

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PEPTİT YÜKLÜ NANO AŞI FORMÜLASYONUNUN
TOKSOPLASMA GONDİİ'YE KARŞI ETKİNLİĞİNİN *IN VIVO* OLARAK
İNCELENMESİ

ZEYNEP KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. RABİA ÇAKIR KOÇ

İSTANBUL, 2017

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PEPTİT YÜKLÜ NANO AŞI FORMÜLASYONUNUN *TOKSOPLASMA*
*GONDİİ'*YE KARŞI ETKİNLİĞİNİN *IN VIVO* OLARAK İNCELENMESİ**

ZEYNEP KAYA tarafından hazırlanan tez çalışması 19.12.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Alper YILMAZ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Özgür KURT
Acıbadem Üniversitesi



Bu alışma, TAGEM-15/ARGE/41 numaralı “*Toxoplasma gondii* ’ye Karşı Nano Boyutta Aşı Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Deney Hayvanlarında Etkinliğinin İncelenmesi” projesi kapsamında desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, büyük bir ilgiyle elinden gelenin fazlasını sunan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ'a teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen Araştırma görevlisi Dr. Yasemin Budama KILINÇ'a ve tezimde kullandığım *Toxoplasma gondii* parazitini temin eden Sayın Mik. Uzm. Dr. Cahit BABÜR'e; çalışma arkadaşlarım Bahar ASLAN, Eslin ÜSTÜN, Hande MUTLU, Güncem Özgün EREN ve Zeynep Karavelioğlu'na desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen başta babam Sadık KAYA olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürler.

Aralık, 2017

Zeynep KAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	17
1.1 Literatür Özeti	17
1.2 Tezin Amacı	17
1.3 Hipotez	18
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	20
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	4
2.1.1 Tarihçe	20
2.1.2 Morfoloji ve Biyolojik Yaşam Döngüsü	21
2.1.2.1 Takizoit form	22
2.1.2.2 Bradizoit form	23
2.1.2.3 Ookist form (Sporozoit form)	9
2.2 Bulaşma Yolları.....	9
2.3 Epidemiyoloji	11
2.4 <i>T.gondii</i> Patogenez ve Patoloji.....	13
2.5 Toksoplazmoz	14
2.6 Tanı Yöntemleri.....	14

2.6.1	İndirekt Tanı Yöntemleri.....	15
2.6.1.1	Sabin-Feldman Test (SFT).....	15
2.6.1.2	Enzim Bağlı Immunosorbent Yöntemi (ELISA).....	15
2.6.1.3	Immunosorbent Aglutinasyon Yöntemi (ISAGA)	16
2.6.1.4	İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT)	16
2.6.1.5	İndirekt Hemaglutinasyon Testi (IHAT).....	16
2.6.1.6	Kompleman Birleşmesi Deneyi (KBD)	16
2.6.1.7	Lateks Aglutinasyon Testi (LAT)	17
2.6.2	Direk Tanı Yöntemleri.....	17
2.6.2.1	<i>T. gondii</i> İzolasyonu.....	17
2.6.2.2	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	17
2.6.2.3	Histolojik Tanı.....	17
2.6.3	Nanoteknolojik Yöntemler ile Toksoplazmozun Tanısı	18
2.7	Toksoplazmoz Tedavisi	19
2.7.1	Nanoteknolojik Yöntemler ile Toksoplazmoz Hastalığına Karşı Yapılan İlaç Tedavi Çalışmaları.....	20
2.8	Toksoplazmoz Hastalığının İmmünolojisi	21
2.9	Aşılar ve <i>T.gondii</i> 'ye Karşı Geliştirilen Aşı Çalışmaları	22
2.9.1	Canlı Aşılar	22
2.9.2	Subunit Aşılar	23
2.9.3	DNA Aşıları	24
2.9.4	Rekombinant Protein Aşıları	24
2.10	SAG1'in Önemi	25
2.11	Peptit Aşıları.....	25
2.12	Nano aşı.....	26
2.12.1	Nanoaşı Teknolojisinde Kullanılan Nano Yapılar	26
2.12.2	<i>T.gondii</i> 'ye Karşı Yapılan Nano aşı Çalışmaları	27
2.12.3	Nano aşı-PLGA'nın Önemi	28

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METOD	30
-------------------------	----

3.1	Deneylerde Kullanılan Malzeme ve Ekipmanlar	31
3.1.1	Kullanılan Kimyasallar.....	31
3.2	Kullanılan Cihazlar.....	32
3.3	Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Maddeler	32
3.3.1	Deneylerde Kullanılan Peptit	32
3.3.2	PLGA.....	33
3.3.3	Peptit Yüklü PLGA Nanopartikülleri	33
3.3.4	Aşı içeriklerinin Oluşturulması	33
3.4	Deneyisel çalışmalarda Hazırlanan Çözeltiler	33
3.4.1	0.01 M'lık PBS Tamponu (pH 7.5).....	33
3.4.2	0.1 M'lık Sodyum Karbonat Tamponu (pH 9.0).....	34
3.4.3	PBS-Tween Çözeltisi (PBS-T).....	34
3.4.4	Hücre Kültürü Medyumu	34
3.4.5	Hücre Sayımı için Tripan Blue Hazırlanması	34

3.4.6	Hücre Dondurma Çözeltilisinin Hazırlanması	34
3.4.7	XTT Çözeltilisinin Hazırlanması	34
3.4.8	Sitrat Tamponunun Hazırlanması	34
3.4.9	1X Lizis Solüsyonunun Hazırlanması	35
3.4.10	Dalak Hücreleri için Besiyeri Medyumunun Hazırlanması.....	35
3.4.11	Lenfosit Prefilasyonu Uyarılımı için Peptit Stoğunun Hazırlanması..	35
3.4.12	PMS Stoğunun Hazırlanması	35
3.4.13	Bloklama Solüsyonunun Hazırlanması	35
3.5	Kullanılan Ölçüm Yöntemleri ve Gereçler	35
3.5.1	Multiplate ELISA Okuyucu	35
3.5.1	Biyogüvenlik Kabini Sınıf II	36
3.5.1	Inverted Mikroskop	36
3.6	Etik Kurul Onayı	36
3.7	DeneySEL Çalışmalar	36
3.7.1	Hücre Kültür Çalışmaları	36
3.7.2	<i>T. gondii</i> Takizoitlerinin L929 Hücre Hattında <i>In Vitro</i> Kültürünün Yapılması	38
3.7.3	XTT Yöntemi ile Sitotoksite Analizinin Yapılması.....	38
3.8	Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması ve <i>In Vivo</i> Çalışmaları	41
3.8.1	Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması ve İmmünizasyon	41
3.8.2	BALB/c Farelerinden Kan Alımlarının Yapılması ve Serum Eldesi.....	43
3.9	<i>T. gondii</i> 'ye Karşı Oluşan IgG Yanıtının (ELISA) ile Tayin Edilmesi.....	44
3.10	Farelerin Sakrifiye Edilmesi ve Dalak Alımının Yapılması.....	46
3.10.1	Dalak Hücreleri Elde Edilmesi ve Ekilmesi.....	47
3.10.1.1	Lenfosit Proliferasyonunun Ölçülmesi	49
3.10.1.2	Sitokin Ölçüm Çalışmaları	49
BÖLÜM 4		
DENEYSEL ÇALIŞMALAR		53
4.1	Hücre Kültürü Çalışmaları	53
4.1.1	<i>T.gondii</i> Takizoitlerinin <i>In Vitro</i> Kültürünün Yapılması	53
4.1.2	XTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	54
4.2	ELISA Sonuçları.....	57
4.3	Sitokin Ölçümleri.....	58
4.4	Lenfosit Proliferasyonunun Ölçülmesi.....	59
BÖLÜM 5		
SONUÇLAR ve ÖNERİLER		60
KAYNAKLAR.....		67
EK-A		
ETİK KURUL BELGESİ		79
ÖZGEÇMİŞ		80

SİMGE LİSTESİ

gr	Gram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
°C	Santigrat Derece

KISALTMA LİSTESİ

CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri)
DMEM-F12	Hücre kültür medyumu (Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ELISA	Enzim-Bağlı-İmmün İnceleme
GRA1	<i>Toxoplasma gondii</i> Yoğun Granül Antijeni 1 (Dense Granule Antigen1)
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
PBS	Sodyum Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline)
PLGA	Poli (Laktik-ko-Glikolik Asit)
SAG1	<i>Toxoplasma gondii</i> Yüzey Antijeni 1 (Surface Antigen 1)
SAG2	<i>Toxoplasma gondii</i> Yüzey Antijeni 2 (Surface Antigen 2)
XTT	XTT sodyum tuzu (2-Metoksi-4-nitro-5-sülfofenil) -2 H – Tetrazolium -5-karboksanilid

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 <i>T. gondii</i> takizoitinde organeller	7
Şekil 2.2 Bradiozit form yapısı	8
Şekil 2.3 <i>T. gondii</i> 'nin üç biyolojik formunun birbirine dönüşmesi	10
Şekil 2.4 Konjenital oküler toksoplazmoza ait görüntü	12
Şekil 3.1 Hücre flaskına ait bir görüntü	37
Şekil 3.2 Kültürde çoğalan L929 hücreleri	37
Şekil 3.3 XTT yönteminin şematik gösterimi	39
Şekil 3.4 XTT eklenmiş 96'lık pleyte ait görüntü	40
Şekil 3.5 Çoklu mikropleyt okuyucuda ölçüm alınması	41
Şekil 3.6 Gruplara bölünen deney hayvanlarının kafes görüntüsü	42
Şekil 3.7 Subkutanöz yolla enjeksiyon	42
Şekil 3.8 Yüz veninden kan alımının yapılması	43
Şekil 3.9 Santrifüj sonrası serum eldesi	43
Şekil 3.10 BALB/c farelerinden alınan kan örneklerinin serumları	44
Şekil 3.11 İnkübasyon sonrasında oluşan renk değişimi	45
Şekil 3.12 Farenin sabitlenmesi	45
Şekil 3.13 Dalak alımının yapılması	46
Şekil 3.14 Filtre üzerine konulan dalağın ezilmesi	47
Şekil 3.15 Dalağın parçalandıktan sonra ve filtreden geçirilmiş görüntüsü	47
Şekil 3.16 Dalak hücre süspansiyonunun elde edilmesi, santrifüj sonrası görüntüsü	48
Şekil 3.17 Dalak hücresinin mikroskopik görüntüsü (20X)	48
Şekil 3.18 Lenfosit proliferasyon pleyt görüntüsü	49
Şekil 3.19 TMB renk ajanı eklendikten sonra pleyt görüntüsü	50
Şekil 3.20 TMB durdurma solusyonu eklendikten sonra pleyt görüntüsü	50
Şekil 4.1 Fibroblast hücrelerini enfekte eden takizoitlere ait görüntü	52
Şekil 4.2 Boş PLGA nanopartiküllerinin 24 ve 48 saatlik sitotoksitesitesi	54
Şekil 4.3 Peptit yüklü PLGA nanopartiküllerinin 24 ve 48 saatlik sitotoksitesitesi	55
Şekil 4.4 İmmunize edilen farelerde ELISA ile ölçülen IgG yanıtları	56
Şekil 4.5 İmmunize edilen farelerde sandviç ELISA ile IFN- γ seviyesinin gösterilmesi .	57
Şekil 4.6 İmmunize edilen farelerde sandviç ELISA ile IL-4 seviyesinin gösterilmesi	58
Şekil 4.7 Peptite dayalı aşı formülasyonları ile immunize edilen farelerde <i>in vitro</i> dalak hücre proliferasyonunun XTT yöntemi ile gösterilmesi	59

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasallar	46
Çizelge 3. 2 <i>In vivo</i> enjeksiyon içerik tablosu	57

PEPTİT YÜKLÜ NANO AŞI FORMÜLASYONUNUN *TOKSOPLASMA GONDİİ*'YE KARŞI ETKİNLİĞİNİN *IN VIVO* OLARAK İNCELENMESİ

Zeynep KAYA

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ

Toxoplasma gondii, bütün sıcakkanlı hayvanları enfekte edebilen hücre içi zorunlu bir parazittir. Tüm dünyada yaygın olarak bulunan *T.gondii*'nin ara konakları insanlar dâhil tüm memeliler ve kanatlılarken, son konakları kedi ve kedigillerdir. *T.gondii* her tip hücreyi enfekte eder ve hücre invazyonu aktif olarak gerçekleştiren zoonotik bir parazit olmasından dolayı tıp ve veterinerlikteki en önemli ökaryotik patojenlerden biridir. *T.gondii* parazetine ait olan hızlı çoğalan formu takizoit, doku kistlerinde oluşan bradizoit ve son konak olarak kedilerin intestinal yapısında gelişen ookist formlarından bulunmaktadır ve bu formlar insanda enfeksiyona sebep olmaktadır. Primer ve kronik enfeksiyon şeklinde görülebildiği gibi morbidite ve mortaliteye de neden olabilir.

Günümüzde *T.gondii*'nin sebep olduğu Toksoplazmoz hastalığına karşı veterinerlikte kullanımı onaylı olan sadece Toxovax isimli aşı bulunmaktadır. Bunun dışında insanlarda kullanılabilecek onaylı bir aşı bulunmamaktadır. *T.gondii*'nin dünya üzerindeki etkisine bakıldığında etkin bir aşı geliştirmenin önemi anlaşılmaktadır. Mevcut aşı çalışmalarında yaygın olarak kullanılan yaklaşımlar önemli bir yere sahip olsa da etkin bir kullanım için taşıyıcı sistemler ve adjuvan gereksinimi ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda nanoteknolojinin gelişmesi ile ortaya çıkan yeni bir aşı uygulaması olan nano aşılardan diğer aşılara göre bulundurduğu avantajlar göze

çarpmaktadır. Nano aşı formülasyonlarında kontrollü salım sisteminin oluşturulması, aşının tek dozda daha etkin olması, kolay taşınabilmesi, antijenin bozunmadan korunması gibi birçok avantaja sahip olması, nano aşıları oldukça cazip hale getirmektedir. Nano aşı formülasyonlarının oluşturulmasında kullanılan, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı tarafından onaylanan biyoyumlu ve biyobozunur Poli (Laktik-ko-Glikolik Asit) PLGA ile sentezlenen nanopartiküller ile nano aşı formülasyonları oluşturulmaktadır.

Bu tez çalışmasında, *T.gondii* parazitinin önemli bir yüzey antijeni olan SAG1'e ait bulunan peptit dizisi ile oluşturulan nano aşı formülasyon etkinliğinin *in vivo* olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Nano boyutta hazırlanan peptit yüklü PLGA ile enkapsüle edilerek hazırlanan nano aşı formülasyonlarının sitotoksitesi XTT yöntemi ile fare fibroblast hücre hattı olan L929 hücrelerinde incelenmiştir. Toksik olmadığı belirlenen nano aşı formülasyonları karşılaştırmalı olarak incelenmesi için farklı aşı kombinasyonları ile aşı grupları oluşturulmuştur. Bunun için nano aşı grubu, peptit grubu, adjuvan peptit karışım aşı grubu ve kontrol grubu olarak 4 farklı BALB/c fare grubu ile çalışılmıştır. BALB/c farelere subkutan olarak enjeksiyon yapılmıştır. İmmünizasyon sonrasında oluşan IgG yanıtları kan alımı ile elde edilen serum örnekleri kullanılarak ELISA yöntemi ile tayin edilmiştir. Makrofajların *in vitro* enfektifliğinin ölçülmesi için dalaktan hücre izolasyonu yapılarak sitokin yanıtlarının ve lenfosit proliferasyon ölçme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Böylece *T.gondii*'ye karşı aşı potansiyeli olabilecek yeni bir çalışma gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Toxoplasma gondii*, nano aşı, ELİSA, SAG1

**PEPTIDE LOADED NANO VACCINE FORMULATION AND *IN VIVO*
EXAMINATION OF EFFICIENCY AGAINST *TOXOPLASMA GONDII***

Zeynep KAYA

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assoc.Prof.Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ

Toxoplasma gondii is an intracellular mandatory parasite that can infect all of the warm blooded animals. Intermediate hosts of *Toxoplasma gondii* which is widespread all over the earth are all of the mammals including people and poultries, also it's last hosts are cats and Felidae. *T.gondii* infects all types of cells and it is one of the most important eucaryotic pathogens in medicine and veterinary medicine since it is a zootonic parasite which performs cell invasion actively. *T. gondii* can be found in three different infective forms throughout it's lifespan including tachyzoite, bradyzoite and sporozoite. The parasite consist of tachyzoites which are fast-growing forms of the parasite, bradyzoites which are located in tissue cysts and oocyst forms which are devoloping in intestine of cats the last hosts. All of these three forms can play role in infecting people and they can be primer and chronic infections, also they can cause to be morbidiy and mortality.

Nowadays, there is only one vaccine which is named Toxovax is verified for using against *Toxoplasma* disease which is caused by *T.gondii*. Apart from that, there is no verified vaccine which can be used on people. Considering the effect of *T. gondii* on the world, the importance of developing an effective vaccine is intelligible. Although subunit vaccines which are commonly used in current vaccine trials have an important place, there are needs for carrier systems and adjuvant for effective using. The

advantages of nanovaccines, which are a new vaccination applications emerging with the development of nanotechnology in recent years, are quite impressive compared to other vaccines. Nanovaccines have promising advantages such as the establishment of controlled release system in nano-scale formulation, the ease of transport, the protection of antigens etc. These advantages make nanovaccines highly attractive for using in nanomedicine field. Nowadays, nanostructured formulations are formed with Poly (Lactic-co-Gycolic Acid) PLGA which is approved as biocompatible and biodegradable by US Food and Drug Administration (FDA) and European Drug Agency. In this thesis study, it is aimed to investigate in vivo the efficacy of the nano vaccine formulation formed by the peptide sequence belonging to SAG1 which is an important surface antigen of *Toxoplasma gondii* parasite. The toxicity of peptide loaded PLGA vaccine formulations which were prepared by encapsulation was performed by XTT method with using mouse fibroblast cell line L929 cells. Afterwards in different combinations of formulations were generated in order to perform comparative examination. In this regard, it was studied with four different BALB/c mouse groups and each of them was injected with nano vaccine, peptide group, adjuvant peptide mixture and control group, respectively. After injection of serum samples immunoreactivity was determined by ELISA technique. In order to measure in vitro activity of macrophages, cell isolation was made from spleen and cytokine responses and measurements of lymphocyte preprophyation were performed.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, nano vaccine, ELISA, SAG1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Toxoplasma gondii, bütün sıcakkanlı hayvanları enfekte edebilen zoonotik, hücre içi zorunlu bir parazittir [1]. *T. gondii* parazitlerinin neden olduğu Toksoplazmoz hastalığı, primer ve kronik enfeksiyon olarak oluşmasının yanı sıra, morbidite ve mortaliteye de neden olabilir. Tüm sıcakkanlı canlılar ise *T.gondii* için ara konaktırlar [2]. *T.gondii* paraziti hayat döngüsü boyunca hızlı çoğalan formu takizoit, doku kistlerinde oluşan bradizoit ve son konak olarak kedilerin intestinal yapısında gelişen ookist formlarından oluşmaktadır ve bu formlar insanda enfeksiyona sebep olmaktadır [3].

T. gondii ookistlerle kontamine olan sular aracılığıyla bulaşabildiği gibi enfekte olan gıdaların ağız yoluyla alınmasıyla; hayvanlarının kistlerini veya sporokistleri içeren iyi pişmemiş etler ile de bulaşabilir [4]. Ayrıca kan nakli, organ nakli ve transplasental geçiş gibi birçok farklı yollarla bulaşma gerçekleştirebilmektedir [5].

Toksoplazmoz özellikle gelişmemiş ülkelerde yüksek oranlarda görülmekte ve dünya nüfusunun üçte birinin latent toksoplazmoz ile enfekte olduğu bilinmektedir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC- Centers for Disease Control and Prevention) tarafından toksoplazmoz enfeksiyonunun dünya çapında bazı bölgelerde prevalansının %95 olduğunu bildirmiştir [6]. Günümüzde *T. gondii*'nin sebep olduğu toksoplazmoz hastalığına karşı veterinerlikte kullanımı onaylı olan sadece Toxovax isimli aşı bulunmaktadır [7]. Bunun dışında insanlarda kullanılabilecek onaylı bir aşı bulunmamaktadır. *T.gondii*'nin dünya üzerindeki etkisine bakıldığında etkin bir aşı

geliştirmenin önemi anlaşılmaktadır. Mevcut aşı çalışmalarında canlı aşı, subunit aşı, peptit aşısı, DNA aşısı, rekombinant protein aşısı gibi yaygın olarak kullanılan aşı yaklaşımları önemli bir yere sahip olsa da etkin bir kullanım için taşıyıcı sistemler ve adjuvan gereksinimi ortaya çıkmaktadır. Nano aşılar son yıllarda geliştirilen ve çeşitli enfeksiyon ajanlarına karşı uygulanan yeni bir aşı uygulaması olup diğer aşılarla göre bulundurduğu avantajlar oldukça göze çarpmaktadır [8]. Nano aşı formülasyonlarında kontrollü salım sisteminin oluşturulması, aşının tek dozda daha etkin olması, aşı antijenini vücutta ki degradesyondan koruması gibi birçok avantaja sahip olması nano aşıları oldukça cazip hale getirmektedir [8]. Nano aşı formülasyonlarının oluşturulmasında kullanılan Poli (Laktik-ko-Glikolik Asit) PLGA Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı biyoyumlu ve biyobozunur bir polimer olup, PLGA'ya dayalı nanopartiküller ile kontrollü salım sistemleri ve aşı taşıyıcı olma özellikleri kullanılmaktadır [9].

3.3 1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında, *T. gondii* parazitinin önemli bir yüzey proteini olan SAG1 ait peptit dizisi ile oluşturulan nano aşı formülasyonunun *T.gondii*'ye karşı aşı olarak kullanılma potansiyelinin ve etkinliğinin in vivo olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

3.4 1.3 Hipotez

Nano boyutta hazırlanan peptit yüklü PLGA ile enkapsüle edilerek hazırlanan nano aşı formülasyonların sitotoksitesinin fare fibroblast hücrelerinde incelenerek uygun olan aşı dozunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Aynı şekilde yine bu hücrelerde *T. gondii* 'ye ait takizoitlerinin kültür çalışmaları yapılmış ve enfektiflik özellikleri incelenmesi amaçlanmıştır. Toksik olmadığı belirlenen nano aşı formülasyonları karşılaştırmalı olarak incelenmesi için farklı kombinasyonların oluşturulması planlanmaktadır. Bunun için nano aşı, peptit grubu, adjuvan peptit karışım grubu ve kontrol olarak 4 farklı BALB/c fare grubu ile çalışılarak gruplar karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. BALB/c farelere nano aşı ile immünize edildikten sonra oluşan immün yanıtların ölçümü için kan alımları yüz veninden gerçekleştirilecektir. Fare kanlarından serum elde edildikten sonra ELISA yöntemi ile antikor yanıtlarının ölçülmesi planlanmaktadır. Deney hayvanlarının sakrifiye edilmesi ile makrofajların *in vitro*

enfektifliğinin ölçölmesi için dalaktan hücre izolasyonu yapılarak sitokin yanıtlarının ve lenfosit proliferasyonu ölçölmesi çalışmaları yapılacaktır böylece peptit dizisinin *T.gondii*' ye karşı uygun aşı olma potansiyeli araştırılacaktır.



GENEL BİLGİLER

2.1 Toxoplasma gondii

2.1.1 Tarihçe

Toxoplasma gondii ilk defa 1908’de Tunus Pastör Enstitüsünde Nicolle ve Manceaux adında iki araştırmacı tarafından *Ctenodactylus gundii* adında bir kemirgenin çeşitli dokularında saptanmıştır [10]. Aynı yıl içerisinde araştırmacı Splendore tarafından tavşandan bulunarak izole edilmiştir [11]. 1910 yılında Mello *T. gondii*’nin köpeklerde hastalık yaptığını keşfetmiştir [10]. 1923 yılında Janku tarafından insanda ilk defa tanımlayarak göze yerleştiğini saptanmıştır, Wolf ve Cowen insanda ilk konjenital toksoplazmozunu bildirmişlerdir [12]. 1937 yılında konjenital bulaşmayı tespit etmişlerdir. Sabin Feldman 1942 yılında insanlardaki hastalığı tam olarak nitelemiş ve 1948 yılında günümüzde de hala kullanılan boyama testini bulup ilk uygulamasını yapmışlardır [13]. Weinman ve Chandler tarafından 1954 yılında parazitin etçiller arasındaki geçişi gösterilmiştir[14]. 1965’de Hutchison, toksoplazmozun fekal oral yolla bulaşabileceğini belirtmiştir ve 1969 yılında Hutchinson ve arkadaşları tarafından yapılan deneysel bir çalışmada, *T.gondii* ile enfekte fare dokusu kediye verilmiş ve kedi dışkılarındaki enfektif ookistler gösterilmiştir[15]. Frenkel 1970 yılında ara konak ve son konak olan canlıları belirlemiş[16]; 1972 yılında Miller [17] beş farklı *T. gondii* suşunu tanımlamıştır, aynı yıllar içerisinde kedilerin etkenin dağılımındaki rolleri Munday tarafından açıklanmıştır[18]. 1980 ve 1990 yıllarında, *T. gondii*’nin fare ve sıçanların davranışlarını değiştirdiklerini bildirmişlerdir [19]. 1983 yılında Luft ve arkadaşları tarafından AIDS

hastaları için ölümcül olan akut toksoplazmozdan kaynaklı olarak ensefaliti incelemişlerdir [20].

2000 yılında Cole ve ark. deniz su samurlarından canlı *T.gondii* izole ederek, ookistler ile deniz sularının kontamine olabildiğini bildirmişlerdir [21]. 2001 yılında yapılan çalışmada enfekte olmuş bireylerin psikomotor performanslarının anlamlı derecede daha geride olduğunu ve konsantrasyonlarını daha çabuk kaybettiklerini göstermişlerdir [22]. 2005 yıllarında *T. gondii* genlerinin haritalanma çalışmaları yapılmıştır [23].

2009 yılında Toksoplazmoz enfeksiyonunun bazı şizofrenik olgularına sebep olabileceği incelenmiştir [24]. 2012 yılında Danimarka’ da yapılan bir araştırmada, *T. gondii* ile enfekte olan kadınların, enfekte olmamış kadınlara kıyasla intihar olasılığı daha yüksek olduğunu bildirilmiştir [25]. 2016 yılında Kanada kazlarından (*Branta canadensis*) iki yeni Atipik *T. gondii* suşu saptanmıştır [26].

Toksoplazmoz, Türkiye’de 1950 yılında ilk defa Akçay ve arkadaşları tarafından bir köpeğin akciğer kesitlerinde psödookistler halinde saptanmıştır [27]. 1953 yılında Unat ve arkadaşları tarafından insanda bulunan *T.gondii* histopatolojik olarak gösterilmiştir[28]. Türk oftalmoloji literatüründe ilk oküler toksoplazmozis olgusu ise 1964’te Tüzmen tarafından yayınlanmıştır [29]. 1967 yılında ülkemizde Toksoplazmoz için serolojik tanı yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Ekmen ve Altıntaş tarafından 1973 yılında köpekten *T. gondii* izolasyonu yapılmıştır [30]. *T. gondii* Ankara suşu adı verilen, yüksek patojeniteye sahip bu suşla çok sayıda deneysel enfeksiyon modeli gerçekleştirilmiştir [31].

