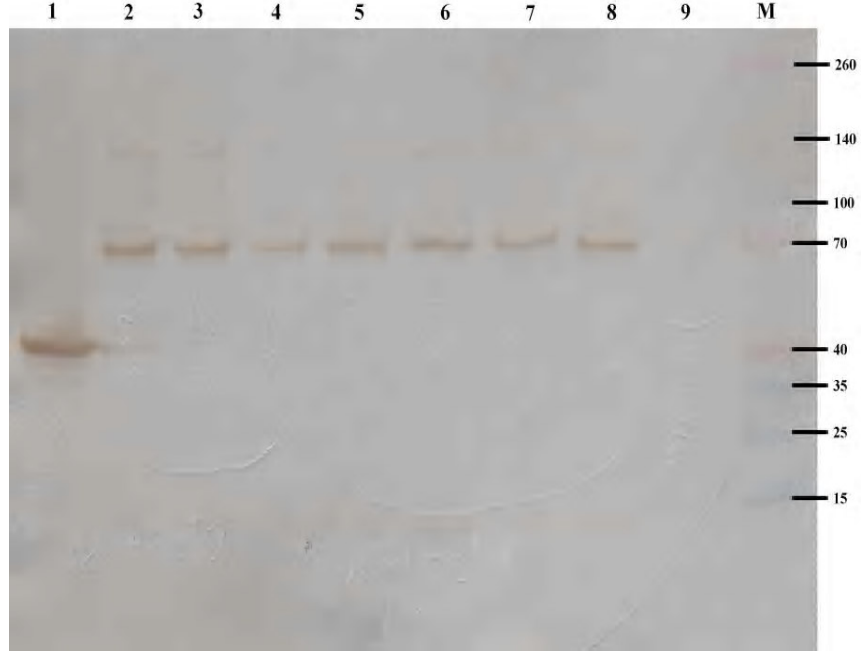
SDS PAGE analizi yapıldıktan sonra Western Blot yapıldı. Bu aşamadan sonra optimum rekombinant protein ekspresyonunun tespiti için ayrıca ECL yöntemi de kullanılarak rCSP bantları görüntülendi (Şekil.4.9).



Şekil.4.9. ECL Yöntemi ile rCSP Bantlarının Görüntülenmesi

4.8. Saflaştırma Sonrası SDS PAGE Analizi

Rekombinant plazmidin tespiti için SDS PAGE analizinden sonra Western Blot yapıldı. DAP tablet ile rCSP bantları gözlemlendi (**Şekil.4.10**).



Şekil.4.10. Saflaştırma Sonrası rCSP Western Blot Sonucu. 1: Pozitif kontrol, 2-8: Örnekler (2: 0,1mM 4,5 saat, 3: 0.1mM 3,5 saat, 4: 0.1mM 2,5 saat, 5: 0.01mM 5,5 saat, 6: 0.01mM 4,5 saat, 7: 0.01mM 3,5 saat, 8: 0.01mM 2,5 saat) 9: Negatif kontrol (0. saat), M: Marker

4.9. Circumsporozoite Protein Yapısı

Plasmodium falciparum CSP gen dizisi kullanılarak 393 aminoasitten oluşan rCSP yapısı elde edildi (Şekil 4.11).

Bu çalışmada elde edilen rCSP içyapısında merkezi bölgede toplam 37 NANP epitopu (Asn-Ala-Asn-Pro) bulunmaktadır. Merkezi bölgede tek başına 3 NANP NVDP epitop tekrarından sonra 15 NANP tekrarı ve arada bulunan bir NVDP epitopunun ardından tekrar 19 NANP epitop tekrarı olduğu tespit edilmiştir. rCSP yapısında toplam 4 adet birbirinden bağımsız NVDP epitopu bulunduğu görülmüştür.

1	MMRKLAILSV	SSFLFVEALF	QEYQCYGSSS	NTRVLNELNY	DNAGTNLYNE	LEMNYYGKQE
61	NWYSLKKNSR	SLGENDDGNN	EDNEKLRKPK	HKKLKQPADG	NPDPNANP	NPDPNANP
121	NANPNVDPNA	NPANPNANP	NANPNANPNA	NPANPNANP	NANPNANPNA	NPANPNANP
181	NANPNANPNV	DPANPNANP	NANPNANPNA	NPANPNANP	NANPNANPNA	NPANPNANP
241	NANPNANPNA	NPANPNANP	NANPNANPNK	NNQNGQGHN	MPNDPNRNVD	ENANANNAVK
301	NNNNEEPSDQ	HIEKYLKIIQ	NSLSTEWSPC	SVTCGNGIQV	RIKPGSANKP	KDQLDYANDI
361	EKKICKMEKC	SSVFNVVNSS	IGLIMVLSFL	FLN		

Şekil 4.11. rCSP Aminoasit Dizisi

4.9.1. rCSP 3 Boyutlu Yapısı

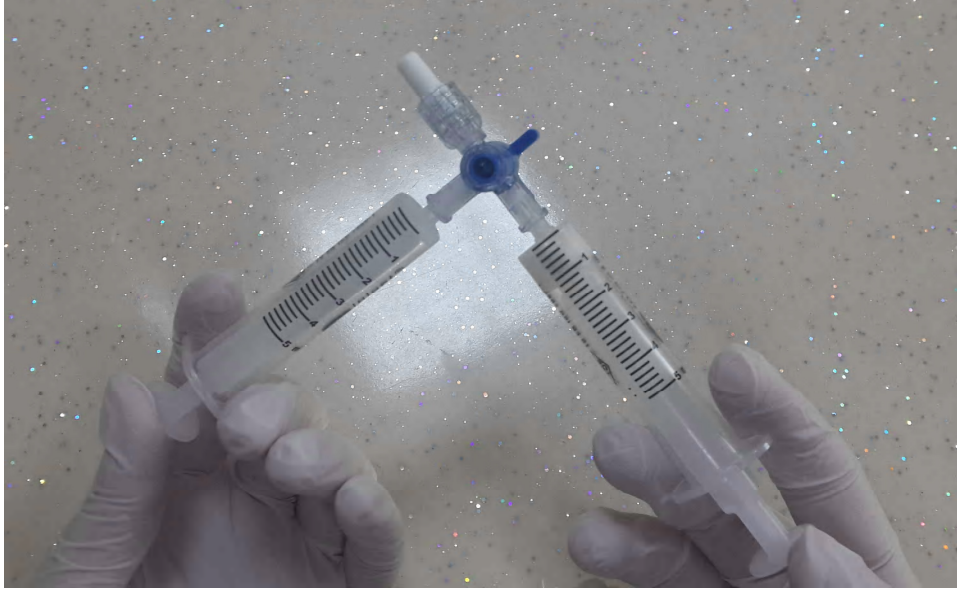
Plasmodium falciparum CSP gen dizisi kullanılarak rCSP'nin 3 boyutlu şekli elde edildi (Şekil.4.12).



