



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**LEİSHMANİASİS TANISINA YÖNELİK POLİMERİK
NANOMALZEMELERİN BİOSENSÖRLERDE
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Tuğçe ATICI

Parazitoloji Anabilim Dalı

İzmir 2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**LEİSHMANİASİS TANISINA YÖNELİK POLİMERİK
NANOMALZEMELERİN BİOSENSÖRLERDE
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Parazitoloji Anabilim Dalı
Parazitoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tuğçe ATICI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seray TÖZ

Bornova-İZMİR

2021

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr.

(Danışman)

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

Özet

Leishmaniasis Tanısına Yönelik Polimerik Nanomalzemelerin Biosensörlerde Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Leishmaniasis, farklı türlerdeki *Leishmania* parazitlerinin vektör kum sineği aracılığı ile bulaştığı bir grup hastalıktır. Hastalık insanda parazitin yerleşim yerine göre klinik olarak başlıca kutanöz leishmaniasis, visseral leishmaniasis ve mukozal leishmaniasis olarak isimlendirilmektedir. Türkiye’de yılda 20-30 visseral leishmaniasis ve 2000 civarında kutanöz leishmaniasis hastası bildirilmektedir.

Günümüzde kutanöz leishmaniasis tanısında birtakım sorunlarla karşılaşılmaktadır. Klasik tanı yöntemi olarak mikroskopi yönteminin hassasiyeti düşüktür ve deneyim gerektirmektedir. Kültür yöntemi ise hassasiyetinin düşük olması, yoğun emek gerektirmesi ve zaman alıcı olması nedeniyle çoğu merkezde rutin tanıda kullanılamamaktadır. Modern tanı yöntemi olarak moleküler tanı ile çok hassas ve hızlı tanı konabilmektedir ancak kontaminasyonun engellendiği özel laboratuvar, pahalı ekipman, optimizasyon ve deneyim gerektirdiği için rutin tanıda yaygın olarak kullanılamamaktadır. Antikorların saptandığı serolojik tanının ise hastalığın lokalize olarak deride yerleşmesi nedeniyle hassasiyeti düşük olup, antijen saptanan hızlı tanı testleri ise son yıllarda üretilmiş ve halen deneme aşamasındadır. Hızlı tanı testleri ülkemizde başarılı bulunsa bile ticari olarak alındığında pahalı yöntemler olup rutin tanıda kullanımı mümkün görünmemektedir. Bu nedenlerle özellikle çok pahalı ekipman gerektirmeyen, rutin tanı laboratuvarlarında kullanılacak hassas ve hızlı sonuç veren yeni tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Leishmaniasis tanısında altın standart olarak kabul edilen kültür yönteminin sonuç verilme süresi bir aya kadar uzayabileceğinden, daha kısa sürede yüksek duyarlılıkla tanı olanağı sağlayan bir yöntemin bulunması leishmaniasis tanısında büyük kolaylık sağlayacaktır.

Etkene özgü geliştirilen biyosensörler, bildiğimiz tanı yöntemlerine göre çoğu zaman spesifik ve duyarlı sonuçların pratik ve kısa sürede alınmasını sağlamaları, tekrar kullanılabilir model olarak ya da düşük maliyetle tek kullanımlık şekilde seri olarak üretebilmeleri nedeniyle gelecek vaat eden biyoanalitik sistemlerdir. Çalışmamızda biyosensörlere etken *Leishmania* spp. parazitinine karşı oluşturulmuş monoklonal antikor sabitlenerek parazitin antijeninin tanınması araştırılmış ve optimize edilmiştir.

Diferansiyel Puls Voltametri, Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi ve Döngüsel Voltametri ölçümleri sonucunda biyosensör sisteminin *Leishmania* spp. tayininde oldukça duyarlı olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler; *Leishmania*, biyosensör, nanomalzeme



Abstract

Investigation of The Availability of Polymeric Nanomaterials for The Diagnosis of Leishmaniasis In Biosensors

Leishmaniasis is a group of diseases transmitted by vector sand flies of *Leishmania* parasites of different species. The disease is clinically referred to as cutaneous leishmaniasis, visceral leishmaniasis and mucosal leishmaniasis according to the location of the parasite in humans. Totally 20-30 visceral leishmaniasis and around 2000 cutaneous leishmaniasis patients are reported annually in Turkey, respectively. Currently, a number of problems are encountered in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. As a classic diagnostic method, microscopy is low in sensitivity and requires experience. The culture method, on the other hand, cannot be used in routine diagnosis in most centers due to its low sensitivity, intensive labor and time-consuming. A very precise and fast diagnosis can be made with molecular diagnosis as a modern diagnostic method, however because of the requirement of a special laboratory where contamination is prevented, expensive equipments, optimisation and experience, it cannot be used in routine diagnosis widely. Serological diagnosis of antibodies are low in sensitivity due to the localisation of the lesions in the skin, while rapid diagnostic tests detected antigen have been produced in recent years and are still in the trial stage. Even if rapid diagnostic tests are successful in our country, they are expensive methods commercially and their use in routine diagnosis does not seem possible. For these reasons, new diagnostic methods that do not require very expensive equipment, which provide precise and fast results that can be used in routine diagnostic laboratories, are needed. Since the culture method, which is considered the gold standard in the diagnosis of leishmaniasis, the duration of the result can extend up to one month, the presence of a method that provides diagnosis with high sensitivity in a shorter time will provide great convenience in the diagnosis of leishmaniasis.

Agent-specific developed biosensors are promising bioanalytical systems because they can be produced commercially as a reusable or in a single use as disposable models at low cost, often providing specific and sensitive results in a practical and short time compared to traditional diagnostic methods. In our study, the recognition of the parasite's antigen was investigated and optimized by fixing the *Leishmania* spp. monoclonal antibody to biosensors.

As a result of electrochemical measurements of Differential Pulse Voltametry, Electrochemical Impedance Spectroscopy and Cyclic Voltametry, *Leishmania* spp.

biosensor system has been shown to be very sensitive in determination of the parasite antigen.

Keywords; *Leishmania*, biosensor, nanomaterial



İçindekiler

Özet.....	I
Abstract.....	III
İçindekiler.....	V
Tablolar Dizini.....	VII
Şekiller Dizini.....	VIII
Grafikler Dizini.....	IX
Kısaltmalar Listesi.....	X
1.Giriş.....	1
2.Genel Bilgiler.....	3
2.1. <i>Leishmania</i> Taksonomisi.....	3
2.2. Morfoloji	3
2.3. Yaşam Döngüsü.....	3
2.4. Tanı.....	3
2.4.1. Hastadan örnek alımı.....	4
2.4.1.1. Visseral leishmaniasis.....	4
2.4.1.2. Kutanöz leishmaniasis.....	4
2.4.2. Direkt tanı yöntemleri.....	4
2.4.2.1. Kültür yöntemleri.....	4
2.4.2.2. Mikroskopik inceleme.....	5
2.4.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	5
2.4.3. İndirekt tanı yöntemleri.....	5
2.4.3.1. Deri testi testi (Montenegro test, Leishmanin skin test, LST)	5
2.4.3.2. İndirekt floresan antikor testi (IFAT)	5
2.4.3.3. Enzime bağlı immüno-sorbent testi (ELİSA)	6
2.4.3.4. Rekombinant K39 (rK39 hızlı tanı testi(immunokromatografik test)	6
2.4.3.5. Doğrudan aglütinasyon testi (DAT)	6
2.4.3.6. Hızlı aglütinasyon tarama testi (FAST)	6
2.4.3.7. Western blot.....	7
2.5. Sensörler.....	7
2.5.1. Elektrokimyasal sensörler sistemleri.....	7
2.5.2. Voltametrik ölçümler.....	7
2.5.3. Dönüşümlü voltametri (CV)	8
2.5.4. Diferansiyel puls voltametri (DPV)	8

2.5.5. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS)	8
2.6. Polimerik nanomalzemeler ve tıpta kullanımları.....	8
3. Gereç ve Yöntem.....	9
3.1. Gereç.....	10
3.1.2. Kimyasal maddeler.....	10
3.1.3. Cihazlar ve sistemler.....	10
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1. Parazit kültürü ve monoklon antikor.....	11
3.2.2. Leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli sensör çalışmaları.....	12
3.2.3. Biyosensörün tasarlanması, elektrokimyasal yüzey karakterizasyonu ve sinyal cevapları.....	12
4. Bulgular.....	14
4.1. Leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli biyosensörün yüzey karakterizasyonu.....	14
4.1.1. Leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli biyosensör ile antijen analizi.....	16
4.1.2. Leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli biyosensör yüzeyinin tekrarlanabilirliği.....	18
4.1.3. Leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli biyosensör yüzeyinin dedeksiyon limiti.....	18
4.1.4. Leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli biyosensör Yüzeyine girişim etkisi.....	19
4.1.5. Leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli biyosensör sisteminin sonuçlarının taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenerek doğrulanması.....	20
5. Tartışma.....	21
6. Sonuç ve Öneriler.....	31
7. Kaynaklar.....	32
Teşekkür.....	40
Özgeçmiş.....	41

TABLÖLAR

Tablo 1. Kullanılan cihazlar ve amaçları.....	10
--	----



ŞEKİLLER

Şekil 1. Biyosensör platformunun aşamaları.....11

Şekil 2. (A) Boş elektrot (B) p(HEMA-MAH-Zn) nanopolimeri (C) p(HEMA-MAH-Zn)/Ab (D) p(HEMA-MAH-Zn)/Ab/Ag Elektron mikroskobu görüntüleri.....19



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. (A) Boş GCE, GCE/p(HEMA-MAH-Zn), GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor, GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor/L. Antijen yüzeylerinin CV diyagramı. (B) Modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinin Nyquist diagramları, (Ölçümler, 5,0 nM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) ve 0,1 M KCl çözeltileri içeren 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponunda gerçekleşmiştir).....	14
Grafik 2. <i>Leishmania major</i> antijen analizi için Boş GCE, GCE/p(HEMA-MAH-Zn), GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor, GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor/ <i>Leishmania</i> antijen yüzeylerinin DPV pikleri (Ölçümler, 5,0 nM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) ve 0,1 M KCl çözeltileri içeren 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponunda gerçekleşmiştir).....	16
Grafik 3. <i>Leishmania major</i> analizi için standart grafiği.....	17
Grafik 4. Biyosensör Yüzeyine Girişim etkisi.....	18

Kısaltma Listesi

DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
KL	:	kutanöz leishmaniasis
VL	:	visseral leishmaniasis
MKL	:	mukozal leishmaniasis
PKDL	:	post Kala-azar dermal leishmaniasis
DKL	:	diffüz kutanöz leishmaniasis
KanL	:	kanin leishmaniasis
<i>L.</i>	:	<i>Leishmania</i>
IFAT	:	indirek floresan antikor testi
WB	:	Western Blotting
kDNA	:	kinetoplastik DNA
LRV	:	<i>Leishmania</i> RNA virüsü
PSG	:	promastigot sekretuar jel
PZR	:	polimeraz zincir reaksiyonu
NNN	:	Novy-MacNeal-Nicolle
rRNA	:	ribozomal RNA
SSU	:	küçük alt birim
ITS	:	internal transcribed spacer
LST	:	leishmanin skin test
DAT	:	direkt aglütinasyon testi

FAST	:	hızlı aglütinasyon tarama testi
CV	:	döngüsel voltametri
DPV	:	diferansiyel puls voltametri
ELİSA	:	enzime bağlı immüno-sorbent testi
HCF	:	hidrofluorocarbon
GCE	:	camımsı karbon elektrot
C_{dl}	:	çift tabaka kapasitansı
R_s	:	çözelti direnci
Z_w	:	Warburg impedansı
R_{ct}	:	yük transfer direnci
Ag	:	antijen
Ab	:	antikor

1.Giriş

Leishmaniasis, farklı türlerdeki *Leishmania* parazitlerinin vektör olan kum sineği aracılığı ile bulaştığı bir grup hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün verilerine göre ihmal edilen hastalıklar arasında sıtmadan sonra dünyada en çok ölüme sebep olan ikinci paraziter hastalıktır. Hastalık insanda parazitin yerleşim yerine göre klinik olarak başlıca kutanöz leishmaniasis (şark çıbanı; KL), visseral leishmaniasis (Kala-azar; VL) ve mukozal leishmaniasis (MKL) olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır (Steverding D., 2017; Osman ve ark., 2017).

Visseral leishmaniasisin en önemli rezervuarı olan köpeklerde kanin leishmaniasis (KanL), insanlardaki hastalığa göre çok daha yüksek oranlarda görülmekte ve asemptomatikten yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan şiddetli bulgular gösteren hastalığa kadar geniş bir yelpazede seyredebilmektedir. Bu nedenle veteriner hekimlik alanında önemli bir sağlık problemidir ve tanı ve tedavideki tüm buluşlar ve gelişmeler bu alana da uygulanabilmektedir (Tamer ve ark., 2008).

Türkiye'de insanlarda leishmaniasis bildirim zorunlu enfeksiyon hastalıkları arasında olup, VL ve KL olmak üzere iki klinik şekli görülmektedir (Omondi ve ark., 2020). Suriyeli misafirler dışında, Türkiye'de yılda 20-30 kala-azar ve 2.000 civarında şark çıbanı hastası bildirilmektedir. Kala-azar daha çok Ege, Akdeniz gibi kıyı bölgelerinde şark çıbanı ise sıklıkla Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde görülmektedir (Gürel ve ark., 2012).

