



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KEMİRGEN SITMA PARAZİTLERİNDE ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİ İLE İNDÜKLENEN HÜCRESEL ÖLÜM
YOLAKLARININ KARAKTERİZASYONU**

Sinem ÜNAL

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Bedia PALABIYIK**

**II. DANIŞMAN
Dr. Ahmed S. I. ALY**

Mayıs, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, 24.05.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Bedia PALABIYIK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Çağatay TARHAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Hızlan Hıncal AĞUŞ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 37560 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her daim yardım ve desteklerini gördüğüm çok değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Bedia PALABIYIK'a ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmed S.I. ALY'e,

Çalışmalarım sırasında bilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Araş. Gör. Ümit Yaşar KINA, Uzman Araştırmacı Mohd KAMIL ve Araş. Gör. Gözde DEVECİ'ye,

Maddi ve manevi desteklerini her zaman gördüğüm sevgili aileme teşekkür ederim.

Mayıs 2022

Sinem Ünal

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. ÇOKLU İLAÇ DİRENCİ	3
2.1.1. Mikroorganizmalarda Çoklu İlaç Direnci	3
2.1.2. Kanserde Çoklu İlaç Direnci	4
2.1.3. Sıtma Parazitinde Çoklu İlaç Direnci	5
2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ VE ETKİLERİ.....	7
2.2.1. Katlanmamış Protein Yanıtı ve Programlı Hücre Ölümü.....	8
2.2.2. Otofaji.....	10
2.2.2.1. Fagofor uzaması ve otofagozom oluşumu	13
2.2.3. Apoptoz	14
2.3. İLAÇ ETKİ MEKANİZMALARI	16
2.3.1. Tunikamisin.....	16
2.3.2. 5-Florourasil	16
2.3.3. Klorokin.....	16
2.4. SITMA	17
2.4.1. Sıtma Epidemiyolojisi	17
2.4.2. Sıtma Etkenleri	18
2.4.3. <i>Plasmodium</i> Yaşam Döngüsü.....	19
2.4.4. Sıtma Vektörleri	21
2.4.5. Kemirgen Sıtma Modeli	22
2.5. GERÇEK ZAMANLI POLİZMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	22
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	24

3.1. ORGANİZMALAR	26
3.1.1. Parazitlerin Üretilmesi.....	26
3.1.2. Farelerde Parazitemi Takibi	26
3.2. BESİYERLERİ VE SOLÜSYONLAR.....	27
3.2.1. Parazit Kültür Besiyeri	27
3.2.2. Yoğunluk Gradiyenti Solüsyonu	27
3.3. DENEY GRUPLARI	27
3.3.1. <i>In vivo</i> Deney Grupları	27
3.3.2. <i>Ex vivo</i> Deney Grupları	28
3.3.2.1. Şizont Senkronizasyonu.....	28
3.3.2.2. Olgun Şizontların Saflaştırılması.....	29
3.3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	29
3.4. GEN EKSPRESYONU ANALİZLERİ	30
3.4.1. RNA İzolasyonu	30
3.4.2. cDNA Sentezi.....	31
3.4.3. Primerlerin Tasarlanması.....	32
3.4.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	33
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. <i>IN VIVO</i> DENEY GRUPLARININ HAZIRLANMASI	36
4.1.1. Parazitemi Takibi.....	36
4.2. <i>EX VİVO</i> DENEY GRUPLARI	38
4.2.1. Olgun Şizontların Saflaştırılması	38
4.2.2. İlaç Gruplarının Hazırlanması	39
4.2.3. <i>Ex vivo</i> Kültürün Üreme Grafiği.....	41
4.3. GEN EKSPRESYONU ANALİZLERİ	42
4.3.1. RNA İzolasyonu	42
4.3.2. cDNA Sentezi.....	44
4.3.3. Hedef Genlerin Anlatım Değişikliklerinin Karşılaştırmalı Analizi.....	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
KAYNAKLAR.....	56
EKLER	67
EK 1. Etik Kurul Karar Metni	67
ÖZGEÇMİŞ	68

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Otofaji ve ilişkili yolların *Plasmodium* türlerinde şematik gösterimi ve her süreçte rol alan genlerin listesi (Yang ve Klionsky, 2009). 12
- Şekil 2.2:** *Plasmodium* türlerinin sivrisinek ve memeli konak arasındaki yaşam döngüsü (Kappe ve diğ., 2010). 20
- Şekil 2.3:** Sıtma parazitinin sivrisinek aşamaları ve eşeyli üreme süreçlerinin detaylı gösterimi (Aly ve diğ., 2009). 21
- Şekil 3.1:** Deney akış şeması.....25
- Şekil 3.2:** *Ex vivo* deney düzeneği şeması.....29
- Şekil 4.1:** *Pbp230p* (-) suşunun akış sitometrisi veri analizi ve konfokal mikroskopi görüntülemesi. Floresan protein üreten parazit hücreleri ile enfekte fare kanı 1/300 oranında sulandırıldıktan sonra akış sitometrisi cihazında analiz edilir. İleri ve yan saçılma dayalı yoğunluk alan grafiği (A) üzerinde eritrosit popülasyonunu içeren kapı “R1” alındıktan sonra floresan ışımaya yoğunluğuna bağlı histogram (B) oluşturulur. Histogramda değerlendirilen floresan yoğunluğuna bağlı olarak oluşturulan yoğunluk grafiğinde (C) ise gerçek floresan ışımaya ile otofloresan ışımaya ayrılır. Bu grafikte alınan kapı ile gerçek parazitemi değeri belirlenir. *Pbp230p* (-) suşu ile enfekte bir fare eritrositinin konfokal mikroskopi görüntüsü (D). Yüzük aşamasındaki parazitin mavi renkli nükleusu “Hoechst 33342” boyası ile boyandı. Parazitin GFP ekspresyonu özelliği sebebiyle sitoplazması yeşil renklidir. Ölçek 2 µm’dir. Görüntü Leica TCS SP8 cihazı ile alındı. 37
- Şekil 4.2:** *In vivo* deney gruplarının üreme grafiği. Parazitemi seviyeleri ortalama %0,5 olarak hazırlanan tüm gruplara ilaç başlangıç gününden (0. gün) itibaren ilgili ilaçlara uygulanarak farelerdeki parazitemi seviyeleri beş gün boyunca takip edilmiştir. (TN1: düşük doz tunikamisin 2 mg/kg/gün; TN 2: yüksek doz tunikamisin 4 mg/kg/gün; 5-FU: 5-fluorourasil 2 mg/kg/gün + Poly.I-Poly.C 0,6 mg/kg/gün; CQ: klorokin 3 mg/kg/gün; DMSO: yalnızca DMSO uygulanan kontrol grubu) 38
- Şekil 4.3:** Accudenz solüsyonu ile oluşturulan yoğunluk gradiyenti.....39
- Şekil 4.4:** Enfekte eritrositlerin ışık mikroskobu ile görüntülenmesi. Kırmızı ok ile gösterilen hücreler parazitin yüzük evresi, mavi ok ile gösterilenler ise trofozoit evresidir. Ölçek 5µm’dir. 40
- Şekil 4.5:** *Ex vivo* deney gruplarının üreme grafiği. Başlangıç parazitemi seviyeleri %15,07 olarak ölçülen kültürden hazırlanan tüm gruplara ilaçlar 0. saatte tek doz uygulandı. Kültürün parazitemi değeri 20 saat boyunca takip edilmiştir. (TN1:

düşük doz tunikamisin 2,5 µg/mL; TN 2: yüksek doz tunikamisin 5 µg/mL; 5-FU1: düşük doz 5-fluorourasil 1,3 µg/mL; 5-FU2: yüksek doz 5-fluorourasil 2,6 µg/mL; CQ: klorokin 0,25 µg/mL; DMSO: yalnızca DMSO uygulanan kontrol grubu). 41

Şekil 4.6: RNA örneklerinin spektrofotometrik analizi. Örneklerin 220-350 nm arası dalga boylarındaki absorbansının ölçümü sonucu oluşturulan grafik. Nükleik asit absorbansının en yüksek olduğu 260 nm baz alınarak, konsantrasyon değerleri hesaplanmaktadır. Ölçüm Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, ABD) cihazında yapılmıştır. Ölçülen tüm örneklerin absorbans eğrileri üst üste eklenerek grafik oluşturulmuştur. 42

Şekil 4.7: RNA örneklerinin DNaz uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra %1'lik agaroz jel görüntüsü. Jel görüntüsünde beklenildiği gibi, örnekler DNaz uygulaması öncesinde (A) genomik DNA konsantrasyonunu ve 18S, 28S ve 5S rRNA bantları görülmüştür. DNaz uygulamasından sonra (B) genomik DNA kontaminasyonunun giderildiği görülmektedir. Ayrıca enzimin ısı ile inaktivasyonundan dolayı RNA ikincil yapılarının denatüre olduğu gözlenmektedir. 44

Şekil 4.8: cDNA örneklerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü. Sentezlenen cDNA tek zincirli olduğu için, birbirleri ve kendi üzerine rastgele katlanmalar ve bağlanmalar oluşturur. Bu nedenle agaroz jelde olduğundan daha küçük boyutlarda gözlenir. 45

Şekil 4.9: *Plasmodium berghei* Pbp230p (-) paraziti ER stres marker geni BIP'in 5 µg/mL tunikamisin, 2,6 µg/mL 5-fluorourasil, 0,25 µg/mL klorokin etkisinde anlatım profilleri. Deney ve kontrol grupları arasındaki anlatım değişimleri tek yönlü varyans analizi modülü ile karşılaştırmalı olarak yapıldı. Post-hoc analizler "Dunnet's Test" ile gerçekleştirildi. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ 46

Şekil 4.10: *Plasmodium berghei* Pbp230p (-) paraziti otofaji ilişkili (A) ATG5, (B) ATG8, (C) ATG12 genlerinin, 5 µg/mL tunikamisin konsantrasyonunda anlatım profilleri. Deney ve kontrol grupları arasındaki anlatım değişimleri tek yönlü varyans analizi modülü ile karşılaştırmalı olarak yapıldı. Post-hoc analizler "Dunnet's Test" ile gerçekleştirildi. * $p < 0,5$, *** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ 46

Şekil 4.11: *Plasmodium berghei* Pbp230p (-) paraziti apoptoz ilişkili (A) MCA1, (B) MCA2, (C) MCA3 genlerinin 5 µg/mL tunikamisin konsantrasyonunda anlatım profilleri. Deney ve kontrol grupları arasındaki anlatım değişimleri tek yönlü varyans analizi modülü ile karşılaştırmalı olarak yapıldı. Post-hoc analizler "Dunnet's Test" ile gerçekleştirildi. * $p < 0,5$, *** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ 47

Şekil 4.12: *Plasmodium berghei* Pbp230p (-) paraziti apoptoz ilişkili (D) MCA2 ve otofaji ilişkili (A) ATG5, (B) ATG8, (C) ATG12 genlerinin, 2,6 µg/mL 5-fluorourasil konsantrasyonunda anlatım profilleri. Deney ve kontrol grupları arasındaki anlatım değişimleri tek yönlü varyans analizi modülü ile karşılaştırmalı olarak yapıldı. Post-hoc analizler "Dunnet's Test" ile gerçekleştirildi. * $p < 0,5$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ 48

Şekil 4.13: *Plasmodium berghei* *Pbp230p* (-) apoptoz ilişkili (D) MCA2 ve otofaji ilişkili (A) ATG5, (B) ATG8, (C) ATG12 genlerinin, 0.25 µg/mL klorokin konsantrasyonundaki anlatım profilleri. Deney ve kontrol grupları arasındaki anlatım değişimleri tek yönlü varyans analizi modülü ile karşılaştırmalı olarak yapıldı. Post-hoc analizler “Dunnet’s Test” ile gerçekleştirildi. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ 49



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Parazit kültür besiyeri içeriği.	27
Tablo 3.2: <i>In vivo</i> deney grupları ve uygulanan günlük ilaç dozları.	28
Tablo 3.3: <i>Ex vivo</i> deney grupları ve uygulanan ilaç dozları.	30
Tablo 3.4: Genomik DNA kontaminasyonunun giderilmesi için DNaz enzimi uygulama reaksiyonunun bileşenleri.	31
Tablo 3.5: cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri.	32
Tablo 3.6: cDNA sentez reaksiyonu koşulları.	32
Tablo 3.7: Hedef genlere özgü tasarlanan reaksiyon primerleri.	33
Tablo 3.8: GZ-PZR reaksiyon bileşenleri.	34
Tablo 3.9: GZ-PZR reaksiyon koşulları.	35
Tablo 4.1: <i>In vivo</i> deney gruplarının başlangıç parazitemi değerleri.	36
Tablo 4.2: RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri.	43

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
<	: Küçüktür
μ	: Mikro
°	: Derece

Kisaltmalar	Açıklama
-------------	----------

°C	: Santigrat Derece
μg	: Mikrogram
nm	: Nanometre
μL	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
FBS	: Fetal Bovin Serum
PBS	: Fosfat Tamponlu Salın
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
TN	: Tunikamisin
5-FU	: 5-Florourasil
CQ	: Klorokin
Poly I + Poly C	: Poliinosinik: polisitidilik asit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
cDNA	: Komplementer DNA
dNTP	: Deoksinükleotit
Ct	: Eşik döngü (“cycle treshold”)
GZ-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
KCl	: Potasyum Klorür
HCl	: Hidroklorik Asit

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEMİRGEN SITMA PARAZİTLERİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ İLE İNDÜKLENEN HÜCRESEL ÖLÜM YOLAKLARININ KARAKTERİZASYONU

Sinem ÜNAL

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

II. Danışman : Dr. Ahmed S. I. ALY

İnsan kanser hücrelerinde tedavi amaçlı kullanılan çeşitli kimyasallara karşı geliştirilen çoklu ilaç direnci “Multiple Drug Resistance, MDR”, kanser tedavisinde başarıyı sınırlayan faktörlerin başında gelmektedir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde programlı hücre ölümünü hedefleyen ilaçların geliştirilmesini amaçlayan çalışmalar hız kazanmıştır. Çoklu ilaç direncinin sıtmaya karşı kullanılan ilaçlara karşı da gözlemlenmiş olması göz önünde bulundurularak; bu çalışmada ER stresi ile tetiklenen hücre ölüm yollarının moleküler mekanizmasının anlaşılması hedeflendi. Bu amaçla kemirgen sıtma paraziti olan *Plasmodium berghei*’de, ER stresini tetikleyen tunikamisin, sıtma ilacı olarak kullanılan klorokin ve kanser ilacı olarak kullanılan 5-Florourasil ilaçlarının hücre canlılığı ve üreme profiline etkileri sorgulandı. Ayrıca apoptoz ve otofaji süreçlerinde rol oynayan hedef genlerin anlatım profilleri transkript düzeyinde araştırıldı.

BIP (“Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein”) geninin anlatımındaki değişim seviyelerine bakıldığında, *Plasmodium berghei* türü kemirgen sıtma parazitlerinde; tunikamisin, 5-fluorourasil ve klorokin ilaçları uygulanmasında güçlü bir ER stresinin tetiklendiği kesin olarak gösterilmiştir. 5-fluorourasil ve klorokin uygulamasında, otofaji ilişkili genlerin aktivasyonuna rağmen hücrelerin apoptoza yöneldikleri; tunikamisin uygulamasında ise hücrelerin doğrudan apoptoza yöneldiği düşünülmektedir.

Mayıs 2022, 83 sayfa.

Anahtar kelimeler: çoklu ilaç direnci, ER stres, otofaji, apoptoz, sıtma.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

CHARACTERIZATION OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS- INDUCED CELL DEATH PATHWAYS IN RODENT MALARIA PARASITES

Sinem ÜNAL

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

Co-Supervisor : Dr. Ahmed S. I. ALY

Multiple drug resistance, MDR, which is developed against various chemicals used for therapeutic purpose in human cancer cells, is one of the factors limiting success in cancer treatment. Therefore, studies aiming at developing drugs targeting programmed cell death in cancer cells have gained speed. Considering multiple drug resistance was also observed against antimalarial drugs, in this study, it was aimed to understand the molecular mechanism of ER stress-induced cell death pathways. For this purpose, effects of ER stress-inducer tunicamycin, antimalarial chloroquine and anticancer 5-Fluorouracil drugs on cell survival and growth investigated in rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. Additionally, expression profiles of target genes that play a role in apoptosis and autophagy processes will be investigated at transcript level.