Şekil.4.12. rCSP 3 Boyutlu Yapısı

4.10. rCSP ve MF59'un Kombinasyonu

rCSP ve MF59 adjuvanı birebir oranda 3 yollu musluk içerisinde karıştırılarak aşı uygulaması için hazır hale getirildi (**Şekil.4.13**).



Şekil.4.13. rCSP + MF59 Kombinasyonu

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sıtma insanlık tarihi boyunca bilinen en önemli hastalıklardan birisidir. Günümüzde hâlen en fazla ölüme neden olan paraziter hastalıktır. Erken tanı konulamadığında çoğunlukla ağır seyreden bir klinik tablo ve ardından ölümlerle sonuçlanmaktadır. Sıtma tanısında geleneksel olarak kalın damla ve ince yayma preparatların mikroskopla incelenmesiyle tanı konulurken, endemik bölgelerde ise RDT'ler sıklıkla kullanılmaktadır. Günümüzde PCR ve rtPCR gibi moleküler yöntemler de sıtma tanısında rutin tetkikler arasında yerlerini almıştır. Halihazırda sıtma tedavisinde kullanılan tüm ilaçlara karşı direnç gelişiminden dolayı tedavide zorluklar yaşanmakta ve DSÖ'nün de tavsiyesiyle kombinasyon terapileri uygulanmaktadır. Yaklaşık bir asırdan beri birçok enfeksiyon hastalığına karşı aşılar kullanılmakta iken günümüzde sıtma da dahil olmak üzere paraziter hastalıklara karşı etkili bir aşı henüz bulunmamaktadır (2).

Plasmodium falciparum, sıtmaya neden olan parazitler içerisinde en sık karşılaşılan etken olmakla birlikte en ağır klinik tabloyu oluşturan ve en fazla ölüme neden paraziter etkidir. Ülkemizde sıtma etkeni olarak *P.vivax* görülmekteyken son yıllarda uluslararası seyahatin kolaylaşması, göçler, savaşlar ve öğrenci değişim programları gibi etmenlere bağlı olarak Türkiye'de de *P.falciparum* ile meydana gelen sıtma vakalarının sayısı giderek artmaktadır (7-16). *P.falciparum*'un en sık görüldüğü yerler tropikal ve subtropikal bölgelerdir. En fazla ölüme neden olduğu bölge ise Sahra-altı Afrika'dır.

Hastalığın kliniği ağır seyrettiğinden ve sıklıkla ölüme neden olduğundan dolayı, aşı çalışmalarına en fazla konu olan sıtma etkeni *P.falciparum*'dur (27).

Sıtmaya karşı aşı geliştirme çalışmaları 1970'li yıllarda başlamıştır. İlk olarak kullanılan radyasyonla attenüe edilmiş sporozoitleri taşıyan sivrisineklere maruz bırakılan kişilerde kısmi bağışıklık elde edildiği tespit edilmiştir (17). Günümüzde genetik mühendisliğindeki ilerlemeler ve etkili adjuvanların keşfinden sonra bu konudaki çalışmalar daha yoğun bir şekilde sürmektedir. DSÖ tarafından hazırlanan gökkuşağı tablosuna göre, parazitin farklı hayat evrelerine yönelik 25 deneysel sıtma aşısının faz çalışmaları hâlen devam etmektedir (80).

Sıtma parazitinin farklı hayat evrelerinde sentezlenen birçok antijenik yapı bulunmaktadır. Günümüze kadar, bu antijenler tek başına veya birbirleriyle kombine edilerek birçok aşı çalışmasında kullanılmışlardır. İlk çalışmalarda attenüe sporozoitlerle yapılan deneylerde bağışıklık elde edilmesi üzerine ilgi pre-eritrositer dönem antijenleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Pre-eritrositer dönemin en önemli antijenik yapısı da gerek sporozoitin gelişiminde, gerekse de invazyondan karaciğer evresine kadar olan dönemde aktif rol oynayan CSP'dir (2).

Circumsporozoite protein parazitin antijenik yapıları içerisinde ilk tanımlananıdır. Bu protein ilk olarak ookistler içerisindeki sporozoitlerde tespit edilmiştir. Dişi anofelin insandan kan emmesi esnasında dermis üzerine enjekte edilen sporozoit yapısında bu protein bulunmakta ve sporozoitin gelişiminde de önemli rol oynamaktadır. CSP'nin yapısında üç önemli bölge bulunmaktadır. Bunlar içerisinde; 1. bölge heparin sülfat proteoglikanları bağlayan bir N terminali, proteinin iç yapısında bulunan dört aminoasitlik bir tekrar bölgesi olan "N-asetil Nöraminik Asit Fosfataz (NANP)" ve 2. bölge de memelilerdeki trombospondin proteini benzeri tip-1 tekrar bölgesi içeren bir C terminalidir. Parazitin enfekte edebildiği insan dışındaki türlerde de bu bölge yapılarının büyük oranda benzeştiği bilinmektedir (87).

Sıtma aşı çalışmaları üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar: pre-eritrositer dönem aşıları, eritrositer dönem aşıları ve bulaşmayı önleyici aşılardır. Bu üç grup içerisinde ise çalışmaların yoğunlaştığı dönem pre-eritrositer dönem aşılardır. Bu aşılar, sporozoit antijenlerine karşı bağışıklık sistemini uyararak karaciğer hücrelerinin enfekte olmasını ve bu hücrelerde parazitin çoğalmasını engellemeyi amaçlayan aşılardır. Pre-eritrositer dönem aşılarında amaç hastalık daha ortaya çıkmadan bu sürecin durdurulması; eğer bu

aşama geçilip sıtmanın klinik bulguları ortaya çıktıysa da bulguların hafifletilmesidir. DSÖ sıtma aşıları (gökkuşağı) tablosunda yer alan 25 adet sıtma aşısı adayının 13 tanesi pre-eritrositer dönem aşısı oluşturmaktadır. Pre-eritrositer dönem aşısı adaylarının etkinlik ve güvenilirlikleri halen test edilmektedir. Bu aşılar içerisinde en bilinenleri ise CS-NANP, ME-TRAP, CS102 ve RTS,S'dir (80, 91).

Seksenli yıllarda başlayan CS-NANP bazlı pre-eritrositer dönem aşısı çalışmalarında, CSP'de birden fazla tekrar gösteren NANP'nin 3 ila 19 arasında değişen 3 farklı kombinasyonu kullanılmıştır (92).

Yine CSP bazlı bir aşısı olan CS102 ise NANP epitopunu içermeyip bunun yerine CSP'nin C terminalinden T epitopları taşıyan, 102 amino asitlik bir sentetik peptid kullanılarak oluşturulmuştur (92).