Hastalığın en ciddi klinik şekli olan VL, dalak, karaciğer ve kemik iliği gibi çeşitli iç organları etkiler ve tedavi edilmediği takdirde ölüm görülebilir (Gürel ve ark., 2012). Şark çıbanı ise kum sineğinin ısırmasından sonra birkaç hafta ile ay içerisinde deride sivilce şeklinde başlayıp daha sonra nodüler veya ülserle lezyona dönüşen bir yara ile karakterizedir. Son yıllarda birçok ülkede, hastalıktan korunma kampanyaları ve hastaların tanısı, tedavisi ve ilacın bulunabilmesinde zorluklar yaşanmakta, özellikle de kolay, fazla deneyim gerektirmeyen tanı yöntemlerine yönelik çalışmalar hız kazanmaktadır (Bailey ve ark., 2017). Leishmaniasis hastalarının hızlıca tespit edilmesi ve tedavilerinin tamamlanması sayesinde vektör kum sineklerinin bu hastalardan paraziti alarak sağlam kişilere bulaştırması engellenebilir. Hastalığın tanısı klinik bulgular, direkt parazitin görüldüğü mikroskopik tanı, kültür, parazitin DNA'sını saptayan yöntemler ve daha nadir olarak ta hastada parazite karşı oluşan

antikorların saptandığı serolojik yöntemler ile konulmaktadır. Hastalığın klinik bulguları birçok hastalık ile benzerlik gösterdiği için klinik tanı etkin değildir. Klasik tanı yöntemi olan mikroskopik tanının hassasiyeti düşüktür ve deneyim gerektirmektedir. Kültür yönteminin ise laboratuvar iş yükü çok fazla olup, sonuç verme süresi bir aya kadar uzayabilmekte ve sekonder enfeksiyonların varlığında kontaminasyon nedeniyle hassasiyet düşmektedir. Kültür yöntemi rutin laboratuvarlarda tanı yöntemi olarak uygulanmamaktadır. Moleküler ve serolojik yöntemler ise donanımlı laboratuvar ve deneyim gerektirmekte ve mikroskopik tanı yöntemine göre pahalıya mal olmaktadır. Bu nedenle sadece referans laboratuvarlarında uygulanmaktadır. Bir diğer tanı yöntemi olan hızlı tanı testi ile tanı konabilse de bu testler de oldukça pahalı ve sensitivitesi bölgedeki endemik türe bağlı değişebilmektedir (Özoğlu ve ark., 2017). Ülkemizde şark çıbanı tanısının hastalığın erken döneminde yapılamaması veya diğer deri hastalıklarına ait farklı tanılar konup gözden kaçırılması hastalığın yaygınlaşmasında önemli rol oynamaktadır (Uzun ve ark., 2018). Bu nedenle, daha kısa sürede yüksek duyarlılıkla tanı olanağı sağlayan, rutin laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilecek, yüksek düzeyde deneyim gerektirmeyen tanı yöntemlerinin geliştirilmesi büyük kolaylık sağlayacaktır. Biyosensörler; yüksek duyarlılık, kısa ölçüm süresi, kişi kaynaklı hataların azaltılması, ölçüm ve analiz giderlerinin düşük olması, otomatik ölçüm ve ayar sistemlerinin devreye sokulması gibi üstünlüklere sahiptir. Analizlenecek maddenin türüne göre sensörler, enzim sensörleri, mikrobiyal sensörler, immünosensörler ve DNA sensörleri gibi gruplara da ayrılabilir. Enzim sensörleri; sensör sisteminin algılayıcı kısmındaki örnekte enzim varlığında, enzimin substratı ile bir araya geldiği zaman meydana gelen reaksiyon sonucu miktarı azalan veya artan maddeleri tayin etmeye yarayan sensör çeşididir. Mikrobiyal sensörler algılayıcı kısımda canlı mikrobiyal hücrelerin varlığında mikroorganizmaların metabolik süreçleri sonucunda oluşan ürünlerden faydalanılarak analitin sinyale dönüştürüldüğü sistemlerdir. İmmünosensörler algılayıcı kısımda bulunan antijen yardımıyla antikorun veya antikor yardımıyla antijenin tayin edildiği sistemlerdir. DNA sensörleri ise; algılayıcı kısımda aranan özgün DNA'ya hibridize olarak tanınmasını sağlayabilecek kısa DNA parçalarının (primerlerin) kullanıldığı ve DNA miktarını tayin etmeye yarayan sensör sistemleridir. Algılama şekillerine göre sensörler; elektrokimyasal, optik, termometrik, piezoelektrik ve manyetik özellikte olabilmektedir (Osibote ve ark., 2011).

2.Genel Bilgiler

2.1. *Leishmania* taksonomisi

Leishmania, protozoa aleminin, zooflagellata sınıfının, kinetoplastida takımının, tripanosomatidae ailesinde yer almaktadır (Banuls ve ark., 2007; Vannier-Santos ve ark., 2002). *Leishmania* parazitlerinin sınıflandırılması önceleri vektörler, coğrafi dağılım, doku tropizmi ve klinik belirti gibi ekobiyolojik kriterlere dayanıyordu (Banuls ve ark., 2007; Vannier-Santos ve ark., 2002; Gardener ve ark., 1974).

2.2.Morfoloji

Kum sineğinde bulunan promastigotlar, 5-20 x 1-4 µm boyutlarında bir hücre gövdesine ve 20 µm uzunluğunda bir ön kamçıya sahip uzun hücrelerdir. Omurgalı konakta bulunan amastigotlar, yaklaşık 2 x 4µm boyutlarında oval hücrelerdir. Her iki gelişim şeklinde de kamçı (flagellum) bir cepten çıkar ve amastigot şeklinde neredeyse tamamen onunla sınırlıdır, bu nedenle sadece elektron mikroskobu ile gözlemlenir (Vannier-Santos ve ark., 2002).

2.3.Yaşam döngüsü

Leishmania spp., iki temel yaşam döngüsüne sahip digenetik parazitlerdir: vektör kum sineğinin intestinal sisteminde promastigot ve omurgalı konağın mononükleer fagositik hücrelerinin içinde amastigot olarak bulunmaktadır (Banuls ve ark., 2007). Parazitin yerleştiği organlara göre oluşan klinik bulgularda değişmekte ve hastalık KL, MKL, ve VL gibi isimlendirilmektedir.

2.4.Tanı

Enfeksiyon ısırık bölgesinde küçük bir kızarıklık ile başlar ve KL'de kızarıklık açık ülser dönüşür veya VL'de parazitin dalak ve karaciğer gibi organlara yayılımı ile enflamatuar reaksiyona neden olur. Enflamatuar reaksiyonlar, parazit türü ve konak bağışıklığı gibi faktörlere bağlıdır (Reithinger ve ark., 2007). Şu anda, KL rutin tanısı

genellikle klinik ve epidemiyolojik parametrelere dayanmakta, kesin teşhis hala kültür veya yayma örneklerinde parazitin gözlemine dayanmaktadır. Klinik bulgular, konağın bağışıklık tepkisine ve parazit türüne bağlı değişebilir ve *Leishmania* türünün tanımlanması, tıbbi takibin daha iyi yönlendirilmesini sağlar. Leishmaniasis teşhisi için kullanılan yöntemlerin sınırlılıkları bulunmaktadır. Kullanılan yöntemler, mikroskopta dokularda parazitin gösterilmesi, hasta serumunda *Leishmania* antikorlarının tespiti, doku, kan veya idrar örneklerinde parazit antijeninin tespiti, doku örneklerinde parazit DNA'sının tespiti ve hücre aracılı spesifik bağışıklığın tespitidir (Thakur ve ark., 2002).

2.4.1.Hastadan örnek alımı

2.4.1.1.Visseral leishmaniasis

Lenf bezi, dalak, karaciğer gibi parazitin yerleştiği organlardan aspirasyon ve biyopsi örnekleri alınarak kültür, mikroskopik tanı ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi direkt tanı yöntemleri ve serum örneği ile de indirekt serolojik tanı yöntemleri uygulanır (Dogan ve ark., 2008; Özbel ve Töz, 2011).

2.4.1.2.Kutanöz leishmaniasis

Derideki lezyonun sağlam deriyle birleştiği kenarından lezyon %70'lik alkol ile silinip başparmak ve işaret parmakları arasında lezyon kenarı sıkıştırılarak kansız hale getirilir ve bistüri, insülin enjektörü veya lanset ile alınan ilk kanlı örnek silinir ve sonraki gelen eksuda sıvısından örnek alınarak yukarıda VL'de anlatıldığı gibi kültür, mikroskopik bakı ve PZR yöntemleri ve hastanın serum örneği ile de serolojik yöntemler uygulanır (Çulha ve ark., 2014).

2.4.2.Direkt tanı yöntemleri

2.4.2.1.Kültür yöntemleri

NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) besiyerinde promastigotların üretilmesi laboratuvar tanısında altın standart yöntemler arasında bulunmaktadır. Sodyum klorür ve agar distile su içinde homojenize edilerek otoklavda sterilize edilir ve soğutulur. Daha sonra

içerisine defibrine hayvan veya insan kanı eklenir ve eğik biçimde donması sağlanır. Besiyeri kullanılacağı zaman içerisine serum fizyolojik veya %10 FCS içeren RPMI 1640 besiyeri eklenir (Gökmen ve ark., 2015).

2.4.2.2 Mikroskopik inceleme

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan doku yayma preparatlarının mikroskopik incelemesi ile tek bir amastigotun gösterilmesi bile hastalığın pozitif tanısı için yeterlidir. Duyarlılığı örneğin kalitesine bağlı düşük olabilmektedir. Ayrıca, amastigotların belirlenmesi önemli ölçüde gözlemcinin deneyimine bağlıdır (Thakur ve ark., 2020).

2.4.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Leishmania parazitlerinin tespiti ve tanımlanması amacıyla DNA temelli teknikler üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Biyopsiler, lenf düğümü aspiratları, kemik iliği ve kan dahil olmak üzere birçok farklı örnekte parazit ve türü tanımlanabilmektedir (Wilson SM., 1995).

2.4.3. İndirekt tanı yöntemleri

2.4.3.1. Deri testi (Montenegro test, Leishmanin skin test, LST)

Deri testi, bir bölgede yaşayan kişilerin parazitle karşılaşma oranlarının tespit edilmesinde önem taşımaktadır, ancak uygulamasında vücuda antijen verilmesi gerektiği için Sağlık Bakanlığı'ndan izin alınması gereklidir ve Türkiye'de uygulanmamaktadır. İnaktif promastigot antijeni deriye enjekte edilir ve 48 saat sonunda reaksiyon bölgesi gözlemlenir (Sadeghian ve ark., 2013).

2.4.3.2. İndirekt floresan antikor testi (IFAT)

İndirekt floresan antikor testinde, *Leishmania* promastigotları antijen olarak kullanılır. Dezavantajları değerlendiren kişiye bağlı subjektif bir test olması, deneyimli personel gerektirmesi, zaman alıcı ve pahalı olmasıdır. Kutanöz leishmaniasis hastalarında,

antikor titrelerinin genellikle VL hastalarında bulunanlardan daha düşük olduğuna dikkat edilmelidir. Hassasiyetinin yüksek olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır ve tedavinin etkinliği değerlendirilebilir (Kar K., 1995).

2.4.3.3.Enzime bağlı immüno-sorbent testi (ELİSA)

Enzime bağlı immüno-sorbent testi, *Leishmania*'nın immünolojik tanısı için yaygın kullanılan testlerdendir. Geleneksel olarak *in vitro* olarak çoğaltılan promastigotlardan antijen hazırlanır ve en az 30 somatik antijen ve birkaç yüzey bileşeninden oluşan bir repertuar içerir. Tüm parazitin eriyik antijeninin kullanıldığı ELISA, daha yüksek bir duyarlılığa sahiptir. Bugüne kadar, çoğu immünolojik tanı yönteminde hem aynı aile içindeki türlerin hem de filogenetik olarak uzak mikroorganizmaların çapraz reaksiyon sorunu nedeniyle tanıda zorluk yaşanabilmektedir (Kar K., 1995).

2.4.3.4.Rekombinant K39 (rK39 hızlı tanı testi (immunokromatografik test)

Herhangi bir özel deneyime ihtiyaç duyulmadan saha koşullarında kullanılmak üzere basit ve doğru bir teste ihtiyaç duyulduğundan, rekombinant K39 (rK39) antijenine dayanan hızlı bir immünokromatografik testi geliştirilmiştir (Özbel ve Töz, 2011)

2.4.3.5.Doğrudan aglütinasyon testi (DAT)

Son 15 yılda yapılan çalışmalar ile DAT'ın, yüksek seviyelerde duyarlılık ve performans kolaylığını birleştiren önemli bir serolojik tanı aracı olduğu kanıtlanmıştır. Ancak bu test ile enfeksiyon zamanı belirlenememektedir (Özbel ve Töz, 2011).

2.4.3.6.Hızlı aglütinasyon tarama testi (FAST)

Son zamanlarda, DAT'ın değiştirilmiş bir versiyonu olan hızlı aglütinasyon tarama testi (FAST) geliştirilmiştir. Bu test, temel olarak sonuçlarının üç saat içinde alınabildiği, tek bir serum dilüsyonu kullanmak üzere tasarlanmıştır. Test, özellikle salgın durumlarında ve büyük popülasyonların taranması için geliştirilmiştir (Özbel ve Töz, 2011).

2.4.3.7. Western blot

Serolojide kullanılan diğerk bir tanı yöntemi ise western blot yöntemidir. Bu yöntem serolojik tanıda denenmiş ve oldukça hassas ve özgül olduğu bildirilmiş, bant modeli hastalık evreleri ile ilişkilendirilmiştir (Ravindran ve ark., 2004).

2.5. Sensörler

Biyosensör, belirli bir hedef analitin varlığında bir numuneyi analiz etme işlevi gören bir cihazdır (Nguyen ve ark., 2019). Biyosensör kullanmanın genel amacı, belirli bir kimyasalın veya bir dizi kimyasalın konsantrasyonu ile orantılı bir elektrik sinyali üretmektir (Powner, Yalcinkaya., 1997).

2.5.1. Elektrokimyasal sensör sistemleri

Kimyasal sensörlerin bir alt sınıfı olan elektrokimyasal biyosensörler, elektrokimyasal dönüştürücülerin düşük tespit limitleri ile gösterilen hassasiyetini, biyolojik tanıma süreçlerinin yüksek özgüllüğü ile birleştirir. Bu cihazlar, hedef analit ile seçici olarak reaksiyona giren ve incelenen analitin konsantrasyonu ile beraber bir elektrik sinyali üreten biyolojik bir tanıma elemanı (enzimler, proteinler, antikorlar, nükleik asitler, hücreler, dokular veya reseptörler) içerir (Ronkainen ve ark., 2010).