Considering the expression levels of the BIP (Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein) gene in rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*; It has been conclusively shown that a strong ER stress is triggered by the administration of tunicamycin, 5-fluorouracil and chloroquine drugs. In the application of 5-fluorouracil and chloroquine, despite the activation of autophagy-related genes, cells tended to apoptosis; and in tunicamycin application, cells directly tended to apoptosis.

May 2022, 83 pages.

Keywords: multiple drug resistance, ER stress, autophagy, apoptosis, malaria.



1. GİRİŞ

Son yıllarda, mikrobiyal enfeksiyonların insidansında önemli bir artış gözlenmiştir. Enfeksiyonların tedavisinde antimikrobiyal ilaçların yaygın olarak kullanılması birçok mikroorganizma türünde ilaç direncinin gelişmesine sebebiyet vermiştir. Çoklu ilaç direnci gelişimi, bir mikroorganizmanın tedavi amaçlı kullanılan antimikrobiyal ilaçlara karşı daha önceden duyarlı olmasına rağmen sonradan direnç kazanması olarak tanımlanır (Tanwar ve diğ., 2014).

İlaç direnç mekanizmalarının anlaşılabilmesine yönelik çalışmalar, yeni ilaçlar geliştirilmesini veya ilaç kombinasyonu uygulamalarını mümkün kılmaktadır. Ayrıca var olan ilaçların farklı hedeflere yönlendirilmesi de ilaç direnci ile mücadelede büyük önem taşımaktadır. Literatür araştırmaları ve son zamanlarda yapılan çalışmalar sayesinde çoklu ilaç direncine karşı yeni ilaçlar geliştirmek yerine, farklı etki mekanizmalarına sahip ilaç kombinasyonlarının birlikte kullanılması başarılı bir tedavi seçeneği oluşturmaktadır. Örneğin sıtma ilacı olan Artemisinin'in hücre bölünmesini G1/G2 fazında durduğu, bir kanser ilacı olan Vinkristin'in ise mikrotübülleri polimerize ederek metafazda mitotik bölünmeyi durduğu bilinmektedir. Böylelikle kanser tedavisinde bu iki ilacın birlikte kullanılması durumunda, G1/G2 fazından kaçan hücrelerin sonraki süreçte vinkristin etkisiyle metafazda yok edilmesi, ilaç kombinasyonlarının olumlu etkisine bir örnektir (Hooft van Huijsduijnen ve diğ., 2013, Wagner ve diğ., 1977).

Hücrede, apoptoz ve otofaji dahil olmak üzere programlanmış hücre ölüm yollarının aktivatörlerinden biri ER stresidir. İlaç direnciyle mücadelede, mevcut ilaçların etkinliğinin artırılması amacıyla oluşturulacak kombinasyonlarda, ER stresi aracılığıyla programlı hücre ölüm yollarının aktivasyonunun sağlanabileceği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarla bir kanser ilacı olan Bortezomib ile beraber otofajiyi blok etme özelliği olan azitromisin veya klaritromisin antibiyotikleri ile kombine tedavinin, aynı anda iki ana hücre içi bozunma mekanizmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu ilaç kombinasyonu ile miyelom ve meme kanseri hücre hatlarında bir transkripsiyon faktörü olan CHOP'un (CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein) anlatım seviyesinin yükselmesiyle ER stresi meydana gelir ve bu stresin apoptoz indüksiyonunu arttırdığı bilinmektedir (Kazama ve diğ., 2018). Laboratuvarımızda da ökaryotik maya tipi bir

model organizma olan *Schizosaccharomyces pombe*'de ER stresi ile hücre ölüm yollarından otofaji arasında bir ilişkinin varlığı gösterilmiştir (Özsamur, 2020; Özarabacı, 2019; Yemenici, 2022).

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında; seçilen antikanser, antifungal ve antimalaryal ilaçların, programlanmış hücre ölüm yolları üzerindeki etkisinin kemirgen sıtma modeli parazitler üzerinde araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla 5-florourasil, tunikamisin ve klorokin ilaçlarının bir parazitik protozoon olan *Plasmodium berghei* türü parazitlerde, parazit üremelerine etkisi *in vivo* ve otofaji ve apoptoz ilişkili genlerin anlatımı üzerindeki etkileri *ex vivo* olacak şekilde incelenmiştir.

In vivo deney grupları her ilaç grubu için dört adet farenin enfekte edilmesiyle oluşturuldu. Beş gün boyunca, yüksek (4 mg/kg/gün) ve düşük (2 mg/kg/gün) olarak iki dozda tunikamisin, tek dozda (5 mg/kg/gün) 5-florourasil ve tek doz (3 mg/kg/gün) olmak üzere klorokin uygulanmıştır.

Ex vivo deney gruplarında altı adet fare enfekte edilerek senkronize saf şizont kültürü hazırlandı. Kültürün başlangıç saatinde yüksek (5 µg/ml) ve düşük (2,5 µg/ml) olmak üzere iki dozda tunikamisin, yüksek (2,6 µg/ml) ve düşük (1,3 µg/ml) olmak üzere tek dozda 5-florourasil ve tek (0,25 µg/ml) doz olmak üzere klorokin uygulandı. Bu kültürden 0, 5, 10, 15, ve 20. saatlerde örnekler alınarak RNA izolasyonu yapıldı. Otofaji ve apoptoz ile ilişkili olduğu bilinen ATG5, ATG8, ATG12, MCA1, MCA2, MCA3 genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişim gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile araştırıldı.

Bu çalışma sonucunda başarılı bir şekilde oluşturulan endoplazmik retikulum stresinin, tunikamisin ilacında apoptoz ilişkili genlerin; 5-fluorourasil ve klorokin ilaçlarında ise otofaji ve apoptoz ilişkili genlerin birlikte aktivasyonuna yol açtığı gösterildi.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ÇOKLU İLAÇ DİRENCİ

Çoklu ilaç direnci, geniş bir yelpazedeki yapısal ve mekanik olarak farklı bileşik sınıflarına direnç olarak tanımlanır. Çoklu ilaç direncine, hedef moleküllerdeki değişimler, gelişmiş DNA onarımı, apoptozdan kaçınma, hücre döngüsü kontrol noktalarındaki değişiklikler, ilaç metabolize eden enzimlerin indüksiyonu, ilaç alınımındaki değişiklikler ve ilaçların hücre dışına aktif taşınması gibi çeşitli mekanizmalar aracılık edebilir (Kibria ve diğ., 2014, Longley ve Johnston, 2005).

Çoklu ilaç direnci gelişimi, HIV enfeksiyonuna sahip hastalar, diyabetik hastalar, organ nakli olmuş bireyler ve ciddi yanık hastaları gibi immun sistemi baskılanmış hastaları, hastane kaynaklı bulaşıcı hastalıklar için kolay bir hedef haline getirir ve bu durum çoklu ilaç direncinin yayılmasına katkıda bulunur (Loeffler ve Stevens, 2003).

Çoklu ilaç direnci gelişimi çeşitli mikroorganizmalar ve kanserle olan savaşta büyük bir problem oluşturmaktadır. Antimikrobiyal ilaç direnci tıp dünyasında birincil ve ikincil çoklu ilaç direnci olarak sınıflandırılır. Birincil çoklu ilaç direnci; organizma veya mikroorganizma, konakçıdaki ilaçla daha önce hiç karşılaşmadığında meydana gelir. İkincil çoklu ilaç direnci; edinilmiş çoklu ilaç direnci olarak adlandırılabilir. İkincil çoklu ilaç direnci, organizma veya mikroorganizma, konakta bu ilaca daha önce maruz kalmışsa gelişebilir (Khalilzadeh ve diğ., 2006, Loeffler ve Stevens, 2003).

Çoklu ilaç direncinin sebep olduğu sorunlar; kanser kemoterapisi, hastane enfeksiyonları, tüberküloz ve sıtma kemoterapisi alanlarında tedavi zorluğu meydana getirmesidir.

2.1.1. Mikroorganizmalarda Çoklu İlaç Direnci

Antibiyotiklerin keşfiyle sağlık camiasında bulaşıcı hastalıklara karşı olan savaş büyük anlamda kazanıldı. Fakat dünya sağlık örgütü raporlarına göre, ilaçların uzun süreli, yanlış dozlarda veya gereksiz kullanımıyla beraber birçok mikroorganizma sınıfı antibiyotiklere dirençli hale geldi. Bu durum enfeksiyonlara karşı uygulanan tedavi sürecinde başarısızlığa neden olarak enfeksiyonun daha kalıcı ve yayılcı olmasına sebebiyet vermektedir.

Çoklu ilaç direnci dünya çapında artan bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Penisilin dirençli *Escherichia coli*, çoklu ilaç direncine sahip *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisin-dirençli *Enterococcus* (VRE) gibi hastane kaynaklı enfeksiyonlardaki artış özellikle yoğun bakım hastaları için önemli bir sorundur (Cornejo-Juárez ve diğ., 2015).

Tüberküloz tedavisindeki en önemli ilaçlar olan rifampisin ve izoniyazid ilaçlarına dirençli *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının sürekli yayılımı, küresel tüberküloz kontrol çalışmaları için çok önemli bir sorundur (Seung ve diğ., 2015).

Antimikrobiyal ilaçlar, aktif antimikrobiyal mekanizmasına göre gruplara ayrılır. Ana gruplar; hücre duvarı sentezini inhibe eden, hücre zarını depolarize eden, protein sentezini inhibe eden veya metabolik yolları inhibe eden ilaçlar şeklinde ayrılır (Griffith ve diğ., 2012; DSÖ, 2021).

2.1.2. Kanserde Çoklu İlaç Direnci

Kanser tedavisinde en önemli sorunlardan biri çoklu ilaç direnci (MDR) gelişimidir. İlaç direncinin belirleyici faktörlerinden biri de membran ABC taşıyıcısının aşırı ekspresyonudur (Gottesman ve diğ., 2002). Kanser hücrelerinin savunma sistemi olarak görev yapan ABC taşıyıcıları, kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilir. Bu durum antikanser ilaçların ve substrat ilaçların hücre içi birikiminin azalmasına sebebiyet vererek tedavide zorluklar meydana getirir. İnsan ABC taşıyıcıları 48 üyeden oluşur. Bunlardan MDR/P-glikoprotein (ABCB1), meme kanseri direnç proteini (ABCG2, MXR), çoklu ilaç direnci proteini 1 (MRP1, ABCC1) ve çoklu ilaç direnci proteini 7 (MRP7, ABCC10), çoklu ilaç direncinin geliştirilmesinde en önemli üyelerdir (Dean ve diğ., 2001).

Son yıllarda özellikle MDR görülen kanserlerde, kanser hücrelerinde Endoplazmik retikulum (ER) stresi indüklenerek hücrelerin otofaji ya da apoptoz gibi programlanmış hücre ölüm (PCD) yollarına yönlendirilmesini hedefleyen çalışmalar hız kazanmıştır (Gopisetty ve diğ., 2019). Bu konuda kanonik olarak iki yaklaşım vardır. İlki olumsuz adaptasyonu kesintiye uğratmak için gelişmiş bazal katlanmamış protein yanıtının (UPR) inhibisyonu ki bu kanser hücreleri için stresli bir ortam yaratmaktadır. İkinci olarak, lokal metabolik bozukluklara neden olan aşırı stresin indüklenmesi ve habis dokularda dengeyi hayatta kalma mekanizmasından hücre ölümü mekanizmalarına kaydıran stres tepkimelerinin aktivasyonudur (Chen ve diğ., 2018).

2.1.3. Sıtma Parazitinde Çoklu İlaç Direnci

Sıtma, tüberküloz ve HIV ile dünyada en çok ölüme sebebiyet veren enfeksiyon hastalıklarındır (DSÖ, 2021). Klorokin'in sıtma vakalarının çok olduğu Afrika'da yaygın kullanıma bağlı olarak, klorokine dirençli suşların kıta boyunca yayılmasına sebep olmuştur ve 1980'lerde sıtmaya bağlı ölümler 2 ila 3 kat artış göstermiştir (Trape, 2001).

1980'lerden beri klorokin ve sülfadoksine dirençli parazitlerle mücadele için meflokin, amodiakin ve kinin olmak üzere farklı sıtma karşıtı ilaçlar tedavi için kullanılmıştır (Petersen ve diğ., 2011). Bu farklı ilaçlarının monoterapide kullanımı şuan ki gibi benzer şekilde parazitlerin direnç geliştirmesiyle sonuçlanmış olsa da, en azından dünyanın bazı bölgelerinde sıtmaya bağlı ölüm oranlarını azaltarak nispeten başarı sağlamıştır (DSÖ, 2021).

Plasmodium'da çoklu ilaç direncinin ortaya çıkmasında; parazitin geçirdiği mutasyon oranı, mutasyonların direnç kazanma ile uyumlu olması, genel parazit yükü ve tedavide seçilen uygun ilaç ve dozu gibi faktörlerin hepsine bağlıdır. Parazitin mutasyon oranı, parazitin üzerinde direncin ortaya çıkması durumunda doğrudan bir etkiye sahiptir. Daha yüksek mutasyon oranları, parazitte ilaç direncinin daha hızlı ortaya çıkmasını ve zararlı mutasyonların birikimini sağlar. *Plasmodium falciparum*'da mutasyon oranı '*Plasmodium falciparum* resistance of chloroquine' (PfDHFR) genindeki kendiliğinden meydana gelen mutasyonları ölçen birtakım deneyler sayesinde yaklaşık olarak 10⁻⁹ olarak belirlenmiştir ki bu değer nispeten düşük bir mutasyon oranıdır (Paget-McNicol ve Saul, 2001). Yapılan bazı in vitro deneyler sonucunda hızlı gelişen çoklu ilaç direnci (ARMD) fenotipi, Güneydoğu Asya'daki suşlar ve diğer coğrafi olarak farklı bölgelerden elde edilen suşlar ile karşılaştırıldığında, Güneydoğu Asya'da daha yüksek oranda ilaç direncine sahip izolatların elde edildiği görülmüştür. Bu tür ARMD parazitler yeni ilaçlara karşı geliştirilen direncin genellikle ilk olarak Güneydoğu Asya'da ortaya çıktığı fikrini düşünülmesine sebep olmuştur (Sniegowski ve diğ., 2000, Rathod ve diğ., 1997).

Artemisinin biyolojik olarak aktif dihidroartemisin'in bir ön ilacıdır ve sıtma tedavisinde sıklıkla, kullanılmaktadır. İlaç molekülleri hemoglobinde bulunan demirli-porfirin (HEM) ile temas ettiğinde, demir (II) oksit endoperoksit halkasını kırmaktadır (Tilley ve diğ., 2016). Bu süreç, proteinlere zarar veren ve bu sayede parazitin ölümüne neden olan serbest radikaller üretmektedir (Cravo ve diğ., 2015, Winzeler ve Manary, 2014). Ancak uzun süreli ve yüksek

dozlarda ilaç kullanımı nedeniyle meydana gelen ilaç direnci artemisinin'in artık tek başına sıtma tedavisinde yeterli olmamasına sebebiyet vermiştir (Tilley ve diğ., 2016). Artemisininin dezavantajı *in vivo* yarı ömürünün çok kısa olmasıdır. Bundan dolayı artemisinin, lumefantrin, amodiaquine, piperaquine, mefloquine, sulphadoxine-pyrimethamine veya pyronaridine gibi daha uzun yarı ömürlü ortak ilaçlarla kombine bir tedavi şeklinde uygulanır (White, 2013, Enserink, 2010).

Sıtma kontrolü için odaklanması gereken iki ana başlık vardır; hastalığın taşınmasına neden olan *Anofel* cinsi dişi sivrisineğin kontrolü ve vaka yönetimidir. Vaka yönetimindeki başarı büyük ölçüde, sıtmaya karşı kullanılan ilaçların etkinliğine bağlıdır (Bhatt ve diğ., 2015). Etkili sıtma ilaçlarına karşı direncinin artması, sıtma kontrolü ve eliminasyonunu tehdit eder. *Plasmodium falciparum*'da antimalaryal ilaç direnci özellikle Asya, Güney Amerika, Sahra altı Afrika'da ortaya çıkmaya başlamıştır ve bu durum o bölgelerde zaten varolan sıtma problemi ile olan mücadeleyi zorlaştırmaktadır (White, 2004). Özellikle klorokin ve sulfadoksin-primetamin ilaçlarına kazanılan direnç nedeniyle Afrika'da çocuklarda sıtmaya bağlı milyonlarca ölüm olmuştur (Trape ve diğ., 1998, Trape, 2001, Korenromp ve diğ., 2003).