2.1.2 Morfolojisi ve Biyolojik Yaşam Döngüsü

Zorunlu hücre içi parazit olan *T. gondii* takizoit, bradizoit ve ookist olmak üzere üç farklı enfektif evresi ve yapısal formları ile kompleks bir hayat döngüsü oluşturur [32]. Bu formlar parazitin çeşitli yaşam dönemlerinde birbirlerine dönüşmektedir [33]. Kedigiller dâhil, sıcakkanlı hayvanlar ile insanda takizoitler ve bradizoitler bulunurken; ookistler sadece kedigillerin bağırsağında bulunur [34].

T. gondii için kediler hem son konak hem de ara konaktır. Kedi dışkıyla atılan ve doğada sporlanmış ookistleri, kediler sindirim yoluyla alarak doğrudan enfekte

olabilirler [35]. Kediler, *T. gondii*'nin doku kisti veya hücre içi takizoitleri barındıran enfekte halde bulunan kemirici gibi ara konakları yiyerek enfekte olabildiği gibi konjenital olarak enfeksiyonunun anneden yavruya geçişi de söz konusudur. Kediler hem takizoit (psödokist), hem bradizoit (doku kisti) hem de sporozoitlerle (ookist) enfekte olabilmektedir [35]. Yani *T. gondii*'nin son konağı olan kedilerde seksüel olarak bulunmasının yanı sıra aseksüel olarak bulunabilir [36].

Kediler tarafından direk ya da indirek yollar ile alınan doku kistlerinin duvarı, intestinal içerisinde proteolitik enzimler ile eriyerek, bradizoitler serbest hale gelmektedir. Bradizoitler bu aşamada intestinal lamina propriaya penetre olup takizoit formunda çoğalırlar [1]. Diğer bradizoitler ise ince bağırsağın epitel hücrelerine penetre olarak fertilizasyon fazı başlatırlar. Ookist duvarının gelişimi için iki flagellaya sahip olan erkek gamet, dişi gamete doğru giderek, fertilizasyonu gerçekleştirir. Bunun sonucunda ookistler gelişip intestinal epitel hücrelerinin yıkımı ile bağırsak lümenine boşalırlar[37].

2.1.2.1 Takizoit Form Yapısı

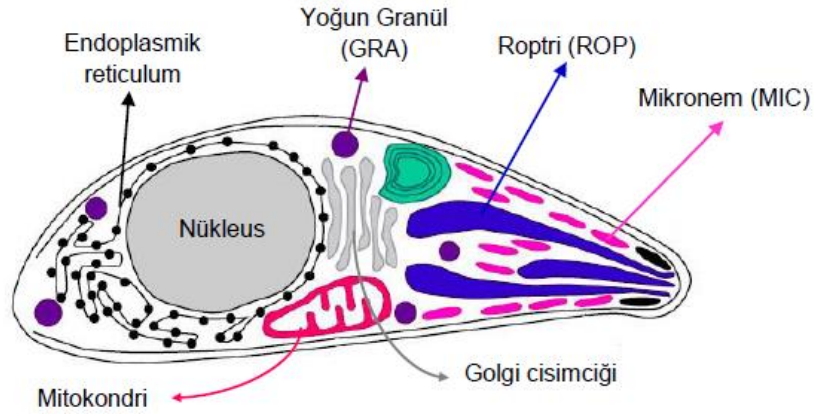
T. gondii'nin yaşam döngüsünde bulunan takizoit form hızlı çoğalan invaziv yapıya sahip olup, akut enfeksiyonda görülen yapısal formudur [38].

Ara konağın tüm hücrelerinde, konak olan kedinin ise intestinal dışı epitelyal hücrelerinde çok hızlı üreyen *T. gondii* 'nin üç formundan birisidir. Takizoitler hilal şekline sahip olup, nükleusu orta kısımda bulunan, ön ucu konik ve daha sivri, arka ucu ise daha yuvarlak olan forma sahiptir [39].

T. gondii'nin takizoit formu, parazitin hızlı çoğalmasını gösteren invaziv formudur. Boyu 4-8 µm ve çapı 2-4 µm civarındadır [40]. Mikroskopik olarak ya da çeşitli boyama yöntemleri ile karakteristik olarak muz ya da portakal dilimi şekline benzemekle birlikte hareketini kayma veya burkulma ile sağlamaktadır.

Ara konakların hücrelerinde bulunan takizoitler endodiyogeni ile çoğalmaktadır böylece takizoitler hücreye girdikten sonra bir süre hareketsiz durmakta ve ardından hücrenin çekirdeğine yakın bir noktaya yerleşmektedir [41]. Parazitofor vakuol içerisinde yuvarlaklaşmakta ve boyutları büyümektedir [41]. Bu süreç sonunda orta hattından dikine ikiye ayrılarak bölünmesini (endodiyogeni) tamamlanmaktadır.

Birçok takizoitin bir araya gelmesi ile oluşan yapılara klon, terminal koloni veya grup denir [42]. Şekil 2.1’de gösterildiği gibi *T. gondii* takizoitine yapısında bulunan yoğun granül, endoplasmik retikulum, golgi cisimciği gibi birçok organel bulunmaktadır [1].



Şekil 2.1 *T. gondii* takizoitinde organeller [43]

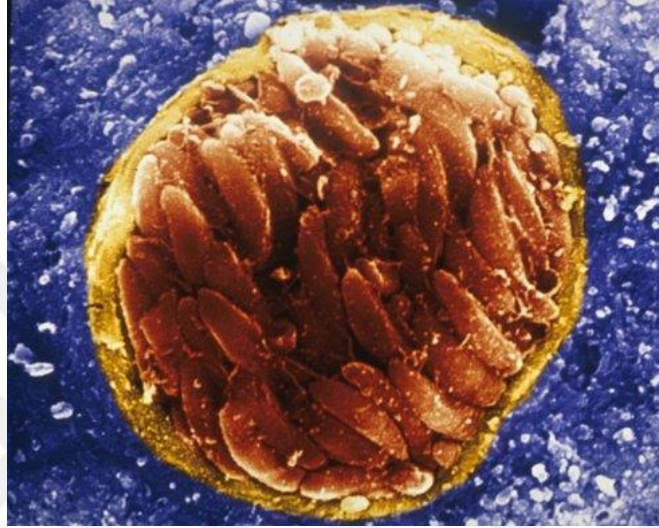
Takizoitler konak hücre içersine aktif penetrasyon veya fagositoz ile girdikten sonra parazitofor vakuol (PV) ile çevrelenirler. *T. gondii* suşları genetik olarak Tip 1, 2 ve 3 olarak sınıflandırılrsa belirgin olan yapısal bir değişiklik yoktur [44].

Takizoitler yaygın olarak serolojik tanı testlerinde antijen olarak kullanılmaktadır[45]. Bu serolojik testlerden olan Sabin Feldman Testi, Fluoresan Antikor gibi testlerde sıklıkla takiozitler kullanılmaktadır. Giemsa- Azur veya Wright boyası ile takizoitler son derece iyi boyanmaktadır [46]. Parazitler Periyodik Asit-Schiff (PAS), Gomori’nin Metenamin Gümüş (methamine silver) ve immunoperoksidaz boyaları ile etkin bir şekilde boyanırlar [46].

2.1.2.2 Bradizoit Form Yapısı

Bradizoit form yapısı; doku kistinin içinde takizoite göre daha yavaş bölünen yapısal formudur [47]. Bradizoitler hilal şekle sahip olup $7 \times 1.5 \mu\text{m}$ boyutunda bulunmakla birlikte, nükleusları arka uçta bulunmaktadırlar. Bradizoitler kendi üstlerine kıvrılan en fazla üç roptri içerirler. Doku kistleri hücre içinde büyüme gösterirken, bradizoitler endodiyogeni ile çoğalırlar.

Bradiziotler ara konakların çeşitli dokularında ve hücre vakuolü içerisinde bulunurken şekil olarak takizoitlere benzese de, çekirdek yerleşimleri takizoit yapısına göre arka uca daha yakındır. Ara konak dokularında oluşan bu kistler 120 µm çapa ulaşabilmekte farklı boyutlarda oluşan bu kistlerin içerisinde değişen miktarlarda yüzlerce yada binlerce bradizoit bulunmaktadır [1].



Şekil 2.2 Bradizoit form yapısına ait bir görüntü [48]

Bradizoit formu takizoite göre daha yavaş çoğalmakta ve oluşan doku kisti belli nedenlerden dolayı parçalandığında içerisindeki bradizoitler, kan ya da lenf dolaşımı yoluyla diğer organlara yayılım göstermektedir. Bradizoit içeren doku kistleri konak hücre içinde kalarak, latent enfeksiyona yol açmaktadırlar.

Doku kistlerinin en sık yerleştiği organ ve dokular olarak santral sinir sistemi, iskelet kası, düz kas ve kalp kası [38] olmakla birlikte bradizoit yapıları da takizotiler gibi PAS ve Giemsa-Azur gibi boyalarla etkin bir şekilde boyanmaktadırlar.

2.1.2.3 Ookist Form Yapısı (Sporozoit form)

Ookistler, son konak olan kedilerin ve bazı kedigillerin dışkılarıyla ortaya çıkan çift katlı bir duvarla çevrili olan formsal bir yapıdır [1]. Ookistlerin enfektif olabilmesi için olgunlaşarak sporulasyon sürecini geçirmesi gerekmektedir. Sporulasyon süresince çevre şartları etkili olmakla beraber, çevrenin ısısı veya oksijeni gibi birçok faktör etkili

olmaktadır. Seksüel üreme sonucunda ortaya çıkan ookistin çapı 10–12 µm arasında olmasına rağmen kedi dışkısı ile dış ortama atıldıktan sonra ki süreçte çevre ısı ve oksijen miktarına bağlı olarak çaplarının 11–13 µm arttığı, 1 ile 21 gün içinde sporlanarak enfeksiyöz hale geldikleri görülmüştür [46]. Dayanıklılığı yüksek ookistlerin nemli toprakta bir yıldan fazla süre boyunca canlılığını koruduğu, akut enfekte kedilerin dışkı ile 7–21 gün içinde 10 milyon kist/gün atabildiği ve bu sebeple kedilerin enfeksiyonun doğada yayılmasının en önemli kaynağı olduğu ileri sürülmüştür [49].

Kedigiller, *T. gondii*'nin herhangi bir form yapısı ile sindirim yoluyla enfekte olduklarında parazitler ince bağırsak epitel hücrelerine girer. Bu aşamada şizogoni (aseksüel çoğalma) sonucu oluşan merozoit ve sporogoni (seksüel çoğalma) sonucunda oluşan ookistler olgunlaşarak mikrogamet ve makrogametleri oluştururlar. Mikrogametinin makrogameti ile fertilizasyonu sonucu oluşan zigotlar, olgunlaşmamış ookistlere dönüştükten sonra bağırsak boşluğuna gider buradan da fekal yolla dışarıya atılırlar [16].

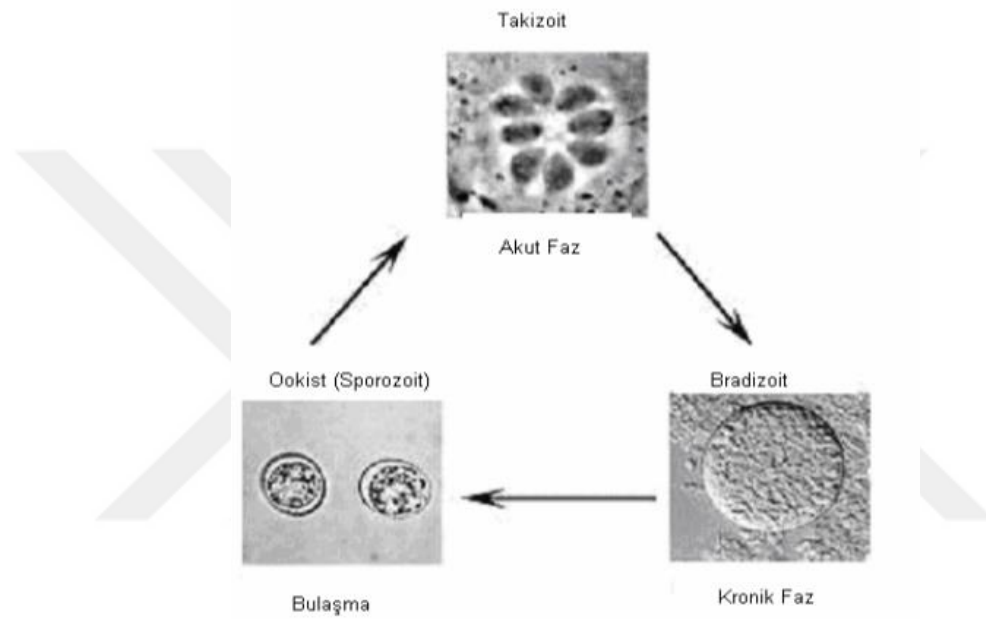
Ara konakların enfeksiyona yakalanması genel olarak iki şekilde oluşmaktadır; Bunlardan ilk oluşum şekli ara konak olan tüm memeli canlılar, sporlanmış ookistleri çevreden ağız yoluyla alması ile ikincisi de memeli hayvanların enfekte olan başka bir ara konağı yiyerek enfeksiyon bulaşmasıdır [50]. Bunun dışında fekal-oral bulaşma, transplasental, kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu ile bulaşma, doku organ nakli ile bulaşmanın yanı sıra laboratuvarlarda gerçekleşen enfeksiyonları da söz konusudur [51]. Ayrıca akut enfeksiyonlu hayvanların pastörize edilmeden çiğ olarak tüketilen sütten kaynaklı toksoplazmoz oluşabilmektedir [52].

2.2 Bulaşma Yolları

T. gondii, aseksüel ve seksüel gelişimini kedi bağırsaklarında geçiren zorunlu hücre içi bir parazittir; kedi dışkısıyla atılan ookistlerin ağız yoluyla alınması tüm ara konak ve son konaklar için başlıca bulaşma kaynağıdır [36]. Kedigillerde 7-21 günlük intestinal gelişim sonunda kedi dışkısıyla birkaç milyon ookist atabilir ve sporulasyondan sonraki üç haftalık süreçte enfektif hale gelen sporozoitleri içeren ookistler oluşmaktadır. İnsanlara bulaşma başlıca rol oynayan faktörler; el yıkama alışkanlığı olmayan erişkinler ve toprakla oynayan çocuklar, çilek gibi iyi yıkanmayan meyveler ile iyi yıkanmayan çiğ

olarak yenilen yeşillikleri (enfekte olan nane, maydanoz, roka, marul) tüketen kişiler sporlu ookistlerle enfekte olabilirler [53]. Kuluçka süresi ortalama olarak bir ile 3 hafta arasında kabul edilmektedir ve sporlanmış ookistleri sindirim yoluyla alan memelilerde enfektif takizoit evresi ortaya çıkmaktadır [54].

Hastalık ara konakların ve kedilerin kontamine olan veya enfekte olan kemirgenlerin tüketilmesi ile de bulaşabilir. İnsanlarda ise pişmemiş veya az pişmiş kistli dokuları içeren gıdaların tüketilmesi ise başlıca bulaşma yollarını oluşturmaktadır [36].



Şekil 2.3 *T. gondii*'nin üç biyolojik formunun birbirine dönüşmesi [55]

Ara konaklarda *T. gondii*'nin hızlı çoğalan formu olan takizoitler ile yavaş çoğalan formu olan bradizoitler gelişmektedir[56]. Takizoit form, dokularda hasara ve güçlü bir yangıya sebep olmasının yanı sıra hastalığın klinik belirtileri ise sonradan ortaya çıkar [57]. *T.gondii* takizoitlerinin sağlam mukozadan birkaç adet içeri girmesi enfeksiyon için yeterli olmaktadır. Laboratuvar enfeksiyonları ile bulaşma da en başlıca sebep takizoitlerle oluşmaktadır [58]. Bunun dışında takizoitlerle bulaşma, kan ve doku transplantasyonu yoluyla veya pastörize edilmemiş çiğ süt tüketimi sonucuda oluşabilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda keçi sütünde *T.gondii* takizoitlerine rastlandığı ve toksoplazmozun keçi sütüyle insanlara bulaşabileceği rapor edilmiştir [52]. Takizoit içeren çiğ etlere dokunulduktan sonra gözlerin ovuşturulmasına bağlı

olarak da takizoitler konjuktivadan vücuda girebilmektedir. Ayrıca enfekte gebelerde, parazit plasenta yoluyla fetüse geçebilmektedir [59], [60].

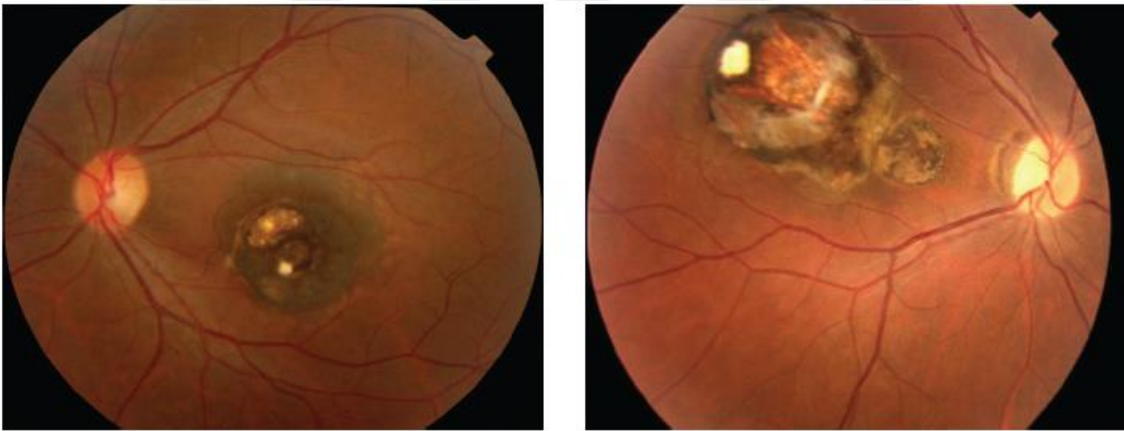
2.3 Epidemiyoloji

T. gondii enfeksiyonun yayılımı içerisinde bulunan coğrafi bölgenin özelliklerine ve popülasyonların yaşam alışkanlıklarına göre değişmektedir. Yapılan araştırmalara göre sıcak nemli iklime sahip bölgelerde toksoplozmazın daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Popülasyonların yaşları ile *toksoplazmaya* karşı oluşan antikorların seropozitiflik artış göstermekte, ancak cinsiyetler arasında önemli bir fark bulunmamaktadır. Amerika’da yapılan bir serolojik araştırma sağlıklı insanların %3-70 oranında *T. gondii* ile enfekte olduklarını ortaya koymuştur [61]. Toksoplazmozun son derece yaygın olmasının nedenleri arasında insanların yeme alışkanlıklarından kaynaklanmasıdır. Dünya çapında toksoplazmozun bu kadar yaygın olmasının sebepleri olarak; bradizoit içeren başlıca domuz ve koyun etlerini çiğ veya az pişmiş olarak tüketilmesi, kontamine su ile ellerin direk teması ile sporozoit içeren ookistlere maruz kalınması gösterilmektedir [62]. Doku kistleri içeren etlerin, ookistlerle kontamine olmuş sebze ve diğer yiyeceklerin ağız yoluyla alınması, *T. gondii*’nin insanlara bulaşın temelini oluşturmaktadır [49]. Hayvan etlerinin (domuz ve koyun) yemek için hazırlanması sırasında kullanılan bıçak, et kesme tahtası ve kıyma makinelerinin kullanıldıktan sonra temizlenmemesi çapraz kontaminasyon riskini oluşturmaktadır [63]. Toksoplazmozun pastörize edilmemiş keçi sütü ve kontamine içme suyu tüketilmesi ve ayrıca yumurtadan da izole edildiği birçok çalışmada bildirilmiştir [62]. Fetüste enfeksiyonun oluşumunda, annenin gebelik döneminde enfekte olmasının yanı sıra nadiren hamilelik döneminden bir ile iki ay önceki süreçte akut toksoplazmozlu olan bir gebenin, immün sistemi sağlam bir gebenin de fetüste toksoplazmoza neden olacağı belirtilmiştir [59].

Laboratuvar çalışanlarında kaza sonucu organizmaları kendilerine inoküle ederek enfekte olabilmektedir. Dünyada *T. gondii* parazitinin su ve gıda kaynaklı salgınlara sebep olabileceği nedeniyle kategori B biyoterörizm ajanı ilan edilmesine sebep olmuştur [64], [65]. Su kaynaklı toksoplazmoz salgınlığının en büyüğü 1995 yılında bildirilmiş ve epidemiyolojik araştırmada 7718 kişinin *T. gondii* ile enfekte olduğu ileri

sürülmüştür. Salgına içme suyu deposunun enfekte sokak kedileri tarafından kontamine edilmesinin sebep olduğu belirlenmiştir [66].

Yapılan çalışmalar da tüm dünyada *T. gondii*'nin görülme oranı %10-90 arasında değişmekte olup toplumlar arası seroprevalans farklılıkları; bulaşın toplumun beslenme alışkanlıklarına, toprak ve kedi dışkısı ile temasa, kişisel hijyene bağlı olduğunu göstermektedir [67]. Dünyada 500 milyon insanın; Avrupa'da doğurgan yaştaki kadınların % 37 ile % 58'inin; Türkiye'de ise % 30 ile 60'ının *T. gondii* ile enfekte olduğu bildirilmiştir[67]. Her yıl A.B.D.'de 400-4000 arası konjenital, 1.26 milyon oküler toksoplazmoz vakası, immün sistemi baskılanmış veya yetmezliği olan hastalarda sayısız ensefalit ve diğer sistemik hastalıklar geliştiği belirtilmektedir. Toksoplazmoz tanısı alan hastaların tedavi masraflarının yıllık 7.7 milyar doları bulduğu ve A.B.D.'de ortalama olarak 750 kişinin toksoplazmoz veya yol açtığı klinik tablolar nedeniyle ölümlerin görüldüğü bildirilmiştir [61], [68]. Konjenital Toksoplazmoz Norveç, Belçika ve Fransa'da gerçekleşen 1000 doğumun her 2 veya 3'ünde, A.B.D.'de her 10.000 doğumdan 1 ile 10'unda görülmektedir [61].



Şekil 2.4 Konjenital oküler toksoplazmoza ait görüntü [69]

Hayvanlarda toksoplazmozun yaygınlığı üzerine Türkiye'de yapılan ilk çalışmalar Ekmen ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [30]. Ülkemizde Toksoplazmozun prevalansı % 17,3-78 arasında değişmektedir. Yapılan bir araştırma sonuçlarına göre hamile kadınlarda toksoplazmoz prevalansı; Şanlıurfa'da % 60.4, İzmir ve çevresinde % 55, Aydın'da % 30.1 olarak saptanmıştır[70], [71]. Sarnıç ve arkadaşları [72] tarafından Diyarbakır Et ve Balık Kurumu'nda kesilen 148 koyunun kan örneklerini SFT yöntemi ile

araştırarak %36.5 oranında seropozitiflik ortaya çıktığını belirtmiştir [72], [73]. Yapılan bir çok çalışma ile ülkemizde değişen oranlarda Toksoplazmozun seroprevalansını ve seropozitiflik oranları tespit edilmiştir [73], [74].

Hayvansal kaynaklı gıdaların sağlığa uygun ortamlarda üretilip, tüketime hazırlanması; insanların çiğ et tüketiminin risklerine karşı bilinçlendirilmesi ile tüm dünyada seroprevalans değerlerinde düşüş sağlanabileceği belirtilmiştir [73].

2.4 *T. gondii*' ye ait Patogenez ve Patoloji

T. gondii zorunlu hücre içi yerleşimli olan bir parazittir ve konak hücreleri invaze ederek yaşamsal döngülerini tamamlamaktadırlar. Bunun sonucunda klinik belirtiler ortaya çıkmaktadır [12]. Ökaryotik bir parazit olan *T.gondii*'nin golgi, ribozom ve mitokondriye gibi organellere sahip olmasına rağmen çoğalabilmek için konak hücreye ihtiyaç duymaktadır [75]. *T.gondii*'ye ait enfeksiyon patogenezi konak hücrelerin aldığı hasarla ilgili olarak gelişmesinin yanı sıra ağır enfeksiyonlarda kalp kası, ciğerler, beyin gibi yaşamsal öneme sahip bir çok doku ve organlarda nekrotik alanlar oluşmaktadır [76]. Akut toksoplazmoz denilen bu dönemde her zaman klinik belirti görülmeyebilir. Kronik toksoplazmoz da ise doku kistlerinin içerisinde bradizoit şeklinde bulunmalarından ve kistin içerisinde çok yavaş çoğalmalarından dolayı hücre tahribatı oluşturmazlar böylece klinik belirtilerin görülmediği bu döneme denilmektedir [77]. Toksoplazmoz immün sistemi sağlam kişilerde oluşan enfeksiyon genellikle asemptomatik seyrederken immün yetmezliği olan kişilerde nörolojik, oküler komplikasyonlara neden olabildiği gibi sistemik komplikasyonlara da neden olabilmektedir. Parazitin plasenta veya kan yolu ile alınması yoluyla fetüste oluşan hastalığa konjenital toksoplazmoz denilmektedir [74]. Hamilelik esnasında enfeksiyonun oluşmasının dışında, latent enfeksiyonun bağışıklık sistemi baskılanmasıyla yeniden akut hale dönüşmesi sonucunda ya da fetüse bulaşmasından ileri gelebilir. Doğumdan önce oluşan bulaşmada kronik tokzoplazmozun belirtileri hafif seyretmesin yüzünden uzun süre fark edilemeyebilir [59]. Oluşan enfeksiyonun erken dönemlerinde düşükler meydana gelebileceği gibi, gebeliğin sonuna doğru ölü doğumlarda görülebilir [59], [71]. Bununla birlikte, yapılan diğer çalışmalarda, şizofren bireylerde *T. gondii* enfeksiyonunun gözlemlendiği ve şizofreni ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir [24], [78].

2.5 Toksoplazmoz

Toksoplazmoz, zorunlu hücre içi protooza olan *T.gondii*'nin sebep olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Kediler, insanlarla birlikte belirleyici konaklardır, diğer memeliler ve kuşlar orta seviye konaklardır [79], [80]. Tüm dünya ülkelerinde başta insanlar olmak üzere memeli ve kanatlı türlerini etkileyebilen zoonotik karakterli bir enfeksiyon olan Toksoplazmozun şiddeti kısmen *T.gondii*'nin suşuna bağlıdır. Enfeksiyon immün sistemi sağlam kişilerde genellikle asemptomatik seyrederken immün yetmezliği olan kişilerde enfeksiyonun seyri nörolojik, oküler ve sistemik komplikasyonlara neden olabilmektedir [81].