2.5.2. Voltametrik ölçümler

Voltametrik ölçümler, bir çalışma elektrodunun, bir referans elektroda karşı uygulanan potansiyel akımı ölçerek karakterize edilir. Akım, çalışan elektrotta bir elektrokimyasal indirgeme veya yükseltgenme yoluyla oluşan elektrolizin sonucunda oluşmaktadır. Elektroliz akımı, moleküllerin elektroda kütle taşıma hızı ile sınırlıdır. Voltametri terimi, potansiyelin belirli bir potansiyel aralığında tarandığı teknikler için kullanılır. Mevcut yanıt genellikle analit konsantrasyonu ile orantılı bir tepe veya platodur (Ronkainen ve ark., 2010).

2.5.3. Döngüsel Voltametri (CV)

Döngüsel voltametri, potansiyel dalga şekli kullanarak sabit bir çalışan elektrotun potansiyelinin doğrusal olarak taranmasından oluşur. Döngüsel voltametri'nin etkinliği, indirgenme yükseltgenme davranışını geniş bir potansiyel aralıkta hızlı bir şekilde gözlemlene kabiliyetine dayanmaktadır. Kullanılan elektrot, redoks işlemi tarafından üretilen akımı ölçer ve uygulanan potansiyele karşı bir akım grafiği oluşturur (Hoyos-Arbeláez ve ark., 2017; Gupta ve ark., 2011).

2.5.4.Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)

Diferansiyel puls voltametri tekniği sabit büyüklükteki pulsların doğrusal bir potansiyel rampası üzerine yerleştirilmesidir. Diferansiyel Puls Voltametri'de dönüş akımı pulsu uygulamasından önce ve puls ömrünün sonlarında olmak üzere iki kere ölçülür ve birinci akım ikinciden çıkarılır. Aradaki fark ve uygulanan potansiyele göre grafik oluşturulur. Bu grafik, saptanmak istenen molekülün konsantrasyonuyla doğru orantılı sonuç vermektedir (Hoyos-Arbeláez ve ark., 2017).

2.5.5.Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal impedimetrik tabanlı bir biyosensörde, elektrotun empedansı ölçülebilir bir yanıtıdır. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi, modifiye edilmiş yüzeylerde meydana gelen biyo-tanım olayları nedeniyle ara yüz özelliklerindeki değişiklikleri araştırmak için kullanılır. Elde edilen empedans yanıtları daha sonra elektrokimyasal işlemlerin kantitatif parametrelerini belirlemek için kullanılabilir (Nguyen ve ark., 2019; Ronkainen ve ark., 2010).

2.6.Polimerik Nanomalzemeler ve Tıpta kullanımları

Polimerik nanomalzemelerin benzersiz fizikokimyasal özellikleri (nano ölçekli boyut, geniş yüzey alanı-kütle oranı ve yüksek reaktivite) ve sistemlere sundukları spesifik özellikler nedeniyle birçok uygulama alanında kişiselleştirilmektedir.

Nanotıpta kullanımları, terapötik ve tanı yöntemlerini büyük ölçüde değiştirmiştir, çünkü bunlar moleküler düzeyde hassas bir şekilde tasarlanmış malzemelerdir (Vasile C., 2019).



3.Gereç ve Yöntem

3.1.Gereç

3.1.1.Kimyasal maddeler

Bu tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler aşağıdaki gibidir:

p(HEMA-MAH-Zn) polimerik nanomalzemesi Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya bölümünden Prof.Dr. Sinan AKGÖL'den temin edildi. *Leishmania major*'un özgül bir proteinine karşı hazırlanmış monoklonal antikor Tokyo Üniversitesi Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi Moleküler İmmünoloji Laboratuvarı Öğretim Üyesi Yardımcı Doçent Chizu Sanjoba'dan temin edildi. Sensör çalışmalarında kullanılan solüsyonun hazırlanması için gerekli olan Glutaraldehit (%25 GA), potasyumhekzasiyanoferrat (III) [K₃Fe(CN)₆] , sığır serum albumini (BSA), ve diğer kimyasallar Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya bölümünden Prof.Dr. Suna TİMUR'dan temin edildi.

3.1.2.Cihazlar ve sistemler

Bu tez kapsamında kullanılan cihaz ve sistemler şunlardır:

Diferansiyel puls voltametri (DPV) ve Döngüsel voltametri (CV) ölçümleri PalmSens potansiyostat (The Netherlands) sensör cihazı ile yapılmıştır. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ölçümleri CHI 6005 C elektrokimyasal analiz edici cihaz (CH Instruments Incorporation, Austin, Texas, USA) ile gerçekleştirilmiştir (tablo 1). Ölçümlerin gerçekleştirilmesi için üçlü elektrod sistemi kullanılmıştır. Çalışma elektrotları ve yardımcı elektrotlar karbon, referans elektrot ise gümüş olarak (Metrohm, Switzerland) temin edilmiştir. Yapılan deneysel çalışmaların hepsi oda koşullarında yapılmıştır.

Cihaz	Yapılan ölçüm	Amaç
PalmSens	DPV	Analitik performans
PalmSens	CV	Yüzey modifikasyonu
CHI 6005 C	EIS	Yüzey modifikasyonu

Tablo 1. Kullanılan cihazlar ve amaçları

3.2.Yöntem

Bu tez kapsamında leishmaniasis tanısına yönelik polimerik nanomalzemenin biyosensörde kullanılabilirliğini araştırmak için elektrokimyasal sensör platformu tasarlanmıştır.

3.2.1.Parazit kültürü ve monoklon antikor

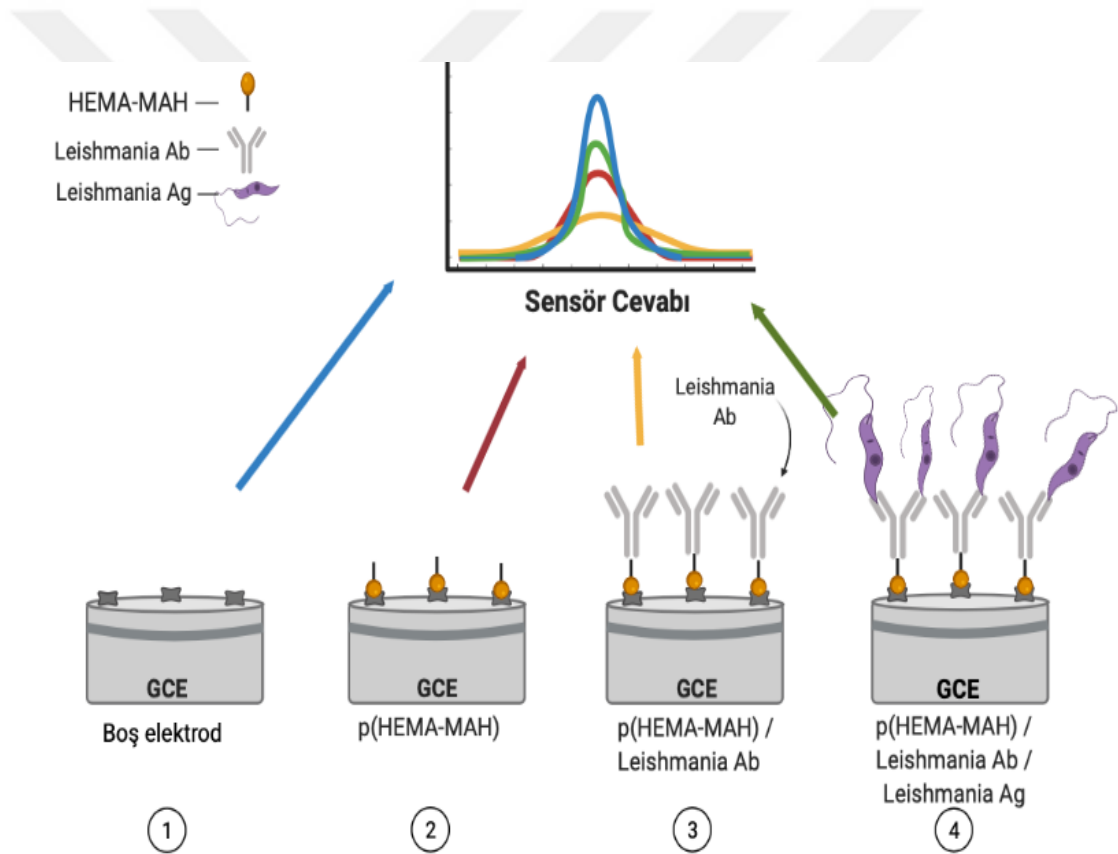
Parazit kültürü için promastigotlar NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) besiyerinde üretilmiştir. Bir gr NaCl ile 4 gr agar 200 mL distile su içinde homojenize edilerek otoklavda sterilize edilmiş ve 56 °C'ye soğutulmuştur. Daha sonra içerisine 30 mL defibrine insan kanı eklenmiş ve eğik biçimde donması sağlanmıştır. Besiyeri kullanılacağı zaman içerisine 1 mL %10 FCS içeren RPMI 1640 besiyeri eklenmiştir (Gökmen ve ark., 2015). Çalışmamızda kullanılmak üzere, EP189 (*Leishmania infantum*), EP200 (*Leishmania tropica*) ve ASKH (*Leishmania major*) suşları NNN besiyerinde idame ettirildikten sonra %10 FCS içeren RPMI 1640 besiyerinde 3 mL ile başlanıp, 2 günde bir iki kat miktarına artırılarak, 16×10^8 sayıda üretilmiştir. Daha sonra bu parazitleri eriyik antijen haline getirmek için 3 kez PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama yapılırken +4°C de 4000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiş ve üst kısmı dökülerek PBS eklenmiş ardından parazitlerin hücre duvarlarının parçalanması

için için 4 kez dondurulup çözöürölmüştür. Ardından 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant toplanmıştır.

Çalışmamızda kullanılmak üzere temin ettiğimiz monoklon antikor 1 mL saf suda çözödürölerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. Leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli sensör çalışmaları

Bu kısımda; ihmal edilmiş tropikal hastalıklar arasında bulunan leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli biyosensör çalışmaları yapılmıştır. Aşamaları şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Biyosensör platformunun aşamaları

3.2.3. Biyosensörün tasarlanması, elektrokimyasal yüzey karakterizasyonu ve sinyal cevapları

Camımsı karbon elektrodunun (GCE) yüzeyi %10 luk fosfat tampon-etanol çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından Prof.Dr.Sinan AKGÖL ve ekibi tarafından sentezlenip karakterizasyon çalışmaları yapılan P(HEMA-MAH-Zn) polimeri GCE yüzeyine 2 ul damlatılmış ve oda sıcaklığında 45 dk kurumaya bırakılmıştır. Hemen ardından 2 ul *Leishmania* antikorunu GCE yüzeyine damlatılmıştır. GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Anti *Leishmania* Ab'un duyarlılığını test etmek için bilinen konsantrasyonlarda 5 ul *Leishmania* eriyik antijeni (Ag) damlatılıp oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Ölçümlerin öncesinde; elektrot yüzeylerinde bağlanmayan maddeleri uzaklaştırmak için her basamaktan sonra fosfat tamponla yıkama yapılmıştır. Tüm çalışma süresince tasarlanan sensörün analitik performansı ile ilgili tüm veriler DPV ölçümleri ile -0,2 ile +0,6 aralığındaki potansiyel uygulanıp, redoks prob (50 mM fosfat tampon pH:7,4 ; 0,1 M KCL; 0,0164 gr HCF) kullanılarak alınmıştır. Analitin *Leishmania* Ag'nin seçici olarak GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Anti *Leishmania* Ab'unun yüzeye bağlanması sonunda elektron transferi kısıtlandığından dolayı bir azalma, yüzeye damlatılan *Leishmania* Ag'si yüzey yükleri sonucunda konsantrasyona bağlı olarak elektron transferinde bir artış olmaktadır. Sensör cevabı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\Delta I = I_0 - I_c$$