Parazit, hızlı gelişimini sürdürebilmek için bir kırmızı kan hücresi içinde bulunan ve toplam proteinin %90'ını temsil eden hemoglobini kullanır, bu proteinin de yaklaşık %75'i eritrositik gelişim evresinde yıkılır (Beck-Johnson ve diğ., 2013, Francis ve diğ., 1997, Goldberg ve diğ., 1990).

Hemoglobinin hidrolizi, aminoasitleri parazit için kullanılabilir hale getirirken, bu süreç aynı zamanda prostetik grup-demirli hemoglobini serbest bırakır ki bu da hızla ferriprotoporfirine oksitlenir. Serbest HEM, enzimleri inhibe ederek, membranları oksitleyerek ve oksidasyon radikallerini üreterek hücrel metabolizmayı etkilediğinden parazit için son derece toksiktir. Bu nedenle, hemoglobinin sürekli olarak bozulması ile, parazitin kesintisiz büyümesi ve çoğalması için, eşzamanlı bir hem detoksifikasyonu gerekmektedir (Chou ve diğ., 1980, Rathore ve diğ., 2006).

Hemoglobinin bu yolla yıkılması sonucunda, parazit tarafından etkin bir şekilde nötralize edilebilen HEM, tam olarak anlaşılamayan bir mekanizmayla, öncelikle hemozoin adı verilen kristal bir yapıya dönüşerek serbest kalır (Lee ve diğ., 2003).

Hem detoksifikasyonu benzersiz bir ilaç hedefi oluşturmaktadır. Geleneksel şifacılar tarafından bilinen birkaç antik sıtma ilacı ve ayrıca genom öncesi çağda geliştirilen en güçlü ilaçlardan bazıları, hem detoksifikasyonunu bloke ederek sıtma önleyici aktivitelerini gösterir. Aslında, hem detoksifikasyonunun önlenmesi sıtmayı kontrol etmek için en yaygın kullanılan stratejidir. Tarihte en yaygın olarak kullanılan antimalaryal ilaç olan klorokin, HEM'e bağlanıp detoksifikasyonunu engelleyerek HEM toksisitesine ve parazitin ölümüne yol açar (Sullivan ve diğ., 1996).

Klorokin direnci için 7. Kromozomda 36 kb'lık bir bölge tanımlanmıştır. Bu lokusun daha sonra incelenmesi ile 424 aminoasit ve 48.6 kDa'lık bir proteinin sindirim vakuol'ünde ("food vakuol") lokalize olduğu anlaşılmıştır. Biyoinformatik analizler sonucu, *PfCRT*'nin organelin sitosolik tarafına bakan 10 transmembranlık bölgeyi kaplayan ve hem N hem C terminalleri olan ilaç/metabolit taşıyıcı ailesinin bir üyesi olduğu anlaşılmıştır. *PfCRT*'yi genetik olarak bozma işlemleri başarısız olmuştur. Bu durum genin temel bir işlevi olduğunu düşündürmüştür. İlaç/metabolit taşıyıcılarının diğer alt üyelerinin arasında aminoasitler, zayıf bazlar ve organik katyonlar bulunur. Klorokin aktif taşıma yoluyla taşındığı gösterilmiştir.

K76T mutasyonu, klorokin tedavisine karşı geliştirilen direnç mekanizması mutasyonunu tanımlamak için güçlü bir anahtardır. Parazit K76T mutasyonuna ek olarak bu mutasyonun meydana getirdiği fonksiyon kaybını gidermek için 3 ek mutasyon daha barındırır. Sonuç olarak *PfCRT* K76T polimorfizmi klorokin direnci için marker olarak kabul edilir (Petersen ve diğ., 2011, Leed ve diğ., 2002).

2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ VE ETKİLERİ

Endoplazmik retikulum ökaryotik hücrelerde bulunan, nüklear membran ile ilişki olan ve sitoplazma içinde yayılım gösteren kanallı ve tabakalı yapıya sahip bir organeldir. Kalsiyum depolanması, lipid sentezi, protein sentezi ve taşınması gibi önemli rolleri üstlenir. Endoplazmik retikulum, organel zarının sitozolik yüzeyinde ribozomların varlığına veya yokluğuna bağlı olarak sırasıyla Granüllü ER ve Granülsüz ER olarak adlandırılır (Almanza ve diğ., 2019). Ayrıca salgı yolağının ilk kompartımanıdır. Salgı yolağı tüm ökaryotik hücre proteinlerinin üçte birinin sentezinden, bunların translayon sonrası modifikasyonundan, kompleksler halinde birleştirilmesinden ve hücre dışı boşluğa salınmasından sorumludur. Proteinler, katlanmamış bir durumda sitozolden endoplazmik retikuluma translokasyon yoluyla salgı yolağına girerler

ve burada uygun üç boyutlu konformasyonlarını elde etmek için şaperon destekli katlanma mekanizmasına maruz kalırlar. DNA replikasyonu, transkripsiyon ve translasyondan farklı olarak, protein katlanması oldukça hataya açık bir işlemdir (Hebert ve Molinari, 2007).

Bu nedenle, sağlıklı bir proteom, verimli protein katlanmasını teşvik etmek için endoplazmik retikulum düzeyinde çalışan karmaşık kalite kontrol mekanizmalarına bağlıdır. Endoplazmik retikulum homeostazısı, fizyolojik talepler ve patolojik hareketler tarafından sürekli olarak kontrol altında tutulur ve hücrede Ca^{2+} depolanması, protein katlanması, lipid ve sterol biyosentezi ve organeller arası iletişim sinyalizasyonu için bir platformdur. Protein salgısının artması veya bozuk endoplazmik protein katlanması, endoplazmik retikulum lümeni içerisinde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olabilmektedir. Bu durum Endoplazmik stres olarak adlandırılır. Endoplazmik retikulumun işlevlerini sürdürmesini ve protein katlama doğruluğunu sağlaması için, ökaryotik hücrelerde UPR, protein dengesini korumak için gen transkripsiyonunu, mRNA translasyonunu ve protein modifikasyonlarını yeniden programlamak ve kontrol etmek için sinyal iletim yolağı ağlarına dönüşmüştür (Hetz ve diğ. 2020).

Endoplazmik retikulum, ökaryotik hücrelerde nüklear membranla ilişkili olan ve sitoplazmada yayılmış tabaka ve kanal yapısıyla, protein sentezi ve taşınması, lipid sentezi ve kalsiyum depolanmasının yapıldığı önemli bir organeldir. ER tabakalarının sitosolik yüzeyinde yüksek yoğunlukta ribozom bulunur ve granüllü ER olarak da adlandırılır. Burası salgılanan veya integral membran proteinlerinin sentezlendiği, katlanma ve translasyon sonrası modifikasyonların yapıldığı ana yerdir. ER tübüllerinin membranında çok az ribozom bulunur ya da bulunmaz (granülsüz ER). Burada da lipid sentezi, kalsiyum depolanması gibi süreçler gerçekleşir (Boyle, 2008). ER’de sentezlenen proteinler oligosakaritlerin eklenmesi (N-glikosilasyon) ve disülfid bağlarının oluşumu gibi kimyasal modifikasyonlara uğradıktan sonra görev alacağı hedef bölgeye taşınır. Proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olmak için şaperon ve katlanma enzimleri görev alır (Araki ve Nagata, 2011).

2.2.1. Katlanmamış Protein Yanıtı ve Programlı Hücre Ölümü

Fizyolojik, çevresel veya patojenik kaynaklı olarak ER’nin protein sentezi, modifikasyonu ve taşınması gibi görevleri engellendiği zaman, ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler biriktirilir. Bu durumu engellemek için bu proteinler öncelikle, ER’den sitosole

aktarılır ve ER ile ilişkili yıkım (ERAD) yoluyla kullanılarak parçalanır (Smith ve diğ., 2011). Ancak bu yolakla katlanmamış/yanlış katlanmış protein birikimi engellenemediği zaman ER stresi oluşur (Walter ve Ron, 2011). ER stresini önlemek ve protein homeostazını korumak için, ökaryotik hücreler katlanmamış/yanlış katlanmış protein yanıtını (UPR) geliştirmiştir (Kozutsumi ve diğ., 1988). UPR başlatılarak protein katlama kapasitesini artırmak için şaperon ve katlama enzimlerinin miktarı artırılır, yeni protein sentezi traslasyonel inhibisyon ile durdurulur, seçili mRNA'lar yıkılır, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler parçalanır (Hollien ve Weissman, 2006, Harding ve diğ., 1999, Travers ve diğ., 2000). Uzun süreli ve şiddetli ER stresi altında UPR, ER homeostazını sağlayamazsa hücre ölüm mekanizmaları indüklenerek hücre ölümü meydana gelir (Corazzari ve diğ., 2017).

Metazoolarda UPR yolağında görevli üç farklı algılayıcı vardır. Bunlar inositol gereken enzim 1 (Ire1), protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK) ve aktivite edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6)'dır (Walter ve Ron, 2011). Bu UPR algılayıcıları ER membranına yerleşik bulunan transmembran proteinlerdir ve ER lümeni ile sitosol arasındaki iletişimi sağlar (Wu ve diğ., 2014). Ire1, ER lümenindeki bölgesiyle katlanmamış proteinleri tespit ederken sitosoldeki bölgesiyle kinaz ve endoribonükleaz tepkimelerini gerçekleştirir (Mori ve diğ., 1993, Sidrauski ve Walter, 1997). Ire1'in aktivitesi Bip1 şaperonuyla düzenlenir. Normal koşullar altında Bip1, Ire1'in N-terminal bölgesine bağlıdır, ama ER stresi ortaya çıktığında Ire1'den ayrılarak UPR'yi başlatır (Bertolotti ve diğ., 2000). Bip1 şaperonunun Ire1'den ayrılarak katlanmamış proteinlere bağlanması Ire1'lerin dimerizasyon oluşturmaya neden olur (Credle ve diğ., 2005). Ire1 dimerizasyonu sonrası meydana gelen yapısal değişiklik Ire1'in endoribonükleaz bölgesini aktifleştirir (Korennykh ve diğ., 2009). Endoribonükleaz tepkimesiyle özellikle belli mRNA'lar kesilir. Bunlar metazoolarda XBP1 (X-kutusu bağlı protein 1), *S. cerevisiae*'de ise HAC1 (ATF/CREB1'in homologu) mRNA'sıdır (Cox ve Walter, 1996). Daha sonra bu mRNA'lar, şaperon veya katlama enzimi gibi ER stresini hafifletecek bileşenleri kodlayan genleri düzenleyen transkripsiyon faktörünü üretir (Sidrauski ve diğ., 1996, Travers ve diğ., 2000).

UPR'nin aktivasyonu ile protein yükü ve şaperon kapasitesi arasındaki dengenin tekrar sağlanması ER stresine karşı genellikle yeterli olur. Fakat uzun süreli devam eden ER stresi durumunda UPR, apoptoz ve otofaji dahil olmak üzere programlanmış hücre ölümünü (PCD, "programmed cell death") tetikleyebilir (Austriaco, 2012).

Plasmodium falciparum, konağından bağımsız bir şekilde olmasına rağmen ER stresi algılayabilir ve bir UPR yanıt düzenleyebilir. *Plasmodium*, daha yüksek ökaryotik hücrelere kıyasla minimal bir UPR ağı içerir ve UPR'ın transkripsiyonel düzenleyici dalları boyunca hareket eden IRE1 ve ATF6'dan yoksundur. Buna karşılık, protein translasyonunun düzenlenmesine etki eden PERK ile ilgili bir UPR sensörü mevcuttur (Chaubey ve diğ., 2014, Gosline ve diğ., 2011).

UPR'ın *Plasmodium berghei* ile enfekte hepatositlerdeki rolü, *ex vivo* ve *in vivo* fare modellerinde araştırılmıştır (Inacio ve diğ., 2015). UPR çoğunlukla karaciğerde, lipid ve glukoz metabolizması gibi metabolik yollarla bağlantılıdır (Fu ve diğ., 2012). Karaciğer metabolik yollarını düzenleyen ER transkripsiyon faktörü CREBH'nin aracılık ettiği başka bir hepatosit spesifik UPR dalı mevcuttur (Lee ve diğ., 2010).

P.berghei'nin hem XBP1 hem de CREBH yolakları ile hepatositlerde UPR'yi indüklediği bilinmektedir. Ayrıca PERK ve ATF6 yolaklarının da bu süreçte aktif olarak rol aldığı bildirilmiştir. XBP1 eklemesinin veya CREBH'nin yıkılmasının ortadan kaldırılması parazit gelişimine zararlıdır. Bu da hepatosit enfeksiyonunda konak UPR'nin *Plasmodium* için yararlı olduğunu gösterir(Inacio ve diğ., 2015).

UPR'ın lipid metabolizmasını, özellikle fosfatidilkolin metabolizmasını düzenleyerek parazit büyümesini desteklemesi mümkündür. Aslında XBP1'ler fosfatidilkolin gibi fosfolipidlerin sentezini indükleyebilir (Sriburi ve diğ., 2004). Bu indüksiyon parazit proteinlerinin parazitofor vakuol zarına lokalize olması için gereklidir ki bu durum karaciğer enfeksiyonu sırasında parazitin hayatta kalabilmesi için esastır (Ittoe ve diğ., 2014).

2.2.2. Otofaji

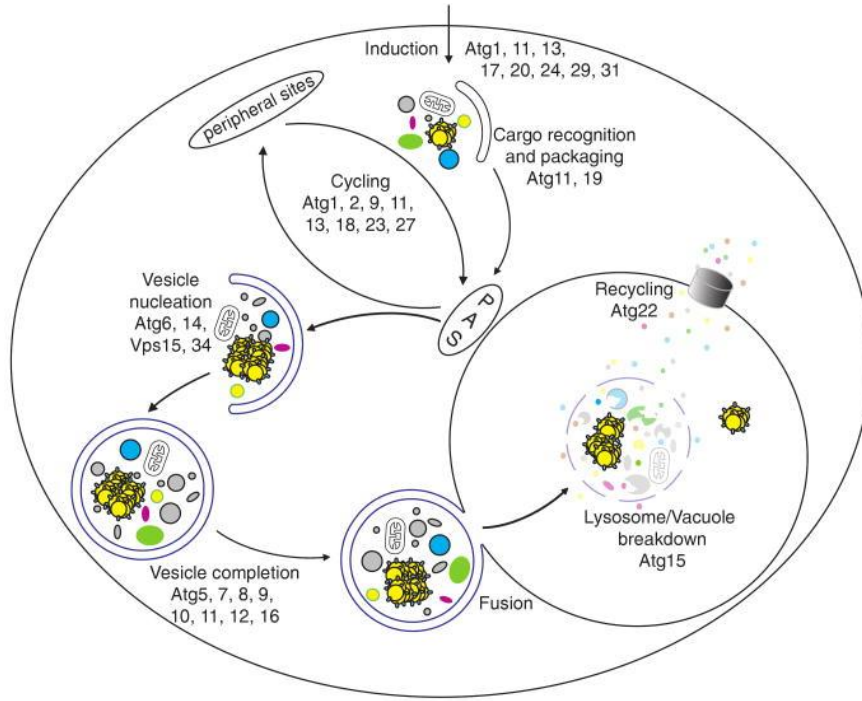
Otofaji ökaryotik hücrelerde evrimsel olarak korunmayı sağlayan, gereksiz ve bozunmuş hücresel proteinleri, organelleri ve diğer sitoplazmik bileşenlerin parçalanmasını hedef alan hücre içi katabolik bir süreçtir. Bu parçalama süreci otofagozom olarak adlandırılan çift zarlı vezikül yapıları içeren ve içerisinde sitozolik atıkları toplayıp bunları lizozoma ileten bir yapı sayesinde gerçekleşir. Parçalanmış ürünler arasından aminoasit, şeker gibi ürünler sitoplazmaya geri verilir. Kısacası otofaji adımları, otofagozomların oluşması, olgunlaşması ve lizozomlarla birleşmesi akabinde lizozoma taşınan kargonun bozulmasıyla sindirimin gerçekleşmesi ve

sindirim sonucu ortaya çıkan bazı makromoleküllerin sitozole geri gönderilmesi şeklinde tanımlanabilir.