Kediler ve kemirici türleri *T. gondii* 'nin hem ara hem de son konakları olmaktadır [36]. *T.gondii* kedilerde şizogoni ve gametogoni evrelerini geçirerek çoğalma safhalarında diğer form yapılarını oluşturur fakat konağın bağışıklı sisteminin zayıfladığı durumlarda ciddi ölümcül Toksoplazmoz vakaları ortaya çıkmaktadır[31], [36], [82]. Bunun dışında Toksoplazmoz gebelerde konjenital enfeksiyon ve diğeri postnatal enfeksiyon olarak bulunmaktadır. Toksoplazmozun belirtilerinde ateş, terleme, kaslarda ve başta ağrı gibi semptomlar görülebilir ortaya çıkan lenfadenopati ilk bulaş sonrasında farklı zamanlarda tekrar ortaya çıkabilmektedir, organ nakli geçiren ve AIDS gibi vakalar toksoplazmoz risk grubunda yer alır ve hastalığın seyri oldukça risklidir [83].

2.6 Tanı Yöntemleri

Toksoplazmoz tanısının konulabilmesi için hastalarda görülen belirtilerin toksoplazmoz şüphesi taşıması gerekir. Toksoplazmozda görülen belirtiler çok çeşitli ve hastalık için spesifik olmadığından, klinik olarak birçok hastalıkla karıştırılmaması için tanı ve teşhis oldukça önemlidir. Bunun için hastanın epikrizinin incelenmesi bağışıklık sistem durumu dikkate alındıktan sonra hastalarda görülen belirtiler göz rahatsızlığı, serebral rahatsızlık gibi kadınlarda da konjenital toksoplazmoz belirtileri incelenmelidir [50]. Tanı için hasta geçmişinde düşükler, anomali veya ölü bebek doğumları incelendikten sonra şüpheli durumlarda gerekli olan testler istenmektedir [5].

Toksoplazmozun klinik belirtileri yerleştiği organa göre de oldukça değişiklik göstermektedir bu sebeple insanlarda toksoplazmozun kliniği tipik olmadığından doğru

tanı koyabilmek için farklı birçok yöntem kullanılmaktadır. Genel olarak tanı yöntemleri direkt ve indirekt tanı teknikleri olarak ikiye ayrılır [51].

2.6.1 İndirekt yöntemler

İndirekt tanı teknikleri serolojik testler yardımı ile toksoplazmoze karşı oluşan antikorların varlığını araştırılır. Bu yöntemler genelde *T. gondii*'ye özgü antikorları belirlemek için kullanılan serolojik testleri kapsamaktadır ve enfeksiyonun genellikle asemptomatik olarak seyrettiği süreçlerde oldukça önemlidir[51], [77] .

2.6.1.1 Sabin-Feldman Boya Testi (SFT)

Sabin Feldman Boya Testi; kan serumunda bulunan antikorların kompleman ile birlikte canlı takizoitleri nötralize ederek metilen mavisi ile boyanmaları yapılmaktadır [84]. Bu test Nötralizan bir test olup enfeksiyonun başlangıcından sonraki haftalarda oluşan İmmünoglobulin G (IgG) antikorlarını ölçer [84]. IgG antikorları enfeksiyon sonrasında 1 ile 2 ay arasında en yüksek seviyesine ulaşmakta ve kanda uzun süre kalmakta ve pozitiflik yaşam boyunca devam etmektedir [85].

2.6.1.2 Enzim Bağlı Immunosorbent Yöntemi (ELISA)

ELISA yöntemi ilk kez Engvall ve Perlmann tarafından uygulanmıştır. *T. gondii*'ye karşı oluşan antikor yanıtlarını ölçmek için bu yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır [50]. Bu teste kullanılan antijen ya da antikor kimyasal olarak enzime bağlanırsa enzimatik ve immünolojik bir deneyin sonunda enzimlerin katabolik özelliklerinden dolayı substrat molekülü ile tepkimeye girer ve enzim ile antijen veya antikor substratının hidrolizi sırasında immünolojik tepkimeyi arttırır [86].

2.6.1.3 Immunosorbent Aglütinasyon Yöntemi (ISAGA)

IgM, IgA, ve IgE antikorlarının belirlenmesinde kullanılır ve ELISA'ya göre daha duyarlı, özgüdür. Bu yöntemin başlangıç aşamasında insan IgM zincirinin CH₂ ucuna özgü olan monoklonal antikorların kullanıldığı Immünoglobulin M'i (IgM) yakalamaya yönelik bir testtir. Bu testin avantajları olarak IgM antikorlarının ELISA'da olduğu gibi enzime bağlı bir konjugat kullanılmaması ve aglütinasyon testlerinin daha basit olmasından kaynaklanmaktadır [87]. Negatif reaksiyonlarda *T. gondii* 'ler çökme eğilimi gösterirken,

pozitif olgularda *T. gondii* 'ler bulut şeklinde kuyuların kenarına yapışık bir aglütinasyon gösterir [87], [88].

2.6.1.4 İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT)

Bu test antijenlerin seri olarak dilüe edilmiş hasta serumu ile inkübe edildikten sonra yıkanması ve floresan ile işaretlenmiş antiglobulin antikorlu serumla tekrar inkübe edilmesi sonucu ve floresan mikroskopla incelendiğinde antikorla birleşmiş olan *T. gondii*'lerin çevresinde sarı ve yeşil floresan ışıma ile görülmektedir [77]. Tokzoplazmoz sonucu oluşan spesifik IgM'i ortaya çıkarmak için kullanılan IgM-IFAT testi romatoid faktörün pozitif olduğu durumlarda ve bazı kollojen doku hastalıklarında yanlış pozitiflik, immün sistem yetmezliğinde negatif sonuçların alınmasına neden olabilmektedir [89].

2.6.1.5 İndirekt Hemaglutinasyon Testi (IHAT)

T. gondii'nin eriyebilen antijenlerine karşı ortaya çıkan antikorların belirlenmesinde kullanılır [90]. Testte Tannik asitle duyarlaştırılmış koyun veya hindi alyuvarları *T. gondii* antikorları içeren serumla karıştırıldığında alyuvarlar aglütine olur. IHAT'nın çok geç pozitifleşmesi nedeni ile akut toksoplazmozun tanısında yararlı olmamaktadır [91].

2.6.1.6 Kompleman Birleşmesi Deneyi (KBD)

Antijen olarak bozulmamış *T. gondii* veya eriyebilen kısımları kullanılmaktadır. Bu test IHA testten daha önce pozitifleşirken, SFBT ve IFAT'dan daha sonra pozitifleşir ve bu testlerin titrasyonunun fazla yükselmediği durumlarda KBD ile titrasyon yükselmesi takip edilir ve IgG ve IgM antikorlarının her ikisinde belirlenebilir [91]. KBD'nin negatifken pozitifleşmesi veya titrenin yükselmesi aktifleşen enfeksiyonu gösterir [90].

2.6.1.7 Lateks Aglutinasyon Test (LAT)

Lateks partiküllerine absorbe edilmiş eriyebilen antijen kullanılmaktadır. Akut enfeksiyonların tanısını koyabilmek için IgM antikorlarını belirleyebilecek testlerin kullanımı ön plana çıkmaktadır[86], [92]. Latent enfeksiyonlar ve diğer parazitlerin varlığında, *T. gondii* 'ye karşı zayıf antikor titrasyonunda çapraz reaksiyon görülebilir [86].

2.6.2 Direk Tanı Yöntemleri

Direkt tanı yöntemleri etken izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), lenfosit kopyalama tekniği ve histolojik metotlar gibi parazitin varlığı veya DNA'sının gösterilmesi amaçlanmaktadır [93].

2.6.2.1 *T. gondii* İzolasyonu

Akut enfeksiyonlarda *T. gondii* 'lerin kan ve vücut sıvılarından izolasyonu ile ayrıca lenf, beyin, miyokard biyopsi materyallerinde, *T.gondii* 'ye özgü antikorlar aranmaktadır. Doku kistlerinin plasenta, fetüs ve yeni doğanda saptanması ile direk tanıya gidilir ve her zaman konjenital toksoplazmoz tanısını kesinleştirir [91].

2.6.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu tanı yönteminde, çok az miktarda ki nükleik asit miktarının çoğaltarak parazit varlığının belirlenmesinde kullanılmaktadır bunun için DNA polimeraz enzimi yardımıyla spesifik nükleik asit parçasının defalarca sentez edilmesi ile oluşmaktadır [94]. Oküler, serebral ve disemine hastalığı olan olguların vücut sıvı ve dokularında PCR ile *T. gondii*'ye ait DNA saptanmaktadır ve gebelerde Toksoplazmoz enfeksiyonu için amniyosentez sıvısından PCR ile çalışılmaktadır [94].

2.6.2.3 Histolojik Tanı

Vücut sıvıları, smear veya doku kesitlerinde takizoitlerin görülmesi akut tokzoplazmoz tanısı için iyi bir yöntem olup, AIDS'li hastalarda toksoplazmik ensefalitte yapılan biyopsilerde sadece %5'inde tokzoplazmoza özgü histolojik yapı saptanmıştır [95]. Dokuda *T. gondii* 'lerin varlığını ortaya çıkarmak için, floresanlı antikor boyalarından ve Giemsa boyasından yararlanılmaktadır [96].

2.6.3 Nanoteknolojik Yöntemler ile Toksoplazmoz Tanısı

Günümüzde biyoteknoloji ve nanoteknoloji alanlarının gelişmesi ile birlikte bu alanlarda yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir. Nanomateriyaller tanı ve teşhis yöntemleri olarak kullanılmaktadırlar [97]. Literatürde yapılan çeşitli çalışmalar ile *T. gondii* enfeksiyonu için altın nanopartiküller ile tanı yöntemleri araştırılmıştır [98]. Jiang W., ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış oldukları bir çalışmada 15 nm boyutundaki altın nanopartiküller ile hazırlanan dinamik akış immünokromatografi testi (DFICT) ile kediler ve köpeklerdeki toksoplazmoz enfeksiyonun serolojik teşhisi incelenmiştir [99]. Yapılan bir diğer çalışmada ise Jiang ve arkadaşları 2013 yılında manyetik altın nanopartiküller (Au-Fe₃O₄) kullanılan bir elektrokimyasal sensörün ve grafen levhaların IgM anti-*T.gondii*'nin belirlenmesinde etkili olduğu göstermişlerdir [100].

Li ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada hamilelik döneminde TORCH (Toksoplazmoz, Rubella, Sitomegalovirus ve Herpes Simpleks Virüs enfeksiyonları) olarak adlandırılan enfeksiyonlara neden olan mikroorganizmlara karşı spesifik IgM'nin tespit edilmesi için lateral flow immünokromatografik (LFIA) çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. IgM anti-insan (human) ile konjuge edilen, PMAA ile modifiye edilen altınmag nanopartiküller kullanılan LFIA, çeşitli patojenlerin uyarılarak tespit edilmesi yeteneğine ek olarak hassaslık ve spesifiklik elde edildiği raporlanmıştır [101].

Lateks piezoelektrik immünoaglutinasyon testini (LPEIA) geliştirmek amacı ile enfekte olmuş tavşan serumundan *T. gondii* antijenleri ile kaplanmış 10 nm boyutlarındaki altın nanopartiküllerin lateksten geçirilerek Toksoplazma antikorlarının tespit edilebilmesi için, 1: 5500'a kadar olan dilüsyonlarda antikor titrelerinin tespitini belirlemeye çalışılmıştır [98].

Serolojik testlerin yanı sıra, diğer *T. gondii* tanı testleri nanopartiküller ve DNA problemleri aracılığıyla genetik materyallerin hızlı bir şekilde tespit edildiğini yapılan çalışmalar ile raporlanmıştır. Fe₃O₄ manyetik nanopartikülleri ile sentezlenmiş quantum dotlar geliştirilerek bu problemlerin hedef DNA tespitinin hassasiyetini ve özgüllüğünü artırılmasıyla ilgili çalışmalar gerçekleştirmiştir [102].

Litarürde yapılan çalışmalara göre nanomalzemelerin kullanımının *T.gondii*'nin farklı formlarına karşı özgüllük ve hassaslık sağlamaları açısından tanı ve teşhis için antikor ve antijen tespitini geliştirilebileceği anlaşılmaktadır.

2.7 Toksoplazmozun Tedavisi

Toksoplazmoz hastalığının tedavisi hastalığın seyri, süresi ve klinik bulgularına göre oldukça farklılık göstermektedir bundan dolayı Toksoplazmoz enfeksiyonunun kesin tedavi süresi bilinmemektedir. Toksoplazmoz sonucu ortaya çıkan semptomların azalması sağlanana kadar iki ile altı hafta boyunca ilaç tedavisine devam edilmelidir [103]. İmmün yetersizliği olan hastalarda tedavi tüm semptomlar iyileştikten sonraki iki hafta boyunca tedavi sürdürülmelidir. *T.gondii* ile enfekte olan toksoplazmozlu AIDS'li hastalarda Primetamin-Klindamisin ya da Primetamin-Sulfadoksin ile birlikte tedavi yapılır [104]. Şu anda toksoplazmozun en etkili tedavisi folik asidin biyosentezini bozan sinerjik bir etkiye sahip olan Primetamin ve Sülfadiazinin kombinasyonudur [104]. Bununla birlikte bu tedavi hipersensivite, kemik iliği baskılanması ve teratojenik etkiler dâhil olmak üzere önemli olan birçok yan etkiye sahiptir.

Konjenital tokzoplazmozlu bebeklerin, aynı şekilde akut tokzoplazmoz geçiren hamilelerin dikkatli bir şekilde tedavi edilmesi gereklidir. Konjenital tokzoplazmozlu olan bebeklerin tedavisindeki takizoitlerin sebep olduğu doku yıkımının önlenmesi ve uzun vadede hastalığın önlenmesi en önemli amaçlardandır [105].

Hayvanlarda oluşan toksoplazmozun tedavisi koyunlarda etkin ve ekonomik olmadığından dolayı önerilmemektedir. Toksoplazmozun biyolojik bariyerleri geçebilme yeteneği olmasında dolayı, spesifik olarak hedefe ulaşabilen ve toksik yan etkileri minimize edilen istenilen etkileri oluşturan bir ilaç ile farmasötik tedavisi henüz mevcut değildir[106].

2.7.1 Nanoteknolojik Yöntemler ile Toksoplazmoz Hastalığına Karşı Yapılan İlaç Çalışmaları

Nanoteknoloji ile ilaçların farmakokinetik özelliklerini geliştirmede ve kontrollü ilaç taşıma sistemlerini oluşturulmasında oldukça etkilidir. Böylece ilaçların farmokinetik özelliklerinin artırılması, kararlılık, çözünme oranı ve bunların yanı sıra ilaç aktivitesinin geçirgenliğini gibi etkin birçok özellik kazanmasını sağlanmaktadır.

T. gondii'nin sebep olduğu enfeksiyonlara karşı tedavinin iyileştirilmesi için nanoteknolojik yöntemler ile yapılan çalışmalar umut vadedicidir. Altın ve gümüş temelli metalik nanopartiküller, polimerik nanopartiküller, lipit nanopartiküller, lipozomlar ile ilgili literatürde birçok çalışma bulunmaktadır.

Gaafar ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada doğal bir polisakkarit olan kitosan ile polimerik nanopartiküllerin ve gümüş nanopartiküllerin birlikteliğinin toksoplazmoz ile enfekte olmuş farelerinin karaciğer ve dalaktaki parazit yükünü azalttığını raporlamıştır [107]. 2015'te Anand ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, çeşitli mikroorganizmalara karşı aktivitesi ve demir ayırma özelliği bulunan bir glikoprotein olan laktoferinin (BLF) ile yüklü aljinat-kitosan polimerik nanopartiküllerin *T. gondii* takizoitleri ile enfekte olmuş BALB/c farelere oral etkilerini rapor etmişlerdir. Laktoferrin ile yüklü aljinat-kitosan polimerik nanopartiküllerinin karaciğer ve dalakta nitrik oksit ve hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak inflamasyonu ve *T. gondii* parazit çoğalmasını azalttığını göstermişlerdir [108].

Pissuawan ve arkadaşlarının tarafından, 39.5 nm'lik altın nanorodlar ve 20 nm'lik altın küreler ile toksoplazmoz yüzey antijenine spesifik olan RH suşunun antikorlarıyla konjuge edilmiş nanopartiküllerin, kullanımını inceleyen deneyler yapmışlardır. Oluşturulan bu konjugatların takizoitlerin yüzeyine bağlanarak lazer ışınına maruz kalındığında in vitro ortamda parazit öldürülmesini artırmıştır, dozun etkisi lazer ışınına maruz kalma sürecine bağlı olduğu bildirilmiştir [109].

Atovaquone, *T. gondii* enfeksiyonuna karşı potansiyel etkinliğin kanıtlanmış olan toksoplazmozda kullanılan bir ilaçtır. Bununla birlikte, Atovaquone düşük çözünürlükte olması biyoyararlanımını düşürmektedir. Bu nedenle, yapılan bazı nanoteknolojik yaklaşımlar ile oluşturulan konjugatlar Atovaquone ile birleştirilerek anti *T. gondii* aktivitesini ve biyoyararlanımı artırılmasına yönelik çalışmalar yapmışlardır [110].

Sordet ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları çalışmada [111] 206 nm Atovaquone yüklü PLA nanokapsüllerin akut ve kronik deneysel toksoplazmozda terapötik etkilerini incelemişlerdir. Farelerin Atovaquone içeren nanokapsüller ile tedavisi, hayatta kalma süresini artırarak ve serbest Atovaquone ile kıyaslandığında paraziti azaltarak akut ve kronik enfeksiyon modellerinde ilaç aktivitesini artırmıştır [111].

2.8 Toksoplazmoz Hastalığının İmmünolojisi

İmmün yanıt; Patojenlerden kaynaklı olarak oluşan enfeksiyonlara karşı organizmayı savunmak için immün sistemdeki organların, hücrelerin ve bu hücrelere ait ürünlerin, patojenlerin ve birbirleriyle olan etkileşimlerinin tümünü kapsamaktadır [112].

Toksoplazmoz hastalığı humoral ve hücresel immün yanıt oluşumuna neden olmakla beraber özellikle toksoplazmoz hastalığının akut döneminde, trofozoitlerin periferik kandan çekilmesine, hastalık belirtilerinin önlenmesine ve parazit yükünün azalmasına neden olmaktadır [113] ve *T.gondii*'ye karşı oluşan antikorların, konakta hücre dışında bulunan parazitlere karşı etkili olduğu ve eriterek öldürdüğü bilinmektedir [114], [115].

İmmün sistem ve *T.gondii* arasındaki etkileşim olması durumunda parazit miktarında düşüşler görülürken kalanların morfolojik şekillerinde farklılıklar meydana gelmektedir. *T. gondii*'nin herhangi bir form yapısı vücuda girdiğinde öncelikle makrofajları aktive etmektedir. Aktive olan makrofajlar aktif veya pasif fagositozla hücre içine aldıkları parazitleri, asidik vakuollerinde öldürmekte ve antijenleri major histokompabilite kompleks molekül Tip II ile sunmaktadır [116]. Sunulan parazitlere ait antijenler, CD4+ T lenfositlerini aktive ederek yardımcı T lenfositlerine diğer bir adıyla Th1 dönüştürmektedirler[117].

İmmün sistemde IL-2 ve INF- γ salgılanmasıyla artan makrofaj ve öldürücü CD8+ T lenfositleri aktive ederek ve immün sistem parazitleri kontrol altına alır ve hastalık asemptomatik olarak gerçekleşir. INF- γ ve IL-2 düzeylerinin enfeksiyona karşı konak immünitesi ile ilişkili olduğu laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalarla incelenmiştir[118]. Toksoplazmoz; immün yetmezliği bulunan özellikle AIDS hastalarında CD4+ T lenfositlerinde azalma ve Th1 lenfositlerinin Th2 hücrelerine dönüşmesiyle birlikte parazitlerde kontrol altına alınamayan bir çoğalma ve virülans artışına neden olur ve hastada ölüme yol açar. Sitokinlerin Toksoplazmoz üzerinde etkilerine bakıldığında, INF- γ 'nin en etkili sitokin olduğu görülmüştür[119]. Tümör nekroz faktörü (TNF), INF- γ tarafından *in vitro* olarak aktive edildiğinde farelerde toksoplazmoza karşı korunma elde edilmiştir. Makrofajlar tarafından INF- γ salgınmasıyla IL-2, IL-7 ve IL-12'nin indirekt olarak toksoplazmoza karşı koruyucu etkisi olduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir [117]. INF- γ 'nin bunun dışındaki etkilerine bakıldığında,

anti-paraziter özelliği dikkat çekmektedir ve INF- γ toksik oksijen radikallerinin ve nitrik oksit salgılanmasına neden olmaktadır. Erken dönemler de hastalarda IL-1, IL-12 ve TNF- α 'nın doğal öldürücü hücrelerinin, INF- γ üretimi için makrofajların aktive olmasına sağladığı belirtilmiştir [117].

Toksoplazmoza karşı etkili olan humoral antikorlar IgG, IgM, IgA, IgE gibi ekstrasellüler alanlarda kompleman ile birleştiklerinde takizoitleri öldürmektedirler [115].

2.9 Toksoplazmoza Karşı Yapılan Aşı Çalışmaları

Aşı; mikroorganizmaların yâda bu patojenlere ait olan bu parçalarının canlı vücudunda etkin immün yanıt oluşturmalarını sağlamak amacıyla bağışıklık sisteminin duyarlılığını arttırmaktır.

T. gondii oldukça farklı antijenik yapı ve kompleks bir hayat döngüsüne sahip olmasından kaynaklı olarak *T. gondii*'ye karşı etkin bir aşı geliştirilmesini kısıtlamaktadır. Şuana kadar ticari olarak piyasada bulunan tek aşı, S48 suşunun canlı ya da atenüe takizoitleri ile geliştirilmiş olan ve veterinerlikte uygulanan Toxovax aşısı [120] olup toksoplazmozü önleyebilen ve kontrol edebilen herhangi bir etkili aşı yoktur [121]. Toksoplazmoza karşı aşı amaçlı kullanılan yaklaşımlar aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır.

2.9.1 Canlı Aşılar

Hücre kültürleri veya hayvan embriyoları gibi farklı üreme ortamlarında mikroorganizmaların çok sayıda pasajlanması ile attenüe edilen böylece vücut için zararsız hale getirilmesiyle oluşturulan zayıflatılmış canlı mikroorganizmalar aşı içeriği olarak kullanılır. Vücut içerisine verildiklerinde çoğalarak yayılır ve lenfoid ve miyeloid hücrelerini uyarırlar.

T. gondii 'ye karşı yapılan ilk aşı çalışmaları 1980'li yılların başına dayanmaktadır [83]. *T. gondii* S48, TS-4 ve T-208 mutant suşları aşı adayı olarak tanımlanmıştır. Toxovax [120] aşısı S48 suşunun canlı ya da atenüe takizoitleri ile geliştirilmiş olan bu aşı koyunlarda uygulanabiliyor olsa da insanlarda ya da diğer hayvanlarda toksoplazmozü önleyebilen ve kontrol edebilen herhangi bir etkili aşı yoktur [121]. S48 Toxovax canlı aşının

bradizoit olma özeliğini kaybetmiş suş ile yapılması ve canlı olması enfeksiyona neden olabileceğinden dolayı kullanılmamaktadır [122].

Canlı ama zayıflatılmış olan mikroorganizmaların mutasyon ile virulansa geri dönüşme riskinin bulunması, soğuk zincire uyulmamasından kaynaklı olarak aşının etkinliğini kaybetmesi, immün sistem yetmezliği olan kişilere uygulanamaması gibi aşı etkinsizliği ve güvenilirlik problemleri mevcuttur. Patojenin tamamının kullanıldığı aşılar ise reaktogenik bileşenleri içerebileceği için beklenmeyen yan etkiler oluşturabilir. Bu yan etkilerin önlenmesi ile daha efektif özellikli aşıların geliştirilmesi için yeni yaklaşımlar denenmeye başlanmıştır. Bunlar peptit aşıları, rekombinant protein aşıları, DNA aşıları gibi çalışmalarından oluşmaktadır [123].

2.9.2 Subunit Aşılar

Aşıda kullanılan mikroorganizmalar öldürüldükten sonra çeşitli yöntemler ile parçalanması ile hazırlanan aşı türüdür ve mikroorganizmaya ait olan antijenik özellikteki kısımlar kullanılır. Mikroorganizmaların patogeneğinde görev alan organeller kullanıldığı için bu aşıların toksik etki göstermemelerinden kaynaklı olarak inaktivasyona gerektirmez. Subunit aşının dezavantajı *T.gondii*'nin yaşam döngüsünde yer alan farklı formları bulunmasından kaynaklı olarak her formuna karşı her zaman koruma sağlamamaktadır [123].

İmmünojenik protein ekstraktları kullanılan aşılarda, ekstrakt içinde immün sistem aktivatörlerini ortadan kaldıran ya da engelleyen farklı hücresel yapıların da bulunması bu aşıların yeteri kadar koruyucu olmamasının nedeni olarak düşünülmektedir [124].

Literatürde yapılan çeşitli çalışmalar ile *T. gondii* takizoitlerin veya SAG1 (p30), GRA2 (gp28.5), GRA5 (p21) veya boşaltım-salgı antijenleri ESA gibi özgül doğal antijenleri ile bağışıklanan farelerin ve sıçanların *T. gondii*'ye karşı korunduğu gösterilmiştir. Bir takım beyin kistlerinde azalmaların olduğu ile değerlendirilmiştir [125]. Koruyucu immünitinin oluşturulmasında için *T. gondii* antijenleri arasında bulunan SAG ailesinin bazı üyeleri ROP ailesinin ve GRA ailesinin [126] etkili oldukları gösterilmiştir.

2.9.3 Rekombinant Protein Aşıları

Bağışıklık sistemini uyarıcı özellikteki antijenler, bakteri, mantar gibi uygun vektörler kullanılarak rekombinant olarak elde edilir ve kullanılır. Rekombinant elde edilen antijen biyokimyasal yollarla karbonhidrat veya protein olarak saflaştırılır. Ancak rekombinant aşıların geliştirilmesi kompleks ve maliyetli olmasından dolayı dezavantajlara bulunmaktadır. Biemans ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptıkları çalışmada PSBAS1c adjuvanı ile *Pichia pastoris* maya içinde ifade edilen rSAG1 ile farelerin aşılınması, koruyucu bir etkiye neden olmuş ve bir Th1 yanıtına yönelik bağışıklığı artırdığını raporlanmıştır[127].

Haumont ve arkadaşlarının 2000 yılında kobaylarda yapmış oldukları araştırmada, *P. pastoris* tarafından ifade edilen rSAG1, koruyucu bağışıklığı oluşturduğu ve konjenital toksoplazmozü önlediği bildirilmiştir [128]. SAG2, SRS1 [129] *T. gondii* antijenlerinin koruyucu bağışıklığın uyarılması Mishima ve arkadaşları tarafından incelenmiştir.