ME-TRAP da pre-eritrositer dönem aşısıdır fakat diğer bahsedilen aşılarından farklı olarak bu bir DNA aşısıdır. Multipl epitop ve CSP gen dizisindeki TRAP olarak bilinen bölgeyi kodlayan DNA dizisi içermektedir (97).

İrradiye (gamma ışınlarıyla ışınlanmış) sporozoitlerin aşısı olarak kullanılması da pre-eritrositer dönem aşılarına dâhil edilebilir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar, irradiye sporozoitlerin kemirgenlerde, maymunlarda ve insanlarda sıtmaya karşı kısıtlı bir immünite oluşturduğunu göstermiştir. İrradiye sporozoitlerin immünite oluşturabilmesi için binden fazla sivrisinek ısırığı gereklidir. İrradiye sporozoitlerle ilgili önemli bir problem ise bunların seri üretiminin nasıl yapılacağı konusudur. Önceki çalışmalarda elde edilen başarılı sonuçlar sayesinde günümüzde bu yöndeki çalışmalar tekrar ilgi odağı olmuştur (60, 84, 85).

Rekombinant RTS,S aşısı DSÖ gökkuşağı tablosuna göre Faz III çalışmalarına ulaşabilmiş tek sıtma aşısıdır. Bu aşıda 19 NANP epitop tekrarı bulunmaktadır. Aynı zamanda Hepatit B yüzey antijenine bağlanmış olan CSP'nin C terminalini de içermektedir. RTS,S'de adjuvan olarak ise AS01E kullanılmıştır (2).

RTS,S'in Faz III çalışmaları sonucu elde edilen verilere göre, 5-17 aylık süt çocuklarında yapılan ilk doz aşılamaı takiben 18 ay sonra ikinci bir doz uygulanmasıyla, çalışma sonunda sıtma vaka sayısını %36 oranında azalttığı bulunmuştur. İlk doz aşılamaı 6-12 haftalık olan infantlarda ise %26 oranında koruma sağlandığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra aşının etkinliğinin her iki grupta da zamanla

azaldığı gözlenmiştir. Aşının etkinliğinin değerlendirilmesinde %80 civarında insektisit ve cibinlik gibi diğer koruma faktörlerinin de mevcut olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. RTS,S saha çalışmaları, sıtmanın en fazla ölüme neden olduğu Afrika'da ve yine en fazla ölüme neden olduğu grup olan 5 yaş altı çocuklar üzerinde yapılmıştır. 2013'te yayınlanan bir araştırmanın sonuçlarına bakıldığında RTS,S'in 4 yıl sonunda koruma oranı %16.8 olarak bulunmuştur. Afrika'da geniş katılımlı bir çalışmada 6 ila 12 haftalık 6537 infantın dahil edilmesiyle yapılan Faz III çalışmasında RTS,S sıtmaya karşı yaklaşık %30 oranında bir koruma sağlamıştır. Afrika'nın 11 farklı bölgesinde yürütülen ve 4453 çocuk üzerinde yapılan bir diğer çalışmada sıtmanın düşük transmisyonunun görüldüğü bölgelerde %60 koruma, orta derecede transmisyonunun olduğu bölgelerde %41 koruma ve yüksek transmisyonun olduğu bölgelerde ise %4 koruma gözlenmiştir (94-96).

Aşının üreticisi olan Glaxo Smith Kline (GSK) firması Haziran 2014'de Avrupa İlaç Ajansı (AİA)'na ruhsat almak üzere resmen başvuru yapmıştır. GSK, AİA'nın değerlendirme sonucuna göre RTS,S'in Temmuz 2015 itibariyle onaylandığını; 2017 yılında ise nihai olarak DSÖ tarafından kullanıma sunulup sunulmayacağına karar verileceğini duyurmuştur. Elimizdeki bu veriler ışığında bir değerlendirme yapıldığında, RTS,S'in sıtmaya karşı ılımlı bir koruma sağladığını fakat bu korumanın yeterli olmadığını ve bu konuda önümüzdeki yıllarda daha detaylı çalışmalar yapılarak daha etkili aşılarda yapılması gerektiği sonucuna ulaşabiliriz.

Çalışmamızda kullanılan *P.falciparum* CSP geninin büyüklüğü 1.182 bp'dir. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore> adresinde mevcut bulunan CSP gen dizilerinin büyüklüğü 1.032-2.337 bp arasındadır. Genbank'ta bulunan ve Tanzania'dan izole edilen AB502850.1 kayıt numaralı gen ile bizim çalışmamızda kullanılan gen %100 aynı baz dizilimine sahiptir. Çalışmamızda kullanılan gen de, Genbank'a KT315396 kayıt no ile kaydedilmiştir.

Pre-eritrositer dönem aşılarda, CSP'nin merkezinde bulunan ve proteinin ana karakterini belirleyen NANP tekrarlarının önemi dikkate alınarak aşı çalışmalarında kullanılmıştır (2, 92). NANP epitoplarının; CSP'nin yapısında doğal olarak bulunduğu şekilde ve/veya sentetik şekilde 3 ila 19 tekrar halinde aşı çalışmalarında etkinliği araştırılmıştır. Bu epitopun aşı çalışmalarında stratejik bir hedef olarak seçilmesi oldukça gerçekçi ve akılcı bir yaklaşım olarak günümüze kadar kabul görmüştür (107).

Circumsporozoite proteine karşı oluşan humoral immünyetede NANP epitop tekrarı önemli bir rol oynamaktadır. Malawi’de NANP epitop tekrarının polimorfizmi üzerine yapılan bir çalışmada 98 farklı izolat kullanılmış ve sonuçta 20 farklı epitop tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre *P.falciparum* CSP yapısı çocuklarda, yetişkinlere göre daha fazla değişkenlik göstermektedir. 1 adet B hücre epitopu ve birçok T hücre epitopu içeren NANP tekrar bölgesinin *P.falciparum* sıtmasına karşı oluşan doğal bağışıklıkta önemli bir etken olduğu düşünülmektedir. RTS,S yapısında 19 NANP tekrarı bulunduğunun bilinmesine rağmen farklı izolatlarda oldukça değişken sayılarda NANP tekrarı bulunduğu bildirilmiştir (108-110). Bizim çalışmamızda kullanılan izolattan elde edilen CSP’deki NANP epitopu tekrar sayısı 37 olarak tespit edildi. Literatürdeki bilgiler ışığında, kullanmış olduğumuz rCSP’deki NANP tekrarının konak immünyetinde B ve T lenfosit yanıtını uyarak aşı etkinliğini olumlu yönde etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

Aşı etkinliğinin artırılması için aşı kombinasyonlarına eklenen moleküllerden biri de adjuvanlardır. Adjuvanlar, vücudun bağışıklık cevabını artırmak için aşılarla ilave edilmektedir. Adjuvanlar yaklaşık bir asırdır aşı yapımında kullanılmaktadır. Günümüzde moleküler tekniklerin ilerlemesiyle immünyeteyi daha etkili olarak uyaran adjuvanlar üretilmektedir. Adjuvanların aşılarla ilave edilmesinin temel sebebi T ve B lenfosit cevaplarının kalıcı bir immünyete için mutlak gerekli olmasıdır (19).