Selektif ve selektif olmayan otofaji olmak üzere iki tip otofaji türü vardır. Selektif olmayan otofajide otofagozomlar sitoplazmanın bir kısmını içine alarak sindirim için lizozomlara iletir. Selektif otofaji de ise çekirdek mekanizmanın aynı olmasının yanı sıra, otofagozomların asıl hedefleri hasarlı organeller, hücre içi patojenler, protein kümeleri gibi belirli yapılardır (Singh ve diğ., 2018).

Otofaji oldukça korunmuş bir süreç olup insanlarda ve mayalarda temel ilkeler son derece benzerdir. Otofajinin moleküler mekanizması, birkaç korunmuş ve ATG (autophagy-related) olarak isimlendirilen proteinler sayesinde gerçekleşir. Çok sayıda maya ATG proteinlerinin insanda homoloğu mevcuttur ve bu proteinlerin diğer proteinler ile olan etkileşimleri ve membranları genellikle benzer veya aynı özellikleri taşır. Ancak bu mekanizma insanda daha karmaşık olmakla birlikte, mayada anlatımı yapılmayan ekstra ATG proteinleri içerir. Bu karmaşıklık insan ATG proteinlerinin otofaji ile ilgili işlevleri yerine getirmesini sağlarken, bağışıklık sisteminde çeşitli görevleri üstlenmesi gibi, temel otofaji süreci dışında olan görevleri de gerçekleştirmesini sağlar (Kaufmann ve diğ., 2014) .

30'dan fazla ATG geni mayada keşfedildikten sonra, bunların ökaryotlarda korunmuş olduğu düşünülmüştür. Ancak önceki çalışmalar otofajinin, parazit için otofajinin adaptif yaşam döngülerinin olası bir sonucu olarak çeşitlendiğini göstermektedir (Cervantes ve diğ., 2014). Şekil 1'de *Plasmodium* türlerinde otofaji ve ilişkili yollar şematize edilmiştir (Yang ve Klionsky, 2009).



Şekil 2.1: Otofaji ve ilişkili yolların *Plasmodium* türlerinde şematik gösterimi ve her süreçte rol alan genlerin listesi (Yang ve Klionsky, 2009).

Otofajinin en temel uyarıcısı besin açlığıdır. Böylelikle herhangi bir temel besin eksikliği otofajiyi tetikleyebilir. Örneğin mayada, nitrojen eksikliği otofaji için en güçlü uyarıcıdır ancak oksotrofik aminoasitler, karbon, nükleik asitler ve hatta sülfat gibi diğer temel moleküllerin eksikliği de daha az şiddetle de olsa otofajiyi tetikleyebilir (Takeshige ve diğ., 1992). Otofajinin parazit gelişiminde, ATG genleri farklılaşmış veya kaybolmuş olsa bile, kritik bir rol oynadığı görülmektedir. Örneğin kemirgen sıtma paraziti *Plasmodium berghei*'de sporozoitin hepatositlerde merozoitlere metamorfozu sırasında gereksiz organelleri uzaklaştırmak için otofaji gereklidir (Cervantes ve diğ., 2014). Memelilerde ise otofajinin düzenlenmesi oldukça karmaşık bir süreçtir. Toplam aminoasitlerin tükenmesi birçok hücre tipinde güçlü bir şekilde otofajiyi tetiklerken, bireysel aminoasitlerin etkileri daha farklıdır. Örneğin Leu, Tyr, Phe, Gln, His, Trp, Met ve Ala gibi aminoasitler *ex vivo* perfüz durumunda karaciğerde otofaji mekanizmasını baskırlar. Bu tür farklılıklar hücre tipine bağlı olarak değişir. Çünkü aminoasit metabolizması dokular arasında büyük farklılıklar gösterir. Buna örnek olarak lösin aminoasitinin sadece iskelet ve kalp üzerinde etkisi olması verilebilir (Mortimore ve Poso, 1987).

Besin açlığı gibi çeşitli uyarılar sonucunda tetiklenen otofaji süreci öncelikle iki protein kompleksinin etkileşime girerek fagofor oluşturmasıyla başlar. Bu iki protein kompleksi; Vps34 (Sınıf III PI3K), Beclin1 (mayada ATG6), ATG14 ve Vps15(p150) içeren bir Vps34 ve otofagozom oluşumunun önemli bir düzenleyicisi olan serin\treonin kinaz ULK1'i (mayada ATG1) içeren bir ULK1 kompleksidir (Glick ve diğ., 2010).

2.2.2.1. Fagofor uzaması ve otofagozom oluşumu

Fagoforun uzaması, otofaji mekanizması için karakteristik bir yapı olan çift membranlı otofagozomun oluşmasını sağlar. Bu oluşum, her ikisi de ATG 7 tarafından katalize edilen iki ubiquitin benzeri konjugasyon mekanizması ile gerçekleşir (Kaur ve Debnath, 2015).

Birinci ubiquitin benzeri sistem, daha sonraki adımlarda ATG16L ile multimerik bir kompleks oluşturan ATG5-ATG12'nin konjugasyonunu sağlar. ATG5-ATG12-ATG16L kompleksi, fagoforun uzayan dış zarı ile birleşir (Glick ve diğ., 2010).

İkinci ubiquitin benzeri sistem; maya ATG8'in memelideki homologu tarafından kodlanan LC3'ün işlenmesiyle meydana gelir. Otofaji indüksiyonundan sonra, LC3B, LC3-I'i oluşturmak üzere ATG4 tarafından proteolitik olarak bölünür. LC3-I, ATG7 tarafından aktive edilir ve daha sonra işlenmiş LC3-II'yi oluşturmak için membrandaki fosfadiletanolamin (PE) ile konjuge edilir.

İşlenmiş LC3-II, büyüyen fagofora alınır ve entegrasyon ATG5-ATG12 aktivasyonu ile sağlanır. ATG5-ATG12- ATG16L'den farklı olarak, LC3-II otofajik zarın genişlemesi ve tamamlanması için gerekli olan otofagozomun hem iç hem dış membranlarında bulunur. Otofagosomal membranın tamamlanıp kapanmasından sonra, ATG5-ATG12-ATG16 kompleksi vezikülden ayrılır ancak LC3-II'nin bir kısmı membrana kovalent olarak bağlı kalmaya devam eder. Bundan dolayı, LC3-II, hücrelerdeki otofaji seviyesini takip etmek ve belirlemek için bir işaretleyici olarak kullanılabilir. Mitokondri, Golgi kompleksi ve endoplazmik retikulum gibi çeşitli organellerin otofagozomal membranın kaynağı olabileceği varsayılmaktadır (Wei ve diğ., 2018). Otofagozom oluşumu tamamlandıktan sonra, dış zara bağlı olan LC3-II, ATG 4 tarafından fosfadiletanolamin'den (PE) ayrılır ve sitosole geri bırakılır. Otofagozom ve lizozom arasındaki füzyonun, lizozomal membran proteini LAMP-1 ve küçük GTPaz Rab7'yi gerektirdiği düşünülmektedir. Gerçekleşen füzyondan sonra, bir dizi asit hidrolaz, paketlenmiş sitoplazmik kargonun bozulmasında rol sahibidir. Bu bozulmadan

kaynaklanan mikro moleküller, özellikle aminoasitler, protein sentezi ve açlık koşulları altında hücrel fonksiyonların sürdürülmesi için sitozole geri gönderilir. ATG22'nin diğer vakuolar permeazlar (Avt3 ve Avt4) ile maya otofajisi sırasında vakuolar aminoasitlerin akışları olarak tanımlanması, besin geri dönüşüm mekanizmalarının anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Bu permeazlar bozunma ve geri dönüşüm sürecinin son adımıdır (Yang ve diğ., 2006).

Memeli hücrelerinde tanımlanmış üç tip otofaji mekanizması vardır. Makrootofaji; temel otofaji tipidir. Sitoplazmik yükün lizozoma, otofagozom ve otolizozom oluşturmak üzere lizozomla birleşen bir ara çift zara bağlı vezikül yoluyla iletilmesi yolu olarak tanımlanır. Mikrootofaji; lizozomal membranın invajinasyonu yoluyla sitoplazmik yükün lizozoma doğrudan iletilmesi olarak tanımlanır. Mikrootofaji, organel boyutu, membran homeostazısı ve nitrojen kısıtlaması altında hücre canlılığının korunmasında önemli bir mekanizmadır (Li ve diğ., 2012). Şaperon aracılı otofaji; uzun süreli besin yoksunluğu koşulları altında sitozolik proteinlerin %30'unun bozulmasından sorumlu olan lizozomal bir proteoliz yoludur. Sitozol ve lizozomal lümendeki moleküler şaperonlar bu proteolitik yolu uyarır (Dice, 2007).

2.2.3. Apoptoz

Programlı hücre ölüm yolağı ya da apoptoz genellikle hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler sonucu aktifleşen ve enerji bağımlı biyokimyasal bir süreç olarak tanımlanır. Apoptoz, normal seyreden hücre döngüsü, immün sistemin düzgün çalışması ve sürdürülebilmesi, hormonlara bağlı atrofi, embriyonik gelişim gibi çeşitli süreçlerin hayati bir basamağı olarak kabul edilir. Apoptozu tetikleyen hem fiziksel hem de patolojik çok çeşitli uyarıcı ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücreler aynı uyarıcıya yanıt olarak mutlak ölüm yanıtı vermemektedir. Örneğin radyoterapi veya kemoterapi için kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarına neden olur ve bu durumda p53'e bağlı bir yoldan apoptotik ölüme yol açar. Diğer yandan kortikosteroidler gibi hormonlar, bazı hücrelerde (örneğin timositler) apoptotik ölüme yol açarken diğer hücreler bundan etkilenmez hatta uyarılırlar (Elmore, 2007).

Apoptoz, kademeli olarak birbirlerini aktive eden kaspaz olarak adlandırılan proteaz enzim grubu tarafından gerçekleştirilir (Wilson ve diğ., 1994). Kaspaz gen ailesi temel olarak üç gruba ayrılmıştır. Grup 1; Kaspaz 1, 4, 5 ve 11 genlerini içerir. Bu genler inflamasyonun düzenlenmesinden sorumlu enzimlerden oluşur (Galluzzi ve diğ., 2016). Kaspaz substrat tanıma dizilerinden biri olan P4 pozisyonunda büyük bir aromatik halka veya hidrofobik kalıntı

tercih ederler. Grup 2’de kaspaz 2,3, 6 ve 7 genleri bulunur. Bu genler klasik olarak apoptozun öncüleri olarak tanımlanırlar. Son olarak grup 3’te kaspaz 8, 9 ve 10 genleri vardır. Bu genlerde apoptoz başlatıcı genlerdir. Ancak P4 konumunda lösin veya valine sahip substratları tercih ederler (Julien ve Wells, 2017).

Kaspaz 1 temel olarak doğal bağışıklıktan, proteaz pro-inflamatuar sitokinler proIL-1 β ve proIL-18 aktivitesinden ve bazı önemli inflammatuar hastalıkların mekanizmasından sorumludur. Kaspaz 1 dokularda zimogen (bir molekülün aktif olmayan formu) şeklinde üretilir ve depolanır (Molla ve diğ., 2020). Kaspaz 1’in kendisi, çeşitli eksojen ve endojen stres faktörlerine yanıt olarak bir araya gelen farklı inflammatuar komplekslerde aktive edilir (Sollberger ve diğ., 2014). Kaspaz 1 tarafından aktive edilen inflammatuar sitokin, komşu hücrelerde inflammatuar yanıtı daha da indüklemek için hücreden atılır (Xia ve diğ., 2021).

Kaspaz 2, memeli kaspaz ailesinin evrimsel olarak en çok korunan üyesidir. Tümör baskılanması, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve DNA onarılması dahil olmak üzere hem apoptotik hem de apoptotik olmayan sinyal yollarında rol alır. Sayısız sinyal molekülü, apoptotik hücre ölümünden farklı olarak çoklu hücresel süreçlere aracılık etmek için kaspaz 2 ile regülasyon halindedir (Vigneswara ve Ahmed, 2020).

Apoptoz aktivasyonunda iki ana yol, içsel ve dışsal yollardır. Dışsal yol, ligandların hücre yüzey reseptörlerine bağlanmasıyla aktive edilir. İçsel veya mitokondriyal yolak, tipik olarak DNA hasarına veya hücresel hasara yanıt olarak verilir. Bu iki yolağın da işleyişi kaspaz 3’ün aktivasyonuna bağlıdır (Porter, 2006). Kaspaz 3’ün aktivasyonu ile, çekirdeğin içindeki DNA’yı parçalayan ve kromatin yoğunlaşmasını başlatan CAD endonükleazın aktivasyonu da dahil olmak üzere hücrenin ölümüne yol açan bir dizi geri dönüşümü olmayan olaylar meydana gelir (Obeng, 2021).

Klasik kaspaz ailesi genlerine sahip olmayan bitkiler, mantarlar ve parazitik protistlerde metakaspazlar olarak bilinen ayrı bir protein ailesi bulunmaktadır. Bazı çalışmalar metakaspazları apoptozla ve apoptoz benzeri ölüm yollarıyla ilişkilendirmektedir. *Plasmodium* türleri de bu aileye ait MCA1, MCA2 ve MCA3 genlerine sahiptir fakat bu genlerin işlevleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Uren ve diğ., 2000; Madeo ve diğ., 2002; Le Chat ve diğ., 2007).

2.3. İLAÇ ETKİ MEKANİZMALARI

2.3.1. Tunikamisin

Tunikamisin *Streptomyces lisosuperificus* bakterisinden elde edilen bir antibiyotik türüdür. Başlangıçta izole edilirken antiviral aktivitesi için elde edilmiş olmasına rağmen, tunikamisinin diğer hücresel sistemleri de inaktive ettiği görülmüştür. Tunikamisinin antiviral etikleri, UDP-N-asetilglukozamin ve dolikol fosfattan N-asetilglukozaminil-fosforlli dolikol sentezini katalize eden transferazı spesifik olarak inhibe ederek meydana getirdiği bilinmektedir. Bu inhibitör etki, dolikol-sakkarit ara maddesinin sentezisini azaltır, ikinci bileşik olarak glikoproteinlerin biyosentezinde çekirdek oligosakkaritin polipeptit alıcıları oluşumunda ve transferinde rol alır. Proteinlerin katlatma modifikasyonlarından biri olan N-glikosilasyonu inhibe ederek ER stresine neden olan Tunikamisin (TN) antibiyotiği ile muamele edilen yabancı ırk *S. cerevisiae*'de apoptoz benzeri hücre ölümü gerçekleşir (Hauptmann ve Lehle, 2008) . Ayrıca, *Plasmodium falciparum* ile yapılan kültüre, tunikamisin uygulandığında parazitlerin sağkalımının önemli ölçüde bozulduğu rapor edilmiştir (Udeinya ve Van Dyke, 1981).

2.3.2. 5-Flourourasil

Çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan 5-Flourourasil, bir urasil analogudur. Nükleotid metabolizmasına dahil olarak; floroüridin trifosfat (FUTP) formunda RNA, floro deoksiüridin trifosfat (FdUTP) formunda da DNA yapısına eklenerek hasara yol açar ve ayrıca floro deoksiüridin monofosfat (FdUTP) formu da timidilat sentazı (TS) inaktive ederek dolaylı yoldan hasara sebep olur. Bu hasarlar sonucunda p53 aktivasyonu ile hücre apoptoza yönelir (Longley ve diğ., 2003). Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar 5-FU'nun aynı zamanda ER stresini oluşturarak glukoz regüle protein olan GRP78 geninin (BIP1, HSP70) aktivasyonuna yol açtığını göstermektedir (Chen ve diğ., 2018). Bu yolla hücrelerde 5-FU toleransının artması ile 5-FU direnci gelişmektedir (Yao ve diğ., 2020).