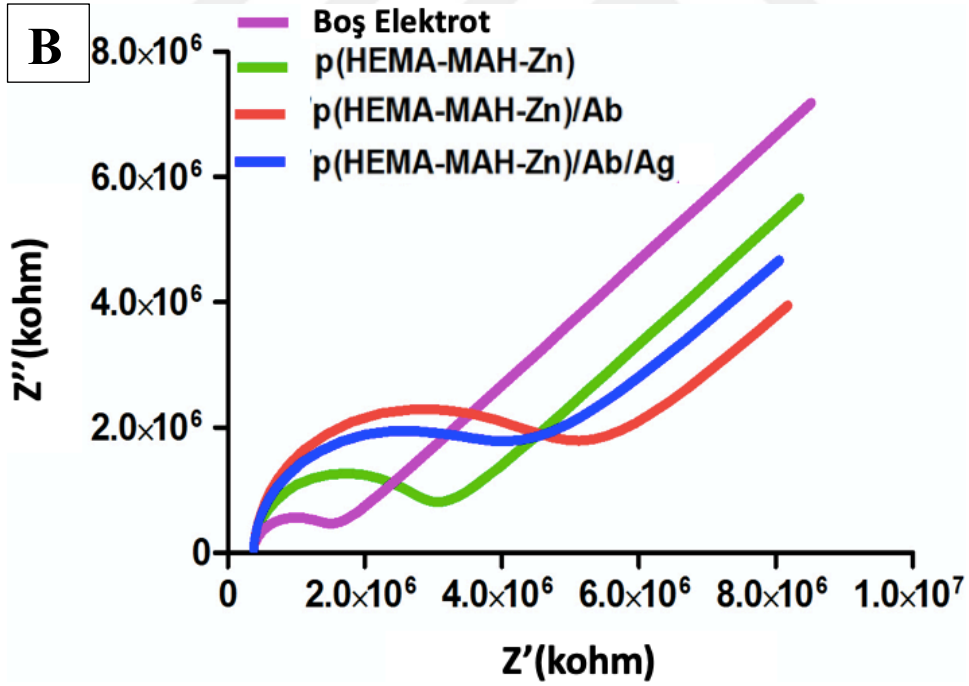
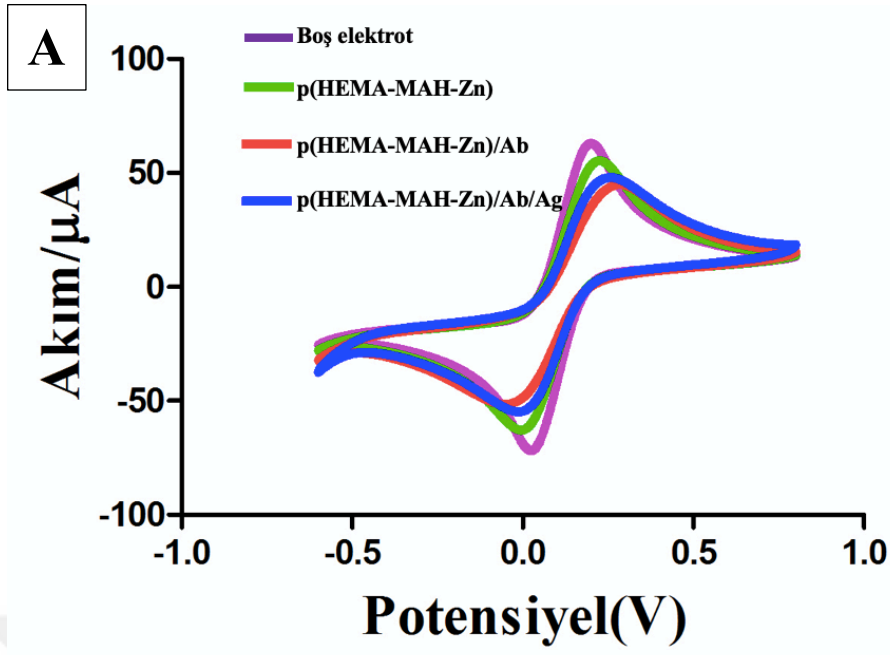
Bu formüle göre I_0 ; *Leishmania* Ag'si bağlanmadan önce alınan sinyal, I_c ise GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Anti *Leishmania* Ab'nin yüzeyine bağlanan *Leishmania* Ag'sinin konsantrasyonuna bağlı alınan sinyaldir. *Leishmania* teşhisine yönelik hazırlanan sensörde antijen uygulama öncesi ve sonrası analitik performansını değerlendirmek için DPV tekniği kullanılmıştır. Elektrodun yüzey karakterizasyonu CV ve EIS teknikleri kullanılarak kanıtlanmıştır. CV ölçümleri -0,2V ile +0,6V potansiyel aralığında, 50mV/s tarama hızında alınmıştır. EIS ölçümleri 0,03-10 kHz frekans aralığında ve potansiyel +0,18V olacak şekilde yapılmıştır.

Leishmaniasis teşhisine yönelik hazırlanan biyosensörün doğrulanması taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar ile *leishmaniasis* teşhisine yönelik hazırlanan antikor temelli biyosensörün örnek uygulama sonuçları karşılaştırılmıştır.

4.Bulgular

4.1.Leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli biyosensörünün yüzey karakterizasyonu

Tezin bu kısmında p(HEMA-MAH-Zn) polimeri adsorpsiyonu ve antikor ile post-modifikasyonu elektrokimyasal ve mikroskopik tekniklerle karakterize edilmiştir. *Leishmania* teşhisine yönelik hazırlanan sensörde analitik performansı gözlemlemek için DPV tekniği, yüzey modifikasyonu için CV ve EIS teknikleri kullanılmıştır. İlk olarak boş GCE yüzeyi ve p(HEMA-MAH-Zn), p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor, p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor/L. antijen gibi modifiye edilmiş GCE yüzeyinin CV diagramlarında akım cevapları karşılaştırılması yapılmıştır. CV diagramlarında; anodik ve katodik akım piklerinde kademeli olarak azalma gözlenmiş yalnız antijen eklendiğinde bir artış gözlenmiştir. Elektrot yüzeyinin anodik pik akımları sırasıyla şu şekildedir; boş GCE yüzeyi için 75,38 μA , GCE/p(HEMA-MAH-Zn) için 66,19 μA , GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor için 51,64 μA , GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor/L. Antijen için 55,14 μA bulunmuştur. Elektrot yüzeylerinin katodik pikleri sırayla şu şekildedir; Boş GCE yüzeyi için -76,16 μA , GCE/p(HEMA-MAH-Zn) için -65,59 μA , GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor için -50,94 μA , GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor/L. antijen için -56,407 μA bulunmuştur. Bu değerler grafik 1 de verilmektedir. Grafik 1 de modifiye edilmeden önce GCE'nin modifiye edilen yüzeylere göre daha yüksek oksidasyon ve redüksiyon akım pikleri bulunmaktadır. Tanıyıcı molekül olan *L. major* monoklonal antikorunun elektroda bağlanmasını sağlayan p(HEMA-MAH-Zn) nanomalzemesi elektrot yüzeyine damlatıldıktan sonra CV diyagramında bariz bir şekilde anodik katodik piklerin azaldığı görülmüştür. P(HEMA-MAH-Zn) nanomalzeme kapladıktan sonra üzerine antikorun bağlanması; antikorun NH₂- grubuyla p(HEMA-MAH-Zn) nanomalzemenin NH₂- grubu arasında Zn çapraz bağlayıcı ile gerçekleşmektedir. Bu sayede elektrot yüzeyine kaplanmış olan malzemeler, redoks probunun girişi için bir blok oluşturduğu için her modifikasyon aşamasından sonra redoks piklerinde azalma olduğu görülmüştür.

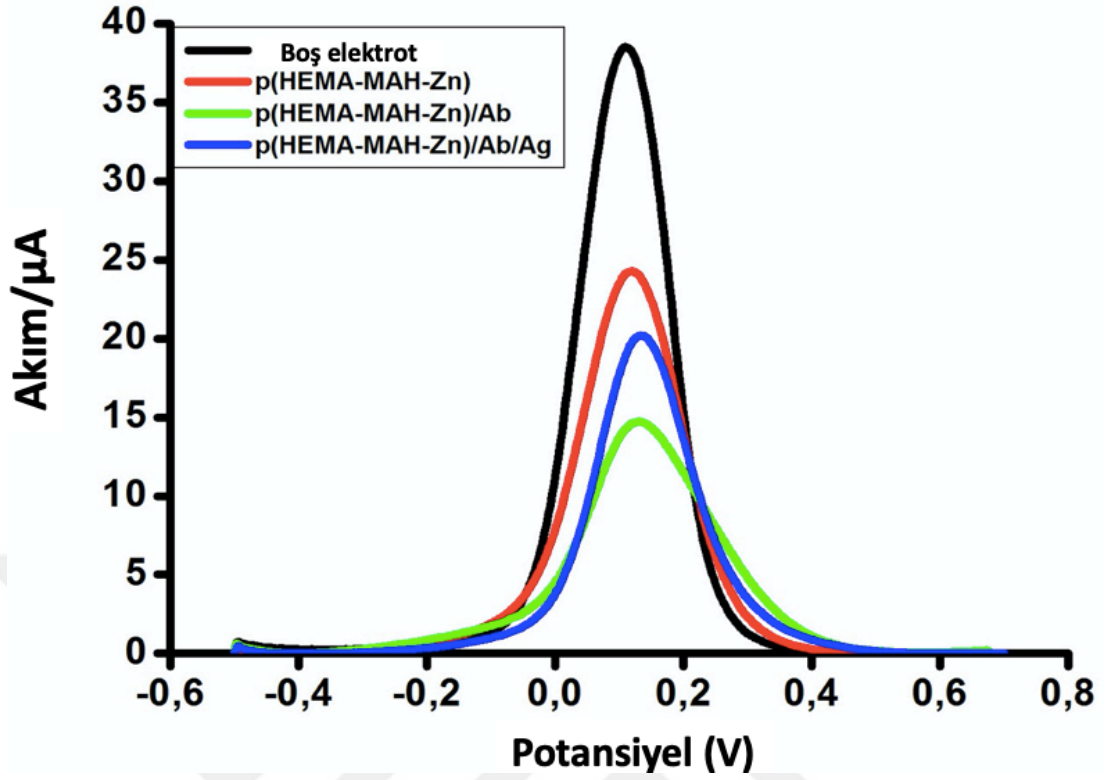


Grafik 1. (A) Boş GCE, GCE/p(HEMA-MAH-Zn), GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor, GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor/L. Antijen yüzeylerinin CV diyagramı. **(B)** Modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinin Nyquist diagramları, (Ölçümler, $5,0 \text{ nM } \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) ve $0,1 \text{ M KCl}$ çözeltileri içeren 50 mM sodyum fosfat ($\text{pH } 7,0$) tamponunda gerçekleşmiştir).

Döngüsel voltametri ölçümleri birlikte EIS ölçümlerinde elektroanalitik arayüzleri bağlanmanın başarılı olduğunu göstermiştir. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi yöntemi yüzey karakterizasyonunun daha iyi kanıtlanması için kullanılmıştır. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi ile yapılan ölçümlerin tümü, Randle eşdeğer devre modeli şeklinde düzenlenerek elektron transfer direncini belirten yarım çember Nyquist çizimi ile gösterilmiştir. Bütün EIS ölçümleri; çift tabaka kapasitansı (C_{dl}), çözelti direnci (R_s) ferrisiyanid redoks mediyatörün difüzyon kontrollü olduğunu belirten Warburg impedansı (Z_w) ve yük transfer direnci (R_{ct}) devre modeline göre düzenlenmiştir. Her bağlanma adımından sonra R_{ct} sonuçlarının arttığı grafik 1’de gösterilmiştir. Nyquist çizimine göre; yük transfer dirençleri elektrot yüzeylerinde oluşturulan her bağlanma aşaması için sırasıyla verilmiştir. Boş GCE için R_{ct} değeri 993 Ω , GCE/p(HEMA-MAH-Zn) için değeri 2354 Ω , GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor için 4115 Ω , GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor/L. Antijen için 3294 Ω ’dır.

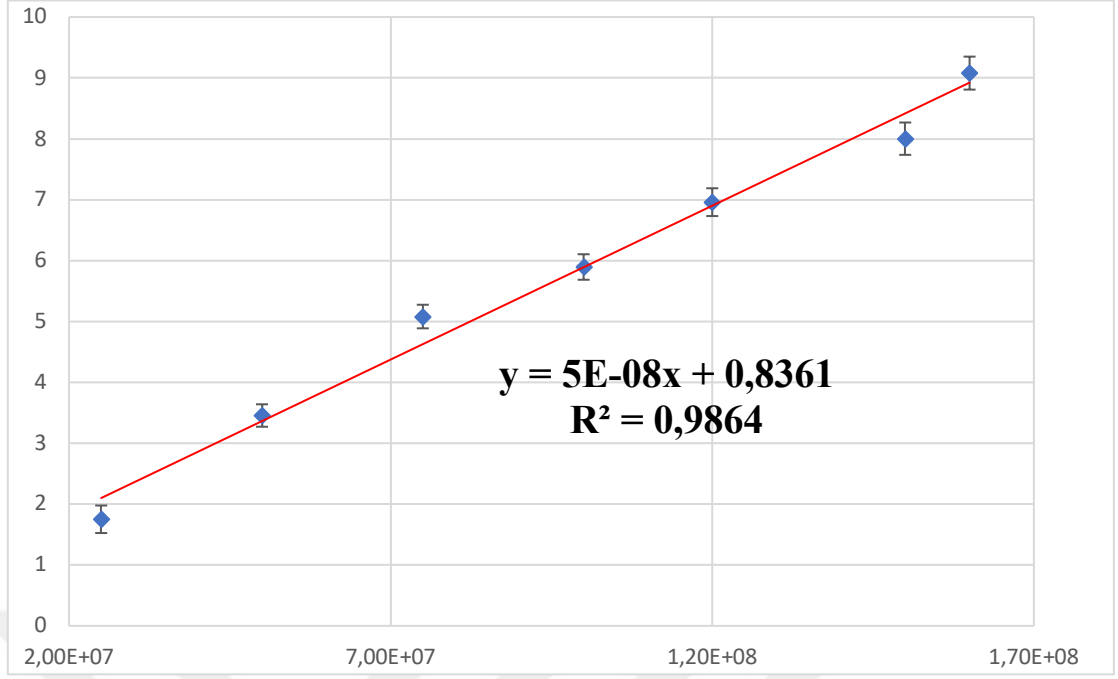
4.1.1. Leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli biyosensör ile antijen analizi

Bu bölümde; leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan sensörün duyarlılık özellikleri değerlendirilmiştir. Diferansiyel puls voltametri tekniği ile farklı konsantrasyonlardaki *Leishmania* antijenleri elektrotlara uygulanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda olan *Leishmania* antijenleri, GCE / p(HEMA-MAH-Zn) / Antikor yüzeyine eklendikten sonra alınan akım piki ile antijen ilave edilmeden önce alınan akım piki arasındaki farktan dolayı açığa çıkan akım pikleri ile kalibrasyon grafiği çizilerek *Leishmania* antijen analizine gidilmiştir. Grafik 2’de gösterildiği gibi sırasıyla p(HEMA-MAH)-Zn, p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor eklendiğinde DPV piklerinde bir azalma gözlenmiştir fakat p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor üzerine *Leishmania* antijeni eklendiğinde boş elektrot ile alınan ölçümü geçmeyecek şekilde konsantrasyona bağlı olarak bir artış görülmüştür. Bu sonuçlara göre; *Leishmania* monoklonal antikoru ile tasarlanan sistemin algılama kapasitesinin oldukça iyi olduğu gözlenmiştir.



Grafik 2. *Leishmania major* antijen analizi için Boş GCE, GCE/p(HEMA-MAH-Zn), GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor, GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor/*Leishmania* antijen yüzeylerinin DPV pikleri (Ölçümler, 5,0 nM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) ve 0,1 M KCl çözeltileri içeren 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponunda gerçekleşmiştir).