2.9.4 DNA Aşıları

Antijen kodlayan geni içeren DNA'nın vücut içerisine verilmesi için yapılan aşı türüdür. Bunun için viral bir antijeni kodlayan DNA parçası ile plazmid birleştirildikten sonra direkt olarak hücre içerisine gönderilir. Hücreler tarafından içeri alınan DNA, protein ürünü halinde sentezlenir. En büyük avantajı viral antijenlerin doğal enfeksiyonlardaki gibi sentezlenmesi ve antijenlerin doğal formlarında kullanılmasıdır [130].

DNA aşıları, hedef olarak seçilen antijenik proteini kodlayan gen bölgesinin uygun bir vektöre yerleştirilen ve konak hücreye verilmesiyle hücrede TH1 veya TH2 immün yanıtları oluşturmaktadır [124], [131]. 2011 yılında yapılan bir çalışmada yapılan DNA aşısında SAG1 ve ROP2 proteinlerini kodlayan plazmitler ile kokteyl DNA aşı oluşturulmuştur. Her formda bulunan antijenlerin kullanıldığı kokteyl DNA aşısının immün yanıtı arttırdığını gösterilmiştir [132].

DNA aşılarının farelerde yeterli düzeyde immün yanıt oluştururken primatlar ve insanlarda yeterli düzeyde immün yanıt oluşturmamaktadır [133]. Üretilen antijen miktarının yetersizliği, plazmit DNA'nın hücrelere eşit düzeyde dağılmaması veya immün yanıtın yeterince uyarılamaması bu aşıların dezavantajlarıdır [123].

2.10 SAG1'in Önemi

T. gondii'nin yüzey antijenleri hücre membranı üstüne lokalize olmuş yapılardır. 1980 yılında Handman ve ark.'larının, 1982 yılında Kasper ve ark.'larının ve 1988 yılında Couevrur ve ark.'larının yaptıkları çalışmalarla *T.gondii*'nin yüzey antijenleri tanımlanmıştır. SDS-PAGE yönteminin kullanıldığı bu çalışmalarda, *T.gondii*'ye ait beş tane yüzey antijeni tanımlanmıştır. *T. gondii*'ye yüzey antijenlerine (SAG) ait olan proteinler SAG1, SAG2 (22 kDa), p23, p35 ve SAG3 (45kDa) olarak gösterilmektedir [134]. Bu proteinler içinde en iyi karakterize edilen SAG1 proteindir. Tüm *T. gondii* suşlarında korunmuş olan SAG1 proteini, takizoitlerdeki ana yüzey antijeni olarak gösterilmesinden dolayı özellikle aşı çalışmalarında, tanı çalışmalarında SAG1 geni veya SAG1 proteini tercih edilmektedir [134]. Ancak farklı kaynaklar veya farklı izolasyon ile saflaştırma yöntemleri nedeniyle antijenlerin kalite ve miktarı değişkenlik göstermektedir [135], [136], [137]. Birçok araştırmacı rekombinant SAG1 üretmeye çalışmış ancak çözünmeyen form yapısı, yanlış katlanmalar sonunda immunoaktivitesini kaybetmesi nedeniyle başarılı olamamıştır [138]. Bu nedenle SAG1 antijeninin epitoplarını içeren peptit aşılarının kullanımı daha cazip bir yaklaşım olmaktadır.

2.11 Peptid Aşıları

Peptid aşıları, hastalık etkeninin antijenik özelliğe sahip proteinlerin fragmentlerinden oluşmakta ve immün sistem tarafından tanınmaktadır. Peptit aşılarının en önemli avantajlarına bakıldığında immün sistemin uyarılmasında, özgül antikorların sentezlenmesine yönelik sitotoksik T hücrelerini ve ya B hücrelerini içerirken, her ikisine yönelik de olabilmektedir[139], [140].

Peptit temelli subunit aşılar minimal bir mikrobiyal komponent kullanarak immün yanıt oluşturmaya hedefler. Bu aşılar genellikle kimyasal olarak sentezlenirler, enfekte edici özellikleri yoktur. Fiziksel olarak daha stabil olmanın yanı sıra klasik aşılar göre daha kolay ve ucuz olarak elde edilirler. Patojen komponentinin minimal seviyede olması nedeniyle alerjik reaksiyon ve otoimmün yanıt riski de azaltılmış olur. Ancak mikrobiyal komponenti minimal seviyede olması nedeniyle yeterli immün yanıt oluşturabilmek için adjuvan yani immün yanıtı artırıcılara gereksinim duyulur [141]. Bundan dolayı

güçlü bir bağışıklık tepkisinin uyarılması için, peptidlere karşı antikor oluşturmada taşıyıcı moleküller gerekmektedir. Bu moleküller bağışıklık sisteminin aktive olmasına destek olacağı gibi kimyasal stabilitenin artmasında da faaliyet gösterirler [140], [142].

2.12 Nano aşılar

Tıp alanında nano partiküllerin kullanılmasıdaki en önemli etkenlerden biri de partiküllerin hücresel bileşenlere yakın boyutta olması ve hücreler tarafından endositoz mekanizması ile hücre içine alınabilmesidir [8]. Bundan dolayı nanoteknolojinin tıp alanındaki kullanımı ilaç taşınımından hastalıkların teşhisine oldukça geniş yer bulmaktadır. Günümüzde nanoteknolojideki gelişmeler ile birlikte yeni aşı tasarımlarının oluşturulmasını sağlamıştır böylece nano aşı alanı oluşmuştur. Nano yapıların aşı teknolojisindeki önemi ise gerek profilaktik gerekse terapötik yaklaşımlarda taşıyıcı bir sistem olarak antijen işlemeyi arttırma veya bağışıklık sistemini aktif duruma getirmek için immunostimülan olarak kullanılması şeklinde açıklanabilir [8]. Günümüzde 1000 nm'den daha küçük olan nano yapılar, *T. gondii* enfeksiyonunun önlenmesinde de alternatif yöntemler olarak araştırılmaktadır. Nanoaşılar toksisiteyi düşürürken farmakokinetiği modüle edebilirler, biyoyararlanımı ve hedef salımını artırabilirler [143].

2.12.1 Nano Aşı Teknolojisinde Kullanılan Nano Yapılar

Polimerik nanopartiküller, biyoyumluluk ve biyobozunurluk gösteren katı sistemlerdir; burada terapötik ajan çözünmüş, absorbe edilmiş ya da polimerin matriksine enkapsüle edilmiş olabilir. Bu nanomateryaller aljinat, insülin ve kitosan gibi doğal polimerler içerebildikleri gibi, poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polietilen glikol (PGE) ya da polyester gibi sentetik polimerler de içerebilirler [144].

Polimerik nanomateryaller taşıyıcı olarak kullanıldıklarında, aşı adaylarının biyoyararlanımını, stabilitesini ve aktivitesini artırırken, toksisitesini azaltıp antijenik yapının degradasyonunu önleyerek ve antijenlerin salımını kontrol ederek etkinliklerini artırır [145].

Nano aşılar da kullanılan nanopartiküller genelde nanokapsüller ve nanoküreler olmak üzere gruplandırılır [146].

2.12.2 Toksoplazmoza Karşı Yapılan Nano Aşı Yaklaşımları

Toksoplazma aşılarının geliştirilmesinde nanopartiküller ve lipozomlar da dâhil olmak üzere çeşitli nanoteknolojik uygulamalar mevcuttur. Nanopartiküllerin *T.gondii* enfeksiyonlarına karşı etkili immün yanıt oluşturduğu fare modellerinde yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir.

Stanley ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada *T.gondii* takizoitlerinin PLG ile enkapsüle ederek hazırlanan nanopartikülleri mukozal aşılama yolu ile koyunlara vermişlerdir. Koyunlar intranasal yoldan aşılanmış ve ookistlerle enfekte edilmişlerdir. Sonuçta hem hücresel hem de güçlü mukozal IgA antikor yanıt oluşturduklarını rapor etmişlerdir [123].

Dimier Poisson ve arkadaşları, gözenekli, maltodekstrin esaslı lipit çekirdekli nanopartiküllere (DGNP/TE) enkapsüle edilen RH suşunun *T. gondii* antijeninin total ekstraktı ile CBA/J faresinin nazal immünizasyonunun koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir. DGNP/TE IL-1, IL-12, IL-6, and TNF- α 'nın hücreler tarafından üretiminin artırarak bu nanopartiküllerin kullanımının Th1/Th17 hücresel cevapları ile birlikte artan IgG üretimi, *T. gondii* tarafından enfekte olan kronik ve akut modellerdeki fareleri koruyarak humoral bağışıklık özgüllüğünü uyardığını rapor etmişlerdir [147].

Benzer şekilde, Tanaka ve arkadaşları, TLR 11 tarafından tanınan güçlü oligomanoz (TgPF-OML) ile kaplanmış lipozomların içine enkapsüle edilen *T.gondii*'ye ait profilin (tgPF) ile hazırlanan nanopartiküller ile C57BL/6 farelerine immünize ederek *T. gondii*'nin sitojenik PLK suşunun neden olduğu toksoplazmoza karşı korumayı artırdığını göstermişlerdir [148].

2009'da, Chen ve arkadaşları, *T. gondii*'nin ME49 ve RH suşu ile pGRA4 ve lipozomlara enkapsüle edilen yoğun granül protein 4 rekombinantını (liposom-pGRA4) kullanarak BALB/c ve C57BL/6 fareleri immünize etmişlerdir. pGR4-lipozomları ile immünizasyon sonrası serumda pGRA4 antijeni ile uyarılan splenositlerde IL-2 ve IFN- γ 'yı indükleyerek IgG2a seviyelerini artırdığını bildirmişlerdir [149].

Chadal ve arkadaşları, modifiye dendrimer nanopartiküller (MDNP) içersine enkapsüle edilen apikal membran antijenleri olan GRA6, ROP2A, ROP18, SAG1 ve SAG2A ile şifrelenen RNA replikonlarının kullanarak RNA'yı, hücrelerin sitoplazmalarına

taşıyabildiğini ve nükleazların aktivitelerinden koruyabildiğini rapor etmişlerdir. Dahası, MDNP-RNA ile tek doz fare immünizasyonunun *T. gondii*'nin oluşturduğu ölümcül enfeksiyonlara karşı koruyucu olabildiğini ve aynı zamanda IFN- γ ve IL-2'nin hafif ekspresyonu ile birleştiğinde CD8+ T lenfositlerinin proliferasyonunu aktive ederek uyardığını göstermişlerdir [150] .

2.12.3 Nanoteknolojik Aşılarda PLGA'nın Önemi

Saflaştırılmış proteinler gibi patojen alt birimlerine dayanan modern aşılarda çoğu, geleneksel aşı antijenlerine göre daha az immünojeniktir ve genelde güçlü bir bağışıklık oluşturamaz [151]. Bu alt-birim aşılarda koruyucu bağışıklık tepkileri ortaya çıkarmak için etkili yardımcı maddeler gerektirmektedir. Bu nedenle, aşılarda günümüzdeki önemli konularından biri, aşılarda immünojenikliğini veya etkililiğini artırılması için yeni adjuvant yaklaşımların geliştirilmesidir [151]. Bağışıklığı ve korumayı geliştiren çeşitli adjuvanlarla ilgili yapılan birçok çalışmada tanımlanmıştır.

Son yıllarda, PLGA polimerleri, aşı antijenlerinin kapsüllenmesi, kontrollü salım sistemlerinin oluşturulmasında önemli yer tutmaktadırlar. PLGA polimerleri, PLGA ile enkapsülasyon yapılması aşı adjuvanı veya taşıma sistemi olarak önemli avantajlar sağlamaktadır. Poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA), biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak uyumlu olan farklı bir polimerdir [152]. Özellikle, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan PLGA polimerleri yıllarca ilaç taşıyıcıları [144] olarak yaygın şekilde kullanılmıştır [153]. PLGA polimerleri aşı antijenlerini kapsüllemek için güvenli ve güçlü adjuvanlar veya iletim sistemleri olarak kullanılmaktadır [154]. PLGA, biyolojik olarak uyumlu metabolitler olan laktik ve glikolik asitlere hidroliz yoluyla biyolojik olarak parçalanarak doğal metabolik yollar vasıtasıyla vücuttan atılabilmektedir [153]. PLGA mikrokapsülasyonu, antijeni vücudun olumsuz şartlarında bozulmaya karşı korur [155] ve antijenlerin uzun süreler boyunca serbest bırakılmasına izin verir [156]. Bu adjuvan etkileri, *T.gondii* gibi intraselüler patojenler ortadan kaldırmak için gerekli olan güçlü bağışıklık özelliğini, özellikle hücre aracılı bağışıklığı artırarak antijenin immünojenitesini güçlendirir [154]. PLGA mikro-parçacıklarının PLGA-kapsüllü antijenlerin uzatılmış salım hızını düzenleyebilme özelliği ile mikropartikülle aşılanmış hayvanlarda uzun vadeli immüniteye neden olduğu yapılan

Çalışma ile etkinliği gösterilmiştir [154]. Sürekli ve uzatılmış antijen salınımı, uzun vadeli korumaya erişmek için antijene spesifik bağışıklığı önemli ölçüde arttırmakta ve uzatmaktadır [156]. PLGA mikropartikülleri ile immünize edilen hayvanlarda uzun süreli etkin bağışıklık yanıtlarını oluşturduğu ve enkapsüle edilmiş olan antijenlerin kontrollü salımını gerçekleştirdiği gösterilmiştir [157].

PLGA partiküllerinde antijen yükünün arttırılması, salınımının optimizasyonu ve stabilizasyonu ile tek dozlu bir aşı tasarımında kullanılmak üzere kullanımı oldukça cazip bir yaklaşım olmaktadır [158].

PLGA mikropartikülleri ile immünize edilen hayvanlarda uzun süreli etkin bağışıklık yanıtlarını oluşturduğu ve enkapsüle edilmiş olan antijenlerin kontrollü salımını gerçekleştirdiği gösterilmiştir [157].

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METOD

3.1 Deneylerde Kullanılan Malzeme ve Ekipmanlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasallar

Kimyasalın Adı	Alındığı Firma	Katalog No
Disodyum hidrojen fosfat $Na_2HPO_4 (12H_2O)$	Merck	1065851000
Dulbecco’s F-12 Medium	Gibco	10565018
Fetal Sığır Serum (FBS)	Gibco	16000044
Freund's Complete Adjuvant	Immunocruz	SC-24018
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck	100317
Mouse IFN-gamma Platium ELİSA	eBioscience	BMS606

Çizelge3.1 Kullanılan kimyasallar devamı

Kimyasalın Adı	Alındığı Firma	Katalog No
Mouse IL-4 Platium ELİSA	eBioscience	BMS613
Na_2CO_3	Sigma	S2127
NaHC^{O_3}	Merck	1063290500
Paranitrofenil fosfat	Sigma	N1891
Penisilin-Streptomisin	Gibco	15140122
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck	1048731000
Potasyum klorür (KCl)	Merck	1049361000
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck	106462
Sodyum Klorür (NaCl)	Duchefa Biochemie	S0520
Süt tozu	Biorad	1706404
Trypsin-EDTA (1X)	Gibco	25200056
Tween-20	Merck	8221840500
Xtt Reaktanı	Santa Cruz	111072-31-2

3.2 Kullanılan Cihazlar

- Hassas Terazı (Precisa XB 220A)
- Ultra-Saf Su Cihazı (Direct-Q 3 UV)
- Nüve Soğutmalı Santrifüj (Hettich Universal 320R)
- Vorteks (Stuart SA 8)
- Roller Mixer (Medispec KJMR-II A)
- Manyetik Karıştırıcı (Heidolph MR 3000)
- Mikropipet (Phoenix; 0.5-10 µl, 100-1000 µl)
- pH metre (Hanna HI 2211 bench pH meters)
- Buzdolabı (Pol- Eko Aparatura)
- Mikroplate Okuyucu (Labline)
- Çoklu plate yıkayıcı (Labline)
- Culture Safe CO2 Etüv (LEEC Precision 50)
- Inverted Mikroskop (BEL INV-199-FL)
- BIOSAFETY CABINET Class II Kabin (TEZSAN)

3.3 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

3.3.1 Deneylerde Kullanılan Peptit

ICPAGTTSSCTSKAVTLSSL dizisi kullanıldı. Ticari olarak sentezlettirilen bu peptit suda çözünür özelliktedir.

Aminoasit dizisi "IleCysProAlaGlyThrThrSerSerCysThrSerLysAlaValThrLeuSerSerLeu " şeklindedir.

3.3.2 PLGA

Poli (Laktik-ko-Glikolik Asit) (PLGA) Ticari olarak Aldrich'ten temin edildi. Katalog numarası 719870 şeklindedir.

3.3.3 Peptit Yüklü PLGA Nanopartikülleri

Peptit yüklü PLGA nanopartikülleri; TAGEM-15-ARGE/41 projesi kapsamında çift emülsiyon yöntemi ile sentezlenen partiküller kullanıldı.

3.3.4 Aşı İçeriklerinin Oluşturulması

Adjuvant grubu için: 200 µg ICPAGTTSSCTSKAVTLSSL dizili peptit ile Freund's adjuvanı PBS içerisinde hazırlandı.

Peptit grubu için: 200 µg ICPAGTTSSCTSKAVTLSSL dizili peptit PBS içerisinde hazırlandı.

Nanoaşı grubu için: PLGA ile enkapsüle edilen 200 µg ICPAGTTSSCTSKAVTLSSL dizili peptit nanopartiküller, PBS içerisinde çözündürülüp 0.45 µm'lik filtre ile sterilize edilerek hazırlandı.

3.4 Hazırlanan Çözeltiler

3.4.1 0.1 M'lık PBS Tamponu (pH 7.5)

2,68 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ hassas terazide tartıldı ve 500 mL ultra saf su ile manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürüldü. 0,156 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ 300 mL ultra saf suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürüldü. Hazırlanan $\text{NaH}_2\text{PO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ çözeltisi içerisinde $\text{Na}_2\text{HPO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ çözeltisi olan 1 litrelik balon jojeye eklendi. 5,84 gr NaCl tartılarak balon jojeye eklendi. Ultra saf su kullanılarak son hacim olarak 1 litreye tamamlandı. pH metrede ölçüm yapılarak NaOH ve HCl yardımı ile pH'ın 7.5'e ayarlandı.

3.4.2 0.1 M'lık Sodyum Karbonat Tamponu (pH 9.0)

3,1 gr Na_2CO_3 tartılarak içerisinde 200 mL ultra saf su olan 250 mL'lik behere eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla Na_2CO_3 ultra saf su içinde çözdürüldü. Son hacim ultra saf su ile 250 mL'ye tamamlandı pH metre ile NaOH veya HCl kullanılarak pH 9.0' a ayarlandı. Daha sonra filtre cihazı ile filtrasyon işlemi yapılarak istenmeyen partiküller uzaklaştırıldı.

3.4.3 PBS-Tween Çözeltisi (PBS-T)

2,68 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ hassas terazide tartılarak içerisinde 500 mL ultra saf su manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürüldü. 0,156 $\text{NaH}_2\text{PO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ 300 mL ultra saf

suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürüldü. Hazırlanan $\text{NaH}_2\text{PO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ çözeltisi içerisinde $\text{Na}_2\text{HPO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ çözeltisi olan 1 litrelik balon jojeye eklendi. 5,84 gr NaCl tartılarak balon jojeye eklendi. Ultra saf su kullanılarak son hacim 1 litreye tamamlandı. pH metrede ölçüm yapılarak NaOH ve HCl yardımı ile pH 7.5'e ayarlandı. Hazırlanan 1 litreli tamponun üzerine 0.5 mL Tween 20 eklendi.

3.4.4 Hücre Kültürü Medyumu

Hücre kültürü medyumunun hazırlanması için DMEM-F12 medyumunun içerisinde 5 µg/ml Penisilin-Streptomisin ve %10 FBS (Fetal Bovine Serum) steril şartlar içerisinde hazırlandı.

3.4.5 Hücre Sayımı için Tripan Blue Hazırlanması

250 µl Tripan Blue boyasının içerisine 15 mL azit içermeyen PBS eklenerek hazırlandı.

3.4.6 Hücre Dondurma Çözeltisinin Hazırlanması

%80 FBS ve %20 DMSO'nun karıştırılması ile steril şekilde hazırlandı.

3.4.7 XTT Çözeltisinin Hazırlanması

XTT sodyum tuzu (2-Metoksi-4-nitro-5-sülfofenil) -2 H – Tetrazolium -5-karboksanilid çözeltisinin hazırlanması için 4 mg tetrazolyum tuzu, 10 µl PMS stoğu, 10 mL hücre kültür medyumunda çözüldürülüp, 0.45 µm'lik filtre ile steril edildi.

3.4.8 Sitrat Tamponunun Hazırlanması

Hassas terazide 0,22 gr glikoz 0,23 gr sodyum sitrat ve 0,08 gr sitrik asit tartıldıktan sonra içerisinde 10 mL ultra saf su olan behere konulup çözüldürüldü ve istenmeyen partiküllerden arındırılmak için 0.45 µm'lik filtre ile süzüldü.

3.4.9 1X Lizis Solüsyonunun Hazırlanması

1 mL 10X lizis solüsyonu üzerine 9 mL ultra saf su ile tamamlandıktan sonra karıştırılarak hazırlandı.

3.4.10 Dalak Hücreleri için Besiyerinin Hazırlanması

DMEM-F12 besiyeri üzerine %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %0,5 Penicillin-Streptomycin olacak şekilde besiyeri hazırlandı.

3.4.11 Lenfosit Prefilasyonu Uyarılımı için Peptit Stoğunun Hazırlanması

5mg/mL peptit stoğu için 15 mg peptit, 3mL PBS içerisinde çözündürüldü. Kullanımdan önce filtre edilerek 37 °C 'de ısıtıldı.

3.4.12 PMS Stoğunun Hazırlanması

XTT için gerekli olan PMS (N-metil dibenzo pirazin metil sülfat) stoğu için 3 mg PMS ultra saf su içerisinde çözündürüldü.

3.4.13 Bloklama Solüsyonunun Hazırlanması

PBS-Tween solüsyonuna 5 gr yağsız süt tozu konuldu ve vortekslendikten sonra filtre kağıdı yardımı ile süzülerek bloklama solüsyonu hazırlandı.

3.5 Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

3.5.1 Çoklu Mikropleyt Okuyucu

Çoklu mikropleyt okuyucu ile absorbands, floresans ve lüminesans ölçümleri yapılabilmektedir. Çoklu kuyucuğa sahip pleytler, ELİSA okuyucunun en önemli ögesidir. Çoklu kuyucuğa sahip pleytler ile çok sayıda deneyin bir kerede gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır. Deneysel değerlerden bilinmeyen verilere ulaşarak eğriye geçirilmekte ya da lineer regresyon denklemindeki eşitlik kullanılarak hesaplama yapılmaktadır [159].

3.5.2 Biyogüvenlik Kabini Sınıf II

Tek yönlü olarak kabin içerisinde yukarı hava akışına sahiptir ve yüksek-verim parçacık yakalama filtresi (HEPA) ile personeli ve kabin içerisinde yapılan uygulamaları kontaminasyonlardan (bulaşıcı mikroorganizmalar ya da patojenler) koruyarak güvenli çalışma imkanı sunmaktadır. Biyomedikal alanında, hücre kültüründe ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıkça kullanılmaktadır [160].

3.5.3 İnverted Mikroskop

Inverted mikroskop, flaskların veya pleytlerdeki canlı hücrelerin morfolojilerini ve boyanan görüntülerinin incelenmesi için kullanılır. Flaskların ve pleyterin yerleşimi için kullanılan kondansör objektifin üzerinde bulunmaktadır böylece ışığın farklı kırılma

özelliği ile sıvı bir ortam içerisinde bulunan mikroorganizmaların yada hücrelerin görölmesini sağlar [161].

Hayvanlar üzerinde uygulanmış olan tüm prosedürler, İstanbul Üniversitesi'nin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onay kararı ekte verilmiştir.

3.7 Deneysel Çalışmalar

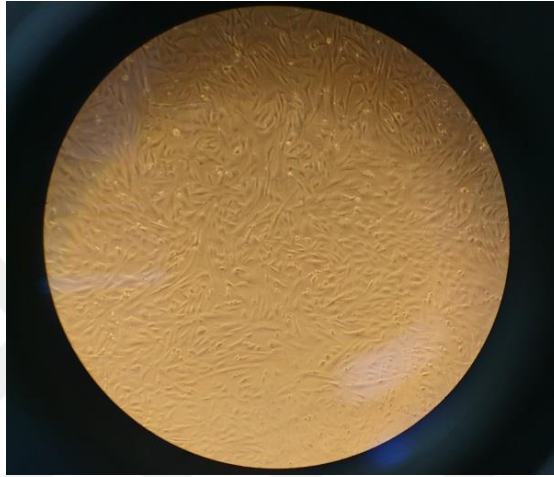
3.7.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

Geliştirilen aşı formölasyonlarının toksisitesinin incelenmesi ve *T.gondi* parazitlerinin kültürünün yapılması amacı ile fare fibroblast hücre hattı (L929) kullanılmıştır. Sıvı azot içerisinde bulunan L929 hücreleri 37C° 'ye ısıtılan beher içerisinde çözöndüröldü. Kryo tüp içerisinde alınan hücreler, 5 mL hücre kültürü medyumunu bulunan 15'lik falkona aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dakika olacak şekilde santriföj edildi. 15'lik falkonda bulunan üst sıvı dökölerek, dipte kalan pellet homojenize edildi. Üzerine 5 mL hücre kültürü medyumunu eklenerek hücre flaskına aktarıldı. Düzenli olarak inverted mikroskop ile hücreler kontrol edildi ve 37C° %5'lik CO₂ inkübasyona bırakılarak konfluent yapı oluşturana kadar günlük olarak kontrol edildi.



Şekil 3.1 Hücre flaskına ait bir görüntü

Tripsinazyon işleminde, hücre flasksı steril PBS ile yıkandı ve ardından %0.25'lik Tripsin EDTA eklendi ve etüv içerisinde 5 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından hücre flasksının içerisinde hücreler toplandı ve hücre kültür medyumunu bulanan 15'lik falkona aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dakika olacak şekilde santrifüj edildi. Pellet homojenize edilerek 96 kuyucuklu pleytlere ekim yapıldı. Şekil 3.2'de L929 hücrelere ait 10X büyütmesine ait konfluent yapı oluşturan hücrelere ait görüntü bulunmaktadır.