2.3.3. Klorokin

Sıtma tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardan olan klorokin; hemoglobinin parçalanmasıyla ortaya çıkan hem moleküllerinin biyomineralizasyon yolu ile hemozoina dönüşmesini engelleyerek, hücre içinde hem toksisitesine neden olmaktadır (Hempelmann, 2007). Bunun dışında kanser hücrelerinde, ER stresini indüklediği ve otofaji yollarını inhibe ederek

hücrenin apoptoza yönelmesine yol açtığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Jia ve diğ., 2018, Mauthe ve diğ., 2018). Ayrıca ilaç direnci gelişmiş kanser hücrelerinde, sensitize edici etkisi sebebiyle, etkinliği araştırılmaktadır (Choi ve diğ., 2016).

2.4. SİTMA

Sıtma, tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olan *Anopheles* türü sivrisinek ısırığı ile bulaşan bir protozoon hastalığıdır. Esas olarak tropikal ve sub-tropikal bölgelere özgü olan hastalığın etkeni *Plasmodium* cinsi parazitik protozoonlardır. Sıtma tipik olarak ateş, yorgunluk, kusma ve baş ağrısı gibi semptomlara neden olur. Ağır vakalarda sarılık, nöbet, koma veya ölüme neden olabilir (Caraballo ve King, 2014).

Parazitin biyolojisinin karmaşıklığı, aşı uzmanlarının ve immünologların tamamen koruyucu bir aşı geliştirmelerindeki en büyük engeldir. Sıtma paraziti yaşam döngüsüyle ilişki karmaşıklığının büyük bir kısmı, parazitin 5000'den fazla tanımlanmış gen içeren bir genom tarafından kontrol edilen hücresel ve moleküler yapıya sahip olmasıdır. Bir kısmı ise parazitin hücre içi gelişim göstermesinden kaynaklı immün yanıtı kolayca saklanmasıdır (Aly ve diğ., 2009).

2.4.1. Sıtma Epidemiyolojisi

Dünya sağlık örgütünün yıllık sıtma raporlarına bakıldığında 2019 yılındaki vaka sayısı 227 milyon iken, 2020 yılının vaka sayısı 241 milyon olduğu görülmektedir (Chakraborty, 2016; DSÖ, 2021). Tahmini sıtma nedenli ölümlerin sayısı ise 2020 yılında 627.000 olarak kaydedilmiştir ve önceki yıla göre ölen sayısı 69.000 kişi artmıştır. Sıtma vakalarının görüldüğü ülkeler; Orta Afrika Cumhuriyeti, Kamerun, Burundi, Burkina Faso, Çad Cumhuriyeti, Demokratik Kongo Cumhuriyeti, Fildişi Sahili, Etiyopya, Gana, Gine, Kenya, Madagaskar, Malavi, Mali Cumhuriyeti, Mozambik, Ruanda, Sierra Leone, Nijerya, Togo Cumhuriyeti, Tanzanya, Zambiya ve Zimbabve'dir. Dört Afrika ülkesi dünyadaki tüm sıtma ölümlerinin yarısından biraz fazlasını oluşturmaktadır. Bu ülkeler; Nijerya (%31,9), Demokratik Kongo Cumhuriyeti (%13,2), Tanzanya Birleşik Cumhuriyeti (%4,1) ve Mozambik (%3,8)'tir. 2015'ten bu yana, Maldivler, Sri Lanka, Kırgızistan, Paraguay, Özbekistan, Arjantin, Cezayir, Çin ve El Salvador ülkeleri sıtma hastalığından temizlenmiş ilan edilmiştir (DSÖ, 2021).

Yayılımı, sivrisinek vektörünün parazit gelişimini sürdürme yeteneği üzerindeki çevresel etkiler tarafından kontrol edilir. Buna bağlı olarak enfeksiyon seviyesi yani bulaşma düzeyi, enfekte sivrisinekler ve insanlar arasındaki temas sıklığına göre belirlenir ve bu da vektör nüfusunun yoğunluğu, coğrafi konum ve beslenme alışkanlıklarından etkilenir. Bulaşma düzeyi, sıtma görülen topluluklarda hastalığa bağlı oluşan klinik tabloyu belirlemede kritik bir öneme sahiptir. Bulaş riskinin düşük ve öngörülemez olduğu bölgelerde sıtmanın değişken olduğu belirtilir. Bu koşullar altında tüm yaş grupları enfeksiyona açıktır. Enfeksiyona maruziyet arttıkça, bulaş yıldan yıla daha tutarlı hale gelir ve maruz kalan birey bağışıklık geliştirmeye başlar (Cowman ve diğ., 2016).

Türkiye’deki sıtma vakaları son yıllarda önemli ölçüde azalmıştır. İlk sıtma kontrol programı 1925’te başlatılmış olmasına rağmen 1945 yılında 2 milyondan fazla hasta sıtma tedavisi görmüştür. Bir tür böcek ilacı olan DDT (dikloro difenil trikloroetan) isimli ilacın kullanılmasıyla 1968 yılında hastalık büyük ölçüde kontrol altına alınmıştır. Kontrol programı başlamadan önce *Plasmodium falciparum* baskın tür iken 1970’lerin başından beri sadece *Plasmodium vivax* vakaları rapor edilmiştir. Daha sonra DDT’ye karşı direnç kazanan *Anofel* cinsi sivrisinekler hastalığının hızlı bir şekilde yayılmasına sebebiyet vermiştir. 1971 yılından itibaren Çukurova ve Amikova bölgelerinde sıtma vakalarının sayısı artış göstermiş 1976’da 37.320 iken 1977 yılında 115.512 olarak rapor edilmiştir. Yoğun çabalar ve önemli maliyetler ile büyük ölçekli kontrol operasyonlarının yeniden başlatılmasının ardından 1978’de bölgede sıtma vakaları azalmaya başlayarak 1979 yılında 29.324 olarak belirtilmiştir. 1990’dan 1996’ya kadar sıtma vaka sayısı kritik rakamlarda kaldı. Vaka sayıları 1994’te 84.321’e ulaştı. Durum ancak 1997’de, vaka sayıları bir önceki yıla göre yarıya indirildiğinde iyileşmeye başladı. Ülkemizde hastalığı ikincil vektör olarak kabul edilen *An. Superpictus*, *An. maculipennis* ve *An. Sulbapinus* türü sivrisinekler bulaştırabilmektedir. Bu tür sivrisinekler yalnızca *Plasmodium vivax* türü parazitinin buluşmasına neden olurlar. Sıtmanın bulaş mevsimi Mart’tan Ekim’e kadar sürer. Türkiye’de sıtma ülkenin güneydoğu kesiminde mevcuttur (DSÖ, 2021).

2.4.2. Sıtma Etkenleri

Sıtma hastalığının etkini olan *Plasmodium* türü parazitik protozoonların insanlarda hastalığa sebep olan beş ana türü bulunmaktadır. Bunlar; *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. knowlesi* ve *P. malariae*’dir.

P. falciparum, morbidite ve mortalite yönünden en ağır sıtma tablosunu oluşturan sıtma türüdür. *P.falciparum* her olgunluktaki eritrosite girebilme yeteneği ile %5-%60 arasında değişebilen parazitemi değerlerine ulaşabilmektedir.

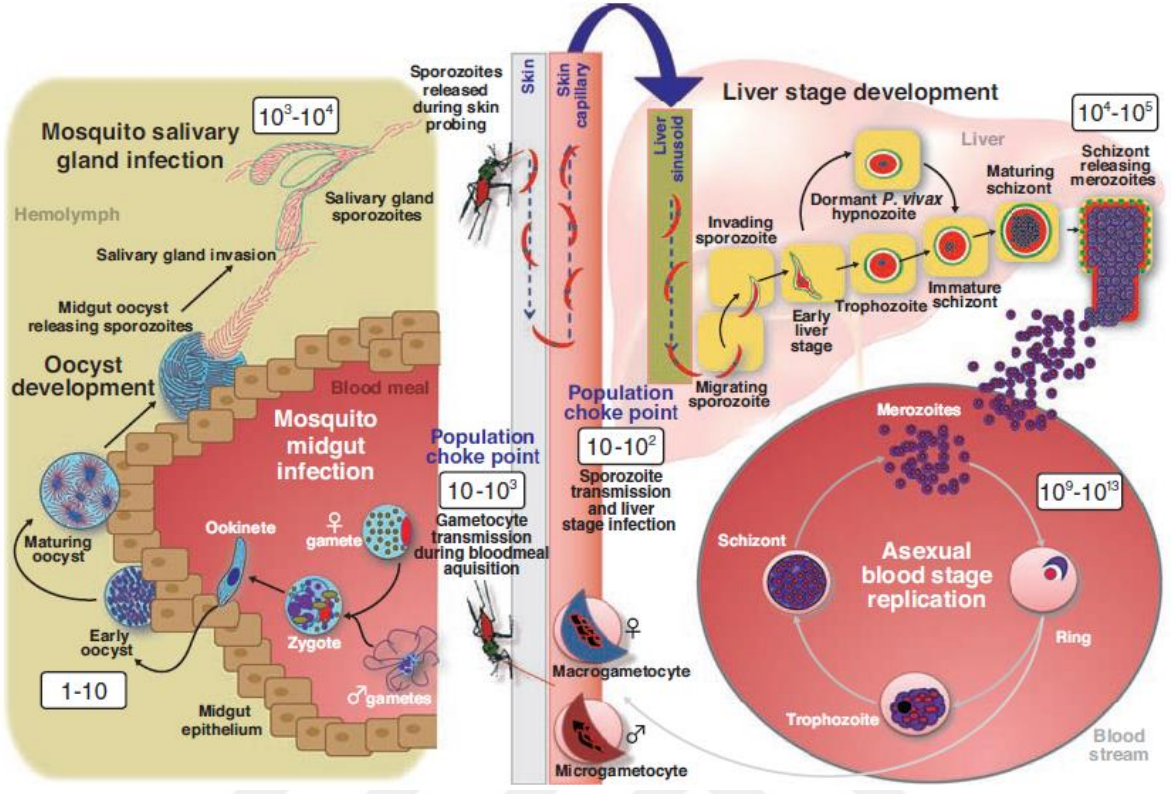
P. vivax, daha hafif morbiditeye sebep olur ve mortalitesi de düşüktür. En genç eritrositleri enfekte edebilme özelliğine sahip oldukları için, %1-3 arasında değişebilen parazitemi değerlerine ulaşabilmektedir (Çelik, 2005, Cervantes, 2013).

P. ovale, sahra altı Afrika'nın orta ve batı bölgelerinde *P. vivax*'sın yerini almış olan *Plasmodium* türüdür. *P.ovale* en genç eritrositleri enfekte edebildiği için, %2'yi aşmayan parazitemi değerlerine ulaşabilmektedir. *Plasmodium vivax* ve *P.ovale* türleri diğer türlerden farklı olarak dormant kalabilmektedir. Bu sayede uyku halinde kalarak yıllar sonra ortaya çıkabilmektedir (Markus, 2011).

P. malariae, batı ve orta Afrika'da bir miktar daha sık olmakla birlikte, tropikal bölgelerin hepsinde oldukça seyrek olarak görülmektedir. En yaşlı eritrositleri enfekte edebildiği için, parazitemi düzeyi %1'i geçmemektedir (Kwenti ve diğ., 2017). *P. knowlesi*, aslında maymun sıtması olarak bilinmesine rağmen son yıllarda insanı da enfekte edebildiği öğrenilmiştir (White, 2008). Güneydoğu asyadaki hemen hemen bütün ülkelerde vakaya rastlanmıştır (Singh ve Daneshvar, 2013).

2.4.3. Plasmodium Yaşam Döngüsü

Plasmodium türleri, memeli ve sivrisinek olmak üzere iki farklı konakta geçen karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptir. Sivrisineğin kanla beslenmesi sırasında tükürük bezlerinden deriye aktarılan hareketli sporozoit formundaki parazitler, kısa bir süre içerisinde kılcal damarlara ulaşarak kan yolu ile karaciğere ulaşırlar. Karaciğer sinüzoidlerinden geçerek hepatositleri enfekte ederler. Karaciğer aşaması ya da eritrosit öncesi aşama denilen bu aşamada hastalık asemptomatiktir. Hepatosit hücrelerine girerken, hücre membranından vakuol oluşturarak, kendilerini hücre sitoplazmasından koruyan bir yapı oluştururlar. Bu yapıya parazitofor vakuol adı verilir. Bu yapı sayesinde parazitler, hücre içi sinyal yollarına müdahale ederek hücrenin kontrolünü ele geçirir ve immün sistem aktivasyonunu engellerler. Karaciğer aşamalarında parazitler çok sayıda mitoz geçirerek on binlerce merozoit oluşturur.

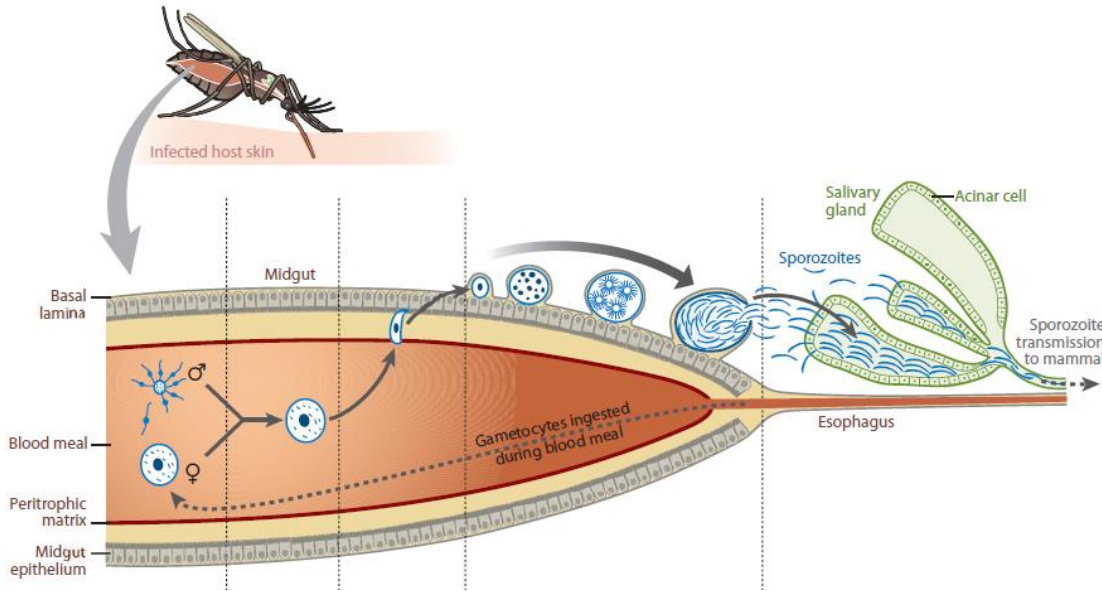


Şekil 2.2: *Plasmodium* türlerinin sivrisinek ve memeli konak arasındaki yaşam döngüsü (Kappe ve diğ., 2010).

Bu aşamadan sonra hepatosit membranından oluşan paketçikler halinde karaciğeri terk ederek, ana kan dolaşımına karışırlar ve semptomatik kan aşamalarını başlatırlar. Merozoitler eritrositleri enfekte ederek eşeysiz üreme döngüsünü başlatırlar. Bu döngüde merozoitler eritrosit içerisine girerek ilk aşama olan yüzük evresini oluşturur. Eritrosit içerisinde gelişen merozoit, trofozoit olarak adlandırılır. Trofozoitler karyokinez ile şizont formlarını oluştururlar. Şizontlar sitokinez ile bölünerek yeni merozoitleri oluştururlar. Bu aşamada merozoitler eritrositleri patlatarak tekrar kan dolaşımına karışır ve yeni eritrositleri enfekte ederler. Bu şekilde kandaki parazitemi seviyesi giderek artmaktadır. Bazı merozoitler bu eşeysiz üreme döngüsünden ayrılarak, yeni enfekte ettikleri eritrositler içerisinde gametosit formuna dönüşürler. Makrogametosit ve mikrogametositler, kanda yeni bir sivrisinek tarafından alınana kadar dolaşımda kalırlar (Şekil 2.1).