Yüzyıl önce keşfedilen alüminyum fosfat, alüminyum hidroksit ve alüminyum potasyum sülfat gibi alüminyum tuzları günümüzde rutin aşı programlarında kullanılan difteri ve tetanos gibi birçok aşının yapımında halen kullanılmaktadırlar. Alüminyum tuzlarının yanı sıra MF59, Monofosforil lipid A, virus benzeri partiküller, yapılandırılmış İnfluenza virozomları ve Kolera toksin sıtma aşısında kullanılmak üzere onay almış adjuvanlardır (102).

Ciba-Geigy ve Chiron firmalarında 90’lı yıllarda yapılan aşı çalışmaları esnasında etkili bir adjuvan olan MF59 (skualen) keşfedilmiştir. MF59’un yapıtaşı olan skualen; insan, bitki ve hayvanlarda doğal olarak bulunan bir maddedir. Lisans aldığı tarihten itibaren milyonlarca kez kullanılmış olan MF59; çocuk, erişkin ve yaşlılarda güvenilirlik ve etkinliğini tartışılmaz bir biçimde ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra MF59 oil-in-water formunda kullanılan ilk ticari adjuvan olma özelliğini de taşımaktadır. Fluad® 1997’de ruhsat almış olan ve günümüzde halen kullanılan ve mevsimsel grip aşısıdır. Bu aşının

her dozu 10 mg skualen içermektedir. Skualenin kendisi tek başına immünojenik değildir. Yüzey gerilimini artıran sürfaktanlarla birlikte emülsiyon formları immünojenik özellik taşımaktadır, MF59'un adjuvan olarak kullanılmasındaki en önemli etken bu maddenin Th₂ yoluyla humoral immün yanıtı uyandırabilmesidir (103-105).

Çalışmamızda adjuvan olarak MF59'un seçilmesinin nedeni, daha önce tasarlanan deneysel sıtma aşılarında, CSP ile bu adjuvanın kullanılmamış olması ve yapılan çalışmalar sonucunda etkili ve güvenilir bir adjuvan olarak kendini ispatlamış olmasıdır (105, 106).

Günümüze kadar çalışılan sıtma aşılarında MF59, PfMSP-1 (*P.falciparum* Merozoite Surface Protein-1) ve PvDBP (*P.vivax* Duffy Binding Protein) antijenleriyle kombine edilerek aşı olarak uygulanmış ve ılımlı derecede antikor yanıtı oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu antijenlerle ilgili gelecekte daha detaylı çalışmalar yapılması tavsiye edilmektedir (111, 112). Fakat bilebildiğimiz kadarıyla literatürde MF59'un CSP ile kombine edilerek aşı olarak uygulandığına dair herhangi bir bilgi mevcut değildir. Bu yönüyle değerlendirildiğinde CSP ve MF59 kombinasyonu ilk kez bu çalışma ile aşı amacıyla formüle edilmiş olunacaktır. Virüslere karşı geliştirilen aşı çalışmalarında ise MF59 yaygın bir biçimde kullanılmış ve oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir (103-105). Oysa *P.falciparum*'un insan vücuduna giriş formu olan sporozoitin yapısında bulunan ve sporozoitin gelişimi, motilitesi ve hedefe ulaşmasında hayati öneme sahip olan CSP'nin, MF59 gibi etkin ve güvenilir bir adjuvanla uygulanması sayesinde oldukça etkili bir sonuç ortaya çıkarabileceği öngörülebilir bir gerçektir. Çalışmamızda da bu hipotez baz alınarak, bu kombinasyonla sıtmaya karşı etkili bir aşı yapılması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda rCSP ve MF59 kombinasyonunun deney hayvanlarına uygulanması neticesinde oluşacak immün yanıtın ve ortaya çıkacak bağışıklık derecesinin araştırılması aşamasına gelinmiştir.

Proteinlerin rekombinant olarak üretilebildiklerinin öğrenilmesinden hemen önce; Stanford Üniversitesi'nde 1970'lerde yapılan çalışmalar sonucu rekombinant DNA teknolojisinin temelleri atılmıştır. Bu keşfin ardından yetmişli yılların ikinci yarısında rekombinant olarak proteinlerin sentezlenebildiği bulunmuştur. İlk olarak sentezlenen rekombinant protein, sentetik insülinidir. Rekombinant proteinler ilaç endüstrisi,

hastalıkların tanısı ve aşı çalışmaları gibi birçok alanda yaygın olarak üretilip kullanılmaktadırlar.

Rekombinant proteinlerin üretilmesi için birçok yöntem mevcuttur. En sık kullanılan yöntem *E.coli* hücreleri ile üretim olmakla birlikte insekt, mantar ve memeli hücrelerinde de üretim yapılabilmektedir. *E.coli* hücreleri uzun zamandır rekombinant protein üretiminde kullanılan ucuz, basit, hızlı ve yüksek üretim kapasitesine sahip bir sistemdir. Proteinlerin rekombinant olarak üretiminde optimizasyonun sağlanabilmesi için birçok değişken mevcuttur. DNA kodonunun optimizasyonu ile başlayan bu süreç primerlerin seçimi, doğru vektör seçimi, sıcaklık ve besiyeri optimizasyonu ve kullanılan solüsyonların optimizasyonu gibi birçok faktör mevcuttur (113).

Bu çalışmada rekombinant protein ekspresyonu amacıyla *E.coli* ekspresyon sistemi kullanılmıştır. *P.falciparum* rCSP ekspresyonunun optimizasyonu amacıyla; *E.coli* BL21 star hücreleri ve *E.coli* C43 hücreleri, *E.coli*'nin üretilmesi için %1 glukoz ilaveli LB sıvı besiyeri kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, rekombinant proteinin saflaştırılma basamaklarında proteinin yıkımını önlemek amacıyla proteaz inhibitörü eklenerek rekombinant protein üretimi optimize edilmeye çalışılmıştır.

Plasmodium falciparum'un pre-eritrositer döneme ait en önemli antijenik yapılarından olan CSP'in rekombinant olarak üretilip, aşı adayı olarak tasarlandığı bu çalışmada immün cevabın artırılması için de etkinliği ve güvenilirliği yapılan çalışmalarla kanıtlanmış MF59 adjuvanı kullanılmıştır. *P.falciparum* genomik DNA'sı kullanılarak; spesifik primerlerle CSP gen bölgesi PCR ile çoğaltılıp daha sonra plazmide klonlanmıştır. Rekombinant plazmid BL21 hücrelerinde eksprese edilmiştir. Eksprese edilen rekombinant protein saflaştırılarak, endotoksinlerinden arındırıldıktan sonra MF59 adjuvanıyla kombine edilmiştir. Bu kombinasyonda kullanılacak rCSP'nin etkinliğinin farklı deney hayvanlarında araştırılabilmesi için; rekombinant protein ekspresyon optimizasyonu çalışmaları yanı sıra, daha yüksek miktarlarda elde edilebilmesi gerekmektedir.