Şekil 3.2 Kültürde çoğalan L929 hücreleri (10X)

Böylece konfluent yapıya ulaştıkları gözlemlenen hücre hattı tripsinizasyon sonrası *T.gondii* parazitlerinin *in vitro* kültürünün yapılmasında ve PLGA ile enkapsüle edilen SAG1'in 'ICPAGTTSSCTSKAVTLSSL' peptit dizisi ile yapılmış olan nanopartiküllerinin toksisitesinin incelenmesi çalışmalarında kullanıldı. Ayrıca hücreler kriyoprezervasyon yapılarak ileri ki çalışmalar için dondurularak saklandı. Kısaca hücrelerin sayımları yapılarak 10^6 hücre/mL olacak şekilde %20 DMSO, %80 Fetal Bovine Serum (FBS) içerisinde kriyotüplere konuldu. Kademeli soğutma işlemleri yapıldıktan sonra sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.7.2 *T. gondii* Takizoitlerinin L929 Hücre Hattında *In Vitro* Kültürünün Yapılması

T.gondii takizoitleri Cahit BABÜR tarafından temin edildi. *T.gondii* takizoitleri ile enfekte BALB/c cinsi laboratuvar farelerinin periton sıvısından elde edilen enfekte takizot sıvısı kontaminsayonlardan arındırılmak için antibiyotik katkılı PBS eklenerek santrifüj edildi, üst sıvı döküldü ve pellet üzerine 3 mL antibiyotik katkılı PBS eklenerek

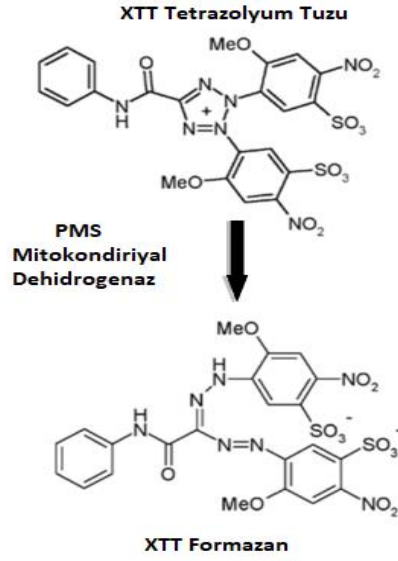
santrifüj edildi. Bu işlem 3 defa tekrarlandı ve böylece *in vitro* kültür için kontamasyonlardan arındırılmış olan *T.gondii* takizotleri hazırlandı. Yukarıda tarif edildiği gibi tripsinizasyon uygulanan L929 hücrelerinin üzerine, *T. gondii* takizoitleri ile 1:10 oranında olacak şekilde hücre kültür medyumuna eklendi. *T.gondii* ekiminden sonra flask her gün mikroskopik olarak gözlemlendi.

Takizoitlerin *in vitro* pasajı için kültür medyum tüpüne alınarak steril PBS eklendi ve 1500 rpm’de 5 dakika olacak şekilde santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant döküldü dipte kalan takizoitlerin olduğu pelletten sayım için örnek alındı ve Toma lamında sayımı gerçekleştirildi.

T. gondii takizoitlerinin sayısı; sayılan takizoitlerin ortalaması, sulandırma kat sayısı ve Toma lamı sabiti (10.000) kullanılarak bulundu.

3.7.3 XTT Yöntemi ile Sitotoksitenin İncelenmesi

PLGA ile enkapsüle edilen SAG1’in ‘ICPAGTTSSCTSKAVTLSSL’ peptit dizisi ile yapılmış olan nanopartiküllerinin toksisitesinin incelenmesi çalışmaları XTT yöntemi kullanıldı. XTT yöntemi, bir tetrazolyum tuzu olan XTT’yi metabolik olarak aktif olan hücrelerin turuncu formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır Şekil 3.3 ‘de gösterilmiştir [162]. Boya duyarlılığı, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır. Ek ajanlara veya hücre yıkama prosedürlerine ihtiyaç olmaması, düşük hücre konsantrasyonlarında bile ölçüm yapılabilecek kadar duyarlılığa sahip olması, çok kuyucuklu pleytlerin kullanılması, çok sayıda örneğin çalışılıp hızlı ve kolay sonuçlar alınabilmesini XTT yönteminin en önemli avantajlarından [163].

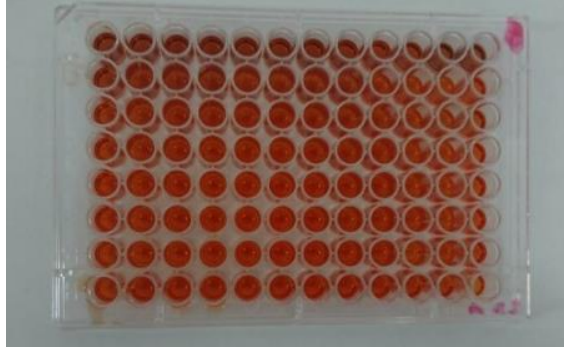


Şekil 3.3 XTT'nin şematik gösterimi

XTT sitotoksite deneyi için; L929 hücre hattının bulunduğu flasklar ekilen ve çoğalan hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla tripsinizasyon işlemi uygulandı. Tripsinizasyon işleminden sonra, hücrelerin üzerine besiyeri ilave edilerek ve 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, pelletteki hücreler Tripan-Blue ile boyanarak Toma lamı yardımıyla sayımı yapıldı. 24. ve 48. saatler için 96 kuyucuklu pleytler ayrı ayrı hazırlandı. 24 saatlik toksisite testi için kuyu başı 10.000 hücre, 48 saatlik toksisite için 5.000 hücre olacak şekilde steril 96'lık pleytlere ekimleri gerçekleştirildi. Bütün uygulamalar biyogüvenlik sınıf II kabini içerisinde steril ve aseptik şartlara uygun olarak gerçekleştirildi. Hücrelerin konfluent yapı oluşturmalar için 24 saat beklendi ve PLGA-Peptit nanopartikülleri ve PLGA boş nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonları (0.495 µg/ml, 1.65 µg/ml, 1.98 µg/ml, 5.94 µg/ml, 7.92 µg/ml, 9.9 µg/ml) belirlendi. Partiküller 0.45 µm'lik filtre ile steril edildikten sonra aynı örnekten en az 4 kuyu olacak şekilde pleytlere eklendi. Eklenen formülasyonlar ile 24 saat ve 48 saat olacak şekilde 37C°'de %5'lik CO₂ etüvde inkübasyona bırakıldı.

PLGA-Peptit nanopartikülleri belirlenen konsantrasyonlar ile kuyucukların üzerine uygulandıktan 24 ve 48 saat sonra, XTT solüsyonu hazırlandı ve her pleyt için 4 mg XTT maddesi, 10 mL DMEM-F12 ve 10 µl PMS stoğu kullanıldı. Kuyucukların hücre kültürü medyumları aspire edildikten sonra her bir kuyucuğa hazırlanan XTT solusyonundan

100 µl eklendi. Şekil 3.4’ de XTT reaktanı eklendikten sonraki pleyt görüntüsü bulunmaktadır.



Şekil 3.4 XTT eklendikten sonra inkübasyona bırakılan 96’lık pleytine ait görüntü

Madde eklenmesinden yaklaşık 4 saat sonra pleytin her bir kuyucuğunun absorbans değeri (OD) çoklu mikroyu okuyucu (Labline Multipleyt Reader) 450 nm dalga boyunda ölçüldü.



Şekil 3.5 Çoklu mikroyu okuyucuda ölçüm alınması

Aynı işlemler 48 saatlik sitotoksisite deneyi için tekrarlandı.

3.8 Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması ve Deney Hayvanları Çalışmaları

3.8.1 Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması ve Enjeksiyon

Deney hayvanları ile yapılan çalışmalar İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan etik kurul onayı ile İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma

Enstitüsü Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda (DETAE) gerçekleştirildi. Sıcaklık, nem, aydınlık/karanlık döngüsü gibi uygun fiziksel koşullar; hayvanların gıda ve su ihtiyaçları, günlük bakımları Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı tarafından karşılandı. 20 adet 6-8 haftalık BALB/c laboratuvar fareleri ile 4 farklı grup oluşturuldu.

T. gondii'nin yüzey protein olan SAG1'den elde edilen 'ICPAGTTSSCTSKAVTLSSL' dizili peptit ile oluşturulan, PLGA enkapsüle edilerek hazırlanan nanoaşının etkinliği hayvan deneylerinde kıyaslamalı olarak incelenmesi amaçlandı. Deney grupları aşağıdaki Çizelge 3.2'de belirtildiği gibi oluşturuldu.

Çizelge 3.2 *In vivo* enjeksiyon içerikleri

Deney Grupları			
Kontrol Grubu	Peptit Grubu	Nano Aşı Grubu	Peptit Adj. Grubu
PBS	Peptit	Peptit yüklü PLGA Nanopartikülleri	Peptit+ Freund's Adjuvanı

Her grupta 4 fare olacak şekilde 4 farklı kafes gruplandırılması yapıldı. Kafeslerin üzerine grup ve enjeksiyon bilgileri not edildi.



Şekil 3.6 Gruplara bölünen deney hayvanlarının kafes görüntüsü

Hazırlanan aşı içerikleri BALB/c fare gruplarına subkutanöz yolla Şekil 3.7’de gösterildiği gibi farenin ense kısmından uygun şekilde tutarak düz bir yüzeye sabitlenmesi suretiyle gerçekleştirildi.

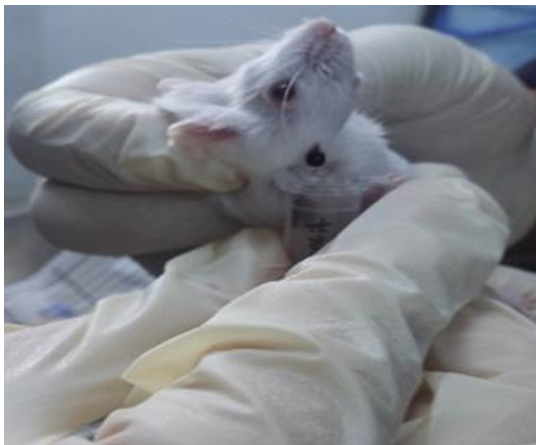


Şekil 3.7 Subkutanöz enjeksiyon

Daha sonra farenin ense derisi hafifçe yukarı kaldırılarak derinin alt kısmına, 1 mL’lik ince uçlu enjektörler ile aşı formülasyonları enjekte edildi.

3.8.2BALB/c Farelerinden Kan Alımlarının Yapılması ve Serume Eldesi

Enjeksiyonu takiben haftalık kan alma işlemi 8 hafta boyunca gerçekleştirildi. Deney boyunca farelerin yüz ven bölgesi ince uçlu lanset ile delinerek, hemolizinin önlenmesi için 20 µl sitrat içeren ependorfların içerisine aktarıldı.



Şekil 3.8 Yüz veninden kan alımının yapılması

Daha sonra pamuk ile yüz bölgesine tampon yapılarak kanın durması sağlandı. Tüm gruplar için aynı işlemler tekrar edildi. Soğuk ortamda muhafaza edilen kanların serum eldesi için 4°C’de 5000 rpm de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan faz ayrımı Şekil 3.9’da gösterilmektedir.



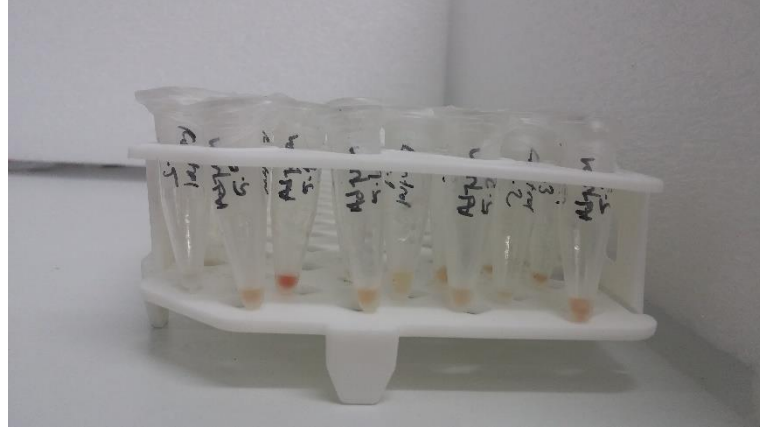
Şekil 3.9 Santrifüj sonrası serum eldesi

Oluşan faz ayrımından üst kısımda kalan serum örneğini içeren süpernatant mikropipet yardımı ile toplanarak ELISA deneyinde kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

3.7 *T.gondii*’ ye Karşı Oluşan IgG Yanıtının Enzim Bağlı İmmunosorbent Yöntemi (ELISA) ile Tayin Edilmesi

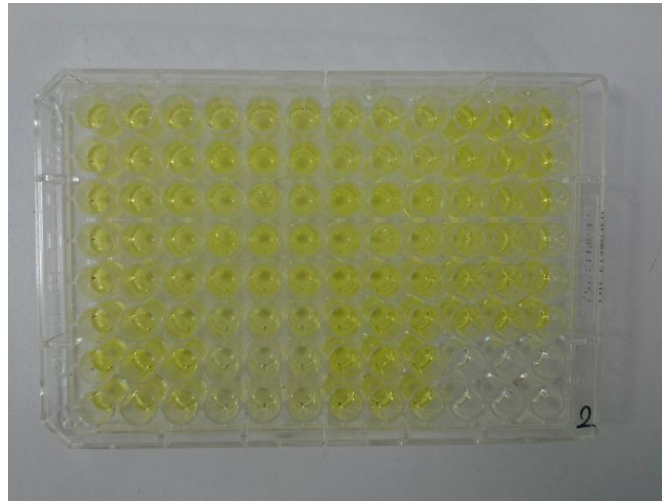
İmmünizasyon sonrası oluşan antikor yanıtının belirlenmesi için ELISA deneyi gerçekleştirildi. Bunun için peptit hazırlanan kaplama solüsyonun içerisinde 10 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde çözündürüldü ve her kuyucuğa 100 µl konularak gece boyu +4°C’de inkübe edildi.

Daha sonra pleytler %0,05 oranında Tween 20 eklenmiş fosfat tamponu (PBS-T) ile 3 kere yıkanarak, 200 µl bloklama çözeltisi (5 gr yağsız süt tozu, 100 mL PBS-T içerisinde) ile spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için 37°C’de 1 saat bloklandı. PBS-T ile 3 kere yıkandıktan sonra fare serumları 3:100 oranında dilüe edilerek kullanıldı.



Şekil 3.10 BALB/c farelerden alınan kan örneklerinin serumları

37°C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı ve ardından pleyt PBS-T ile 5 kere yıkandı. Alkalen fosfataz konjuge anti-Fare IgG antikor, 1:500 oranında PBS-T içerisinde dilüe edildikten sonra hazırlanan solüsyondan kuyucuklara 100’er µl eklendi ve 1 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında pleyt PBS-T ile 5 kere yıkandı. Son aşama için substrat olarak kullanılan paranitrofenil 5mL distile su içerisinde çözündürülerek hazırlandıktan sonra pleyt kuyucuklarına 100’er µl eklendi ve 37°C inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu pleytte oluşan renk değişimi Şekil 3.11’de görülmektedir.



Şekil 3.11 İnkübasyon sonrasında oluşan renk değişimi

İnkübasyondan 45 dakika sonra çoklu pleyt okuyucuda 405 nm dalga boyunda okuma yapıldı ve ELISA sonuçları değerlendirildi.

3.10 Farelerin Sakrifiye Edilmesi ve Dalak Alımının Yapılması

İmmünizasyonu takip eden 8. haftada deney gruplarındaki BALB/c farelerde oluşan immün yanıtın etkinliğinin incelenmesi için servikal dislokasyon ile sakrifikasyon gerçekleştirildi.

Dalak alımının uygulanması: Sakrifikasyonu takiben fareler sırtüstü pozisyonda sabitlendi.



Şekil 3.12 Farenin sabitlenmesi

Sakrifikasyon sonrası farenin sabitlenmesi Şekil 3.12’de görüldüğü gibi sırtüstü pozisyonda sabitlenen hayvanların derisi ve peritonu steril makas yardımı ile kesildi.

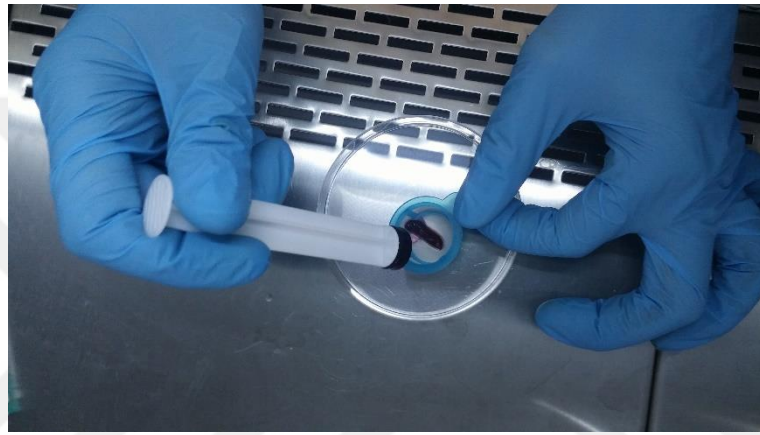


Şekil 3.13 Dalak alımının yapılması

Şekil 3.13’de gösterildiği gibi karın boşluğundan kesilen farenin dalağı pens yardımı ile çıkartıldı. Pens ile dikkatli bir şekilde alınan dalaklar 5 mL besiyeri içerisine konuldu. Falkonlar buz ile dolu su içerisine bırakıldı.

3.10.1 Dalak Hücresi Elde Edilmesi ve Ekilmesi

Dalakların bulunduğu falkonların içerisindeki besiyeri DMEM-F12 aspire edildi, dalak filtre üzerine alındı ve ezilerek tek hücre süspansiyonu elde edildi. 3 mL PBS ile parçalanmış dalak hücrelerinden elde edilen hücre süspansiyonu toplanarak 15’lik falkon içerisine aktarıldı ve bu işlem alınan tüm dalaklar için uyguladı.

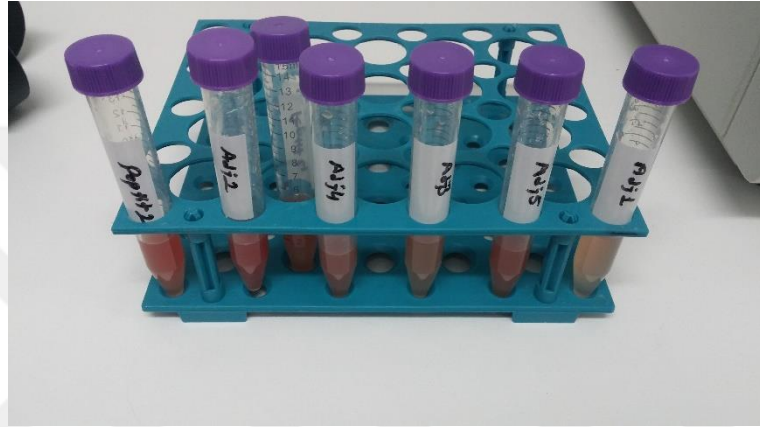


Şekil 3.14 Filtre üzerine konulan dalağın ezilmesi



Şekil 3.15 Dalağın parçalanıp filtreden geçirilmiş görüntüsü

Hazırlanan falkonlar 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü. Pelletin üzerine 3 mL 1X Lizis solüsyonu eklendikten sonra 5 dakika boyunca buz üzerinde muhafaza edilerek arada bir karıştırıldı. Süre sonunda son hacim 14 mL olacak şekilde PBS ile tamamlanarak reaksiyon durduruldu. Tekrar 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Şekil 3.16’da gösterildiği gibi santrifüj sonrası oluşan hücre süspansesinin süpernatantı döküldü ve pellet çözündürüldükten sonra Tripan Blue ile hücre sayımı yapıldı. Hücreleri içeren pelletten 1 µl alınarak 49 µl tripan mavisi içerisine eklendikten sonra hemositometre ile hücre sayımı yapıldı.



Şekil 3.16 Dalak hücre süspansiyonunun elde edilmesi (santrifüj sonrası) görüntüsü

Sayım sonunda lenfosit proliferasyonu ve sitokin deneyi için her bir kuyucuğa 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde steril 96’lık hücre pleytlerine ayrı ayrı ile ekim yapıldı.



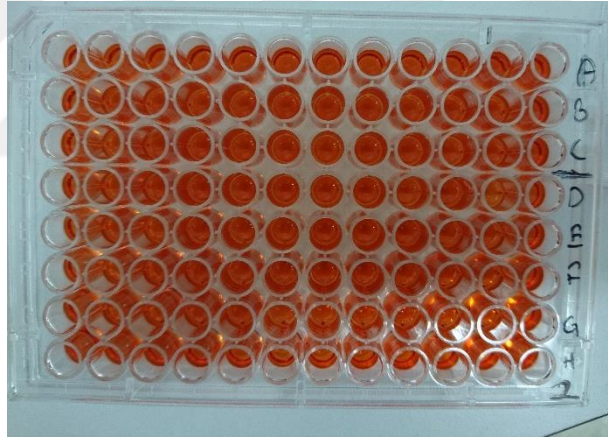
Şekil 3.17 Dalak hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20X)

Şekil 3.17’de gösterildiği gibi inverted mikroskop (20X büyütme) ile elde edilen dalak hücrelerinin yoğunluğu kontrol edildi. 37°C ’de % 5’lik CO₂ etüvünde inkübasyona bırakıldı.

3.10.1.1 Lenfosit Proliferasyonunun Ölçülmesi

Dalaktan elde edilen hücreler pleyt kuyularına ekildikten sonraki gün peptit ile uyarılma işlemi yapıldı. 5 mg/ml PBS içerisinde hazırlanan peptit stoğu kuyulara ekilmiş olan hücrelerin üzerine 10 µl olarak ilave edildi. Uyarma yapılmayan diğer kuyucuklara ise aynı miktarda PBS ilave edildi. Daha sonra 37°C ’de % 5’lik CO₂ etüvde inkübasyona bırakıldı.

Tüm pleytlerin süpernatantları alındıktan sonra besiyeri içerisinde çözündürülen XTT reaktanı kuyucukların üzerine 100 µl olacak şekilde ilave edildi. 4 saat 37°C ’de % 5’lik CO₂ etüvünde inkübasyona bırakıldıktan sonra, renk oluşumu çoklu pleyt okuyucuda 450 nm absorban değerlerinde ölçüldü.



Şekil 3.18 Lenfosit proliferasyonuna ait görüntü

3.10.1.2 Sitokin Ölçümlerinin Yapılması

Daha önceden ekimi yapılan dalak hücrelerinin IL-4 için 24 saat, IFN γ için 96 saatlik inkübasyon yapıldı. Belirlenen süreler sonunda sitokinler için ekilen hücreler toplandı ve ependorflara konularak -20°C ’de çalışma yapılana kadar saklandı. Ticari olarak alınan sitokin kitleri kullanılarak sitokin ölçümleri gerçekleştirildi.

- IFN γ Sitokin Ölçülmesi

Standartlar; ticari olarak alınan kitte belirtildiği gibi aşağıdaki şekilde hazırlandı ve kullanıldı.

Standartların hazırlanması:

A) 10.000 pg/mL için 1mL örnek dilüsyon solüsyonu ependorfa konuldu ve oda sıcaklığında bekletildi.

B) 20.000 pg/mL için 0.2 mL A'dan alındı 0.8 mL örnek dilüsyon solüsyonu eklenerek karıştırıldı.

C) 1000 pg/mL için 0.3 mL B'den alındı 0.3 mL örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.

D) 500 pg/mL için 0.3 mL C'den alındı 0.3 mL örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.

E) 250 pg/mL için 0.3 mL D'den alındı 0.3 mL örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.

F) 125 pg/mL için 0.3 mL E'den alındı 0.3 mL örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.

G) 62,5 pg/mL için 0.3 mL F'den alındı 0.3 mL örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.

H) 31,2 pg/mL için 0.3 mL G'den alındı 0.3 mL örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.

Biotinated Anti Mouse IFN γ hazırlanması: Biotinated Anti Fare IFN γ ile antikor dilüsyon solüsyonu ile 1:100 oranında dilüsyon yapılarak karıştırıldı. Total hacim 100 μ L/kuyu olacak şekilde hazırlandı.

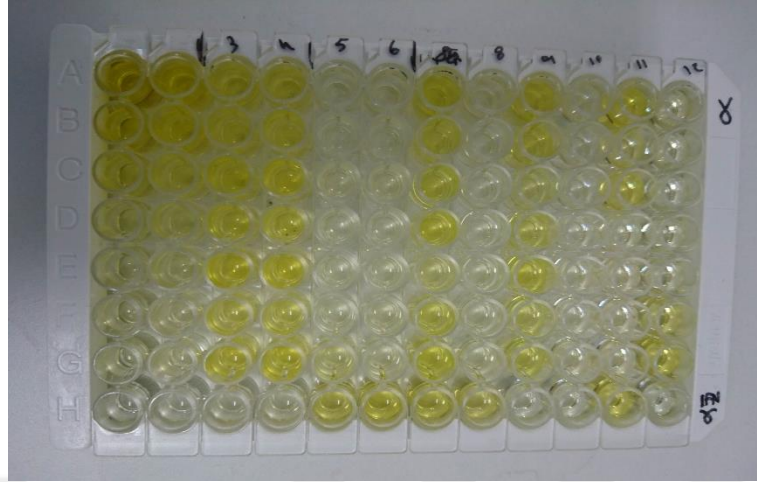
Avidin-biotin-peroksidaz (ABC) kompleks çalışma solüsyonu hazırlanması: ABC Kompleks 1:100 oranında ABC dilüsyon solüsyonu ile dilüsyon yapılarak karıştırıldı.

ABC çalışma solüsyonu ve TMB renk ajanı kullanılmadan 30 dakika önce 37°C de ısıtıldı.

Kit içerisinde bulunan kimyasallar ile gerekli olan solüsyonlar ve standartlar hazırlandı.

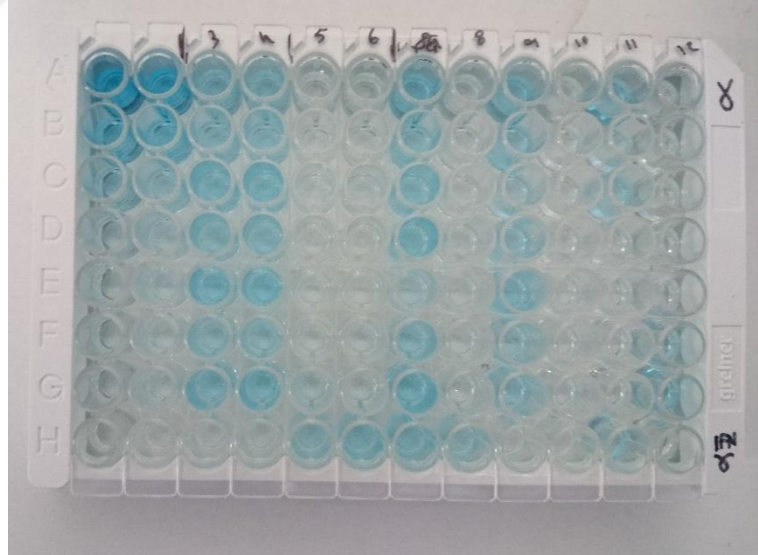
Daha sonra standart IFN γ örnekleri 2 tekrarlı olacak şekilde 100 μ L olarak kuyucuklara eklendi. Kontrol olarak örnek dilüsyon solüsyonu kullanıldı. Dilüe edilmiş olan süpernatantlar 100 μ L olarak kuyucuklara eklendi. Daha sonra pleyt 37°C'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda pleyt aspire edildi ve 100 μ L Biotinated Anti Fare IFN γ eklendikten sonra 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. PBS ile 3 kere yıkama yapıldıktan sonra 100 μ L ABC çalışma solüsyonu eklenerek 37°C'de 30 dakika

inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 5 kere PBS ile yıkama yapıldıktan sonra 90 µl TMB renk ajanı eklenerek 37°C'de 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.19 TMB renk ajanı solusyonu eklendikten sonra pleyt görüntüsü

Bu işlemin ardından 0.1 mL TMB durdurma solüsyonu eklenerek çoklu pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda 30 dakika içerisinde okuma yapıldı.