Gametositlerin; enfekte memeli konaktan kan ile beslenen sivrisineklerin bağırsağına geçmesi ile sivrisinek aşamaları başlar. Gametositler burada aktifleşerek gametlere dönüşürler. Sayıca az olan mikrogametositler yaklaşık on dakika içerisinde üç defa mitoz bölünme geçirerek mikrogametleri oluşturur. Mikrogametler hareket edebilmek ve makrogametlere tutunabilmek

için flagella yapıları oluşturur. Bu işleme eksflagellasyon denir. Mikrogamet ve makrogamet in birleşmesiyle oluşan hareketsiz diploit zigot formu yaklaşık 20 saat içerisinde hareketli ookinet formuna dönüşürken aynı zamanda mayoz geçirerek eşeyli üremeyi tamamlar. Ookinet formu bağırsak epiteli ile basal lamina arasına yerleşerek, hareketsiz oosist formuna dönüşür. Oosist hücresi birkaç gün içerisinde binlerce sporozoit hücresi üretir. Sayıca çoğalan sporozoit hücreleri oosist hücresinden çıkarak sivrisinek hemolenf boşluğu içerisine dağılır ve göç ederek tükürük bezlerini istila ederler (Şekil 2.2). Bu aşamadan sonra sporozoitler, sivrisineğin bir sonraki beslenmesi ile tekrar memeli konağa aktarılmayı beklerler (Aly ve diğ., 2009, Kappe ve diğ., 2010, Mlambo ve diğ., 2012, Chora Â ve diğ., 2022).



Şekil 2.3: Sıtma parazitinin sivrisinek aşamaları ve eşeyli üreme süreçlerinin detaylı gösterimi (Aly ve diğ., 2009).

2.4.4. Sıtma Vektörleri

Sivrisinekler, insanda meydana gelen birçok hastalığın çok etkili taşıyıcı vektörleridir ve günümüzde hala morbidite ve mortalite açısından en yıkıcı hastalıkların yayılmasından sorumlulardır. Sıtma parazitlerinin bulaşması dişi *Anopheles* sivrisineklerinin varlığına bağlıdır. Hastalık yayılımında etkili olan ana iki tür *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus*'dur (Loonen ve diğ., 2020). Sivrisineklerin; yumurta, larva, pupa, sivrisinek olmak üzere 4 farklı yaşam evresi vardır. Yumurta, larva ve pupa evreleri suculdur. Dişi *Anopheles*

sivrisineği kanla beslendikten sonra yumurtalarını suya bırakır. Genellikle bırakılan yumurtaların olgun sivrisinek oluşturma oranı %1 ila %10 arasında değişmektedir (Beck-Johnson ve diğ., 2013).

2.4.5. Kemirgen Sıtma Modeli

Kemirgenlerin insan hastalıklarını incelemek için model organizmalar olarak kullanılması, türler arasındaki genetik ve fizyolojik benzerliklere dayanmaktadır. Sıtma araştırmalarında kemirgen modelleri, enfeksiyonun karaciğer ve kan evrelerinden kaynaklanan semptomları ve hastalığın bulaş yolu çalışmalarında önemli bir modeldir (De Niz ve Heussler, 2018).

In vivo sıtma araştırmalarında yaygın olarak kemirgen sıtma parazitleri olan *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium yoelii* ve *Plasmodium vinckei* kullanılır. Kemirgen sıtma modellerinin avantajları, çok sayıda parazit mutantının üretilmesini kolaylaştırmasıdır (de Koning-Ward ve diğ., 2015). Hızlı ilaç direnç geliştirebilme yeteneği sebebiyle, yeni ilaç hedefleri bulunması çalışmalarında kemirgen sıtma paraziti *Plasmodium berghei* türü güvenli bir *in vivo* sıtma modeli olarak kullanılmaktadır (Maslachah ve diğ., 2017)

2.5. GERÇEK ZAMANLI POLİZMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, amplifikasyon ve saptamayı tek adımda birleştiren bir veri toplama tekniğidir. Bu teknikte *Thermus aquaticus*'tan izole edilen yüksek ısıya karşı dayanıklı bir enzim olan iTaq polimeraz kullanılır. Enzimin ters transkripsiyon yeteneği, mRNA dizilerinden DNA dizilerini oluşturmaya olanak sağlar (Higuchi ve diğ., 1993, Saiki ve diğ., 1988).

GZ-PZR tekniği sonucunda elde edilen verilen analiz edilmesi için farklı yöntemler mevcuttur. Bir tanesi göreceli miktar tayini yöntemidir. Bu yöntem hedef genin anlatımının, bir referans gene göre değişiminin belirlenmesine dayanır. Diğer bir yöntem ise kesin miktar tayinidir. Reaksiyonun başlangıcındaki kopya sayısının belirlenmesi için kullanılır (Livak ve Schmittgen, 2001).

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tekniğinde toplam ürün miktar tayini, floresan ışığa veren probalar veya SYBR Green I gibi direkt PZR ürünlerine bağlanabilen floresan boyalar ile sağlanır (Ponchel ve diğ., 2003, Holland ve diğ., 1991).

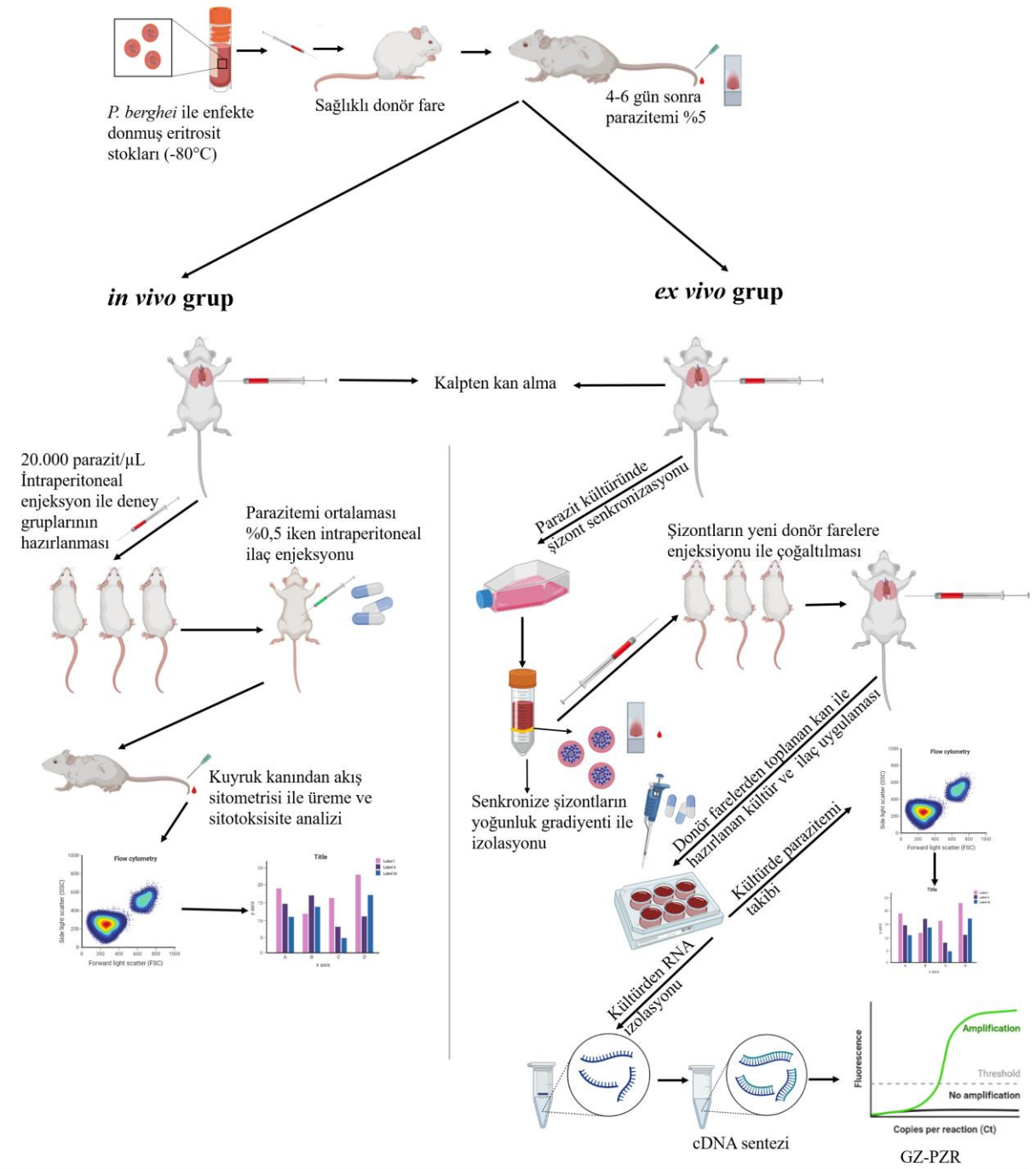
Reaksiyonlar amplifikasyonun ilk olarak tespit edildiği döngü veya zaman noktasından itibaren tanımlanmaya başlar. Bu değeri genellikle, floresan yoğunluğunun arka plan floresansından daha büyük olduğu zaman olan döngü eşiğı (Ct) olarak isimlendirilir. Sonuç olarak, başlangıç materyalindeki hedef DNA miktarı ne kadar fazlaysa, floresan sinyalde o kadar hızlı şekilde önemli bir artış görülecek ve daha düşük bir Ct elde edilecektir (Heid ve diğ., 1996).

Bu tez çalışmasında hedeflenen genlerin anlatım seviyelerinde olan değışiklikleri saptamak için GZ-PCR tekniğı kullanılmıştır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

Çalışma kapsamında 24'ü kan donörü, 20'si deney ve kontrol grupları olmak üzere toplam 44 fare kullanılmıştır. Bu deney hayvanlarının kullanımı ile ilgili etik kurul onayı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 28.12.2020 tarihli toplantısında onaylanmış 2020/235 numaralı karar yazısı ile tarafımıza bildirilmiştir. Çalışma *in vivo* ve *ex vivo* olmak üzere iki ayrı grupta yapılmıştır. *In vivo* grupta enfekte fare kanındaki parazitlerin seçilen ilaçlar ile muamelesi sonucunda, ilaçların parazit üreme profillerine etkisi araştırılmıştır. *Ex vivo* grupta ise; seçilen ilaçların, hücre ölüm yolakları ile ilişkili hedef genlerin ifadeleri üzerine etkisi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.1: Deney akış şeması

3.1. ORGANİZMALAR

Bu çalışmada, yeşil floresan protein (GFP) eksprese eden *Plasmodium berghei* ANKA yabancı tip benzeri bir parazit suşu olan *Pbp230p* (-) kullanıldı. Parazitemi hesaplamaları sırasında akış sitometri analizi kullanılacağı için kolaylık sağlaması açısından bu parazit türü tercih edilmiştir. Bu parazit suşu Bezmialem Vakıf Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Dr. Ahmed Aly tarafından geliştirilmiştir. *Pbp230p* (-) suşunun biyolojik özellikleri açısından yabancı tipten farkı olmadığı önceki çalışmalarla gösterilmiştir (Hart ve diğ., 2014).

Kemirgen sıtma modelinde memeli konak olarak, *Plasmodium berghei* türü için en uygun fare ırklarından biri olan CD1 ırkı beyaz fareler kullanmıştır. CD1 türü fareler akraba olmayan farelerin çiftleşmesinden oluşan “outbred” farelerdir. Bu hayvanların dış görünüşleri aynı olsa da genetik olarak heterojen yapıdadırlar. Tüm fareler Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilmiştir.

3.1.1. Parazitlerin Üretilmesi

In vivo ve *ex vivo* deney gruplarının hazırlanabilmesi için altışar adet CD1 faresi, *Pbp230p* (-) suşu parazit ile enfekte dondurulmuş stoktan alınan 750 µL fare kanının intraperitoneal yolla enjekte edilmesiyle enfekte edildi. Bu şekilde donör fareler içerisinde parazitlerin çoğaltılması sağlandı.

3.1.2. Farelerde Parazitemi Takibi

Enfekte farelerden günlük olarak kuyruktan alınan 2 µL kan ile sürüntü preparatları hazırlandı. Bu preparatlar metanol ile 1 dakika fiks edildikten sonra %5’lik Giemsa boyası ile 15 dakika boyandıktan sonra distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Bu preparatlar ışık mikroskopunda 1000X mercek ile immersiyon yağı kullanılarak görüntülendi. 30 alanda sayılan tüm eritrositlerin enfekte eritrositlere oranı “%” cinsinden hesaplanarak enfekte farelerdeki parazitemi oranı belirlendi. Bu işlem çalışma sürecindeki tüm donör farelere günlük olarak uygulandı.

3.2. BESİYERLERİ VE SOLÜSYONLAR

3.2.1. Parazit Kültür Besiyeri

Parazit ile enfekte eritrositler ile kültür oluşturulabilmesi için fetal bovin serum (“FBS”) ve gentamisin içeren RPMI 1640 besiyeri Tablo 3.1’de gösterilen miktarlarla karıştırılarak hazırlanmıştır.

Tablo 3.1: Parazit kültür besiyeri içeriği.

Malzeme	Hacim
RPMI 1640 (Gibco, ABD)	141.25 mL
FBS	35 mL
Gentamisin (50 mg/ml)	50 µL
Toplam	175 mL

3.2.2. Yoğunluk Gradiyenti Solüsyonu

Enfekte eritrositlerin, enfekte olmayanlardan ayrılması için Accudenz solüsyonu ile yoğunluk gradiyenti oluşturuldu. 27.6 gr Accudenz tozu, 5 mM Tris-HCl (pH: 7,5), 3 mM KCl, 0,3 mM EDTA ile birleştirilerek 100 mL distile su içerisinde çözdürüldü. 0.22 µm porlu enjektör filtresi ile filtre edilip otoklavlandı.

3.3. DENEY GRUPLARI

3.3.1. *In vivo* Deney Grupları

In vivo deney gruplarını oluşturmak için donör enjeksiyonu sonrasında ikinci günden itibaren enfekte farelerin kuyruğundan kan alınarak kan sürüntü preperatı (smear) hazırlandı. Parazitemi değeri %5 olduğunda, kalpten kan toplama yöntemi ile tüm kan toplandı.

Toplanan kandan; 450 µL RPMI 1640 ile 50 µL kan olacak şekilde 10-5 değerine kadar seri sulandırma yapıldı. Hemositometre ile kan hücreleri sayıldı. 200 µL RPMI içerisinde 20.000 parazit hücresi olacak şekilde parazit enjeksiyon dozları hazırlandı. Bu dozlar ilaçların

uygulanacağı fare gruplarını oluşturmak için toplamda 20 fareye intravenöz yolla enjekte edildi. Enjeksiyonun ikinci gününden itibaren her fare için parazitemi değeri akış sitometrisi yöntemi ile kontrol edildi. Bunun için 2 µL kuyruk kanı, heparin içeren 300 µL PBS çözeltisi ile dilüe edilerek BioRad S3e cihazında analiz edildi.

Tablo 3.2: *In vivo* deney grupları ve uygulanan günlük ilaç dozları.

İlaç Grupları	Doz (mg/kg/gün)	Fare Sayısı
Tunikamisin 1	2	4
Tunikamisin 2	4	4
5-FU (+Poly.I-Poly.C*)	5 (+0,6*)	4
CQ	3	4
DMSO (Kontrol)	-	4

* 5-Fluorourasil'in oluşturduğu toksisiteyi ortadan kaldırmak için antagonistik etki olarak interferon indükleyici bir madde olan Poliinosinik; polisitidilik asit kullanılmaktadır (Stolfi ve diğ., 1983).

Farelerin parazitemi değerleri yaklaşık %0,5 olduğunda kontrol ve ilaç grupları oluşturularak, Tablo 3.2'de belirtilen dozajlarda beş gün boyunca günde bir kez intraperitoneal yolla uygulandı. Parazitemi değerleri akış sitometrisi ile günlük olarak takip edildi ve beşinci günün sonunda deney sonlandırılarak, ilaçların parazit sağkalımına etkisi üreme eğrisi çizilerek değerlendirildi.