Günümüzde halen milyonlarla ifade edilen vaka sayısı ve yüzbinlerle ifade edilen can kayıplarına rağmen sıtmaya karşı etkili bir aşı olmaması ve mevcut ilaçların hepsine karşı bildirilen direnç, bu alanda yapılan ve yapılması planlanan çalışmaları daha da önemli hale getirmektedir.

Bu çalışma sonrasında, farklı modifikasyonlarla elde edilecek verilerin geliştirilmesi ve diğer yüksek organizmalı deney hayvanlarında enfeksiyona karşı etkinliğinin araştırılması ile sıtmaya karşı aşı çalışmalarına önemli bir katkı sağlanmış olunacaktır.

6.KAYNAKLAR

1. Saygı G, Temel Tıbbi Parazitoloji. 1. Baskı, Esnaf Ofset Matbaacılık, Sivas, 1998: ss71-85
2. Özcel MA, Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir, 2007: ss79-134
3. Altıntaş K, Tıbbi Parazitoloji. 1. Baskı, Kozan Ofset, Ankara, 2002: ss181-222
4. Kantele A, Jokiranta TS. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. Clin Infect Dis. 2011;52:1356-62
5. Collins WE. *Plasmodium knowlesi*: a malaria parasite of monkeys and humans. Annu Rev Entomol 2012;57:107-21
6. Cox-Singh J. Zoonotic malaria: *Plasmodium knowlesi*, an emerging pathogen. Curr Opin Infect Dis 2012;5:530-36
7. Uyar Y, İnanc T, Sahin S, Kuk S, Yazar S. 2001-2013 Yılları Arasında Kayseri'de Sıtma Epidemiyolojisi. Türkiye Parazitol Derg 2015;39:86-9
8. Alver O, Akalın H, Mıstık R, Helvacı S, Töre O. Bursa'da Sıtma Epidemiyolojisi. Türkiye Parazitol Derg 2005;29:68-72
9. Bayındır Y, Aycan ÖM, Atambay M, Karaman Ü, Aydoğdu İ. Malatya'da Uganda Kökenli İlk *Falciparum* Sıtması: İki Olgu. Türkiye Parazitol Derg 2005;29:157-9.
10. Karaman Ü, Atambay M, Yaşar S, ve ark. Malatya'da Son Yedi Yıl İçindeki Sıtma Olguları. Türkiye Parazitol Derg 2007;31:245-8
11. Alver O, Yılmaz E, Akçağlar S, Töre O. Bursa'da Sıtma. Türkiye Parazitol Derg 2007;31:249-55
12. Çelik T, Kölgelir S. Adıyaman'da 2000-2011 Yılları Arasında Aktif Ve Pasif Sürveyans İle Saptanan Sıtma Olguları. Türkiye Parazitol Derg 2012;36:204-7
13. Cetinkol Y, Yıldırım AA. Ordu İlinde 2002-2011 Yılları Arasında Sıtma Epidemiyolojisi. Türkiye Parazitol Derg 2013;37:69-72
14. Parlak E, Ertürk A, Çayır Y, Parlak M. Sporadik Bir Bölgede: Dört İmport Sıtma Olgusu. Türkiye Parazitol Derg 2013;37:161-4

15. GüvenT, Eser FC, Yılmaz GR, Güner R, Taşyaran MA. Seyahat İlişkili P. Falciparum Sıtması: Dört Olgu. *Türkiye Parazitol Derg* 2013;37:225-8
16. Altun HU, Gül YK, Vudalı E, ve ark. Uganda Kaynaklı Plasmodium Falciparum Sıtması. *Türkiye Parazitol Derg* 2013;37:229-32
17. Clyde DF. Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg* 1975;3:397-401
18. Richie TL, Saul A. Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature* 2002;415:694-701
19. Mohan T, Verma P, Rao DN. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *Indian J Med Res* 2013;138:779-95
20. The History of Malaria and Ancient Diseases, Available from: URL: <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/>(07.07.2015)
21. Akdur R. Sıtma ve Sıtma Salgınları Tarihi. *Bilim Tarihi Araştırmaları* 2006;2:43-54
22. Sinnis P1, Zavala F.The Skin: where malaria infection and the host immune response begin. *Semin Immunopathol* 2012;34:787-92
23. Chakravarty S, Cockburn IA, Kuk S, et al. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nature Medicine* 2007;13:1035-41
24. Malaria FAQs, Available from: URL: <http://www.cdc.gov/malaria/about/faqs.html> (07.07.2015)
25. Versiani FG, Almeida ME, Mariuba LA, Orlandi PP, Nogueira PA. N-terminal Plasmodium vivax merozoite surface protein-1, a potential subunit for malaria vivax vaccine. *Clin Dev Immunol* 2013;965841
26. Sporozoits. Available from: URL: <http://www.medicine.mcgill.ca/tropmed/old/lecture2%20malaria.htm> (07.07.2015)
27. WHO World Malaria Report 2014. Available from: URL: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/ (07.07.2015)
28. The Top 10 Causes of Death. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html> (07.07.2015)
29. Alonso PL, Tanner M. Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. *Nature Medicine* 2013;19:150-5
30. O'Brien SF, Delage G, Seed CR, et al. The Epidemiology of Imported Malaria and Transfusion Policy in 5 Nonendemic Countries. *Transfus Med Rev* 2015;29:162-71
31. Camburn AE, Ingram RJ, Holland D, Read K, Taylor S. Imported malaria in Auckland, New Zealand. *N Z Med J* 2012;125:48-53