Şekil 3.20 TMB durdurma solüsyonu eklendikten sonraki pleyt görüntüsü

- IL-4 Sitokin Ölçülmesi

Standartlar ticari olarak alınan kitte belirtildiği gibi aşağıdaki şekilde hazırlandı ve kullanıldı.

Standartların hazırlanması

- A) **10.000 pg/mL için** 1mL örnek dilüsyon solüsyonu ependorfa konuldu ve oda sıcaklığında bekletildi.
- B) **1000 pg/mL için** 0.05 mL A'dan alındı 0.95 mL örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.
- C) **500 pg/mL için** 0.3 mL B'den alındı 0.3 mL örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.
- D) **250 pg/mL için** 0.3 mL C'den alındı 0.3 mL örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.
- E) **125 pg/mL için** 0.3 mL D'den alındı 0.3 mL örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.
- F) **62,5 pg/mL için** 0.3 mL E'den alındı 0.3 mL örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.
- G) **31,2 pg/mL için** 0.3 mL F'den alındı 0.3 mL örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.
- H) **15,6 pg/mL için** 0.3 mL G'den alındı 0.3 mL örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.

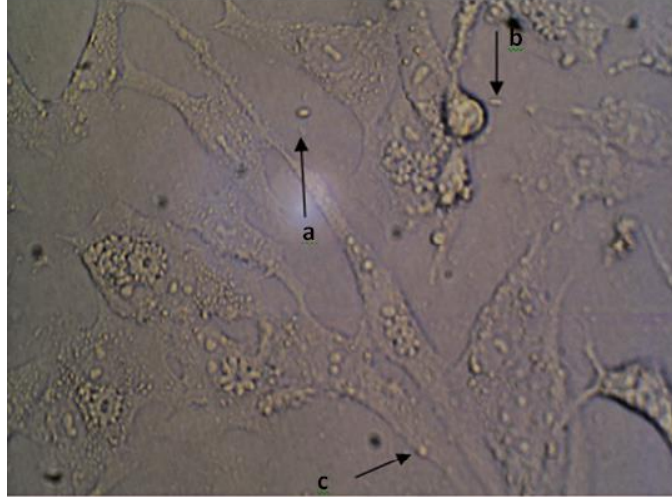
Kit içerisinde bulunan kimyasallar ile gerekli olan solüsyonlar ve standartlar hazırlandı. IFN γ ölçümünde açıklanan prosedür takip edilerek deney gerçekleştirildi.

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

4.1.1 *T. gondii* Takizoitlerinin L929 Hücre Hattında İn Vitro Kültürünün Yapılması

L929 hücrelerinin hücre kültürüne eklenen *T. gondii* takizotleri günlük olarak inverted mikroskop ile takibi yapıldı. Ekimin yapıldığı gün kültür ortamında hareketli takizoitler görülürken %5 CO₂ etüvünde 37C° inkübasyondan sonraki günlerde hareketli takizoitlerin olmadığı; çoğunun hücre içine girdiği tespit edildi. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi hücrenin içerisinde parazitofor vakuol içerisinde parazitler mevcuttur.

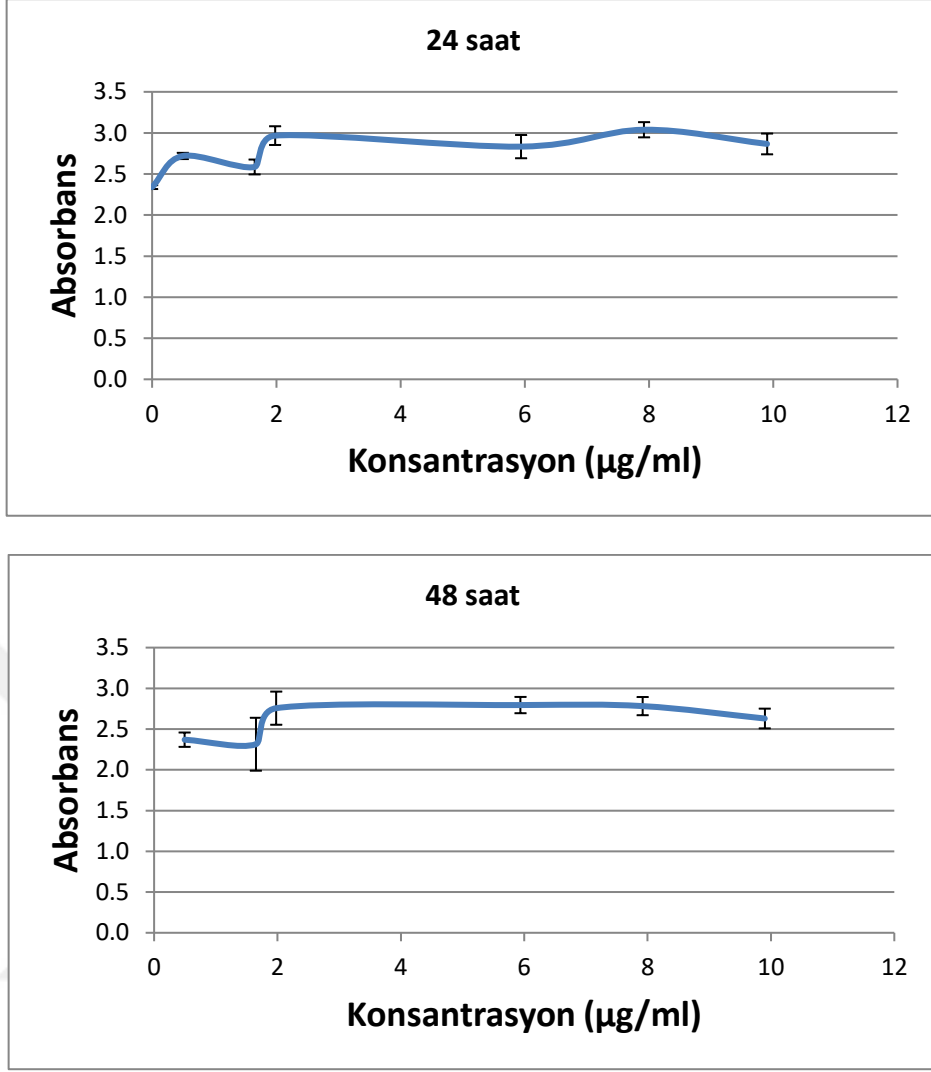


Şekil 4.1 Fibroblast hücrelerini enfekte eden takizoitler (a:hücre dışında, b:hücre içine girmeye çalışırken c: hücre içerisinde)

Hücreleri enfekte eden takizotlerin, kültürün 3. gününden itibaren çoğalarak hücreleri parçaladığı gözlemlendi ve şekilde gösterildiği gibi takizoitlerin hücreleri enfekte etme aşamaları mevcuttur (Şekil 4.1). Şekilden görüleceği üzere *T.gondii* ile L929 hücreleri başarılı şekilde enfekte edilmiş ve ileride aşı çalışmalarında veya antitoksoplazmal etkilerin incelenmesi için kullanılabilecek parazit kültürü elde edilmiştir.

4.1.2 XTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

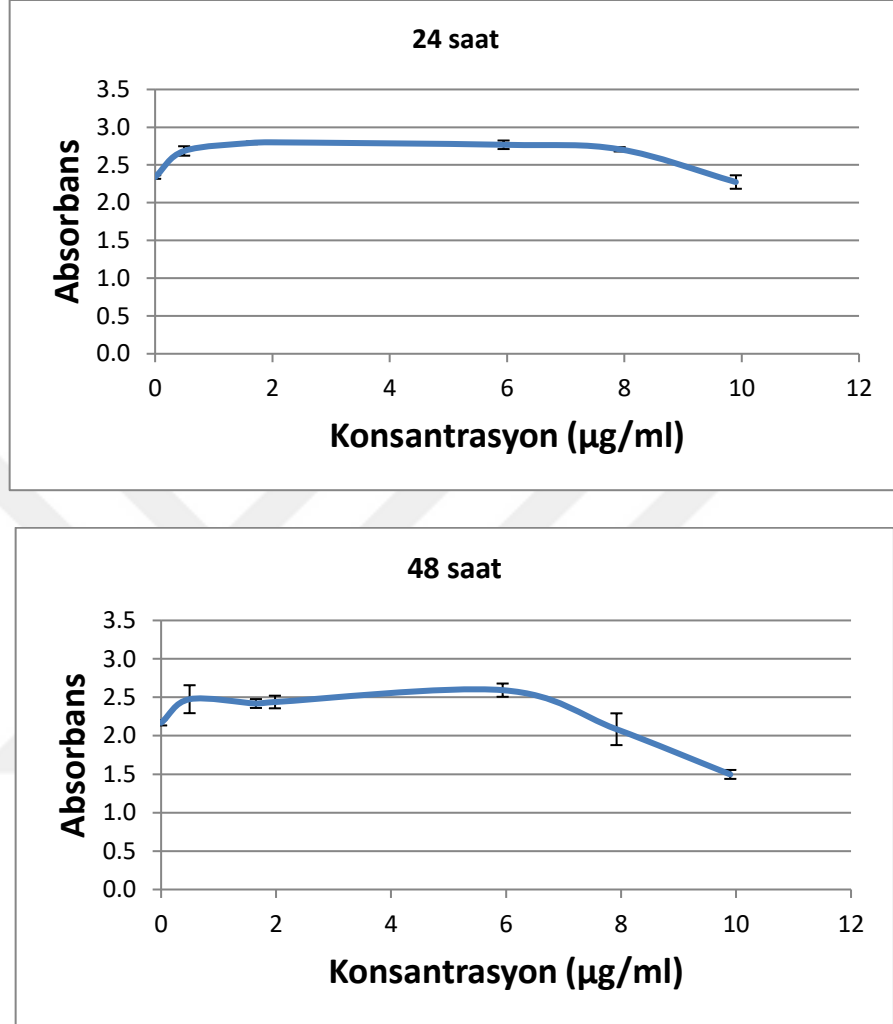
Çalışmada L929 hücre hattı üzerinde, peptit yüklü PLGA nanopartiküllerinin ve peptit içermeyen PLGA nanopartiküllerinin 5 farklı konsantrasyonunun toksisitesi 24. ve 48. saatlerde değerlendirilmiştir. Elde edilen optik yoğunluk değerleri mitokondriyal aktivite ile doğru orantılı olduğu için, hücre canlılığı azaldıkça optik densite değerlerinde (Y ekseni) azalma beklenmektedir.



Şekil 4.2 Peptit içermeyen boş PLGA nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksitesi

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi peptit içermeyen PLGA nanopartikülleri hücre canlılığını azaltıcı herhangi bir etki göstermemiştir. İncelenen konsantrasyonlarda optik densite kontrole göre azalmamış, hatta az miktarda artırmıştır. Bu da PLGA nanopartiküllerinin hücrelerin metabolik aktivitesini olumsuz yönde etkilemediği, dolayısıyla hücre canlılığını azaltmadığını göstermektedir. Sonuç olarak peptit içermeyen PLGA nanopartiküllerinin incelenen konsantrasyonlarda toksik olmadığını söylemek mümkündür. Bu bulgular, literatürde yer alan PLGA’nın biyoyumlu olduğuna dair bilgileri destekler niteliktedir. Son 10 yılda, PLGA polimerleri, aşı antijenlerinin kapsüllemenmesi, kontrollü salım sistemlerin oluşturulmasında önemli yer

tutmaktadırlar. PLGA polimerleri, PLGA ile enkapsülasyon yapılması aşı adjuvanı veya taşıma sistemi olarak önemli avantajlar sağlamaktadır [152], [153].

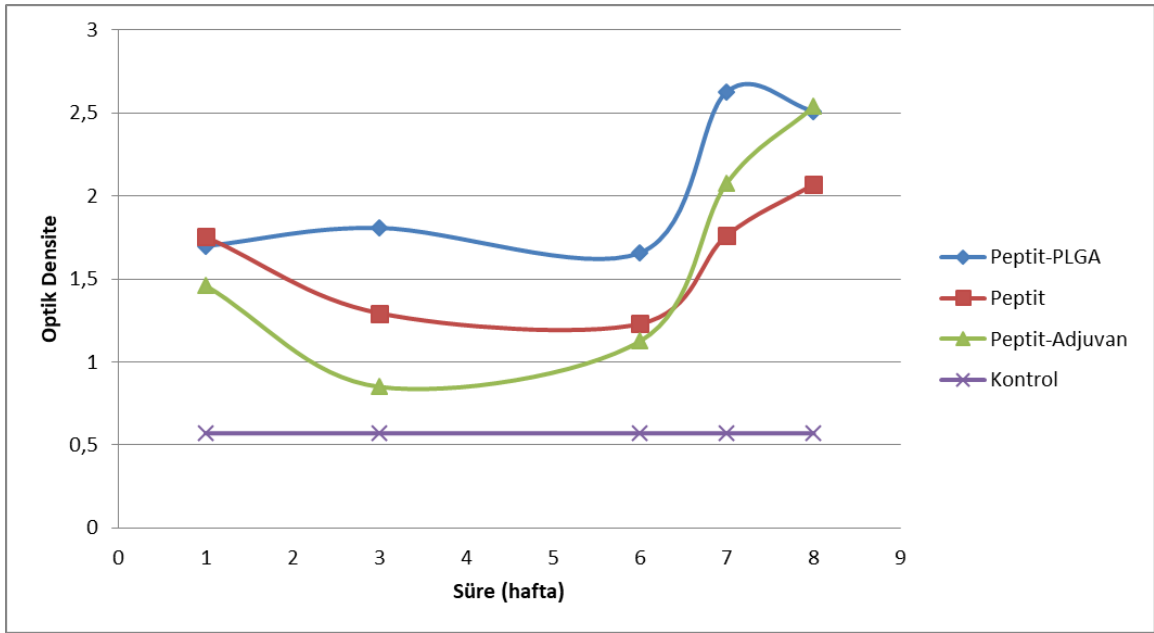


Şekil 4.3 Peptit yüklü PLGA nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksitesi

Peptit yüklü nanopartiküllerin sitotoksite sonuçlarına göre ölçülen optik yoğunluklarına bakıldığında 24 ve 48 saatlik inkübasyonda hücre proliferasyonunun arttırdığı ve toksik etki oluşmadığı gözlemlendi (Şekil 4.3). Boş PLGA nanopartiküllerinde olduğu gibi peptit yüklü nanopartiküllerinde de toksik etki görülmemesi, incelenen konsantrasyonlarda peptit kullanımının nanopartiküle toksik etki kazandırmadığını göstermektedir.

4.2 ELİSA Sonuçları

Peptit ile oluşturulan aşı formülasyonları (peptit yüklü PLGA, Freundun adjuvanı ile ve tek başına peptit) ile immünize edilen farelerdeki IgG antikor miktarları ELISA yöntemi ile incelendi. Şekil 4.4’ de 3 farklı aşı formülasyonlarının 8 hafta boyunca oluşturdukları yanıtlar kıyaslı şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Peptide dayalı aşı formülasyonları ile immünize edilen farelerde ELISA ile ölçülen IgG yanıtları: Peptit-PLGA=peptit yüklü PLGA nanopartikülleri, Peptit=tek başına peptit kullanılan grup, Peptit-Adjuvan= Freund’un adjuvanı ile kullanılan peptit grubu

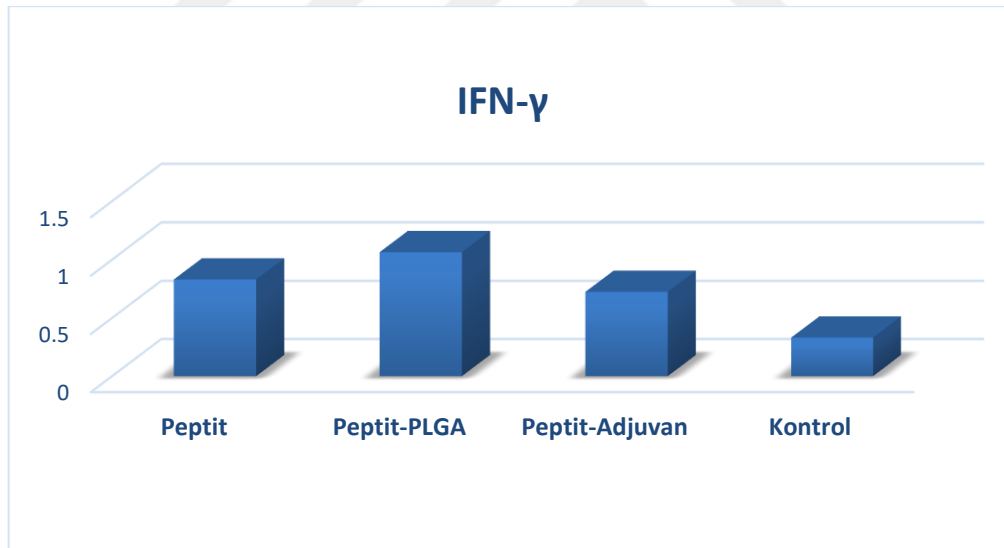
Şekil 4.4’de görüldüğü gibi antikor yanıtı ilerleyen haftalarda ilk haftalara göre daha yüksek seviyelerdedir. İncelenen gruplar arasında en düşük antikor seviyesinin tek başına peptit kullanılan gruplarda olduğu belirlenmiştir. Yine de kontrole göre peptit grubunda da antikor yanıtı daha yüksektir. Bunun sebebi peptitin tek başına yeterince immün yanıt oluşturmaması veya canlıda hızlı degradesi olması olabilir. Diğer taraftan PLGA içine enkapsüle edilen peptit grubunun ve Freundun adjuvanı ile kullanılan peptit grubunun oluşturduğu antikor yanıtı çok daha yüksektir. Bilindiği gibi Freundun adjuvanı oldukça etkili bir adjuvan olup en önemli dezavantajı toksik olmasıdır.

Toksisitesi nedeniyle insanda aşı adjuvanı olarak kullanılamamaktadır. Diğer taraftan PLGA toksik olmama özelliğinin yanısıra yüksek antikor yanıtını uyatabilmiştir.

4.3 Sitokin Ölçümleri

Dalaktan elde edilen dalak hücrelerinde sitokin kitleri ile yapılan ölçümler Şekil 4.5 ve 4.6’da gösterilmiştir.

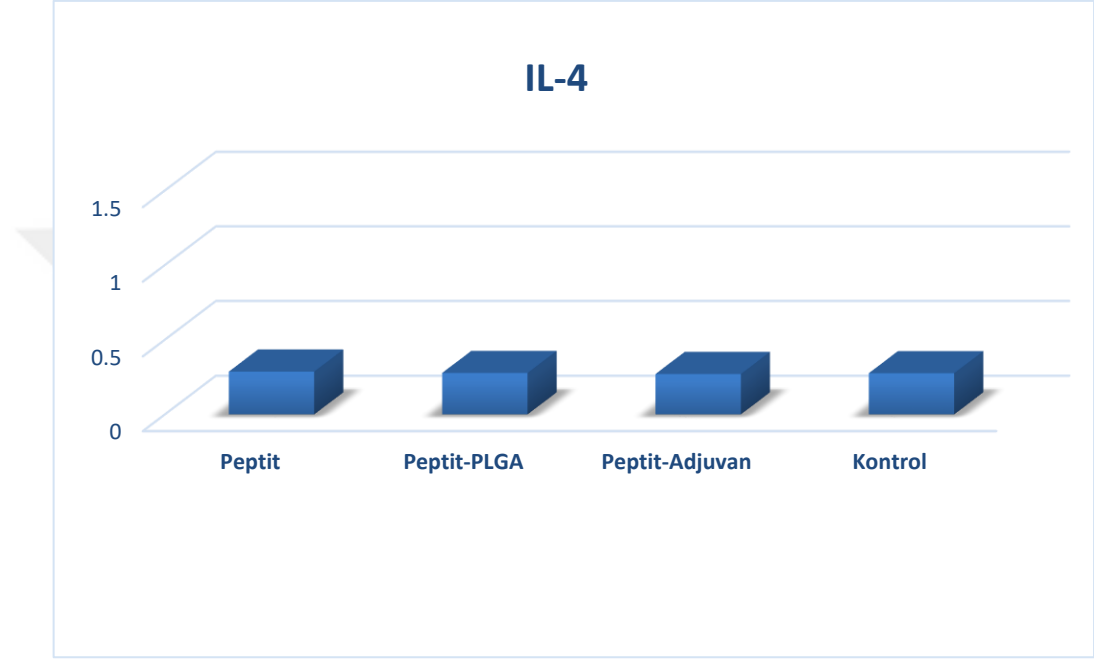
İmmün sistemde INF- γ salgılanması makrofaj ve öldürücü CD8+ T lenfositini aktive ederek parazitleri kontrol altına almada ve Th1 türü immün yanıtta etkindir. INF- γ toksik oksijen radikallerinin ve nitrik oksit salgılanmasına neden olmaktadır. Nitrik oksit ve hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak inflamasyonu ve *T.gondii* parazit çoğalmasını azaltmaktadır[164]. Toksoplazmoza karşı ideal bir aşı geliştirilmesinde tüm bu anti-paraziter özellikleri nedeniyle INF- γ sitokinlerini uyacak aşı formülasyonunun geliştirilmesi önem kazanmaktadır.



Şekil 4.5 Peptide dayalı aşı formülasyonları ile immunize edilen farelerde sandviç ELISA ile IFN- γ seviyesinin gösterilmesi

Şekil 4.5’de görüldüğü gibi IFN- γ seviyesi, çeşitli aşı formülasyonları ile immünize edilen deney gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksektir. Ancak incelenen gruplar arasında en yüksek seviyede IFN- γ peptit-PLGA grubunda gözlenmiştir.

IL-4, IL-5, IL-6 gibi sitokinler Th2 tür immüniteyi uyarır. Bu sitokinlerden IL-4 seviyesi ölçülerek Th2 yanıtın oluşup oluşmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bilindiği üzere *T.gondii*'ye karşı koruyucu yanıt genellikle sistemik Th1 yanıtının uyarılması ile başarılmaktadır [164]. Bu nedenle Th2 yanıtının oluşmaması ve IL-4'ün de düşük seviyede olması beklenmektedir.

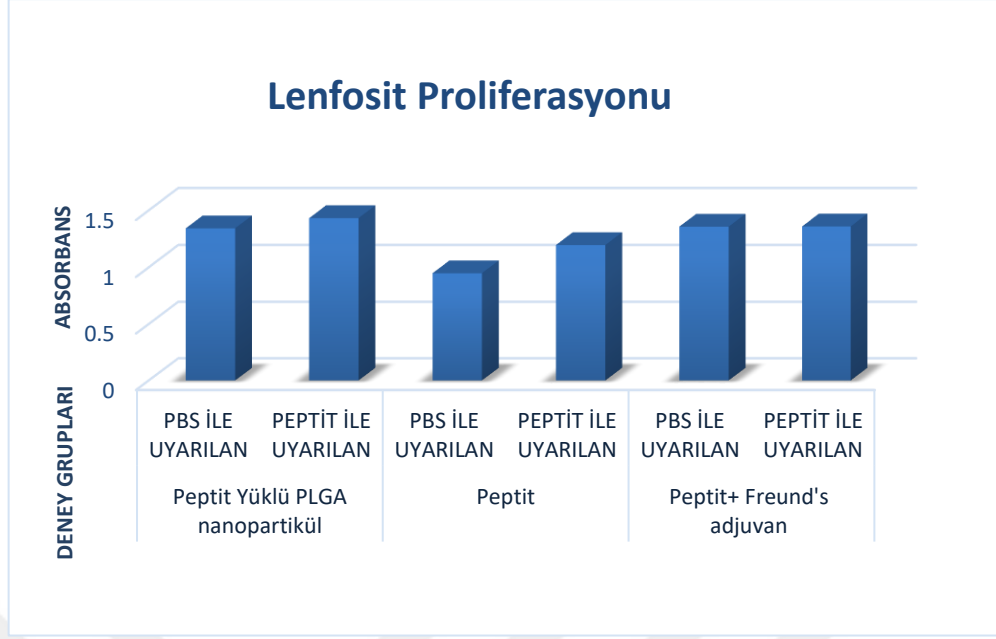


Şekil 4.6 Peptide dayalı aşı formülasyonları ile immunize edilen farelerde sandviç ELISA ile IL-4 seviyesinin gösterilmesi

Şekil 4.6'de görüldüğü üzere immunize edilen aşı gruplarının hiçbirinde IL-4 seviyesi kontrolden daha yüksek değildir. Bu sonuçlar seçilen peptitin Th1 türü immün yanıtı uyardığını desteklemiştir.

4.4 Lenfosit Proliferasyonunun Sonuçları

Farklı deney gruplarından elde edilen dalak hücreleri ilgili peptit ile uyarıldıklarında proliferasyon olarak aktifleşmesi beklenmektedir. Bu deneyde negatif kontrol olarak PBS eklenmiştir.



Şekil 4.7 Peptite dayalı aşı formülasyonları ile immunize edilen farelerde *in vitro* dalak hücre proliferasyonunun XTT yöntemi ile gösterilmesi

Şekil 4.7’da görüldüğü gibi peptite ait formülasyonlar ile immünize edilen farelerin *in vitro* dalak hücrelerinin proliferasyonu peptit ile uyarımlarda PBS’e göre daha yüksek görüldü. Adjuvan grubunda ise peptit ile PBS arasında fark görülmedi. Nanoaşı grubunda ise peptit ile uyarılan grubun biraz daha yüksek proliferasyon gösterdiği tespit edildi. Diğer sonuçlarda olduğu gibi lenfosit proliferasyonu ölçümünde de peptit-PLGA grubu ile peptit-adjuvan grubunun tek başına peptitten daha yüksek bir değerde olduğu gösterilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Toksoplazmoz, zorunlu hücre içi protozoa olan *T.gondii*'nin sebep olduğu bulaşıcı bir hastalıktır [79], [80]. Tüm dünya ülkelerinde başta insanlar olmak üzere, memeli ve kanatlı türlerini etkileyebilen zoonotik enfeksiyona sebep olan *T.gondii*, konak hücreleri invaze ederek yaşamsal döngüsünü tamamlamaktadır. Toksoplazmozun son derece yaygın olmasının nedenleri arasında insanların doku kistleri içeren etleri, ookistlerle kontamine olmuş sebze ve diğer yiyeceklerin tüketilmesi gibi birçok bulaşma yolunun olması gösterilebilir [2], [26]. Enfeksiyon immün sistemi sağlam kişilerde genellikle asemptomatik seyrederken immün yetmezliği olan kişilerde enfeksiyonun seyri nörolojik, oküler veya sistemik komplikasyonlara neden olabilmektedir [81]. Toksoplazmoz hastalığının tedavisi hastalığın seyri, süresi ve klinik bulgularına göre oldukça farklılık göstermesinden dolayı toksoplazmoz enfeksiyonunun kesin tedavi süresi bilinmemektedir.