Sonrasında, $1,6 \times 10^8$ - 2×10^5 /mL aralığında farklı *Leishmania* antijen konsantrasyonu, monoklonal antikor ile modifiye edilmiş elektrotlara uygulanmıştır ve grafikte görüldüğü gibi doğrusal denklemi $y=5E-08x + 0,8361$ (R^2 ; 0,9864) olan kalibrasyon grafiği çizilmiştir. *Leishmania* tayinine yönelik tasarlanan biyosensör için doğrusal tayin aralığı $1,6 \times 10^8$ - $2,5 \times 10^7$ /mL olarak bulunmuştur.



Grafik 3. *Leishmania major* analizi için standart grafiği

4.1.2. *Leishmaniasis* tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli biyosensör yüzeyinin tekrarlanabilirliği

Tezin bu kısmında, GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor yüzeyi ile ilgili tekrarlanabilirlik ölçümleri yapılmıştır.

Antikor ile kaplanmış olan elektrot yüzeyine *Leishmania* antijeni damlatılıp DPV tekniği ile art arda yedi adet ölçüm yapılarak sistemin tekrarlanabilirliği ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonunda varyasyon katsayısı %1,98, standart sapma değeri ($\pm S, S$) $\pm 2,56$ olarak bulunmuştur. Bulunan değerler ile bu yöntemin etkinliği doğrulanmıştır.

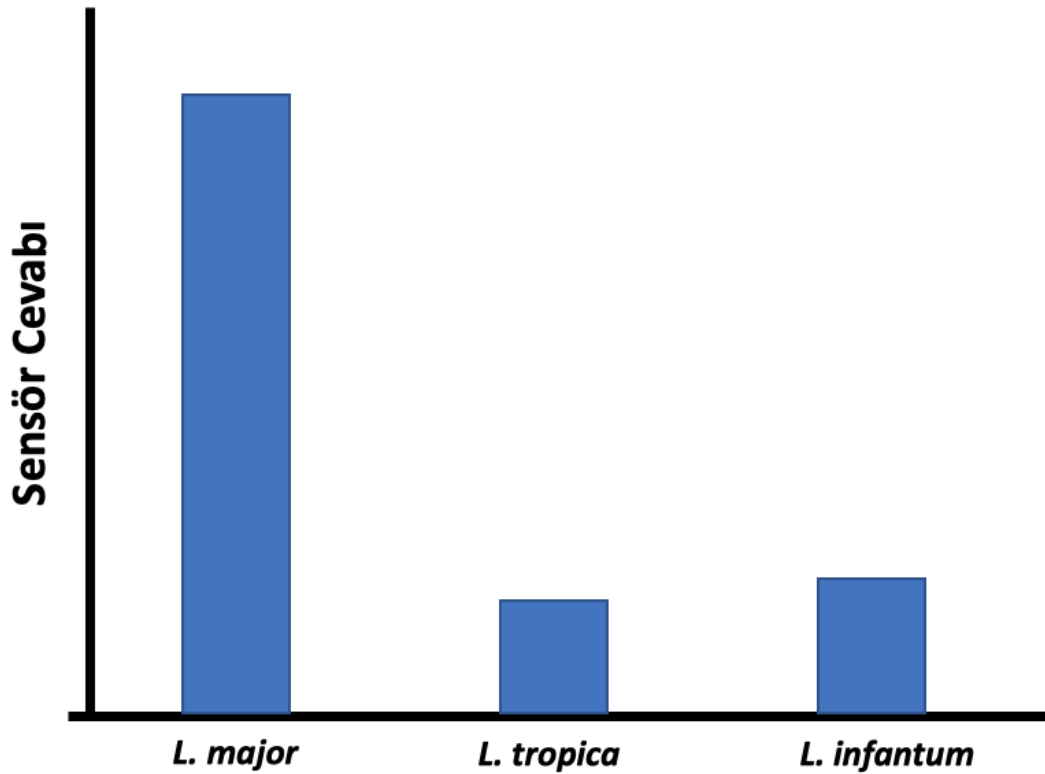
4.1.3. *Leishmaniasis* tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli biyosensör yüzeyinin dedeksiyon limiti

Bu sistemin diğer bir analitik performansı ise tayin edilebilen en düşük dedeksiyon limitidir (LOD). Doğrusal tayin aralığındaki en düşük *Leishmania* antijen konsanstrasyonunda arka arkaya 10 ölçüm alınıp 3Sb/m formülü ile hesaplanmıştır.

$1,6 \times 10^8 - 2,5 \times 10^7 / \text{mL}$ *Leishmania* antijen konsantrasyonu kullanılarak hesaplanan LOD değeri $1 \times 10^8 / \text{mL}$ olarak hesaplanmıştır.

4.1.4. Leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli biyosensör yüzeyine girişim etkisi

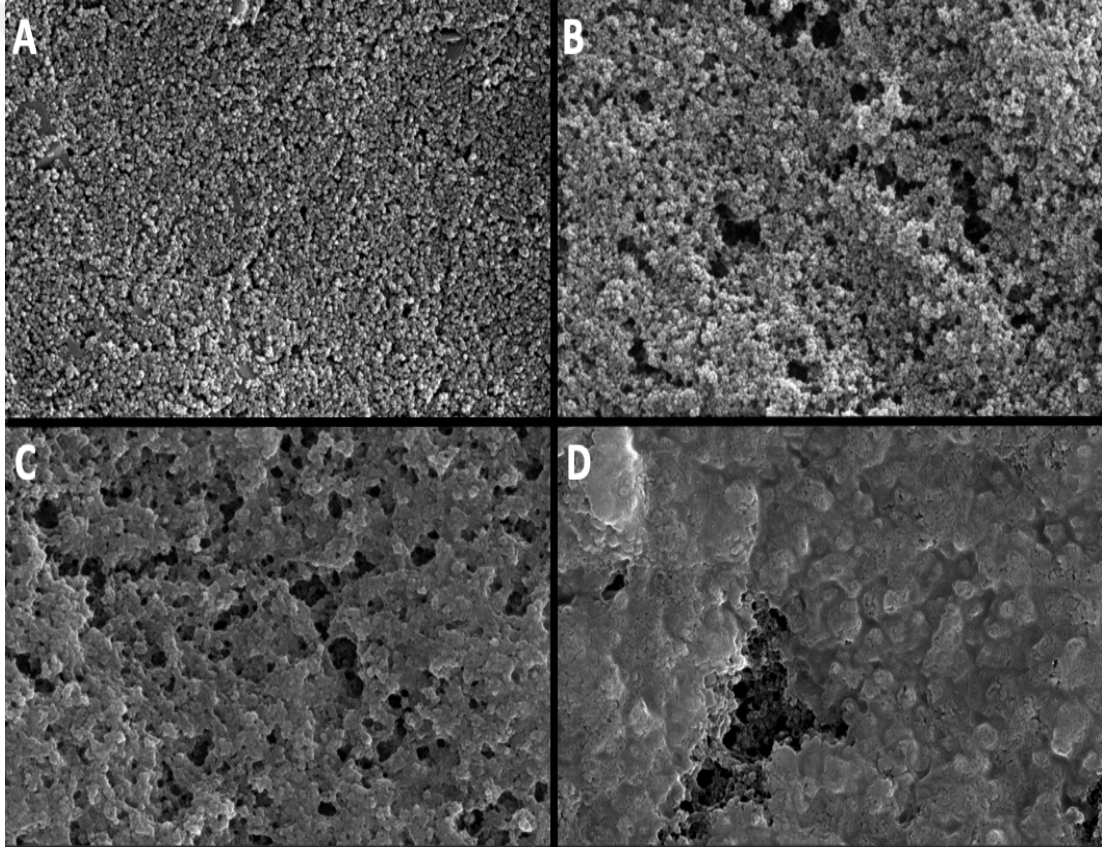
Yapılan tüm bu çalışmaların yanı sıra GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor yüzeyinin seçimliliğinin araştırılması amacıyla *Leishmania major* antijenine benzer özellik gösterecek diğer *Leishmania* türleri de girişimciler kullanılmıştır. GCE/p(HEMA-MAH-Zn)/Antikor yüzeyine *Leishmania major* antijeni ve diğer girişimciler 10 ug/mL konsantrasyonda eklenmiş ve ölçümleri alınmıştır. Diferansiyel puls voltametri tekniği ile elde edilen sonuçlarda, diğer maddelerin sisteme önemli bir girişim etkisi olmadığı doğrulanmıştır (Grafik 4). Tasarlanan bu sistemin *Leishmania major*'a seçimli olduğu gösterilmiştir.



Grafik 4. Biyosensör Yüzeyine Girişim etkisi

4.1.5. Leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikor temelli biyosensör sisteminin sonuçlarının taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenerek doğrulanması

Tezin bu son bölümünde elektrot üzerinde sırasıyla boş elektrot, p(HEMA-MAH-Zn) nanopolimeri, p(HEMA-MAH-Zn)/Ab ve p(HEMA-MAH-Zn)/Ab/Ag şeklinde oluşturulan platformun aşamaları elektron mikroskobu ile görüntülenerek doğrulanması sağlanmıştır.



Şekil 2. (A) Boş elektrot (B) p(HEMA-MAH-Zn) nanopolimeri (C) p(HEMA-MAH-Zn)/Ab (D) p(HEMA-MAH-Zn)/Ab/Ag Elektron mikroskobu görüntüleri

5.Tartışma

Leishmaniasis, farklı türlerdeki *Leishmania* parazitlerinin vektör kum sineği aracılığı ile insana ve diğer memelilere bulaşması ile oluşan, etken *Leishmania* türüne göre zoonotik ve antroponotik karakterde olabilen bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün en önemli altı tropikal hastalık içine aldığı leishmaniasis, günümüzde giderek artan sayıdaki ülkede halk sağlığı problemine dönüşmüştür (Osman ve ark., 2017).

Leishmania parazitleri, sırasıyla omurgalı konaklarda ve omurgasız konaklarda bulunan amastigot ve promastigot olmak üzere iki ana morfolojik şekilde bulunur. Kum sineğinin kan emmesi sırasında alınan amastigotlar, bağırsakta promastigotlara dönüşür. Bu dönüşüm sırasında ardışık olarak proliferatif promastigot, nektomonad, haptomonad ve en son enfektif şekil metasiklik promastigot oluşmaktadır (Sacks D.L., 1989; Sacks ve Perkins, 1984; Schlein ve ark., 1991; Mojtahedi ve ark., 2008). Promastigot şeklinin ana yüzey glikokonjugant proteini lipofosfoglikandır (LPG). *Leishmania* türünün belirli bir kum sineğini enfekte etme yeteneği, LPG farklılığına bağlıdır (Sacks D.L., 1989). Promastigotların diğer bir salgısı da karbonhidrat bakımından zengin olan ipliksi jel benzeri yapı promastigot sekretuar jeldir (PSG). Promastigot sekretuar jel, kum sineği kusmasını engelleyen yapıyı (Stomodeal valv) tıkayarak oluşturduğu baskı ile bu bölgenin sürekli açık kalmasına neden olur. Bu sayede kum sineğinin kan emildiği sırada parazitlerin konak kanı içerisine kusulması sağlanır (Demir S., 2019; Vannier-Santos ve ark., 2002). Parazitler memeli konakta mononükleer hücreler tarafından fagosite edilir. Fagosite edilen promastigotlar, ısı şokuna bağlı gen ekspresyonu dahil olmak üzere morfolojik ve biyokimyasal modifikasyonlara uğrar ve amastigot şekline farklılaşır ve mononükleer fagositik hücreler (makrofaj) ile lenf ve kan damarları yoluyla oluşan hastalık türüne göre ya deri ya da başta dalak, karaciğer ve kemik iliği olmak üzere retikuloendotelial sistemde yerleşir (Vannier-Santos ve ark., 2002, Desjeux P., 1992). Hastalık insanda parazitin yerleşim yerine göre klinik olarak başlıca KL (şark çıbanı), VL (kala-azar) ve MKL olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunun dışında VL sonrasında oluşan post Kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) ve diffüz kutanöz leishmaniasis (DKL) gibi klinik şekiller de bulunmaktadır. Yine KL kendi içinde nodüler, ülsere, ülsere nodüler ve rezidivan KL olmak üzere klinik şekillere ayrılmaktadır (Steverding ve ark., 2017; Osman ve ark., 2017). Leishmaniasis, hastalık çeşitleri, klinik bulguları, vektörleri ve etken parazit türleri açısından Eski ve Yeni Dünya ülkelerinde farklılık

göstermektedir. Hastalık olarak VL ve KL her ikisinde de görülmekte, MKL ve DKL sadece Yeni Dünyada, PKDL ise Eski Dünya'da bazı ülkelerde görülmektedir. Leishmaniasis vektörleri olarak kum sineklerinin dünyada tanımlanan altı cinsinden, Eski Dünya'da *Phlebotomus*, Yeni Dünya'da *Lutzomyia* cinsleri vektörlüğü kanıtlanmış türleri içerdiği için tıbbi öneme sahiptir (Alten ve ark., 2016).

Visseral leishmaniasis etkeni parazit türleri Eski Dünya'da başlıca *L. donovani* kompleksi (*L. donovani* ve *L. infantum*) içerisinde yer almaktadır. Yeni Dünya'da *L. chagasi* olarak bilirse de *L. infantum* ile aynı olduğu kabul edilmiştir. Kutanöz leishmaniasis etkeni parazit türleri Eski Dünya'da *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. infantum* ve *L. donovani*'dir. Yeni Dünya KL etkeni parazit türleri *L. mexicana* kompleksi (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. pifanoi*, *L. garnhami*, *L. waltoni*), *Viannia* alt cinsi içerisindeki *L. braziliensis* kompleksi (*L. [V.] braziliensis*, *L. [V.] peruviana*) ile *L. guyanensis* kompleksinden (*L. [V.] guyanensis*, *L. [V.] panamensis*, *L. [V.] shawi*) den oluşmaktadır (Vannier-Santos ve ark., 2002). Parazitin endosimbiontu olan *Leishmania* RNA virüsünün de (LRV) evrim sırasında değişerek Eski ve Yeni Dünya ülkeleri parazit türlerinde LRV1 ve LRV2 diye ayrıldığı bilinmektedir (Nalçacı ve ark., 2019).