32. Schwartz KR, Vinci R. Imported pediatric malaria presenting to an urban pediatric emergency department: a case series. *PediatrEmerg Care* 2012;28:1385-8
33. Agarwal A, McMorrow M, Arguin PM. The increase of imported malaria acquired in Haiti among US travelers in 2010. *Am J Trop Med Hyg* 2012;86:9-10
34. Mardin Savur İlçesi Sıtma Salgını İnceleme ve Değerlendirme Raporu. Available from: URL: <http://www.ttb.org.tr/kutuphane/mardinsitmarpr.pdf> (07.07.2015)
35. Trofozoitler. Available from: URL: <http://health.mo.gov/lab/bloodparasites.php> (07.07.2015)
36. Azikiwe C, Ifezulike C, Siminialayi I, et al. A comparative laboratory diagnosis of malaria: microscopy versus rapid diagnostic test kits. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012;2:307-10
37. Maltha J, Gillet P, Jacobs J. Malaria rapid diagnostic tests in travel medicine. *Clin Microbiol Infect* 2013;5:408-15
38. Bisoffi Z, Gobbi F, Buonfrate D, Van den Ende J. Diagnosis of Malaria Infection with or without Disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012;4:e2012036
39. Hawkes M, Conroy AL, Opoka RO, et al. Use of a three-band HRP2/pLDH combination rapid diagnostic test increases diagnostic specificity for falciparum malaria in Ugandan children. *Malar J* 2014;13:43
40. Mouatcho JC, Goldring JP. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. *J Med Microbiol* 2013;62:1491-505
41. Nyunt MH, Kyaw MP, Win KK, Myint KM, Nyunt KM. Field evaluation of HRP2 and pan pLDH-based immunochromatographic assay in therapeutic monitoring of uncomplicated falciparum malaria in Myanmar. *Malar J* 2013;12:123
42. Shokoples S, Mukhi SN, Scott AN, Yanow SK. Impact of Routine Real-Time PCR Testing of Imported Malaria over 4 Years of Implementation in a Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol* 2013;6:1850-4
43. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J Parasitol* 2009;47:93-102
44. Snounou G, Singh B. Nested PCR analysis of Plasmodium parasites. *Methods Mol Med* 2002;72:189-203
45. Snounou G. Genotyping of Plasmodium spp. Nested PCR. *Methods Mol Med* 2002;72:103-116
46. Kuamsab N, Putaporntip C, Pattanawong U, Jongwutiwes S. Simultaneous detection of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum gametocytes in clinical isolates by multiplex-nested RT-PCR. *Malar J* 2012;11:190

47. Mangold KA, Manson RU, Koay ESC. Real-Time PCR for Detection and Identification of *Plasmodium* spp. J Clin Microbiol 2005;43:2435-40
48. Morassin B, Fabre R, Berry A, Magnaval JF. One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. Am J Trop Med Hyg 2002;66:503-8
49. Malaria treatment table. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/treatmenttable.pdf> (07.07.2015)
50. Rowland M, Freeman T, Downey G, Hadi A, Saeed M. DEET mosquito repellent sold through social marketing provides personal protection against malaria in an area of all-night mosquito biting and partial coverage of insecticide-treated nets: a case-control study of effectiveness. Trop Med Int Health 2004;9:343-50
51. Debboun M, Strickman D. Insect repellents and associated personal protection for a reduction in human disease. Med Vet Entomol 2013;27:1-9
52. Medlock JM, Vaux AG. Impacts of the creation, expansion and management of English wetlands on mosquito presence and abundance - developing strategies for future disease mitigation. Parasit Vectors 2015;8:142
53. Floore TG. Mosquito larval control practices: past and present. J Am Mosq Control Assoc 2006;22:527-33
54. Kroeger A, Horstick O, Riedl C, Kaiser A, Becker N. The potential for malaria control with the biological larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in Peru and Ecuador. Acta Trop 1995;60:47-57
55. Walshe DP, Garner P, Abdel-Hameed Adeel AA, Pyke GH, Burkot T. Larvivorous fish for preventing malaria transmission. Cochrane Database Syst Rev 2013;12:CD008090
56. Denise L. Doolan, Carlota Dobaño, J. Kevin Baird. Acquired Immunity to Malaria. Clin Microbiol Rev 2009;22:13-36
57. Chattopadhyay R, Conteh S, Li M, et al. The Effects of radiation on the safety and protective efficacy of an attenuated *Plasmodium yoelii* sporozoite malaria vaccine. Vaccine 2009;27:3675-80
58. Suzuki M, Waki S, Igarashi I, et al. An alternative approach to malaria vaccine with a permanent attenuated mutant from a high virulence *Plasmodium berghei* strain. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A 1987;264:319-25
59. Chattopadhyay R, Conteh S, Li M, et al. The Effects of radiation on the safety and protective efficacy of an attenuated *Plasmodium yoelii* sporozoite malaria vaccine. Vaccine 2009;27:3675-80
60. Rénia L, Grüner AC, Mauduit M, Snounou G. Vaccination using normal live sporozoites under drug treatment. Methods Mol Biol 2013;923:567-76

61. Kuk S. CD8+ and CD4+ T lymphocyte responses against malaria. *Mikrobiyol Bul* 2007;41:329-39
62. Radtke AJ, Tse SW, Zavala F. From the draining lymph node to the liver: the induction and effector mechanisms of malaria-specific CD8(+) T cells. *Semin Immunopathol* 2015;37:211-20
63. Cockburn IA, Tse SW, Zavala F. CD8+ T cells eliminate liver-stage *Plasmodium berghei* parasites without detectable bystander effect. *Infect Immun* 2014;82:1460-4
64. Belongia EA, Naleway AL. Smallpox vaccine: the good, the bad, and the ugly. *Clin Med Res* 2003;1:87-92
65. Smith KA. Louis pasteur, the father of immunology? *Front Immunol* 2012;3:68
66. Pol J, Bloy N, Buqué A, et al. Trial Watch: Peptide-based anticancer vaccines. *Oncoimmunology* 2015;4:e974411
67. Nakalembe M, Mirembe FM, Banura C. Vaccines against human papillomavirus in low and middle income countries: a review of safety, immunogenicity and efficacy. *Infect Agent Cancer* 2015;10:17
68. Huang X, Wu H, Lu Q. The mechanisms and applications of T cell vaccination for autoimmune diseases: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014;47:219-33
69. Minor PD. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology* 2015;479-480:379-92
70. Hajar R. History of Medicine Timeline. *Heart Views* 2015;16:43-45
71. Vaccines. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/vaccines-list.htm> (07.07.2015)
72. Saade F, Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2012;11:189-209
73. Barnard RT. Recombinant vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2010;9:461-3
74. van Oers MM, Pijlman GP, Vlak JM. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *J Gen Virol* 2015;96:6-23
75. Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar J* 2012;11:11
76. Cohen YZ, Dolin R. Novel HIV vaccine strategies: overview and perspective. *Ther Adv Vaccines* 2013;1:99-112
77. Wong SS, Webby RJ. Traditional and new influenza vaccines. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:476-92
78. Barry AE, Arnott A. Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. *Front Immunol* 2014 Jul 28;5:359