3.3.2. *Ex vivo* Deney Grupları

Ex vivo deney gruplarının oluşturmak için donör enjeksiyonu sonrasında ikinci günden itibaren enfekte farelerin kuyruğundan kan alınarak kan sürüntü preperatı hazırlandı. Yaklaşık olarak %10'luk parazitemi elde edildikten sonra farelerin kanı kalpten kan alma yöntemi ile toplandı.

3.3.2.1. *Şizont Senkronizasyonu*

Toplanan kan farklı parazit evrelerinin senkronizasyonu amacıyla; parazit kültür besiyeri ile 20 mL'ye tamamlanarak iki ayrı 50 mL santirüj tüpüne bölündü ve 8 dakika boyunca 1500 rpm'de hızlanma değeri 0, yavaşlama değeri 4 olacak şekilde santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı. Pelet 150 mL besiyerinde süspanse edildi ve cam erlenmeyere gece boyu kültür edilmek üzere transfer edildi. Kültür %5 CO₂ %5 O₂, %90 N₂ koşullarında, 37 °C'de ve 40 rpm'de 12 saat

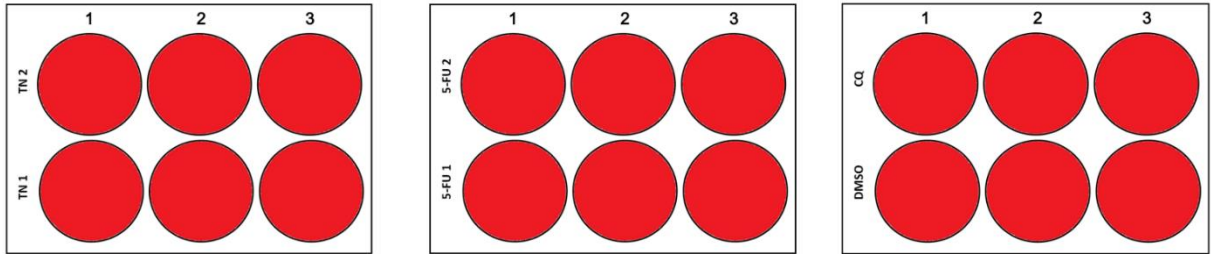
boyunca inkübe edildi. Parazit kültürünün senkronizasyonu Giemsa ile boyanmış ince kan sürüntüsü yöntemi ile kontrol edildi.

3.3.2.2. Olgun Şizontların Saflaştırılması

Parazit kültürü 4 adet 50 mL'lik santrifüj tüpüne 35'er mL olacak şekilde dağıtıldı. Serolojik pipet yardımıyla, tüplerin tabanından 10 mL Accudenz solüsyonu yavaşça eklenerek faz farkı oluşturuldu. Tüpler 20 dakika boyunca 200 g'de hızlanma değeri 0, yavaşlama değeri 3 olacak şekilde santrifüj edildi. Bu işlemler sonunda faz farkı oluşturuldu. Böylelikle enfekte eritrositlerin ortada bir kahverengi halka şeklinde ayrılması sağlandı. Ortada biriken enfekte eritrositler dikkatlice Pastör pipeti ile toplanıp yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Toplanan enfekte hücrelerin hacmi santrifüj tüpü içerisinde besiyeri ile 30 mL'ye tamamlandı. 10 dakika boyunca aynı şekilde santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet 2 mL besiyeri ile süspanse edilerek çoğaltmak amacıyla 12 adet fareye intravenöz yolla enjekte edildi.

3.3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Donör farelerden toplanan senkronize parazitler ile enfekte kan, kalpten kan alma yöntemi ile toplandıktan sonra besiyeri ile 20 mL'ye tamamlanarak iki ayrı 50 mL santrifüj tüpüne bölündü ve 8 dakika boyunca 1500 rpm'de hızlanma değeri 0, yavaşlama değeri 4 olacak şekilde santrifüj edildi. Pellet 180 mL parazit kültürü ile süspanse edildi ve 3 adet 6 kuyulu plağa, 9 mL dağıtılarak Şekil 3.2'de gösterildiği şekilde deney grupları hazırlandı.



Şekil 3.2: Ex vivo deney düzeneği şeması.

Hazırlanan gruplara Tablo 3.3’de gösterilen ilaçlar uygulandıktan sonra; 0., 2,5., 7,5., 12,5., 17,5. ve 20. saatlerde üreme grafiği için akış sitometrisinde ölçülmek üzere ve ayrıca 0., 5., 10., 15. ve 20. saatlerde GZ-PZR ile gen ifadesi değişikliklerinin analizi için örnekler toplandı.

Tablo 3.3: *Ex vivo* deney grupları ve uygulanan ilaç dozları.

İlaç Grupları	Doz (µg/mL)	Kültür Hacmi(mL)
Tunikamisin 1	2,5	9
Tunikamisin 2	5	9
5-FU 1	1,3	9
5-FU 2	2,6	9
CQ	0,25	9
DMSO (Kontrol)	-	9

3.4. GEN EKSPRESYONU ANALİZLERİ

3.4.1. RNA İzolasyonu

Ex vivo parazit kültürünün belli saatlerinde toplanan hücre örneklerinden 5. , 10. ve 20. saatlerde toplanan hücreler ile çalışmaya devam edildi. Toplanan hücreler 5 dakika 300 g’de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet soğuk PBS içinde süspanse edilerek 300 g’de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler TRIZOL kullanılarak pipetaj yoluyla parçalandı. $5 - 10 \times 10^6$ hücre hacmi için 1 mL TRIZOL kullanıldı. Homojenize edilmiş örnek 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Örnek santrifüjlenerek supernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktırıldı. Örneklerin üzerine her 1 mL TRIZOL için 0,2 mL kloroform eklendi. 15 saniye vorteks ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 2–3 dakika inkübe edildi. Maksimum 12,000 g’de, 2–8 °C’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün devamında altta kırmızı faz, fenol-kloroform faz, ara faz ve en üstte sulu renksiz faz olarak ayırım gerçekleşti. Renksiz sulu faz, ara fazı bozmayacak şekilde dikkatlice alınarak yeni bir tüpe aktarıldı ve hacmi belirlendi. RNA, sulu faz ile izopropanol karıştırılarak çöktürüldü. Kullanılan 1 mL TRIZOL için 0,5 mL izopropanol eklendi. Örnek, oda ısısında 10 dakika inkübe edildi ve 12,000 g’den fazla olmayacak şekilde 4°C’de 10 dakika

santrifüj edildi. RNA çökeltisi tüpün yanında ve altında jel benzeri bir yapıda pelet oluşturdu. Süpernatant komple uzaklaştırıldı. 1 mL TRİZOL için 1 mL %75'lik ethanol ile pelet yıkandı. Örnek vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 7,500 g'den fazla olmayacak şekilde 2-8 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi ve kalan ethanol tamamen uzaklaştırıldı. Pelet 40 µL saf su ile çözündürüldü ve örneklerin konsantrasyonu spektrofotometre ("Nanodrop 8000 Thermo, ABD") ile ölçüldü. İzolasyon sonrası genomik DNA kontaminasyonun giderilmesi için RNA örneklerine DNase uygulandı. Reaksiyon tüpleri Tablo 3.4'deki gösterilen şekilde hazırlanarak 37 °C'de 40 dakika tutuldu. Sürenin sonunda tüplere 1 µL, 50 mM EDTA eklendi ve ısı bloğuna konularak 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.

Tablo 3.4: Genomik DNA kontaminasyonunun giderilmesi için DNaz enzimi uygulama reaksiyonunun bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar	Son Konsantrasyon
DNaz Tamponu 10x	1 µL	1X
DNaz	1 µL	1 U/ µL
RNA	2 µL	1 µg/mL
Saf su	6 µL (10 µL'ye tamamlandı)	-

3.4.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için ticari bir kit kullanıldı. (Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit"). Reaksiyon, üretici firmanın talimatlarına uyularak hazırlandı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5: cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar	Son Konsantrasyon
RT Tamponu (10X)	2 µL	1 X
dNTP karışımı	0,8 µL	100mM
RT Random Primers	2 µL	0.5µg/mL
Multiscribe Reverse Transkriptaz	1 µL	50 U/µL
RNA	10 µL	100ng/mL
Saf su	4,2 µL (20 µL'ye tamamlandı)	

Yukarıda verilen şartlarda hazırlanan reaksiyon, Bio Rad T100 PZR cihazında Tablo 3.6'daki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.6: cDNA sentez reaksiyonu koşulları.

	1.Adım	2.Adım	3.Adım	4.Adım
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 Dakika	120 Dakika	5 Dakika	∞

3.4.3. Primerlerin Tasarlanması

Otofaji ve apoptoz ilişki genlerin mRNA dizileri 'NCBI Nucleotide Database ve PlasmoDB'den alındı. İlgili genlere ait primerler Primer 3 programı kullanılarak tasarlandı (Tablo 3.7). Tasarlanan primerlerin sentezi ticari bir firmadan hizmet alımı olarak yapıldı.

Tablo 3.7: Hedef genlere özgü tasarlanan reaksiyon primerleri.

Gen	Primer	Dizi	GC (%)	Tm (°C)	Ürün Boyutu
ATG5	İleri	5'- CTGCATGTGAATTTTCCCAC -3'	45	49,73	277 bp
	Geri	5'- AAGGAGATTTTAATGGAATTTG -3'	27	45,52	
ATG8	İleri	5'- CCCCTTTGAAAGTAGAGTTGCAG-3'	48	55,27	82 bp
	Geri	5'- CGCTTTTTCACACACCACTGG -3'	50	51,78	
ATG12	İleri	5'- TGGAAATGAAACACTAGTATCCA -3'	35	49,93	105 bp
	Geri	5'- TCCAAATTGGGTTTAATCGTGTT -3'	35	49,93	
MCA1	İleri	5'- AAAACAGAAGGAGAAATAATTG -3'	27	45,52	74 bp
	Geri	5'- AATTTAACTCCATCTTTTAATGG -3'	26	46,36	
MCA2	İleri	5'- AATGGACCCTTGTTCCATCC -3'	50	51,78	82 bp
	Geri	5'- TTCCCCTTCATGAGCAACTC -3'	50	51,78	
MCA3	İleri	5'- CAACAATGCGCTCCAATG -3'	50	48,04	132 bp
	Geri	5'- TGCATTTGCACCAGGATG -3'	50	48,04	
BIP	İleri	5'- CCCACTACTTTTGCACCTGA-3'	50	54,12	138 bp
	Geri	5'-TAAACCAGCAATTGCACCAG-3'	45	53,33	
GFP	İleri	5'- GATACCCGGACCACATGAAG -3'	55	53,83	152 bp
	Geri	5'- GATCCTGTTGACGAGGGTGT -3'	55	53,83	

3.4.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Ele alınan genlerin farklı koşullardaki anlatım profillerindeki değişim “SYBR green” temeline dayalı GZ-PZR yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntemde ticari bir enzim (Bio Rad, “iTaq SYBR Green Master Mix” ve “Qiagen Rotor Gene qPCR” cihazı kullanıldı. Yapılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları ile ATG5, ATG8, ATG12, MCA1, MCA2, MCA3 ve normalizasyon için referans gen olarak GFP genlerinin anlatımına bakıldı.

Reaksiyon tüpleri Tablo 3.8'deki gibi hazırlandı ve reaksiyon Tablo 3.9'da gösterilen koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 3.8: GZ-PZR reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µL)	Son Konsantrasyon
iTaq SYBR Green Master (2X	10	X
İleri Primer	1	500 nM
Geri Primer	1	500 nM
cDNA	2	100 ng
Steril Saf Su	6	-
Toplam	20	

Tablo 3.9: GZ-PZR reaksiyon koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre
Başlangıç PZR		
Aktivasyonu	95°C	30 Saniye
Döngüler		
Denatürasyon	95°C	5 Saniye
Primer Bağlanması	60°C	30 saniye
Uzama	60°C	10 Saniye
Erime Eğrisi Analizi	65°C- 95°C	0,2°C aralıklarla artışta her 5 saniyede okuma

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışma üç deney tekrarı ile gerçekleştirildi. Deney ve kontrol grupları arasındaki anlatım değişimleri GraphPad Prism 9.3.1 yazılımında, tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) modülü ile karşılaştırmalı olarak yapıldı. Post-hoc analizler “Dunnet’s Test” ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. IN VIVO DENEY GRUPLARININ HAZIRLANMASI

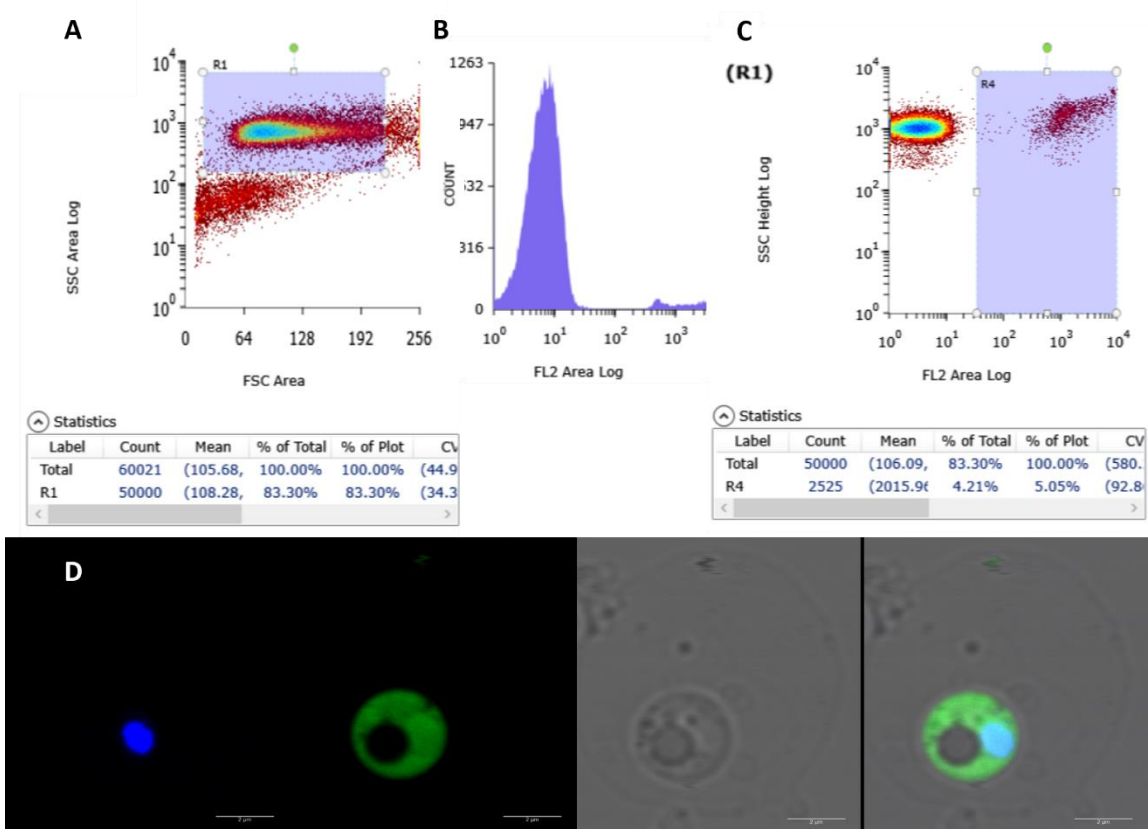
Tüm fareler aynı sayıda parazit ile enfekte edilmelerine rağmen CD1 ırkı fareler “outbred” oldukları için parazitemi gelişim hızı her bir bireyde farklılık göstermektedir. Bu sebeple deney grupları, 0. gün parazitemi değeri her grup için yaklaşık olarak ortalama %0,5 olacak şekilde oluşturulmuştur. Tüm farelerin 0. gün parazitemi değerleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: *In vivo* deney gruplarının başlangıç parazitemi değerleri.