Şark çıbanı olgularının %70'den fazlası ise 10 ülkede (Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, Kosta Rika, Etiyopya, İran, Peru, Sudan, Suriye) görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü kayıtlarına göre; leishmaniasisten 12 milyon insanın etkilendiği, 350 milyon insanın risk altında olduğu, yılda 1,5 milyon yeni şark çıbanı olgusu ile 500.000 yeni Kala-azar olgusunun kayıtlara geçtiği ve leishmaniasise bağlı yıllık ölüm sayısının yılda 60.000 civarında olduğu bilinmektedir (WHO 2000).

Şark çıbanı kum sineğinin ısırmasından sonra birkaç hafta ile ay içerisinde deride sivilce şeklinde başlayıp daha sonra nodüler veya ülsere lezyona dönüşen bir yara ile karakterizedir. Vektör kum sineklerinin gece aktif olmasından dolayı bu yaralar genellikle gece yatarken vücudun açıkta kalan bölümlerinde (yüz, el, bacak vb.) daha fazla görülmektedir, tedavi edilmediği takdirde lezyon bölgesinde ciddi yara izleri kalmaktadır. Bu yara izleri özellikle genç insanlarda sosyal ve estetik problemlere sebep olmaktadır (Gürel ve ark., 2012).

Şark çıbanı, tropik ve subtropik iklime sahip ülkelerde leishmaniasisin en sık görülen şeklidir. Sosyo ekonomik durumu düşük, sosyal karışıklıklar yaşanan, tedaviye ulaşımın daha zor olduğu Orta Doğu, Kuzey Afrika, bazı Asya ülkeleri ile Orta ve Güney Amerika ülkelerinde insidansı gittikçe artmakta, bu ülkelerde yaşayan insanların zorunlu göçleri nedeniyle de daha önce karşılaşılmayan bölgelerde yeni endemik alanlar ortaya çıkmaktadır. İklim değişikliğine bağlı olarak vektör kum sineklerinin yayılım alanları da değiştiği için bazı yeni endemik alanların kalıcı hale gelme olasılığı bulunmaktadır. Bu nedenlerle son yıllarda birçok ülkede, hastalıktan korunma kampanyaları ve hastaların tanısı, tedavisi ve ilacın bulunabilmesinde zorluklar yaşanmakta, özellikle de kolay, fazla deneyim gerektirmeyen tanı yöntemlerine yönelik çalışmalar hız kazanmaktadır (Bailey ve ark., 2017).

Hastalığın tanısı klinik bulgular, direkt parazitin görüldüğü mikroskopik tanı, kültür, parazitin DNA'sını saptayan moleküler temelli yöntemler ve hastada parazite karşı oluşan antikorların saptandığı serolojik yöntemler ile konulmaktadır. Hastalığın klinik bulguları birçok hastalık ile benzerlik gösterdiği için klinik tanı etkin değildir. Klasik tanı yöntemi olan mikroskopik tanının hassasiyeti düşüktür ve deneyim gerektirmektedir. Kültür yönteminin ise laboratuvar iş yükü çok fazla olup, sonuç verme süresi bir aya kadar uzayabilmekte ve sekonder enfeksiyonların varlığında kontaminasyon nedeniyle hassasiyeti düşmektedir. Moleküler yöntemlerin tanıdaki hassasiyeti yüksektir ancak donanımlı laboratuvar ve deneyim gerektirdikleri için genelde diğer tanı yöntemlerine göre pahalıya mal olmaktadır. Bu nedenle sadece referans laboratuvarlarında uygulanmaktadır (Özoğlu ve ark., 2017). Geleneksel parazitolojik/serolojik tekniklerin tanıdaki sınırlılıkları nedeniyle moleküler yöntemler önem kazanmıştır (de Paiva-Cavalcanti ve ark., 2015). Klasik tanının aksine, hassas ve hızlı olmaları nedeniyle KL tanısında öncelikle önerilmektedir. Moleküler teknikler, alternatif bir tanı yönteminin yanı sıra tamamlayıcı ve doğrulayıcıdır. Dünya çapındaki rutin laboratuvarlarda moleküler teknikler uygulanabilir ve güvenilir olmaları nedeniyle tercih edilirler (Thakur ve ark., 2020). Parazitin DNA dizileri hakkındaki bilgiler, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tabanlı yöntemlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmıştır. Rekombinant teknolojinin gelişimiyle birlikte, tanı amaçlı rekombinant proteinler üretmek için bir dizi strateji geliştirilmiştir. (Reithinger ve ark., 2007; Singh ve Sivakumar, 2003; Singh ve ark., 2005; Tavares ve ark., 2003). Etken ajanın tanısı, doğrudan klinik örneklerden de

mümkündür. Antikor saptama yöntemlerinden farklı olarak, konakçı türe özgü reaktif gerekli değildir ve aynı reaktifler konak, rezervuar veya vektör örnekleri için kullanılabilir (Schallig ve Oskam, 2002). Polimeraz zincir reaksiyonunda çeşitli gen hedefleri kullanılabilir. Önemli gen hedeflerinden bazıları, 18S-ribozomal RNA (rRNA), küçük alt birim (SSU) rRNA, tekrarlayan genomik DNA bölgeleri, β -tübülün gen bölgesi, gp63 gen lokusu, “internal transcribed spacer” (ITS) bölgesi, kinetoplastik DNA bölgeleridir (Gangneux ve ark., 2003). Çeşitli çalışmalarda, PZR'nin herhangi bir klinik belirti veya semptomun ortaya çıkmasından birkaç hafta önce paraziteminin saptanabildiği bildirilmiştir (Schönian ve ark., 2001). Martin-Sanchez ve arkadaşları (2004), PZR-ELISA kullanarak asemptomatik bireylerin %24'ünün kanlarında *Leishmania* kDNA'sı taşıdığını saptamışlardır.

Serolojik tanıda, İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT), ELISA ve Western Blotting (WB) analizi gibi pek çok serolojik test kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden IFAT, fikse edilmiş tam parazit yüzey antijenlerine karşı oluşan anti-*Leishmania* antikorlarını belirlemek için kullanılmaktadır. Eski Dünya KL'de IFAT'ın duyarlılığı parazitolojik olarak kanıtlanmış olgularda %56-81 bulunmuş ve iyileşme sonrası titrelerde düşme eğilimi gözlenmiştir. (Silveira ve ark., 1999). ELISA testinde, eriyik antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte ve immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir. ELISA testi ile leishmaniasis ve tripanozomal enfeksiyonların birlikte görüldüğü bölgelerde çapraz reaksiyon nedeniyle yanlış pozitif sonuç alınabilmektedir. Bu nedenle, özgül tanı için *Leishmania*'nın antijenik bileşenlerinin karakterizasyonu önemlidir. Farklı moleküler kütlelerdeki birkaç antijenle %100 özgüllük elde edilmiş, ancak duyarlılık %37'ye kadar düşmüştür (Vinayak ve ark., 1994). *Leishmania braziliensis*'in yaygın görüldüğü bölgelerde ELISA IFAT'a oranla daha yüksek hassasiyet göstermiştir (Silveira ve ark., 1999). Saflaştırılmış proteinlerin kullanıldığı testler, promastigot veya eriyik antijenlerin kullanıldığı testlere oranla bölgelere göre farklı olmak üzere daha yüksek özgüllük ancak daha düşük hassasiyet gösterebilir. Rekombinant K39 hızlı tanı testi ile Hindistan'da insan VL hastaları ile yapılan birkaç çalışmada, testin %100 duyarlı olduğu bildirilmiştir (Bern ve ark., 2000; Sundar ve ark., 2002). Ancak, Sudan'da insan VL olgularında duyarlılığı sadece %67 bulunmuştur (Zijlstra ve ark., 2001). Brezilya'da endemik bir bölgeden 1798 kanin leishmaniasisli (KanL) köpeğin serumuna uygulandığında ise %92,1 duyarlılık ve %99,5 özgüllük göstermiştir. Bununla birlikte, test ile 1:40 ila 1:320 aralığında düşük

IFAT titreli hayvanlardaki aktif enfeksiyon tespit edilememiştir (Reithinger ve ark., 2007). Proteinsiz ortamda yetiştirilen promastigot antijenlerinin kullanıldığı ELISA ile %95'lik duyarlılık elde edilmiştir (Rajasekariah ve ark., 2001). Yeni Dünya'da, bu test KL tanı ve tedavi kontrolünde kullanılmıştır. Western blotting yöntemi, bir membran üzerine sabitleştirilmiş proteinleri tanımlamada kullanılmaktadır. Protein solüsyonunda aranan bir proteinin olup olmadığını ve varsa ne kadar olduğunu anlamak için kullanılan bir yöntemdir. Serolojik testler Kala-azar tanısında yüksek özgünlük ve hassasiyet ile etkin olarak kullanılırlar da donanımlı laboratuvar ve optimizasyonda deneyim gerektirmeleri nedeniyle her rutin laboratuvarında uygulanmamaktadırlar. Şark çıbanı ise deride yaralar şeklinde seyretmekte ve nadiren komşuluk nedeniyle mukozaya yayılım göstermektedir. Hastalığın genellikle deride sınırlı kalması nedeniyle, antikor yanıtı sınırlı olmakta ve serolojik testlerin tanıdaki yeri çok sınırlı kalmaktadır (Zeyrek ve ark., 2012). Antikor temelli tanıların, bazı hastalarda zayıf yanıtlar, tedavi sonrası antikorların kalıcılığı, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda antikorların eksikliği gibi sınırlamaları da bulunmaktadır. Antijen seviyelerinin parazit yükü ile geniş ölçüde ilişkili olması beklendiğinden, bir antijen saptama testi, teşhis için daha kullanışlıdır. İdrarda antijen tespiti, çeşitli paraziter enfeksiyonların teşhisi için denenmiştir. Visseral leishmaniasis hastalarının idrarında *Leishmania* antijenlerinin tespiti Kohanteb ve arkadaşları (1987) tarafından uygulanmış, hastaların idrarında 72-75 ve 123 kDa'lık iki polipeptit tespit edilmiştir. Bunlardan 72-75 kDa'lık polipeptidin duyarlılığı %96, özgüllüğü ise %100 bulunmuştur.

Türkiye'de leishmaniasisin Kala azar ve şark çıbanı olmak üzere iki klinik şekli görülmektedir. Ülkemizde leishmaniasis için ulusal bir kontrol programı bulunmaktadır, leishmaniasis insanlar için bildirim zorunlu bir hastalıktır, hastaların ücretsiz olarak tanı ve tedavisi yapılmaktadır. Hastalığın en ciddi klinik formu olan Kala-azar, dalak, karaciğer ve kemik iliği gibi çeşitli iç organları etkilemekte ve tedavi edilmediği takdirde yüksek oranda ölümle sonuçlanabilmektedir. Ülkemizde resmi olarak yılda 20-30 Kala-azar olgusu bildirilmektedir ve hastalık daha çok Ege, Akdeniz gibi kıyı bölgelerinde görülmektedir (Gürel ve ark., 2012).

Türkiye'de Suriyeli misafirler dışında yılda 1.500-2.000 civarında şark çıbanı hastası bildirilmektedir. Ülkemiz KL'nin en sık görüldüğü 12 ülke arasında yer almaktadır.

Nüfusumuzun %44'ünün şark çıbanı riski altında bulunduğu bildirilmektedir (WHO 2000). Şark çıbanı sıklıkla Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde görülmektedir. Yolculukların kolaylaşması, artması ve çeşitli nedenlerle toplu insan hareketlerinin artmasına paralel olarak yetersiz altyapı ve sağlıksız konutlarda barınma gibi faktörlerin yıllardır Güneydoğu Anadolu'da sınırlı yerleşim gösteren şark çıbanının yayılımındaki en önemli belirleyiciler olduğu düşünülmektedir (Gürel ve ark., 2017).

Klasik bilgilere göre Türkiye'de *Leishmania (L.) infantum*, VL; *L. tropica* ve *L. major* ise şark çıbanı etkeni olan türlerdir. Ancak son yıllarda, *L. infantum*'un bazı endemik bölgelerde şark çıbanına da neden olabildiği ve benzer şekilde *L. tropica*'nın da nadiren VL'ye neden olabildiği bildirilmektedir (Karakuş ve ark., 2017). Ayrıca daha önceleri ülkemizde bildirilmeyen *L. donovani*'de son yıllarda nadir olarak KL ve VL etkeni olarak bildirilmektedir (Özbilgin ve ark., 2016). İnsanların rezervuarlık yaptığı *Leishmania tropica*'nın etken olduğu kutanöz leishmaniasis hastalarının hızlıca tespit edilmesi ve tedavilerinin tamamlanması sayesinde vektör kum sineklerinin bu hastalardan paraziti alarak sağlam kişilere bulaştırması engellenir. Ülkemizde şark çıbanı tanısının kısa zamanda yapılamaması veya diğer deri hastalıklarına ait farklı tanımlar konup gözden kaçırılması gibi nedenler hastalığın yaygınlaşmasında önemli rol oynamaktadır.