79. WHO vaccine roadmap brief. Available from: URL:
http://www.who.int/malaria/mpac/vaccine_roadmap_brief_march_2013.pdf (07.07.2015)
80. WHO Malaria vaccines (rainbow) table. Available from: URL:
http://www.who.int/immunization/research/development/Global_malaria_vaccine_pipeline_2014March.pdf?ua=1 (07.07.2015)
81. Kinyanjui SM. The Immunology of Malaria. KEMRI-Wellcome Trust Research Programme, Kilifi, Kenya. 2012
82. Garcia JE, Puentes A, Patarroyo ME. Developmental biology of sporozoite-host interactions in *Plasmodium falciparum* malaria: implications for vaccine design. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:686-707
83. Tyagi RK, Neeraj KG, Sahu T. Vaccination Strategies against Malaria: novel carrier(s) more than a tour de force. *J Control Release* 2012;1:242-54
84. Roestenberg M, McCall M, Hopman J, et al. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. *N Engl J Med* 2009;361:468-77
85. Luke TC, Hoffman SL. Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *J Exp Biol* 2003;206:3803-8
86. Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, et al. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* 2002;185:1155-64
87. Doud MB, Koksai AC, Mi LZ, et al. Unexpected fold in the circumsporozoite protein target of malaria vaccines. *Proc Natl Acad Sci* 2012;20:7817-22
88. Kumar S, Zheng H, Deng B, et al. A slot blot immunoassay for quantitative detection of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in mosquito midgut oocyst. *PLoS One* 2014;9:e115807
89. Ferguson DJ, Balaban AE, Patzewitz EM, et al. The repeat region of the circumsporozoite protein is critical for sporozoite formation and maturation in *Plasmodium*. *PLoS One* 2014;9:e113923
90. Circumsporozoite Protein 3 boyutlu İllüstrasyonu. Available from: URL:
<http://vector.childrenshospital.org/2012/05/shining-light-on-a-global-killer-in-3d/> (07.07.2015)
91. Malaria vaccines. Available from: URL:
<http://www.niaid.nih.gov/LabsAndResources/labs/aboutlabs/lmiv/productGroups/Pages/pStage.aspx> (07.07.2015)
92. Graves PM, Gelband H. Vaccines for preventing malaria (pre-erythrocytic) The Cochrane Library. 2009, Issue 1

93. PATH. RTS,S malaria candidate vaccine reduces malaria by approximately one-third in African infants. Available from: URL: <http://www.malariaivaccine.org/rd-rtss.php> (07.07.2015)
94. Agnandji ST, Lell B, Fernandes JF, et al. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med* 2012;24:2284-95
95. Bejon P, White MT, Olotu A, et al. Efficacy of RTS,S malaria vaccines: individual-participant pooled analysis of phase 2 data. *Lancet Infect Dis* 2013;13:319-27
96. Olotu A, Fegan G, Wambua J, et al. Four-year efficacy of RTS,S/AS01E and its interaction with malaria exposure. *N Engl J Med* 2013;368:1111-20
97. Moorthy VS, Imoukhuede EB, Milligan P, et al. A Randomised, Double-Blind, Controlled Vaccine Efficacy Trial of DNA/MVA ME-TRAP Against Malaria Infection in Gambian Adults. *PLoS Med* 2004;1:e33
98. Wijayalath W, Cheesman S, Tanabe K, et al Strain-specific protective effect of the immunity induced by live malarial sporozoites under chloroquine cover. *PLoS One* 2012;7:e45861
99. Graves PM, Gelband H. Vaccines for preventing malaria (blood-stage) The Cochrane Library. 2009, Issue 1
100. Graves PM, Gelband H. Vaccines for preventing malaria (spf66)The Cochrane Library. 2009, Issue 1
101. Pfs25/EPA. Available from: URL: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01434381> (07.07.2015)
102. Coler RN, Carter D, Friede M, Reed SG. Adjuvants for malaria vaccines. *Parasite Immunol* 2009;9:520-8
103. O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, Rappuoli R, Giudice GD. The history of MF59(®) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert Rev Vaccines* 2013;12:13-30
104. Bart SA, Hohenboken M, Della Cioppa G, et al. A cell culture-derived MF59-adjuvanted pandemic A/H7N9 vaccine is immunogenic in adults. *Sci Transl Med* 2014;6:234ra55
105. O'Hagan DT, Podda A. MF59: A safe and potent oil in water emulsion adjuvant for influenza vaccines, which induces enhanced protection against virus challenge. *Birkhäuser Advances in Infectious Diseases* 2008;1:221-244
106. O'Hagan DT. MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection. *Expert Rev Vaccines* 2007;6:699-710
107. Zavala F, Tam JP, Hollingdale MR, et al. Rationale for development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *Science* 1985;228:1436-40

108. Bowman NM, Congdon S, Mvalo T, et al. Comparative population structure of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein NANP repeat lengths in Lilongwe, Malawi. *Sci Rep* 2013;3:1990
109. Zeeshan M, Alam MT, Vinayak S, et al. Genetic variation in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in India and its relevance to RTS,S malaria vaccine. *PLoS One* 2012;7:e43430
110. Rich SM, Ferreira MU, Ayala FJ. The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 2000;16:390-6
111. Stowers AW, Cioce V, Shimp RL, et al. Efficacy of two alternate vaccines based on *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in an Aotus challenge trial. *Infect Immun* 2001;69:1536-46
112. Yazdani SS, Shakri AR, Mukherjee P, Baniwal SK, Chitnis CE. Evaluation of immune responses elicited in mice against a recombinant malaria vaccine based on *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Vaccine* 2004;22:3727-37
113. Recombinant protein production optimization. Available from: URL: http://www.genscript.com/gsfiles/techfiles/Optimizing_conditions_for_recombinant_soluble_protein_production_in_E_coli.pdf (07.07.2015)

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ETİK KURULUN ADRESİ : Erc.Üni. Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi

Tarih: 08.04.2013

Toplantı Sayısı: 05

Karar No: 13/75

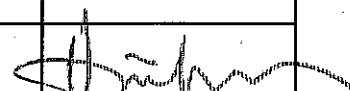
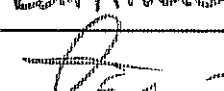
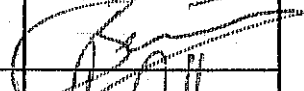
Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

08.04.2013

tarhinde

Prof.Dr.Harun ÜLGER

Başkanlığı'nda toplanmıştır.

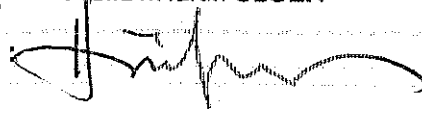
Üye Adı/Soyadı	Unvanı	Bölümü	İmza
Harun Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Abdullah İnci	Prof. Dr.	Vet. Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	Katılmadı
Coşkun Tez	Prof. Dr	Fen Fakültesi	
Fusun F. Erdoğan	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Ahmet Öztürk	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül Aycan.	Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Gökçen Y. Çelik	Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	Katılmadı
Aydın Alan	Yrd. Doç. Dr.	DEKAM	
Asiye Gökbelen	Yar. Sevenler Der. Baş.	Sivil top. kuruluşu temsilcisi	Katılmadı
Serap A. Eroğlu	Avukat	Kurumla ilişkisi olmayan üye	Katılmadı

Üniversitemiz Tıp Fakültesinden Prof.Dr.Salih KUK tarafından sunulan "Balb/c farelerde Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein ve MF 59 'dan oluşan rekombinant protein aşısına karşı oluşan immun yanıtın değerlendirilmesi" adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına **oy birliğiyle** karar verildi adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına **oy birliğiyle** karar verildi