Günümüzde toksoplazmozun en etkili tedavisi folik asidin biyosentezini bozan sinerjik bir etkiye sahip olan Primetamin ve Sülfadiazinin kombinasyonudur [104]. Ancak bu tedavi hipersensivite, kemik iliği baskılanması ve teratojenik etkiler dâhil olmak üzere birçok ciddi yan etkiye sahiptir. Ayrıca *T. gondii*'nin oldukça farklı antijenik yapısının bulunması ve kompleks bir hayat döngüsüne sahip olması toksoplazmoza karşı etkin aşı geliştirilmesini kısıtlamaktadır. Şu ana kadar ticari olarak piyasada bulunan tek aşı, S48 suşunun canlı ya da atenüe takizoitleri ile geliştirilmiş olan veterinerlikte kullanılan Toxovax aşısıdır. Ancak bu aşıda canlı suşları barındırması mutasyon ile virulanslık

kazanma riskinin bulunması, soğuk zincire uyulmamasından kaynaklı aşının etkinliğini kaybetmesi gibi etkinlik ve güvenilirlik konusunda problemleri mevcuttur. Bunun dışında toksoplazmozü önleyebilen ya da kontrol edebilen herhangi etkili biri aşı bulunmamaktadır [120].

Toksoplazmoza karşı aşı geliştirilmesinde kullanılan çeşitli aşı yaklaşımlarında ölü parazitlerin kullanımı, atenüe parazitlerin kullanımı, subunit aşilar, rekombinant proteinler ve DNA aşiları gibi sınıflandırılabilirler. Patojenin tamamının kullanıldığı aşilar ise reaktogenik bileşenleri içerebileceği için beklenmeyen yan etkiler oluşturabilir. Subunit aşilar, belli bir protein ya da antijenik yapının kullanımına dayanmaktadır. *T. gondii* takizoitlerin veya SAG1 (p30), GRA2 (gp28.5), GRA5 (p21) veya boşaltım-salgı antijenleri ESA gibi özgül doğal antijenleri ile bağışıklanan farelerin ve sıçanların *T. gondii*'ye karşı korunduğu gösterilmiştir. Bir takım beyin kistlerinde azalmaların olduğu ile değerlendirilmiştir [125]. Rekombinant olarak SAG1 üretilmi ile yapılan çalışmalar çözünmeyen form ve yanlış katlanmalar sonucunda SAG1'in immunoaktivitesini kaybetmesi nedeniyle başarılı olamamıştır [138]. Bu nedenle SAG1 antijeninin epitoplarını içeren peptit aşilarının kullanımı daha cazip bir yaklaşım olmaktadır.

Literatürde SAG1 peptitleri ilgili yapılan bir çalışmada *T.gondii*'nin SAG1 yapısından elde edilen sentetik bir peptit (SAG1 48-67) hem doğrusal hem de çoklu antijenik yapı (MAP- Multiple Antigenic Peptide) olarak hazırlanmıştır. Her iki yapının da koruyucu etkisi fareler üzerinde incelenmiştir. Çalışma sonucunda (SAG1- 48-67) MAP ile aşılamanın etkili bir T hücresi immün yanıtını indüklediğini gösterdiğini bildirmişlerdir [165]. Son zamanlarda, bu proteini içeren 17 peptitten sadece 8'inin farelerde spesifik antikor üretimi indüklediği ve karboksil termininden türetilmiş peptitlerin önemli ölçüde etkili olduğu belirtilmektedir [166]. Yapılan bir diğer çalışmada P30'dan türetilen beş sentetik peptid (48-67, 82-102, 213-230, 238-256 ve 279-285), fare ve sıçan deney modellerinde B ve T hücre belirleyicileri açısından etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda SAG1 türevli peptitlerin antijenik ve immünojenik özelliklerinin önemi belirtilmiştir [167].

Peptit temelli subunit aşilar minimal bir mikrobiyal komponent kullanarak immün yanıt oluşturmayı hedefler. Bu aşilar genellikle kimyasal olarak sentezlenirler, enfekte edici

özellikleri yoktur. Fiziksel olarak daha stabil olmanın yanı sıra klasik aşılar göre daha kolay ve ucuz olarak elde edilirler. Patojen komponentinin minimal seviyede olması nedeniyle alerjik reaksiyon ve otoimmün yanıt riski de azaltılmış olur. Ancak mikrobiyal komponenti minimal seviyede olması nedeniyle yeterli immün yanıt oluşturabilmek için adjuvanlara (immün yanıtı artırıcı) gereksinim duyulur [141]. Güçlü bir bağışıklık tepkisinin uyarılması, peptidlere karşı antikor oluşturulması için taşıyıcı moleküller gerektirmektedir. Bu moleküller bağışıklık sisteminin aktive olmasına destek olacağı gibi kimyasal stabilitenin artmasında da faaliyet gösterirler [140, 142].

Günümüzde nanoteknolojik yöntemler ile ilaçların ve aşıların farmakokinetik profillerini geliştirilmesinde, aşı etkinliklerinin artırılmasında ve kontrollü ilaç taşıma sistemlerini oluşturulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda nanoteknolojik yaklaşımlar ile *T. gondii*'nin sebep olduğu toksoplazmoz enfeksiyonuna yapılan çalışmalar umut vadedicidir [97]. Yapılan çalışmalarda *T. gondii*'ye karşı subunit aşı geliştirilmesinde ana yüzey antijeni olan SAG1'e (P30) odaklanmıştır. Bu çalışmalar, *Escherichia coli*'de veya mayada üretilen rekombinant SAG1 veya SAG1'den türetilmiş, saflaştırılmış SAG1 peptidlerini [165], [167] içermektedir. Yapılan çalışmaların çoğunda hayvan modellerinde koruma sağlandığının görülmesi peptit aşıların geliştirilmesinin önemini göstermiştir.

Bu tez çalışmasında, *T. gondii* parazitinin önemli bir yüzey proteini olan SAG1 ait peptit dizisi ile oluşturulan nano aşı formülasyonunun etkinliği ve aşı olarak kullanılma potansiyelinin *in vivo* olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla yapılan deneysel çalışmaların elde edilen sonuçları değerlendirildiğinde; ilk olarak L929 hücrelerinin hücre kültürü medyumuna eklenen *T. gondii* takizotleri ile enfeksiyonu başarılı şekilde gerçekleştirilmiş ve hücre içi parazitofor vakuol içerisinde takizoitler tespit edilmiştir. Böylece ileriki aşı çalışmalarda kullanılabilecek parazit stoğu elde edilmiştir.

Daha sonra aşı formülasyonlarının fare deneylerinden önce *in vitro* sitotoksite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve 24 saatlik sitotoksite çalışma sonuçlarına göre oluşturulan formülasyonların hücre proliferasyonunun arttırdığı ve toksik etki oluşturmadığı gözlemlenmiştir. 48 saatlik sitotoksite sonuçları incelendiğinde ise hücre

canlılığının az bir miktarda olsa azaldığı görülmüştür bu durumun hücre medyumunun yetersiz gelmesi ya da boş nanopartiküllerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuç olarak oluşturulan aşı formülasyonunun toksik etki göstermediği tespit edilmiştir. Aşı uygulama amacıyla birçok çalışmada PLGA kullanılmasının nedeni, yaptığımız çalışmada da gösterildiği üzere, PLGA polimerinin toksisite oluşturmaması gibi birçok avantaja sahip olan bir polimer olmasıdır. Literatürde Stanley ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada *T.gondii* takizoitlerinin PLGA ile enkapsüle ederek hazırlanan mikro ve nano partikülleri mukozal aşılama yolu ile koyunlara vermişlerdir. Koyunlar intranazal yoldan aşılanmış ve ookistlerle enfekte edilmişlerdir. Sonuçta hem hücresel hem de güçlü mukozal IgA antikor yanıtı ve IFN- γ üretiminde arttığını hücresel immün yanıtların oluştuğunu rapor etmişlerdir [123]. Ancak literatürdeki çalışmalarda parazitin ya da proteinin tamamı kullanılmış olup, bu tez çalışmasında özgün peptit dizilerinin PLGA polimeri ile kullanılması yönünden literatüre özgün bir katkı sağlamaktadır.

In vivo çalışmalarda hazırlanan aşı formülasyonları ve diğer aşı gruplarının farelerin immünize edilmesi ile 8 hafta boyunca elde edilen serumların spesifik IgG düzeyleri ELİSA yöntemi ile incelendiğinde 3. 6. ve 7. haftada nanoaşı grubunda en yüksek seviyede antikor varlığı söz konusuyken, 8. haftada adjuvan grubunun antikor yanıtında da bir yükselme görülmektedir. Bunun dışında diğer aşı grupları incelendiğinde 'ICPAGTTSSCTSKAVTLSSL' dizili peptit aşı grubunun ilerleyen haftalar boyunca IgG düzeyinin anlamı olarak arttığı görüldü. Literatürde yapılan bir çalışmaya göre SAG1 peptitleri ile immunize edilen farelerden elde edilen serumlarının IgG sonuçlarına göre deneyde kullanılan 16 peptitten sadece 8'i spesifik humoral yanıt oluşturmuştur. Yapmış oldukları deney sonuçlarına göre en yüksek seviyedeki antikor yanıtının 'ICPAGTTSSCTSKAVTLSSL' dizili peptitten elde edildiğini göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen IgG antikor yanıtın literatür bilgisi ile aynı bağlamda olarak yapmış olduğumuz çalışmayı desteklemektedir [166]. Ancak bu çalışmada, tez çalışmasından farklı olarak peptitler PLGA gibi bir polimer ile enkapsüle edilmeden kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarda PLGA ile enkapsüle peptitlerin tek başına kullanımına göre daha yüksek antikor yanıtı oluşturmaları; tezde kurulan hipotezi destekleyici bir sonuç olmuştur.

T.gondii'ye karşı oluşan antikorların, konakta hücre dışında bulunan parazitlere karşı etkili olduğu ve eriterek öldürdüğü bilinmektedir[115]. Toksoplazmoza karşı etkili olan humoral antikorlar ekstrasellüler alanlarda kompleman ile birleştiklerinde takizoitleri öldürmektedirler[115]. Ancak farelerdeki humoral immünitinin virülansı zayıf suşlara karşı sınırlı koruma sağlarken, virülan suşlarda etkisiz bulunmuştur[81].

In vivo çalışmalarda incelenen diğer bir parametre sitokin yanıtının ölçülmesi olmuştur. 'ICPAGTTSSCTSKAVTLSSL' dizili peptitin farklı formülasyonları ile immünize edilen farelerdeki sitokin seviyeleri incelenmiştir. Nano aşı grubunda IFN- γ seviyelerinin kontrole göre oldukça yüksek olduğu, IL-4 seviyelerinin ise kontrolle benzer olduğu görülmektedir. Sitokinlerin toksoplazmoz üzerinde ki etkilerine bakıldığında, IFN- γ 'nin en etkili sitokin olduğu görülmüştür [119]. Tümör nekroz faktörü (TNF), IFN- γ tarafından *in vitro* olarak aktive edildiğinde farelerde toksoplazmoza karşı korunma elde edilmiştir [117].

İmmün sistemde IFN- γ salgılanmasıyla artan makrofaj ve öldürücü CD8+ T lenfositleri aktive ederek ve immün sistem parazitleri kontrol altına alır ve hastalık asemptomatik olarak gerçekleşir. IFN- γ düzeylerinin enfeksiyona karşı konak immünitesi ile ilişkili olduğu deney hayvanlarında yapılan çalışmalarla incelenmiştir [117], [118].

Makrofajlar tarafından IFN- γ salınmasıyla IL-2, IL-7 ve IL-12'nin indirekt olarak toksoplazmoza karşı koruyucu etkisi olduğu, çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. IFN- γ 'nin bunun dışındaki etkilerine bakıldığında, anti-paraziter özelliği dikkat çekmektedir. IFN- γ toksik oksijen radikallerinin ve nitrik oksit salgılanmasına neden olmaktadır. Erken dönemler de hastalarda IL-1, IL-12 ve TNF- α 'nın IL-15 ile birlikte doğal öldürücü hücrelerinin, IFN- γ üretimi için makrofajları uyardıkları belirtilmiştir [117].

IL-4, IL-5, IL-6 gibi sitokinler Th2 tipi immüniteyi uyarır. Bu sitokinlerden IL-4 seviyesi ölçülerek Th2 yanıtın oluşup oluşmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bilindiği üzere *T.gondii*'ye karşı koruyucu yanıt genellikle sistemik Th1 yanıtının uyarılması ile oluşmaktadır [164]. Bu nedenle Th2 yanıtının oluşmaması ve IL-4'ün de düşük seviyede olması beklenmektedir. Elde edilen sonuçlarda IL-4'ün kontrolle benzer seviyede olması yanıtın Th1 yönünde olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Son aşamada ICPAGTTSSCTSKAVTLSSL dizili peptite ait formülasyonlar ile immünize edilen farelerin dalak hücrelerinin proliferasyonu peptit ile uyarımlarda PBS'e göre daha yüksek görüldü. Adjuvan grubunda ise peptit-PBS arasında fark görülmedi. Nanoaşı grubunda ise peptit ile uyarılan grubun biraz daha yüksek olduğu görüldü. Bu tez çalışmanın sonucunda peptit yüklü nano aşı formülasyonlarının *T.gondii*'ye karşı etkinliği yapılan deneyler sonucunda incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre ideal bir aşıda bulunması gereken özellikleri nano aşı formülasyonlarının kapsadığını göstermektedir.

Günümüzde kullanılan aşılarda içerisinde çok çeşitli antijenik yapıya sahip mikroorganizma ya da ürünlerini içermekte ve yeterli bağışıklığı sağlamak için minimal antijen miktarı her aşıya göre değişiklik gösterebilmektedir. Etkin bir immün tepki için genellikle doz tekrarları gerekmektedir. Çünkü inaktif aşılar primer antikor tepkisi hemen oluşmaz ve meydana gelen antikorlar kısa ömürlüdür. Attenüe aşılar tek doz uygulanması sonucunda yüksek titrede antikor oluşmaktadır. Fakat zayıflatılmış mikroorganizma kullanılması nedeniyle bu aşılar bir çok yan etki bulunmaktadır. İdeal bir aşıda bulunması gereken özelliklere bakıldığında yapılan immünizasyon sonucunda aşının etkili ve uzun süreli bağışık sağlaması beklenmektedir. Nano aşı formülasyonlarının oluşturulmasında kullanılan PLGA polimeri ile yapılan enkapsülasyon sonucunda, peptit yapısı vücut içerisinde bozunmadan korunmakta ve daha uzun sürede daha yavaş salınım göstermektedir. PLGA polimeri sayesinde nano aşı formülasyonlarının oluşturulması, saklanması ve uygulanmasında birçok avantaj sağlamaktadır. Antijenin enkapsüle olmasından dolayı daha stabil, kararlı bir yapı kazanabilmektedir. Literatürde yaygın olarak kullanılan bağışıklık sistemini uyarılmasında yardımcı olan bunun dışında toksik yan etkilere sebep olan Freund's Adjuvantı gibi ek maddelere ihtiyaç bulunmamaktadır. Çünkü yapılan deney sonuçlarında nano aşı formülasyonlarının IgG düzeyleri incelendiğinde diğer gruplara kıyasla (Freund's adjuvant aşı grubu ve peptit grubu) koruyucu düzeyde bir bağışıklığın oluşmasını sağladığı görüldü. İmmünizasyon sonrasında ki haftalarda incelenen farelerde gözle görülür herhangi bir yan etki veya fare sakrifikasyonunun sonucunda hayvanların herhangi bir dokusunda anomaliye rastlanılmamıştır.

Bu tez çalışmasında peptit yüklü nano aşı formülasyonlarının *T.gondii*' ye karşı etkinliğinin *in vivo* olarak incelenmesinde elde edilen bulgulara göre nano aşı grubunda yüksek ve uzun süreli immün yanıt oluşmuş ve kullanılan peptitle ilgili literatürdeki bilgiler ile desteklenmiştir. Gelecek çalışmalarda nano aşı formülasyonlarının *T.gondii* paraziti ile enfekte edilerek aşı etkinliğinin parazit yükünü azaltması ve koruyuculuk sağlama durumun açısından araştırılabilir.

Böylece bu çalışmada ilk kez olarak *T.gondii* yüzey proteinine spesifik peptit dizisinin PLGA polimeri ile enkapsüle formunun (nanoaşı) BALB/c farelerde oluşturduğu koruyucu immün yanıt tek başına peptit ve Freund'un adjuvanı ile peptit grubuyla kıyaslı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre seçilen peptit dizisi tek başına immün yanıtı artırdığı gibi, PLGA ile enkapsüle formda kullanıldığında çok daha yüksek bir immün yanıt oluşturmuştur.

KAYNAKLAR

1. Dubey, J., Lindsay D., ve Speer C., (1998). 'Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts', *Clinical microbiology reviews*, 11(2):267-299.
2. Serter N., (2006). Genel Mikrobiyoloji Ve Immünoloji, 8.ci Baskı, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
3. Hutchison, W. vd., (1969). 'Life cycle of *Toxoplasma gondii*' *British Medical Journal* 4(5686):806.
4. Biberoglu, Ö. ve Ceylan Z.G., (2016). 'Gıda Kaynaklı Zoonoz Bir Parazit: *Toxoplasma gondii*', *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*,11(1).
5. Desmonts, G. vd., (1985). 'Prenatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis', *The Lancet*, 325(8427):500-504.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) , Toxoplasmosis Prevention, Epidemiology & Risk Factors, <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html>, 21.Ocak.2018.
7. Buxton, D., (1993). 'Toxoplasmosis: The First Commercial Vaccine', *Parasitology Today*, 9(9):335-337.
8. Nandedkar T.D., (2009). 'Nanovaccines: Recent Developments in Vaccination', *Journal of Biosciences*, 34(6):995-1003.
9. Danhier, F. vd., (2012). 'PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications', *Journal of Controlled Release*, 161(2):505-522.
10. Dubey, J.P., (2008). 'The history of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years', *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(6):467-475.
11. Ferguson, D.J., (2009). "Toxoplasma gondii: 1908-2008, Homage to Nicolle, Manceaux and Splendore" *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2):133-148.
12. Weiss, L.M. ve Dubey J.P., (2009). 'Toxoplasmosis: A History of Clinical Observations,' *International Journal for Parasitology*, 39(8):895-901.

13. Sabin, A.B. ve Feldman, H.A., (1948). 'Dyes as Microchemical Indicators of A New Immunity Phenomenon Affecting A Protozoon Parasite (Toxoplasma),' Science, 108(2815): 660-663.
14. Weinman, D. ve Chandler, A.H., (1954). 'Toxoplasmosis in Swine and Rodents Reciprocal Oral Infection and Potential Human Hazard', Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 87(1):211-216.
15. Hutchison, W., (1965). 'Experimental Transmission of Toxoplasma gondii', Nature, 206(4987):961-962.
16. Frenkel, J., Dubey, J. ve Miller, N., (1970). 'Toxoplasma gondii in Cats: Fecal Stages Identified as Coccidian Oocysts,' Science, 167(3919):893-896.
17. Miller, N.L., Frenkel, J. ve Dubey, J., (1972). 'Oral Infections with Toxoplasma Cysts and Oocysts in Felines, Other Mammals, and in Birds,' The Journal of Parasitology, 928-937.
18. Frenkel, J., (1973). 'Toxoplasma in and Around Us', Bioscience, 23(6): 343-352.
19. Hay, J., (1983). 'The Effect of Congenital and Adult-Acquired Toxoplasma Infections On The Motor Performance of Mice', Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 77(3):261-277.
20. Luft, B.J., (1984). 'Toxoplasmic Encephalitis in Patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome', Jama, 252(7):913-917.
21. Cole, R., (2000). 'Biological and Molecular Characterizations of Toxoplasma gondii Strains Obtained From Southern Sea Otters (Enhydra lutris nereis)', Journal of Parasitology, 86(3):526-530.
22. Havlíček, J. vd., (2001). 'Decrease of Psychomotor Performance in Subjects with Latent Asymptomatic Toxoplasmosis', Parasitology, 122(5):515-520.
23. Khan, A. vd., (2005). 'Composite Genome Map and Recombination Parameters Derived From Three Archetypal Lineages of Toxoplasma gondii', Nucleic acids Research, 33(9):2980-2992.
24. Yolken, R., Dickerson, F. ve Torrey, E., (2009). 'Toxoplasma and Schizophrenia', Parasite Immunology, 31(11):706-715.
25. Pedersen, M.G. vd., (2012). 'Toxoplasma gondii Infection and Self-Directed Violence in Mothers', Archives of General Psychiatry, 69(11):1123-1130.
26. Verma, S.K. vd., (2016). 'Toxoplasmosis in Geese and Detection of Two New Atypical Toxoplasma gondii Strains From Naturally Infected Canada Geese (Branta canadensis)', Parasitology Research, 115(5):1767-1772.
27. Akçay, Ş., Pamukçu, M. ve Baran, S. (1950). 'Bir köpekte Toxoplasma Observasyonu', Türk Vet. Hek. Dern. Derg, 245.
28. Unat, E., (1983). 'Toxoplasma gondii'nin ve Toxoplazmozun Tarihçesi Toxoplasmosis', 1:8
29. T.B., (1964). 'Bir Toksoplazmik Koryoretinit Vakası,' Ank. Numune Hast Bült, 4:75.

30. Ekmen, H. ve Altintas, K., (1973). 'Bir Kopekten *Toxoplasma gondii* İzolmanı', Turk Hijyen ve Tecrubi Biyoloji Dergisi.
31. Hazıroğlu, R. vd. (2003). 'Pathological and İmmunohistochemical Studies in Rabbits Experimentally İnfected with *Toxoplasma gondii*', Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 27(2):285-293.
32. Duru, S.Y. ve KUL, O., (2016). 'Tokso plazmozis', Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences-Internal Medicine-Special Topics, 2(1):58-62.
33. Beaman, M.H., (1995). '*Toxoplasma gondii*', Principles and Practice of İnfectious Diseases, 2455-2475.
34. Lindsay, D.S., Weiss, L.M. ve Suzuki, Y., (2003). 'Toxoplasmosis, in North American Parasitic Zoonoses', Springer, 129-150.
35. Stagno, S. vd., (1980). 'An Outbreak of Toxoplasmosis Linked to Cats', Pediatrics, 65(4):706-712.
36. Elmore, S.A. vd., (2010). '*Toxoplasma gondii*: Epidemiology, Feline Clinical Aspects, and Prevention', Trends in Parasitology, 26(4): 190-196.
37. Dubey, J., Miller, N. ve Frenkel, J., (1970). '*Toxoplasma gondii* Life Cycle in Cats', Journal of The American Veterinary Medical Association, 157(11):1767.
38. Dubey, J.P., (2016). 'Toxoplasmosis of Animals and Humans', CRC press.
39. Iskandar, T., (1999). 'A Review About Toxoplasmosis on Animals and Humans', Wartazoa, Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences, 8(2):58-63.
40. Medical Care Development International, Microscopy Findings, http://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/english/DPDx5/HTML/Frames/S-Z/Toxoplasmosis/body_Toxoplasmosis_mic1, 21.Ocak.2018
41. Wang, Y., Weiss, L.M., ve Orlofsky, A., (2009). 'Host Cell Autophagy is İnduced by *Toxoplasma gondii* and Contributes to Parasite Growth', Journal of Biological Chemistry, 284(3):1694-1701.
42. Amerizadeh, A., (2015). 'In-Vivo İnduced Antigens Of *Toxoplasma Gondii* And Their Application In Diagnosis Of Human Toxoplasmosis', Universiti Sains Malaysia.
43. Ajioka, J.W., Fitzpatrick, J.M., ve Reitter, C.P., (2001). 'Ultrastructure of a *Toxoplasma gondii* Tachyzoite', Expert Review in Molecular Medicine.
44. Ajzenberg, D., vd., (2002). 'Microsatellite Analysis of *Toxoplasma gondii* Shows Considerable Polymorphism Structured into Two Main Clonal Groups', International journal for Parasitology, 32(1):27-38.
45. Kimbita, E.N., vd., (2001). 'Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* İnfektion in Cats by Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay Using Recombinant SAG1', Veterinary Parasitology, 102(1):35-44.
46. Öncel, T., vd., (2005). 'Detection of Toxoplasmosis *gondii* Seropositivity in Sheep in Yalova by Sabin Feldman Dye Test and Latex Agglutination Test', Türkiye Parazitol Derg, 29: 10-2.

47. Woodison, G. ve Smith, J., (1990). ' Identification of The Dominant Cyst Antigens of *Toxoplasma gondii*', *Parasitology*, 100(3):389-392.
48. Ferguson,D., ViaEurekAlert, Tissue Cyst,
<https://www.scientificamerican.com/article/rage-disorder-linked-with-parasite-found-in-cat-feces/>, 21.Ocak.2018.
49. Uttah, E., Ogban, E. ve Okonofua, C., (2013). 'Toxoplasmosis: A global Infection, So Widespread, so Neglected', *IJSRP*, 3:1-6.
50. Hill, D. ve Dubey, J., (2002). 'Toxoplasma gondii: Transmission,Diagnosis and Prevention', *Clinical Microbiology and Infection*, 8(10):634-640.
51. Montoya, J.G., (2002). 'Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis', *The Journal of Infectious Diseases*, 185:S73-S82.
52. Sacks, J.J., Roberto, R.R. ve Brooks, N.F., (1982). 'Toxoplasmosis Infection Associated with Raw Goat's Milk' *Jama*, 248(14):1728-1732.
53. Buxton, D., vd., (2006). 'Toxoplasmosis: The Possibility of Vertical Transmission' *Small Ruminant Research*, 62(1):43-46.
54. Montoya, J. ve Liesenfeld, O., (2004). 'Toxoplasmosis', *Lancet*, 363.
55. Toxomap Wustl Educycle, *Toxoplasma Genome Map*,
http://toxomap.wustl.edu/life_cycle.htm, 21.Ocak.2018.
56. Dubey, J., vd., (1986). 'Distribution of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Commercial Cuts of Pork', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 188(9):1035-1037.
57. Remington, J.S., Thulliez, P. ve Montoya, J.G., (2004). 'Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis', *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3):941-945.
58. Keskin, D. ve Toroglu, S., (2017). 'Tokso plazma gondii'nin İnsan ve Hayvan Sağlığı Açısından Önemi', *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5:582-599
59. Kravetz, J.D. ve Federman, D.G., (2005). 'Toxoplasmosis in Pregnancy', *The American Journal of Medicine*, 118(3):212-216.
60. Kuman, H. ve Altıntaş, N., (1996). 'Protozoon Hastalıkları', *Ege Üniversitesi Basımevi*,79-100, İzmir.
61. Jones, J.L., vd., (2001). 'Toxoplasma gondii Infection in the United States: Seroprevalence and Risk Factors', *American Journal of Epidemiology*, 154(4):357-365.
62. Meuwissen, J., (1970). 'Transmission of Toxoplasmosis', *British Medical Journal*, 1(5694):496.
63. Damriyasa, I., vd., (2004). 'Cross-sectional Survey in Pig Breeding Farms in Hesse, Germany: Seroprevalence and Risk factors of Infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in Sows', *Veterinary Parasitology*, 126(3):271-286.