Gerek VL gerekse KL etken *Leishmania* türüne bağlı olarak zoonotik özellik gösterebilmektedir. Zoonotik özellik gösteren *Leishmania* türleri kum sinekleri ile hayvanlardan insanlara geçmektedir ve hastalığın yayılımında oldukça büyük etkisi bulunmaktadır. Kanin leishmaniasis köpekler için önemli bir hastalık olup, köpekler rezervuar olarak da hastalığın yayılımında büyük öneme sahiptir. Bu yüzden tanımlarının konulup tedavilerinin yapılması hastalığın yayılmasında büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle sahada çalışan klinisyen veteriner hekimler de birçok hastalığı taklit edebilen kanin leishmaniasis olgularında hızlı ve doğru tanı koymaya ihtiyaç duymaktadırlar. Kanin leishmaniasis, erken tanı konmadığında tedavisi zor ve yüksek oranda ölüme neden olabilen bir hastalıktır. Tanı konması, hem hastalığın diğer köpeklere ve insanlara yayılmaması açısından hem de insektisitli koruyucu tasmaların veya damlaların kullanılması açısından da önem taşımaktadır. Türkiye'de kanin leishmaniasisin bildirim zorunlu değildir ancak veteriner hekimlikte önemli bir

toplum sağlığı problemi oluşturmaktadır. Özellikle VL'nin endemik olduğu farklı b6lgelelerimizde %1-40 arasında değişen oranlarda saptanmaktadır (T6z ve ark., 2013). K6pekleri hastalanan kişiler hastalığın ailelerine bulaşması endişesi taşımakta ve veteriner hekimler ile tıp hekimleri VL ve kanin leishmaniasis için tek sağlık konsepti çatısı altında birlikte çalışmaktadırlar. K6pek n6fusunun fazla olması nedeniyle tanı 6zel kliniklerde hızlı tanı testleriyle konmaktadır. Farklı firmaların kanin leishmaniasis hızlı tanı testlerinin bilimsel d6zeyde karşılaştırmalı çalışmaları 6lkemizde hen6z yapılmamıştır, 6lkemizdeki hassasiyet ve 6zg6ll6kleri bilinmeden farklı testler tanı amacıyla uygulanmaktadır ve bu testlerin maliyetleri y6ksektir. Bu nedenle bu alanda 6lkemizde 6retilecek hızlı sonuç veren, y6ksek d6zeyde hassas ve 6zg6l, 6zel kliniklerde uygulanabilecek, uzmanlık gerektirmeyen testlere y6ksek d6zeyde ihtiyaç bulunmaktadır. Bu nedenle, daha kısa s6rede y6ksek duyarlılıkla tanı olanağı sağlayan, rutin laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilecek, y6ksek d6zeyde deneyim gerektirmeyen tanı y6ntemlerinin geliştirilmesi b6y6k kolaylık sağlayacaktır.

Nanotıp uygulamaları, nanomalzemelerin ve biyolojik cihazların tıbbi kullanımından nanoelektronik biyosens6rlere ve hatta biyolojik makineler gibi molek6ler nanoteknolojinin gelecekteki olası uygulamalarına kadar uzanmaktadır (Farokhzad ve Langer, 2006). Nanobiyoteknoloji, tanının tedavi ile entegrasyonunu kolaylaştırarak kişiselleştirilmiş tıbbi olanak sağlayabilmektedir. Molek6ler 6lekte algılama sağlayabilmekte, vir6s parçaları, prekanser6z h6creler ve geleneksel tanı y6ntemleriyle tespit edilemeyen hastalık belirteçleri gibi patolojilerin belirlenmesine yardımcı olabilmektedir. (Seo ve ark., 2006). Biyosens6rler; y6ksek duyarlılık, kişi kaynaklı hataların azaltılması, kısa 6l6m s6resi, 6l6m ve analiz giderlerinin d6ř6k olması, otomatik 6l6m ve ayarlama sistemlerinin devreye sokulması gibi 6st6nl6klere sahiptir (6zoğlu ve ark., 2017). Amaç, biyolojik bir elementin reaksiyona girdiği kimyasal veya biyokimyasal konsantrasyonla orantılı b6y6kl6k veya frekans olarak bir sinyal oluşturmaqdır. Bu s6rete, kimyasal konsantrasyonunun hızlı bir Şekilde elektrik sinyaline d6n6řt6r6lmesi çok 6nemlidir (Powner ve Yalcinkaya, 1997). Biyosens6rleri içeren farklı disiplinler, biyolojik sistemlerin 6zg6ll6đ6n6 ve hassasiyetini mikroişlemcilerin veya bilgisayarların hesaplama g6c6yle birleştirir (Turner ve ark., 1987). Amaç, biyolojik bir elementin reaksiyona girdiği kimyasal veya biyokimyasal konsantrasyonla orantılı b6y6kl6k veya frekans olarak bir sinyal oluşturmaqdır. Bu s6rete, kimyasal konsantrasyonunun hızlı bir Şekilde elektrik

sinyaline dönüştürülmesi çok önemlidir (Powner ve Yalcinkaya, 1997). Biyosensörleri oluşturan algılama katmanının yapımında veya sensör sistemi oluşturmada kullanılan materyallerde, enzim-substrat, antikor-antijen, lektin-şeker ve nükleik asitler-tamamlayıcı sekansları gibi birbirini tamamlayan çiftler önem taşımaktadır. Bunlara ek olarak, mikro organizmalar, hayvan veya bitki hücreleri ve hatta doku parçaları da algılama katmanına dahil edilebilir. Biyosensörlerin tasarımında yaygın olarak kullanılan iki ana malzeme sınıfı, özellikle canlı organizmalardaki metabolik reaksiyonları katalize edebilen oldukça özelleşmiş proteinler olan enzimler ile hem hayvanlar hem de insanlar tarafından doğal olarak üretilen antikorlardır (Powner ve Yalcinkaya, 1997). Elektrokimyasal biyosensörlerin kullanımı basitlik, hızlilik, düşük maliyet ve yüksek hassasiyet gibi avantajlar sağlar. Bu tez kapsamında Elektrokimyasal biyosensörlerde kullanılan en yaygın ölçüm türleri, potansiyometrik, voltametrik ve impedans ölçümler kullanılmıştır. Temel olarak, dönüştürücü elektrot yüzeyinde meydana gelen redoks reaksiyonları tarafından üretilen akım, voltaj, direnç veya yüzeysel yük gibi elektroaktif maddelerin fizikokimyasal özelliklerindeki değişiklikler çıkış sinyalleridir (Nguyen ve ark., 2019).

Leishmania spp. parazitinin saptanmasına yönelik literatürde çeşitli sensör sistemleri (elektrokimyasal, piezoelektrik, optik, vb.) bulunmaktadır. Bir çalışmada, manyetik kobalt-çinko ferritini ($Co_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$), *L. major*'un tespitine yönelik elektrokimyasal bir genosensörün geliştirilmesi için kullanılmıştır. Manyetik kobalt-çinko ferritin uçlarına tek iplikli DNA probları sabitlenmiş ve sonuç olarak yüksek duyarlılık ve özgüllük ile tespitinin mümkün olduğu gösterilmiştir (Heli ve ark., 2016). Başka bir çalışmada, *Leishmania* parazitlerinin tanımlanması için PCR içermeyen ve işaretli bir ultra-hassas elektro-kimyasal DNA biyosensörü ile yapılmıştır. Altın nano partiküller ilk olarak, bir şekil yönlendirme maddesi olarak spermidin kullanılarak elektro-çökeltme yöntemiyle elektro-metalik hale getirilmiş daha sonra biyosensör, bir *Leishmania* spesifik DNA probunun altın partikül üzerine immobilizasyonu ile üretilmiş daha sonra tamamlayıcı tek iplikli DNA dizisinin seçilen koşullar altında biyosensör ile hibridizasyonu incelenmiştir. Sonuç olarak *Leishmania* türlerini ayırt etmek için uygulanabilir olduğu gösterilmiştir (Moradi ve ark., 2016). Bir başka çalışmada enfekte olmuş konakların dokularında *L. infantum* antijenlerini tespit etmek için immünosensör bazlı bir test geliştirmeyi amaçlamıştır. *Leishmania infantum*'a karşı oluşturulmuş monoklonal antikorları, 2-aminoetanoetil (sisteamin) filmi ve glutraldehit ile kaplanıp, glisinle bloke edilen altın yüzey üzerinde immobilize

edilmiş ve *L. infantum* ile enfekte olmuş ve enfekte olmamış kontrol hamster dalaklarının süspansiyonları ile temas halinde yerleştirilmiştir. Bu sonuçlar, bu tahlilin, patogenez ve bağışıklık ile ilgili çalışmalar için deney hayvanlarının organlarındaki *L. infantum* amastigotlarını ölçmek için faydalı olabileceğini ve bunun, insan ve köpeğin antijen tespitine dayalı bir tanı yönteminin geliştirilmesi için umut verici bir araç olduğunu göstermiştir (Cabral-Miranda ve ark., 2014). *Leishmania major* kinetoplast DNA'sının (kDNA) protein kodlayıcı olmayan bir bölgesinden belirli bir tek iplikli DNA probunu bağlayan altın nanoparçacıklarının hibridizasyonuna dayanan yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Sonuçlar, bu yöntemin, diğer *Leishmania* olmayan türlerden *L. major*'un teşhisi için faydalı olduğunu göstermiştir (Sattarahmady ve ark., 2016). Chagas hastalığı ile çapraz reaksiyonu önleyebilen, VL'nin daha hassas bir şekilde teşhisi için bir elektrokimyasal immünosensör geliştirilmiştir. Enzim bağlantılı immünosorbent testinde (ELISA) *L. infantum* antijenleri, sensöre en iyi şekilde bağlanmak için metodolojik olarak standardize edilmiştir. Chagas ve leishmaniasis tanılı hastaların serumlarında anti-*Trypanosoma cruzi* ve anti-*Leishmania* sp. antikor tayini için kullanılmıştır. Altın nanoparçacıklarla modifiye edilmiş bir karbon elektrotun, tüm antijenlerin etkin adsorpsiyonunu garanti etmek için en iyi platform olduğu düşünülmüş ve sonuç olarak mevcut akım pikleri, tanımadan sonra lineer olarak azalmış ve farklı hastalık türleri (sindirim, kardiyak, belirlenmemiş Chagas/akut ve kronik VL) arasındaki ayrım saptanabilmiştir. Aynı gruplarla ELISA ile karşılaştırmalı analizler yapılmış ve ELISA testlerinde çapraz reaksiyonlar (yüksek sayıda yanlış pozitif) nedeniyle düşük bir özgüllük (%44) saptanırken, önerilen immünosensör yüksek seçicilik ve özgüllük (%100) sunmuştur. Farklı Chagas ve VL hastalarından alınan serum örneklerinde herhangi bir yanlış pozitiflik veya yanlış negatiflik vermemiştir (Martins ve ark., 2020)

Bu tez kapsamında leishmaniasis tanısına yönelik geliştirilen antikor temelli biyosensörün ilk basamağında p(HEMA-MAH-Zn) nanopolimeri elektrot yüzeyine sabitlenmiştir. Daha sonra *L. major* monoklonal antikoru ve polimerin amino gruplarının bağlanması sağlanmıştır. Sonrasında p(HEMA-MAH-Zn)/antikor şeklinde modifiye ettiğimiz elektrotun üzerine *L. major* antijeni eklenmiştir. Her bir modifikasyon işleminden sonra DPV, EIS ve CV elektrokimyasal teknikleri ile ölçüm alınmıştır. Bu şekilde leishmaniasis tanısına yönelik geliştirilen antikor temelli biyosensörün *Leishmania* antijen analizi için $1,6 \times 10^8$ - $2,5 \times 10^7$ /mL tayin aralığı

hesaplanmıştır. Ortam koşulları optimize edildikten sonra DPV tekniği kullanılarak *L. major* antijeninin saptanma limiti belirlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında, geliştirilen bu sistemin *Leishmania* spp. tayininde oldukça duyarlı bir sistem olduğu doğrulanmıştır. Bu özelliği bakımından tasarlanmış olan sensörün klinik açıdan çok büyük önem taşıdığı görülmektedir.



6. Sonuç ve Öneriler

Yaptığımız bu çalışmalar, sensör geliştirme çalışmaları için umut vadetmektedir. Leishmaniasis tanısına yönelik tasarlanan antikör temelli biyosensör sisteminin p(HEMA-MAH-Zn)/Ab/ *Leishmania major* antijenine karşı yüksek spesifikliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Diğer *Leishmania* türleri ile çapraz reaksiyon saptanmamıştır. Tasarlanan sensör modeli, hedef molekül olan *L. major* antijenini saptamada büyük avantajlara sahiptir. Tasarladığımız modelin diğer *Leishmania* türleri için de tasarlanabilme avantajı bulunmaktadır. Model Türkiye’de insanlarda KL ve VL ile köpeklerde kanin leishmaniasis tanısı için farklı *Leishmania* türlerine özgü uyarlanabilecektir. Elde edilen sonuçlara göre çalışmamız ile ihmal edilen tropikal hastalıklar arasında bulunan leishmaniasis tanısı için yeni, yüksek duyarlılığa sahip, hızlı tayin edebilme yeteneği olan gelecekte leishmaniasis tayinine yönelik güçlü sistem niteliği barındıran bir platform oluşturulmuştur.

7. Kaynaklar

- Alten, B., Maia, C., Afonso, M. O., Campino, L., Jiménez, M., González, E., ... & Gradoni, L. (2016). Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(2), e0004458.
- Bailey, F., Mondragon-Shem, K., Hotez, P., Ruiz-Postigo, J. A., Al-Salem, W., Acosta-Serrano, A., & Molyneux, D. H. (2017). A new perspective on cutaneous leishmaniasis—Implications for global prevalence and burden of disease estimates. *PLoS neglected tropical diseases*, *11*(8), e0005739.
- Banuls, A. L., Hide, M., & Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology*, *64*, 1-458.
- Bern, C., Jha, S. N., Joshi, A. B., Thakur, G. D., & Bista, M. B. (2000). Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *63*(3), 153-157.
- Boelaert, M., Lynen, L., Desjeux, P., & Van Der Stuyft, P. (1999). Cost-effectiveness of competing diagnostic-therapeutic strategies for visceral leishmaniasis. *Bulletin of the World Health Organization*, *77*(8), 667.
- Bray, 1974; Lumsden, 1974; Pratt ve David, 1981; Lainson ve Shaw, 1987
- Cabral-Miranda, G., de Jesus, J. R., Oliveira, P. S., Britto, G. G., Pontes-de-Carvalho, L. C., Dutra, R. F., & Alcântara-Neves, N. M. (2014). Detection of parasite antigens in *Leishmania infantum*-infected spleen tissue by monoclonal antibody-, piezoelectric-based Immunosensors. *Journal of Parasitology*, *100*(1), 73-78.
- Çulha, G., Doğramacı, Ç. A., Gülkan, B., & Savaş, N. (2014). Kutanöz leishmaniasis ve Hatay İlindeki durumu. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, *71*(4), 171-178.
- Davies, C. R., Kaye, P., Croft, S. L., & Sundar, S. (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *Bmj*, *326*(7385), 377-382.