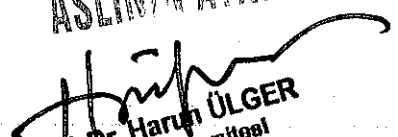
Tarih : 08.04.2013

Etik Kurul Başkanı : Prof.Dr.Harun ÜLGER

İmzası



ASLININ AYNIYDIR


Prof. Dr. Harun ÜLGER
Erciyes Üniversitesi
Hayvan Deneyleri
Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Yunus UYAR
Uyruğu : TC
Doğum Tarihi ve Yeri : 11.03.1979, Gölbaşı
Medeni Durumu : Evli
Tel. : (+90) 05056815740
E-posta : dryunusuyar@yahoo.com
Yazışma Adresi : Erciyes Üniversitesi Tıp Fak.Tıbbi Parazitoloji AD
Melikgazi/KAYSERİ

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Tıp Fakültesi	Fırat Üniversitesi	1998-2004
Doktora	Tıbbi Parazitoloji AD	Erciyes Üniversitesi	2012-2015

Doktora Tezi Başlığı ve Danışmanı: Sıtma Aşısında Alternatif Kombinasyon:

Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein ve MF59

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Salih KUK

Yabancı Dil: İngilizce

Görevler:

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Dr.	Bingöl SSK Hastanesi, Bingöl Devlet Hastanesi, Bingöl	2005-2008
Mesul Müdür/Dr.	Özel İçel Tıp Merkezi, Mersin	2008-2010
Meslek Yetkilisi/Dr.	Türk Kızılayı Kayseri Kan Bağış Merkezi, Kayseri	2011-Halen

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. BALB/c farelerde Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein ve MF59'dan oluşan rekombinant protein aşısına karşı oluşan immün yanıtın değerlendirilmesi. Erciyes Üniversitesi BAP TDK-2014-5370. Araştırmacı. 2014-2015

2. Farelerde Rekombinant Cathepsin L1 Proteinine Karşı İmmün Yanıtın Değerlendirilmesi Erciyes Üniversitesi BAP TOA-12-4128, Araştırmacı. 2012-2015

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

Türkiye Parazitoloji Derneği

ESERLER**A. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:**

A1. Yazar S, Kuk S, Cetinkaya U, **Uyar Y**, Sahin I. Leishmania sp. in Visceral Leishmaniasis suspected patients in Kayseri. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2013;60:185-87

A2. Sakalar C, Kandemir I, **Uyar Y**, Kuk S, Gurbuz E, Yazar S. Polymerase Chain Reaction Based Subtyping of Blastocystis spp. Isolates from Symptomatic Patients in Turkey. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2013;33(4):1064-8

B. Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

B1. Şakalar Ç, **Uyar Y**, Yürürdurmaz M.A, Tokar S, Yeşilkaya H, Gürbüz E, Kuk S, Yazar S. Blastocystis Sp. Subtip 3 Small-Subunit Ribozomal Geninin Klonlanması. Türkiye Parazitol Derg 2013;37:13-8

B2. **Uyar Y**, Yürük M, Erdoğan E, Kuk S, Şahin I, Yazar S. 2011-2013 Yılları Arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Turk Hij Den Biyol Derg 2014;71(3):125-30

B3. **Uyar Y**, İnanç T, Sahin S, Kuk S, Yazar S. 2001-2013 Yılları Arasında Kayseri'de Sıtma Epidemiyolojisi. Türkiye Parazitol Derg 2015;39:86-9

C. Kitap Bölümü:

C1. Yazar S, Uyar Y. Enfeksiyon Acilleri, Sıtma, Bölüm 8: 1-4, Basım aşamasında

D. Ulusal ve Uluslararası Katılımlı Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:

D1. Uyar Y, Kuk S, Yazar S, Plasmodium Falciparum Circumsporozoite Protein(Csp) Geninin Elde Edilmesi. XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, DENİZLİ, TÜRKİYE, 29 Eylül - 5 Ekim 2013, ss.31-31

D2. Uyar Y, İnanç T, Şahin I, Kuk S, Yazar S. 2001–2013 Yılları Arasında Kayseri’de Sıtma Epidemiyolojisi. XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, DENİZLİ, TÜRKİYE, 29 Eylül - 5 Ekim 2013, ss.32-32

D3. Uyar Y, Demiraslan H, Kuk S, Yazar S. HIV Pozitif Hastalarda İntestinal Parazitlerin Araştırılması. XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, DENİZLİ, TÜRKİYE, 29 Eylül - 5 Ekim 2013, ss.134-134

D4. Uyar Y, Yürük M, Erdoğan E, Kuk S, Şahin I, Yazar S. 2011-2013 Yılları Arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı’na Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı, XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, DENİZLİ, TÜRKİYE, 29 Eylül - 5 Ekim 2013, ss.100-100

D5. Uyar Y, Gülger A, Özkan B, Kuk S, Yazar S. Petri Kutularına İşlenen Sanat. XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, DENİZLİ, TÜRKİYE, 29 Eylül - 5 Ekim 2013, ss.90-90

D6. Yazar S, Kuk S, Çetinkaya U, Uyar Y, Sahin I. Leishmania Sp. In Visceral Leishmaniasis Suspected Patients In Kayseri, 1st National Symposium on Vectors and Vector-Borne Diseases with International Participation, NEVSEHİR, TURKIYE, 9-10 Eylül 2012, pp.35-35

E. Konuşmacı Olarak Katıldığı Toplantılar:

E1. Yazar S. Parazitlerde Gen Susturma (Gene Silencing) ve miRNA (mikro RNA) (**Yuvarlak Masa Oturumu**). Uyar Y. Protozoonlarda Gen Susturma. XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, DENİZLİ, TÜRKİYE, 29 Eylül - 5 Ekim 2013.

E2. Yazar S. Ekinokokkozise Moleküler Bakış (**Yuvarlak Masa Oturumu**). Uyar Y. Kistik Ekinokokkoziste moleküler tanıya gerek var mı? 7. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, ORDU, TÜRKİYE, 4-7 Eylül 2014.

F. Aldığı Kurslar ve Katıldığı Eğitim Programları:

- F1.** UMKE İlk Yardım Eğitimi, Bingöl, 2006
- F2.** Aile Hekimliği Sertifika Programı, Mersin, 2008
- F3.** ESWT Uygulama Eğitimi, Ankara, 2009
- F4.** Ozonterapi Uygulama Eğitimi, İstanbul, 2009
- F5.** İş Güvenliği Eğitimi, Kayseri, 2014

G. Katıldığı Bilimsel Toplantılar:

- G1.** XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 28 Eylül - 4 Ekim 2013, Denizli.
- G2.** VII. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 04 - 07 Eylül 2014, Ordu.