64. Pappas, G., vd., (2006). 'Category B Potential Bioterrorism Agents: Bacteria, Viruses, Toxins, and Foodborne and Waterborne Pathogens', *Infectious Disease Clinics*, 20(2):395-421.
65. Dubey, J., (2004). 'Toxoplasmosis—a Waterborne Zoonosis', *Veterinary Parasitology*, 126(1):57-72.
66. Isaac-Renton, J., vd., (1998). 'Detection of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Drinking Water', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6):2278-2280.
67. Abdullah, O.M., (2015). 'Determination of Seroprevalence of Toxoplasmosis Among Retinitis Patients in Khartoum', *Alzaeim Alazhari University*.
68. Buzby, J.C. ve Roberts, T., (1996). 'Updates US Foodborne Disease Costs for Seven Pathogens', *Food Review: The Magazine of Food Economics*, 19:3.
69. Hasanreisoglu, M. ve Özdek, Ş., (2013). 'Oküler Toksoplazmozis: Epidemiyoloji, Bulaş Yolları, Patogenez, Popülasyon Biyolojisi, Klinik Özellikler, Tanı ve Tedavi', *Journal of Retina-Vitreous*, 21:4.
70. Pappas, G., Roussos, N. ve Falagas, M.E., (2009). 'Toxoplasmosis Snapshots: Global Status of *Toxoplasma gondii* Seroprevalence and Implications for Pregnancy and Congenital Toxoplasmosis', *International Journal for Parasitology*, 39(12): 1385-1394.
71. Kölgelir, S., vd., (2009). 'Gebelerde Toksoplasma gondii Seroprevalansı', *Dicle Tıp Dergisi*, 36:3.
72. Sarıncı, H., (1976). 'Toxoplasma gondii Antikorlarının Araştırılması', *Dicle Üniv. Tıp Fak. Derg*, 5(3): 565-585.
73. ÖNCEL, T., 'Toxoplasmosis', <https://vetkontrol.tarim.gov.tr/pendik/Belgeler/Toxoplasmosis.pdf>, toncel@penvet.gov.tr, 21.Ocak.2018.
74. İnci, A., Yener, C. ve Güven, D., (2014). 'Bir Devlet Hastanesinde Gebe Kadınlarda Toksoplazma, Rubella ve Sitomegalovirüs Seroprevalansının Araştırılması', *Pam Tıp Derg*, 7(2): 143-46.
75. Kim, K., (2004). 'Role of Proteases in Host Cell Invasion by *Toxoplasma gondii* and Other Apicomplexa', *Acta tropica*, 91(1):69-81.
76. Montoya, J.G. ve Remington, J.S., (1996). 'Toxoplasmic Chorioretinitis in the Setting of Acute Acquired Toxoplasmosis', *Clinical Infectious Diseases*, 23(2):277-282.
77. Gutierrez, Y., (2000). 'Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations', *Oxford University Press, USA*.
78. Tanyüksel, M., vd., (2010). 'Possible Role of Toxoplasmosis in Patients with First-Episode Schizophrenia', *Turkish Journal of Medical Sciences*, 40(3):399-404.
79. Robert-Gangneux, F. ve Dardé, M.L., (2012). 'Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis', *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2):264-296.

80. Al Nasr, I., vd., (2016). 'Toxoplasmosis and Anti-Toxoplasma Effects of Medicinal Plant Extracts-A mini-Review', *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(8):730-734.
81. Machala, L., vd., (2013). 'Incidence and Clinical and Immunological Characteristics of Primary *Toxoplasma gondii* Infection in HIV-Infected Patients', *International Journal of Infectious Diseases*, 17(10): 892-896.
82. Milli, U. ve Hazirolu, R., (1990). 'Pulmonary Epidermoid Cysts in a Cat', *Veterinary Record*, 127(11).
83. Dubey, J. ve Jones, J., (2008). 'Toxoplasma gondii Infection in Humans and Animals in the United States', *International Journal for Parasitology*, 38(11):1257-1278.
84. Grillo, R., vd., (1999). 'The Past and Present Role of the Sabin Feldman Dye Test in the Serodiagnosis of Toxoplasmosis,' *Bulletin of the World Health Organization*, 77(11).
85. Pinon, J.M., vd., (1995). 'Evaluation of Risk and Diagnostic Value of Quantitative Assays for Anti-Toxoplasma gondii Immunoglobulin A (IgA), IgE, and IgM and Analytical Study of Specific IgG in Immunodeficient Patients', *Journal of Clinical Microbiology*, 33(4):878-884.
86. Lappin, M.R. ve Powell, C.C., (1991). 'Comparison of Latex Agglutination, Indirect Hemagglutination, and ELISA Techniques for the Detection of Toxoplasma gondii-specific Antibodies in the Serum of Cats', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5(5):299-301.
87. Tayşi, B., Yücel, A. ve Aybay, C., (2000). 'IgG Avidite Testinin Toxoplasma Antikor Kinetiği Yönünden Değerlendirilmesi', *Mikrobiol Bül*, 34:355-363.
88. Paul, M., (1997). 'Use of the ISAGA Method in Detection of Specific IgM, IgA, IgE Antibodies in Acquired and Congenital Toxoplasmosis', *Wiadomosci Parazytologiczne*, 43(1):39-51.
89. Özkan, A.T., vd., (2008). 'Investigation of Anti-Toxoplasma gondii Antibodies in Cats of the Ankara Region of Turkey Using the Sabin-Feldman Dye Test and An Indirect Fluorescent Antibody Test', *Journal of Parasitology*, 94(4):817-820.
90. McCabe, R. ve Remington, J., (1983). 'The Diagnosis and Treatment of Toxoplasmosis,' *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2(2): 95-104.
91. Badur, S., (1990). 'Tokso plazmozun Serolojik Tanısı,' *Klinik Dergisi*, 1(3):3-6.
92. Holliman, R., vd., (1989). 'Discrepant Toxoplasma Latex Agglutination Test Results', *Journal of clinical Pathology*, 42(2):200-203.
93. Shen, L., Li, W. ve He, Y., (2011). 'Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis', *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 23(4):465-7, 469.
94. Lin, M. H., vd., (2000). 'Real-Time PCR for Quantitative Detection of Toxoplasma gondii', *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11):4121-4125.

95. Kuman, H., vd., (1995). 'Toxoplasmosis İmmün Yetmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları', T Parazitol Dern. Yayın, 12:137-164.
96. Bottone, E.J., (1991). 'Diagnosis of Acute Pulmonary Toxoplasmosis by Visualization of Invasive and Intracellular Tachyzoites in Giemsa-stained Smears of Bronchoalveolar Lavage Fluid', Journal of Clinical Microbiology, 29(11):2626-2627.
97. Zhang, L., et al.,(2008). 'Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments', Clinical pharmacology & therapeutics, 83(5): p. 761-769.
98. Wang, H., vd., (2004). 'A Piezoelectric Immunoagglutination Assay for Toxoplasma gondii Antibodies Using Gold Nanoparticles,' Biosensors and Bioelectronics, 19(7):701-709.
99. Jiang, W., vd., (2015). 'A Novel Dynamic Flow Immunochromatographic Test (DFICT) Using Gold Nanoparticles for the Serological Detection of Toxoplasma gondii Infection in Dogs and Cats', Biosensors and Bioelectronics, 72:133-139.
100. Jiang, S., vd., (2013). 'A Novel Immunosensor for Detecting Toxoplasma gondii-Specific IgM Based on Goldmag Nanoparticles and Graphene Sheets'; Colloids and Surfaces Biointerfaces, 101:481-486.
101. Li, X., vd., (2015). 'Gold Magnetic Nanoparticle Conjugate-Based Lateral Flow Assay for the Detection of IgM Class Antibodies Related to TORCH Infections'; International Journal of Molecular Medicine, 36(5):1319-1326.
102. He, L., vd., (2015). 'Fluorescent Detection of Specific DNA Sequences Related to Toxoplasma gondii Based on Magnetic Fluorescent Nanoparticles Fe₃O₄/CdTe' Biosensor', International Journal of Biochemistry Research & Review, 6(3):130-139.
103. Ozcan, K., vd., (1988). 'The Prevalence of Toxoplasma Antibodies Among the Patients with Symptoms of Toxoplasmosis At the Hospital of the Faculty of Medicine University of Cukurova', Mikrobiyoloji bulteni, 22(1):45-50.
104. Sheffield, H.G. ve Melton, M.L., (1975). 'Effect of Pyrimethamine and Sulfadiazine on the Fine Structure and Multiplication of Toxoplasma gondii in Cell Cultures', The Journal of Parasitology, 704-712.
105. Unat, E.K., (1979). 'Tıp Parazitolojisi: İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları', İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 2:2597.
106. Barragan, A. ve Sibley, L.D., (2003). 'Migration of Toxoplasma gondii Across Biological Barriers', Trends in Microbiology, 11(9):426-430.
107. Gaafar, M., vd., (2014). 'Chitosan and Silver Nanoparticles: Promising Anti-Toxoplasma Agents', Experimental Parasitology, 143:30-38.
108. Anand, N., vd., (2015). 'Oral Administration of Encapsulated Bovine Lactoferrin Protein Nanocapsules Against Intracellular Parasite Toxoplasma gondii', International Journal of Nanomedicine, 10:6355.

109. Pissuwan, D., vd., (2009). 'Destruction and Control of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites Using gold Nanosphere/antibody Conjugates. *Small Nano Micro*, 5(9): 1030-1034.
110. Dalencon, F., vd., (1997). 'Atovaquone and Rifabutine-Loaded Nanocapsules: Formulation Studies', *International Journal of Pharmaceutics*, 153(1):127-130.
111. Sordet, F., vd., (1998). 'Assessment of the Activity of Atovaquone-Loaded Nanocapsules in the Treatment of Acute and Chronic Murine Toxoplasmosis', *Parasite*, 5(3):223-229.
112. Akira, S., Uematsu, S. ve Takeuchi, O., (2006). 'Pathogen Recognition and innate immunity', *Cell*, 124(4):783-801.
113. Denkers, E.Y. ve Gazzinelli, R.T, (1998). 'Regulation and Function of T-cell-Mediated Immunity During *Toxoplasma gondii* Infection', *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4): 569-588.
114. Caner, A., (2007). 'Kök Hücre ve Karaciğer Transplantasyon Hastalarında Toxoplasmosisin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemleri ile Takibi', Ege Üniversitesi, Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
115. Durdu, B., (2008). 'Sağlıklı Gebelerde Toksoplazma Seropozitifliği, IgG avidite Değerlerinin İncelenmesi ve Seropozitifliğe Etki Eden Çeşitli Risk Faktörlerinin Araştırılması, T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul.
116. Frickel, E.-M., vd., (2008). 'Parasite Stage-Specific Recognition of Endogenous *Toxoplasma gondii*-Derived CD8+ T cell Epitopes', *The Journal of Infectious Diseases*, 198(11):1625-1633.
117. Gazzinelli, R.T., vd., (1991). 'Synergistic Role of CD4+ and CD8+ T Lymphocytes in IFN-gamma Production and Protective Immunity Induced by an Attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine', *The Journal of Immunology*, 146(1):286-292.
118. Ely, K.H., Kasper, L.H., vd Khan, I.A., (1999). 'Augmentation of the CD8+ T cell Response by IFN- γ in IL-12-Deficient Mice During *Toxoplasma gondii* Infection', *The Journal of Immunology*, 162(9): 5449-5454.
119. Caetano, B.C., et al.,(2006). 'Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice', *Human gene therapy*, 17(4): p. 415-426.
120. Buxton, D., vd., (1991). 'Vaccination of Sheep with a Live Incomplete Strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and Their Immunity to Challenge When Pregnant', *The Veterinary Record*, 129(5): 89-93.
121. Bhopale, G.M., (2003). 'Development of a Vaccine for Toxoplasmosis: Current Status', *Microbes and Infection*, 5(5): 457-462.
122. Innes, E.A., vd., (2009). 'Veterinary Vaccines Against *Toxoplasma gondii*', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2): 246-251.

123. Bruna-Romero, O., Oliveira, D.M. ve Andrade-Neto, V.F., (2012). 'Toxoplasmosis: Advances and Vaccine Perspectives in Current', Topics in Tropical Medicine, InTech, 170-180.
124. Hiszczyńska-sawicka, E., vd., (2014). 'Veterinary Vaccines Against Toxoplasmosis', Parasitology, 141(11):1365-1378.
125. Darcy, F., vd., (1992). 'Protection of Mice and Nude Rats Against Toxoplasmosis by a Multiple Antigenic Peptide Construction Derived from Toxoplasma gondii P30 antigen', The Journal of Immunology, 149(11):3636-3641.
126. Darcy, F., vd., (1988). 'Induction of a Protective Antibody-Dependent Response Against Toxoplasmosis by In vitro Excreted/secreted Antigens from Tachyzoites of Toxoplasma gondii', Parasite Immunology, 10(5):553-567.
127. Biemans, R., vd., (1998). 'The Conformation of Purified Toxoplasma gondii SAG1 Antigen, Secreted from Engineered Pichia pastoris, is Adequate for Serorecognition and Cell proliferation', Journal of Biotechnology, 66(2):137-146.
128. Haumont, M., vd., (2000). 'Protective Immunity Against Congenital Toxoplasmosis with Recombinant SAG1 Protein in a Guinea Pig Model', Infection and Immunity, 68(9): 4948-4953.
129. Mishima, M., vd., (2001). 'Modified Protection Against Toxoplasma gondii Lethal Infection and Brain Cyst Formation by Vaccination with SAG2 and SRS1', Journal of Veterinary Medical Science, 63(4): 433-438.
130. Liu, M., (2003). 'DNA Vaccines: A Review', Journal of Internal Medicine, 253(4): 402-410.
131. Liu, S., vd., (2009). 'Evaluation of Protective Effect of Multi-Epitope DNA Vaccine Encoding Six Antigen Segments of Toxoplasma gondii in Mice', Parasitology Research, 105(1):267.
132. Khosroshahi, K.H., vd., (2011). 'Evaluation of The Immune Response Induced by DNA Vaccine Cocktail Expressing Complete SAG1 and ROP2 Genes Against Toxoplasmosis', Vaccine, 29(4):778-783.
133. Lim, S.S.-Y. ve Othman, R.Y., (2014). 'Recent Advances in Toxoplasma gondii Immunotherapeutics', The Korean Journal of Parasitology, 52(6):581.
134. Liu, K.-Y., vd., (2006). 'Biological Role of Surface Toxoplasma gondii Antigen in Development of Vaccine', World Journal of Gastroenterology: WJG, 12(15): 2363.
135. Beghetto, E., vd., (2006). 'Chimeric Antigens of Toxoplasma gondii: Toward Standardization of Toxoplasmosis Serodiagnosis Using Recombinant Products', Journal of Clinical Microbiology, 44(6):2133-2140.
136. Hofgärtner, W.T., vd., (1997). 'Detection of immunoglobulin G (IgG) and IgM Antibodies to Toxoplasma gondii: Evaluation of Four Commercial Immunoassay Systems', Journal of Clinical Microbiology, 35(12):3313-3315.

137. TAYLOR, D.W., vd., (1990). 'Identification of an Apically-Located Antigen That Is Conserved in Sporozoan Parasites', *The Journal of Protozoology*, 37(6): 540-545.
138. Makioka, A., Suzuki, Y., ve Kobayashi, A., (1991). 'Recognition of Tachyzoite and Bradyzoite Antigens of *Toxoplasma gondii* by Infected Hosts', *Infection and Immunity*, 59(8):2763-2766.
139. Arda, M., (2000). 'Temel Mikrobiyoloji', 2. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara,
140. Moisa, A.A., ve Kolesanova, E.F., (2012). 'Synthetic Peptide Vaccines in Insight and Control of Infectious Disease in Global Scenario,' *InTech*.
141. Azmi, F., vd., (2014). 'Recent Progress in Adjuvant Discovery for Peptide-Based Subunit Vaccines', *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(3):778-796.
142. Li, W., vd., (2014). 'Peptide Vaccine: Progress and Challenges', *Vaccines*, 2(3):515-536.
143. Zhang, N.Z., vd., (2015). 'Recent Advances in Developing Vaccines Against *Toxoplasma gondii*: An Update', *Expert Review of Vaccines*, 14(12):1609-1621.
144. Tiwari, G., vd., (2012). 'Drug Delivery Systems: An Updated Review', *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1): 2.
145. Shah, P., Bhalodia, D., ve Shelat, P., (2010). 'Nanoemulsion: A pharmaceutical Review', *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1(1):24.
146. Salata, O.V., (2004). 'Applications of Nanoparticles in Biology and Medicine', *Journal of Nanobiotechnology*, 2(1):3.
147. Dimier-Poisson, I., vd., (2015). 'Porous Nanoparticles as Delivery System of Complex Antigens for an Effective Vaccine Against Acute and Chronic *Toxoplasma gondii* Infection', *Biomaterials*, 50:164-175.
148. Fereig, R.M., ve Nishikawa, Y., (2016). 'Towards a Preventive Strategy for Toxoplasmosis: Current Trends, Challenges, and Future Perspectives for Vaccine Development, Vaccine Design, Methods and Protocols,' *Vaccines for Veterinary Diseases*, Volume 2:153-164.
149. Chen, R., vd., (2009). 'Protective Effect of DNA-Mediated Immunization with Liposome-Encapsulated GRA4 Against Infection of *Toxoplasma gondii*', *Journal of Zhejiang University-Science*, 10(7): 512-521.
150. Chahal, J.S., vd., (2016). 'Dendrimer-RNA Nanoparticles Generate Protective Immunity Against Lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* Challenges with a Single Dose', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113:29.
151. Nascimento, I., ve Leite, L., (2012). 'Recombinant Vaccines and the Development of New Vaccine Strategies', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(12):1102-1111.

152. Heegaard, P.M., vd., (2011). 'Adjuvants and Delivery Systems in Veterinary Vaccinology: Current State and Future Developments', *Archives of Virology*, 156(2):183-202.
153. Eldridge, J.H., vd., (1991). 'Biodegradable Microspheres as a Vaccine Delivery System', *Molecular Immunology*, 28(3):287-294.
154. Jain, S., O'Hagan, D.T., ve Singh, M., (2011). 'The Long-Term Potential of Biodegradable poly (lactideco-glycolide) Microparticles as the Next-Generation Vaccine Adjuvant', *Expert Review of Vaccines*, 10(12):1731-1742.
155. Sinha, V., ve Trehan, A., (2003). 'Biodegradable Microspheres for Protein Delivery', *Journal of Controlled Release*, 90(3):261-280.
156. Lim, T.Y., Poh, C.K., ve Wang, W., (2009). 'Poly (lactic-co-glycolic acid) as a Controlled Release Delivery Device', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(8):1669-1675.
157. Raman, C., vd., (2005). 'Modeling Small-Molecule Release from PLG Microspheres: Effects of Polymer Degradation and Nonuniform Drug Distribution', *Journal of Controlled Release*, 103(1):149-158.
158. Ye, M., Kim, S., ve Park, K., (2010). 'Issues in Long-Term Protein Delivery Using Biodegradable Microparticles', *Journal of Controlled Release*, 146(2): 241-260.
159. Crowther, J.R., (2001). 'Overview of ELISA in Relation to Other Disciplines, in *The ELISA guidebook*', Springer, 1-8.
160. Biyogüvenlik Kabinleri – Kapsam, Biyogüvenlik Kabinleri, <http://www.kapsamsaglik.com.tr/urunler/biyoguvanlik-kabinleri>, 21.Ocak.2018.
161. Açık Ders, Işık Mikroskopu, http://www.acikders.org.tr/pluginfile.php/1110/mod_resource/content/0/konu12.pdf, 21.Ocak.2018.
162. Roehm, N.W., vd., (2001). 'An Improved Colorimetric Assay for Cell Proliferation and Viability Utilizing the Tetrazolium Salt XTT', *Journal of Immunological Methods*, 142(2):257-265.
163. Meshulam, T., vd., (1995). 'A Simplified New Assay for Assessment of Fungal Cell Damage with the Tetrazolium Dye (2, 3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT)', *Journal of Infectious Diseases*, 172(4):1153-1156.
164. Mordue, D.G., vd., (2001). 'Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines', *The Journal of Immunology*, 167(8): 4574-4584.
165. Darcy, F. vd., (1992). 'Protection of Mice and Nude Rats Against Toxoplasmosis by a Multiple Antigenic Peptide Construction Derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen', *The Journal of Immunology*, 149(11):3636-3641.
166. Siachoque, H., vd., (2006). ' *Toxoplasma gondii*: Immunogenicity and Protection by P30 Peptides in a Murine model', *Experimental Parasitology*, 114(1): 62-65.

167. Godard, I., vd., (1994). 'Antigenicity and Immunogenicity of P30-Derived Peptides in Experimental Models of Toxoplasmosis', *Molecular Immunology*, 31(17):1353-1363.



EK-A

ETİK KURUL BELGESİ





T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2014/ 31

Sayın: Prof. Dr. Yaşar Ali ÖNER
İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi

03.04.2014

Karar No :2014/31

Başvuru :20.02.2014

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen ve Yrd. Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ'a ait "Toksoplazmaya Karşı Nano Boyutta Aşı Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Deney Hayvanlarında Etkinliğinin İncelenmesi " isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Fare
	Cinsiyeti	Dişi
	Sayısı	48
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	01.09.2015/01.09.2017	

Prof. Dr. Alper AKDOĞAN KAYMAZ
İB HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof.Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Doç.Dr.Alper OKYAR
Üye

Yrd.Doç.Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak.Yük. Müh.
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı I.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221
nolu Oda Avcılar -İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail : ihadyek@istanbul.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zeynep KAYA
Doğum Tarihi ve Yeri : 05.07.1990 - Bakırköy
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : zeynepkaya@windowlive.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Formasyon	Biyoloji Öğr.	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
Lisans	Biyoloji	Fatih Üniversitesi	2014
Lise	Türkçe-Matematik	Büyüçekmece Lisesi	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2016	İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi	Viroloji Lab. Stajyeri
2014	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	Hematoloji Lab. Stajyeri

YAYINLARI

Bildiri

1. Berber B., Karaltı İ., Nur Oter G., Cakır Koc R., Budama Kılinc Y., **Kaya Z.**, "Coconut Oil Encapsulated Chitosan Nanoparticles: Cytotoxicity, Anticandidal and Antibiofilm Activity Against Multi-Species Candida Biofilms" 1st International Eurasia Mycology Congress, MANİSA, 03-05 Haziran 2017, ss.73.
2. **Kaya Z.**, Çakır Koç R., Kiliç Y., Berber B., Uçarkuş E., "Antibacterial Effect of Coconut Oil Encapsulated Chitosan Nanoparticles" 22. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu BIOMED 2017, ANKARA TÜRKİYE, 12- 14 Mayıs 2017, ss.99.
3. **Kaya Z.**, Çakır Koç R., Budama Kılinc Y., "İyonik Jelasyon Yöntemi ile Cocos *Nucifera* Yağı Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Oluşturulması ve Karakterizasyonu" 5. Ulusal Nanoteknoloji Kongresi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İSTANBUL TÜRKİYE, 9-10 Mart 2017.
4. Gözütok K., Çakır Koç R., **Kaya Z.**, "Investigation the Toxicity of Peptide Loaded Nanoparticles" Nanobilim ve Nanoteknoloji Kongresi, Gebze Teknik Üniversitesi, KOCAELİ TÜRKİYE, 03-05 Haziran 2016.
5. **Kaya Z.**, Çakır Koç R., "*Toxoplasma gondii* Takozoitlerinin L929 Hücre Hattında *in vitro* Kültürünün Yapılması" Ulusal Biyolojik Bilimler Kongresi, KONYA TÜRKİYE, 29 Aralık 2016 ss.80.
6. **Kaya Z.**, Çakır Koç R., Budama Kılinc Y., Ünal G., " Toksoplazmozun Tanısı ve Parazite Spesifik İmmünoglobülinY Antikoru Üretimi "19. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu, ERZURUM TÜRKİYE, 05-09 Ekim 2015, ss.103.
7. Özdemir B., Çakır Koç R., **Kaya Z.**, " *T. gondii*'ye Karşı Aşı Çalışmalarında SAG1 Yüzey Antijeninin Önemi" 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu, ERZURUM TÜRKİYE, 05-09 Ekim 2015

Makale

1. Budama Kılinc Y., Cakır Koc R., **Kaya Z.**, 'Preparation and Cytotoxicity of *Coriandrum sativum* L. Oil-Loaded Chitosan Nanoparticles 'JOTCSA, 2017;5(1):179–92.
2. Cakır Koc R., Budama Kılinc Y., **Kaya Z.**, Berber B., Uçarkuş E., 'Coconut Oil Encapsulated Chitosan Nanoparticles: Cytotoxicity, Antibacterial & Antibiofilm Activities Against Acne Vulgaris' In press

Kitap

1. Çakır Koç R., Budama Kılınç Y., Özdemir B., **Kaya Z.**, Sert M., Özçelik N., ' *In Vivo* and *In Vitro* Experiments for the Evaluations of Porous Biomaterials', *Frontiers in Biomaterials*, 2017, Vol. 4, 385-412

Proje

1. Influenza A Enfeksiyonu Tanısı İçin (M2e) Peptidine Spesifik ImmünoglobülinY Antikoru Dayalı İmmünokromatografi Yöntemi ile Hızlı Tanı Kiti Geliştirilmesi, TÜBİTAK 1003-Öncelikli Alanlar ArGe Projeleri Destekleme Programı, Proje Bursiyeri,15.10.2015
2. *Toxoplazma gondii*'ye Karşı Nano Boyutta Aşı Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Deney Hayvanlarında Etkinliğinin İncelenmesi, TAGEM Ar-Ge Destekleme Programı, Araştırmacı, 2015- 2018 Tamamlandı.
3. Toksoplazmozun Tanısında Kullanılmak Üzere Parazite Spesifik Immünoglobülin Y Antikorusunun Üretimi, BAP projesi, Araştırmacı, 2015-2017,Tamamlandı.
4. *Toxoplazma gondii* Parazitlerinin Yüzey Proteini ile Adjuvant Etkili Polimer Kombinasyonunun Toksoplazmoza Karşı Koruyucu Etkinliğinin İncelenmesi, BAP Projesi, Araştırmacı, 2015-2017, Tamamlandı