- de Paiva-Cavalcanti, M., de Moraes, R. C. S., Pessoa-e-Silva, R., Trajano-Silva, L. A. M., da Cunha Gonçalves-de-Albuquerque, S., Tavares, D. D. H. C., ... & Pereira, V. R. A. (2015). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell & bioscience*, 5(1), 31.
- Demir, S. (2019). *Leishmania*'nın Konak İçerisindeki Sağlık Stratejileri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 43(2), 83.
- Desjeux, P. (1992). Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World health statistics quarterly* 1992; 45 (2/3): 267-275.
- Dogan, N., Bör, O., Dinleyici, E. C., Töz, S. O., & Ozbel, Y. (2008). Ulkemizin kuzeybatısındaki il ve ilçelerde yaşayan çocuklarda anti-*Leishmania* seroprevalansinin farklı serolojik yöntemlerle araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 103-11.
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2006). Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced drug delivery reviews*, 58(14), 1456-1459.
- Gangneux, J. P., Menotti, J., Lorenzo, F., Sarfati, C., Blanche, H., Bui, H., ... & Derouin, F. (2003). Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of old world *Leishmania* infections in an area of nonendemicity. *Journal of clinical microbiology*, 41(4), 1419-1422.
- Gardener, P. J., Chance, M. L., & Peters, W. (1974). Biochemical taxonomy of *Leishmania*: II: Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 68(3), 317-325.
- Gökmen, A. A., Öncel, K., Özdemir, O. A., Pektaş, B., Çavuş, İ., Güngör, S., ... & Demirci, M. (2015). Kutanöz Leishmaniyazis Tanısında Alternatif Bifazik Nutrient Besiyeri. *Mikrobiyol Bul*, 49(2), 266-271.
- Gupta, V. K., Jain, R., Radhapyari, K., Jadon, N., & Agarwal, S. (2011). Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—a review. *Analytical biochemistry*, 408(2), 179-196.
- Gürel, M. S., Yeşilova, Y., Ölgün, M. K., & Özbel, Y. (2012). Türkiye'de kutanöz leishmaniasisin durumu. *Türkiye Parazit Derg*, 36(2), 121-9.
- Heli, H., Sattarahmady, N., Hatam, G. R., Reisi, F., & Vais, R. D. (2016). An electrochemical genosensor for *Leishmania* major detection based on dual effect of immobilization and electrocatalysis of cobalt-zinc ferrite quantum dots. *Talanta*, 156, 172-179.

- Henriques, C., & De Souza, W. (2000). Redistribution of plasma-membrane surface molecules during formation of the *Leishmania amazonensis*-containing parasitophorous vacuole. *Parasitology research*, 86(3), 215-225.
- Hoyos-Arbeláez, J., Vázquez, M., & Contreras-Calderón, J. (2017). Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. *Food chemistry*, 221, 1371-1381.
- Kar, K. (1995). Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical reviews in microbiology*, 21(2), 123-152.
- Karakuş, M., Nasereddin, A., Onay, H., Karaca, E., Özkeklikçi, A., Jaffe, C. L., ... & Töz, S. (2017). Epidemiological analysis of *Leishmania tropica* strains and giemsa-stained smears from Syrian and Turkish leishmaniasis patients using multilocus microsatellite typing (MLMT). *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(4), e0005538.
- Kohanteb, J., Ardehali, S. M., & Rezai, H. R. (1987). Detection of *Leishmania donovani* soluble antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(4), 578-580.
- Leishmania*, W. H. O. (2000). HIV co-infection in south-western Europe 1990–1998: a retrospective analysis of 965 cases. *Geneva: World Health Organization*, 14.
- M.A. Vannier-Santos, A. Martiny ve W. de Souza) (Cell Biology of *Leishmania* spp./ Invading and Evading.
- Martins, B. R., Barbosa, Y. O., Andrade, C. M., Pereira, L. Q., Simão, G. F., de Oliveira, C. J., ... & Alves-Balvedi, R. P. (2020). Development of an electrochemical immunosensor for specific detection of visceral leishmaniasis using gold-modified screen-printed carbon electrodes. *Biosensors*, 10(8), 81.
- Martin-Sanchez, J., Pineda, J. A., Morillas-Marquez, F., Garcia-Garcia, J. A., Acedo, C., & Macias, J. (2004). Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70(5), 545-548.

- Mojtahedi, Z., Clos, J., & Kamali-Sarvestani, E. (2008). *Leishmania major*: identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Experimental parasitology*, 119(3), 422-429.
- Moradi, M., Sattarahmady, N., Rahi, A., Hatam, G. R., Sorkhabadi, S. R., & Heli, H. (2016). A label-free, PCR-free and signal-on electrochemical DNA biosensor for *Leishmania major* based on gold nanoleaves. *Talanta*, 161, 48-53.
- Nalçacı, M., Karakuş, M., Yılmaz, B., Demir, S., Özbilgin, A., Özbel, Y., & Töz, S. (2019). Detection of *Leishmania* RNA virus 2 in *Leishmania* species from Turkey. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 113(7), 410-417.
- Nguyen, H. H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D., & Kim, M. (2019). Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials*, 12(1), 121.
- Omondi, Z. N., Demir, S., & Arserim, S. K. (2020). Kayseri İlinin Kum Sineği Faunası Üzerine Entomolojik Çalışma: Türkiye'nin Orta Anadolu Bölgesi'nde Yeni Bir Kutanöz Leishmaniasis Odağı. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*, 44(3), 158.
- Osibote, E., Noah, N., Sadik, O., McGee, D., & Ogunlesi, M. (2011). Electrochemical sensors, MTT and immunofluorescence assays for monitoring the proliferation effects of *Cissus populnea* extracts on Sertoli cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 1-14.
- Osman, M., Mistry, A., Keding, A., Gabe, R., Cook, E., Forrester, S., ... & Lacey, C. J. (2017). A third generation vaccine for human visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis: First-in-human trial of ChAd63-KH. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(5), e0005527.
- Özbel Y, Töz Ö S, 2011 Leishmaniasis. Korkmaz M, Ok Ü.Z. (Ed), Parazitoloji Laboratuvar (s. 307-320). Türkiye Parazitoloji Derneği. Yayın No: 23
- Özbilgin, A., Çulha, G., Uzun, S., Harman, M., Topal, S. G., Okudan, F., ... & Özbel, Y. (2016). Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation of *Leishmania major* from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions. *Tropical Medicine & International Health*, 21(6), 783-791.
- Özbilgin, A., Harman, M., Karakuş, M., Bart, A., Töz, S., Kurt, Ö., ... & Özbel, Y. (2017). Leishmaniasis in Turkey: Visceral and cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* in Turkey. *Acta Tropica*, 173, 90-96.

- Özoğlu, Ö., Ünal, M. A., & Altuntaş, E. G. (2017) Biosensors: Lactate Biosensors in Food and Health Field. *Türk Yaşam Bilimleri Dergisi*, 2(2), 180-193.
- Pimenta, P. F., Saraiva, E. M., Rowton, E., Modi, G. B., Garraway, L. A., Beverley, S. M., ... & Sacks, D. L. (1994). Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(19), 9155-9159.
- Powner, E. T., & Yalcinkaya, F. (1997). Intelligent biosensors. *Sensor review*.
- Rajasekariah, G. H. R., Ryan, J. R., Hillier, S. R., Lisa, P. Y., Stiteler, J. M., Cui, L., ... & Martin, S. K. (2001). Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *Journal of immunological methods*, 252(1-2), 105-119
- Ravindran, R., Anam, K., Bairagi, B. C., Saha, B., Pramanik, N., Guha, S. K., ... & Ali, N. (2004). Characterization of immunoglobulin G and its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy. *Infection and immunity*, 72(2), 863-870.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*, 7(9), 581-596.
- Romero, G. A. S., Orge, M. D. L. G. O., de Farias Guerra, M. V., Paes, M. G., de Oliveira Macêdo, V., & de Carvalho, E. M. (2005). Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta tropica*, 93(1), 49-56.
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747-1763.
- Sacks, D. L. (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental parasitology*, 69(1), 100-103.
- Sacks, D. L., & Perkins, P. V. (1984). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, 223(4643), 1417-1419.
- Sattarahmady, N., Movahedpour, A., Heli, H., & Hatam, G. R. (2016). Gold nanoparticles-based biosensing of *Leishmania major* kDNA genome: visual and spectrophotometric detections. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 235, 723-731.

- Schallig, H. D., & Oskam, L. (2002). Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine & International Health*, 7(8), 641-651.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L., & Shlomai, J. (1991). Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 245(1313), 121-126.
- Schoone, G. J., Hailu, A., Kroon, C. C. M., Nieuwenhuys, J. L., Schallig, H. D. F. H., & Oskam, L. (2001). A fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(4), 400-401.
- Schönian, G., El Fari, M., Lewin, S., Schweynoch, C., & Presber, W. (2001). Molecular epidemiology and population genetics in *Leishmania*. *Medical microbiology and immunology*, 190(1-2), 61-63.
- Seo, W. S., Lee, J. H., Sun, X., Suzuki, Y., Mann, D., Liu, Z., ... & Dai, H. (2006). FeCo/graphitic-shell nanocrystals as advanced magnetic-resonance-imaging and near-infrared agents. *Nature materials*, 5(12), 971-976.
- Sadeghian, G., Ziaei, H., Bidabadi, L. S., & Nilforoushzadeh, M. A. (2013). Evaluation of leishmanin skin test reaction in different variants of cutaneous leishmaniasis. *Indian journal of dermatology*, 58(3), 239.
- Silveira, T. G. V., Arraes, S. M. A. A., Bertolini, D. A., Teodoro, U., Lonardoni, M. V. C., Roberto, A. C. B. S., ... & Shaw, J. (1999). Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(4), 413-423.
- Singh, S., & Sivakumar, R. (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *Journal of postgraduate medicine*, 49(1), 55
- Singh, S., Dey, A., & Sivakumar, R. (2005). Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert review of molecular diagnostics*, 5(2), 251-265.
- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 10(1), 1-10.
- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 10(1), 1-10.
- Sundar, S., & Rai, M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9(5), 951-958.

- Sundar, S., Pai, K., Sahu, M., Kumar, V., & Murray, H. W. (2002). Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 96(1), 19-23.
- Tamer, G. S., Polat, E., Töz, S. Ö., & Altaş, K. (2008). Kocaeli sokak köpeklerinde visceral leishmaniasis seroprevalansı. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 32(3), 183-186.
- Tavares, C. A. P., Fernandes, A. P., & Melo, M. N. (2003). Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert review of molecular diagnostics*, 3(5), 657-667.
- Thakur, S., Joshi, J., & Kaur, S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Journal of Parasitic Diseases*, 1-20.
- Toz, S. O., Culha, G., Zeyrek, F. Y., Ertabaklar, H., Alkan, M. Z., Vardarli, A. T., ... & Ozbel, Y. (2013). A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(5), e2205.
- Turner, A., Karube, I., & Wilson, G. S. (1987). *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford university press.
- Uzun, S., Gürel, M. S., Durdu, M., Akyol, M., Fettahlıoğlu Karaman, B., Aksoy, M., ... & Harman, M. (2018). Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey. *International journal of dermatology*, 57(8), 973-982.
- Vannier-Santos, M. A., Martiny, A., & Souza, W. D. (2002). Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current pharmaceutical design*, 8(4), 297-318.
- Vasile, C. (2019). Polymeric nanomaterials: recent developments, properties and medical applications. *Polymeric nanomaterials in nanotherapeutics*, 1-66.
- Vinayak, V. K., Mahajan, D., Sobti, R. C., Singla, N., & Sundar, S. (1994). Anti-66 kDa antileishmanial antibodies as specific immunodiagnostic probe for visceral leishmaniasis. *The Indian journal of medical research*, 99, 109-114.
- Wilson, S. M. (1995). DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field applications and practicalities. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 89(sup1), 95-100.

- Zeyrek, F. Y., Erdogan, D. D., Uluca, N., Tumer, S., & Korkmaz, M. (2012). The role of serology in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(Supplement A).
- Zijlstra, E. E., Nur, Y., Desjeux, P., Khalil, E. A. G., El-Hassan, A. M., & Groen, J. (2001). Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Tropical Medicine & International Health*, 6(2), 108-113.



Teşekkür

Yüksek Lisans eğitimim boyunca her zaman desteğini hissettiğim, fikirleri ve yapıcı eleştirileriyle bana örnek olan biricik danışmanım Prof. Dr. Seray TÖZ başta olmak üzere, her zaman çözüm odaklı olan ve desteklerini esirgemeyen Prof Dr. Yusuf ÖZBEL'e, sensör çalışmalarında bizi destekleyen Prof. Dr. Sinan AKGÖL'e ve Prof. Dr. Suna TİMUR'a, aynı zamanda birlikte çalışmaktan keyif aldığım, başım sıkıştığında yanına koşabildiğim hocam Arş. Gör. Serdar ŞANLI'ya teşekkür ederim. Çalışmamızda kullandığımız monoklon antikoru üreten ve çalışmamız için temin eden Dr. Öğr. Üyesi Chizu Sanjoba'ya da teşekkür ederim.

En büyük teşekkürü de bu tezi görmesini istediğim ama göremeyen biricik savaşçı babam Adem ATICI, canım annem Gülşah ATICI ve tüm aileme etmek isterim.

İzmir, 2021

Tuğçe ATICI

Özgeçmiş

1. **Adı Soyadı:** Tuğçe ATICI
2. **Doğum tarihi:**
3. **Unvanı:** Biyolog
4. **Öğrenim durumu:**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Ege üniversitesi	2016
Yüksek Lisans	Parazitoloji	Ege üniversitesi	Devam ediyor

5. Yayınlar

5.1.Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Karakuş, M., **Atıcı, T.**, Karabela, Ş. N., Baylan, O., Limoncu, M. E., & Balcıoğlu, İ. C. (2020). Detection of permethrin resistance and phylogenetic clustering of turkish head lice (*Pediculus humanus capitis*; De Geer, 1767 populations. *Acta tropica*, 204, 105362.

5.2.Kongre bildirileri

1. **Atıcı T., Töz S., Gürsoy E., Kuşat Ol K., Özbel y., Akgöl S.** Biyosensörük sistemler ve kutanöz leishmaniasisin tanısında kullanımı, 21. Parazitoloji kongresi poster bildirisi, 28 Eylül-3 Ekim 2019, İzmir.