	Fare 1	Fare 2	Fare 3	Fare 4	Ortalama
DMSO	0,02	0,87	0,63	0,14	0,45
TN 1- 2mg/Fare	0,78	0,01	0,61	0,73	0,53
TN 2- 4mg/Fare	0,55	0,75	0,01	0,71	0,50
5FU- 5 mg/Fare	0,01	0,84	0,7	0,38	0,48
CQ- 3mg/Fare	0,77	0,56	0,20	0,35	0,47

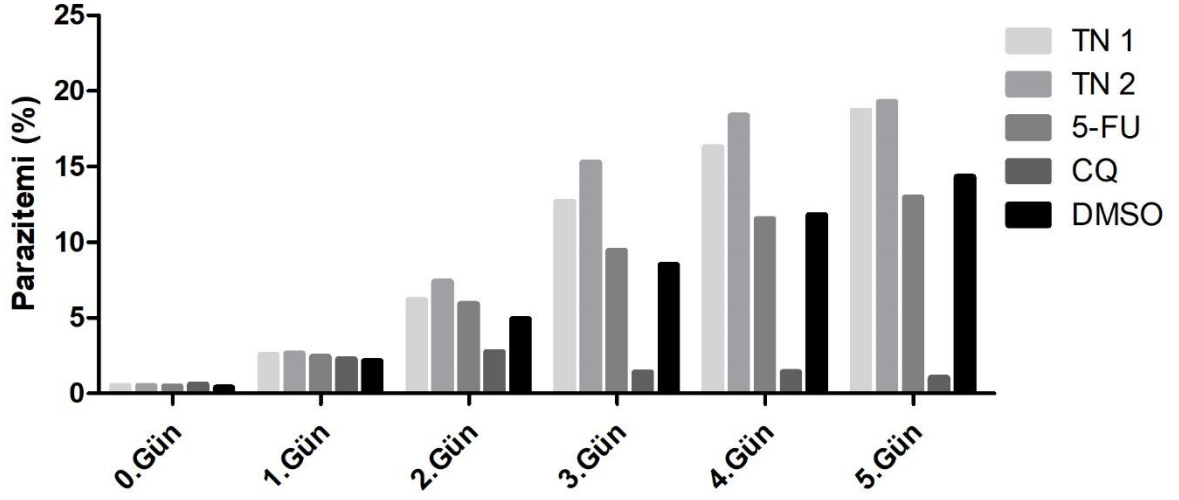
4.1.1. Parazitemi Takibi

Plasmodium berghei Pbp230p (-) suşunun, yeşil floresan protein (GFP) eksprese edebilme özelliği sayesinde ek bir boyama gerektirmeden akış sitometri analizleri yapılabilmektedir. Bu suşun, konfokal mikroskop altındaki görüntüsü ve akış sitometri analiz görüntüsü Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: *Pbp230p* (-) suşunun akış sitometrisi veri analizi ve konfokal mikroskopi görüntülemesi. Floresan protein üreten parazit hücreleri ile enfekte fare kanı 1/300 oranında sulandırıldıktan sonra akış sitometrisi cihazında analiz edilir. İleri ve yan saçılma dayalı yoğunluk alan grafiği (A) üzerinde eritrosit popülasyonunu içeren kapı “R1” alındıktan sonra floresan ışımaya yoğunluğuna bağlı histogram (B) oluşturulur. Histogramda değerlendirilen floresan yoğunluğuna bağlı olarak oluşturulan yoğunluk grafiğinde (C) ise gerçek floresan ışımaya ile otofloresan ışımaya ayrılır. Bu grafikte alınan kapı ile gerçek parazitemi değeri belirlenir. *Pbp230p* (-) suşu ile enfekte bir fare eritrositinin konfokal mikroskopi görüntüsü (D). Yüzük aşamasındaki parazitin mavi renkli nükleusu “Hoechst 33342” boyası ile boyandı. Parazitin GFP ekspresyonu özelliği sebebiyle sitoplazması yeşil renklidir. Ölçek 2 μm ’dir. Görüntü Leica TCS SP8 cihazı ile alındı.

In vivo deney gruplarına, ilaç uygulaması intraperitoneal yolla beş gün boyunca yapıldı ve parazitemi değerleri günlük olarak kuyruk kanından, akış sitometrisi yöntemi ile takip edildi. Oluşturulan üreme grafiği Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Uygulanan ilaçların çözücü ortamı olarak kullanılan DMSO’da artan paraziteminin tespiti bu çözücünün paraziteminin üremesini engellemediği anlaşılmaktadır. Bu ilaçlardan sadece pozitif kontrol olan klorokin, parazit üremesini sınırlandırmıştır. 5-fluorourasilin üreme profillerine bir etkisi gözlenmemiştir. Tunikamisin dozları arttıkça, parazit üreme miktarı da artmaktadır.

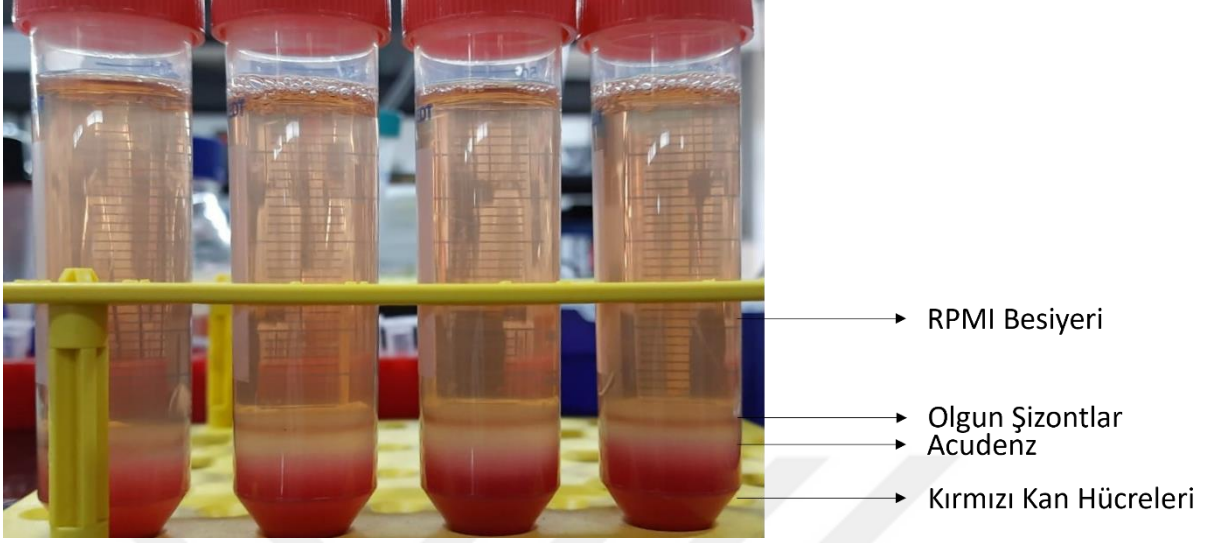


Şekil 4.2: *In vivo* deney gruplarının üreme grafiği. Parazitemi seviyeleri ortalama %0,5 olarak hazırlanan tüm gruplara ilaç başlangıç gününden (0. gün) itibaren ilgili ilaçlara uygulanarak farelerdeki parazitemi seviyeleri beş gün boyunca takip edilmiştir. (TN1: düşük doz tünikamisin 2 mg/kg/gün; TN 2: yüksek doz tünikamisin 4 mg/kg/gün; 5-FU: 5-fluorourasil 2 mg/kg/gün + Poly.I-Poly.C 0,6 mg/kg/gün; CQ: klorokin 3 mg/kg/gün; DMSO: yalnızca DMSO uygulanan kontrol grubu)

4.2. EX VİVO DENEY GRUPLARI

4.2.1. Olgun Şizontların Saflaştırılması

İlaç stresi uygulanacak olan *ex vivo* deney gruplarını hazırlamak için öncelikle Bölüm 3.3.2.1’de anlatıldığı gibi parazit kültürü hazırlandı. Gece boyu inkübe edilen parazitlerin oluşturduğu şizont formunun izolasyonu için Bölüm 3.3.2.2’de anlatıldığı gibi olgun şizont saflaştırması yapıldı. Saflaştırma sırasında faz farkı beklenen şekilde oluşmuş olup Şekil 4.3’te gösterilmiştir.

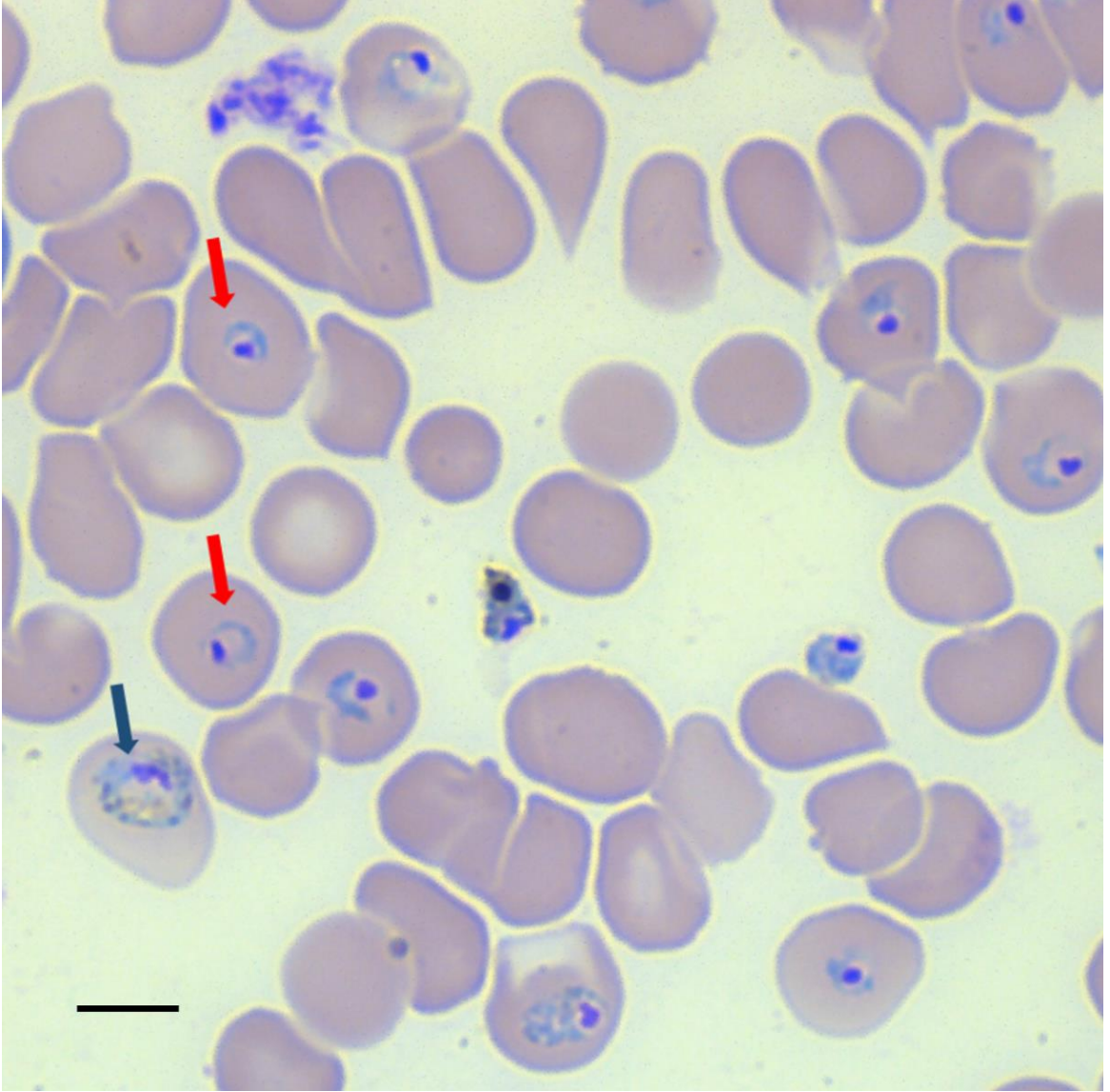


Şekil 4.3: Accudenz solüsyonu ile oluşturulan yoğunluk gradiyenti..

4.2.2. İlaç Gruplarının Hazırlanması

Ex vivo deney grupları Bölüm 3.3.2.3’de anlatıldığı gibi hazırlandı. Sıfırıncı saatte parazitemi değeri %15,07 olarak hesaplanan kültür her kuyuda 9 mL olacak şekilde kuyulara paylaştırıldı.

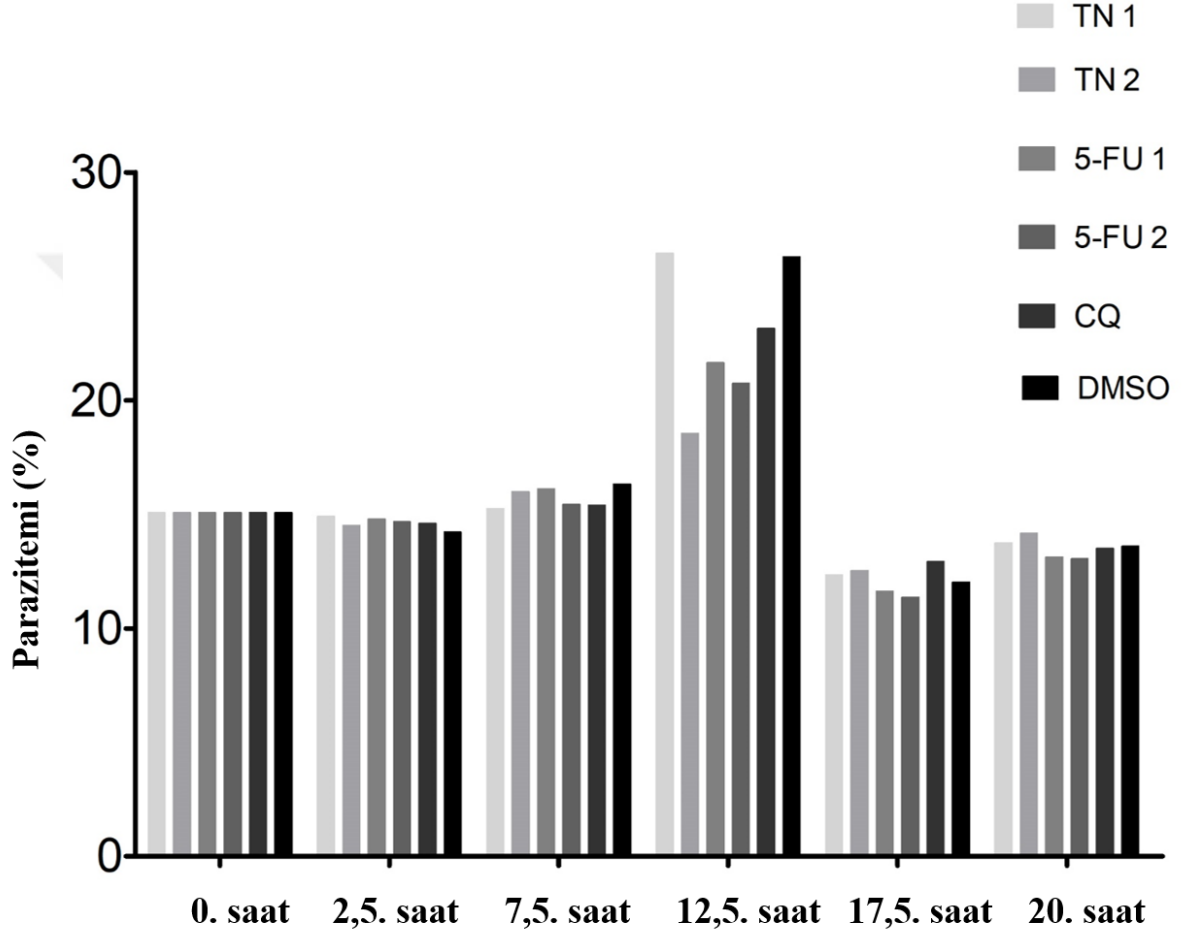
Ayrıca kültür kalitesini tayin etmek amacıyla ince kan sürüntü preperatı hazırlandı. Preperat metanol ile fikse edildikten sonra Giemsa ile boyanarak “Leica DM 2500 Led” ışık mikroskobu altında kontrol edildi. Enfekte eritrositlerin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü Şekil 4.4’te gösterildi. Parazit kültüründe yüzde yüz senkronizasyon sağlamak mümkün değildir. Ancak şekilde (Şekil 4.4) görüldüğü gibi çoğu parazit yüzük evresinde iken yakalanmış ve kültür hazırlandı.



Şekil 4.4: Enfekte eritrositlerin ışık mikroskobu ile görüntülenmesi. Kırmızı ok ile gösterilen hücreler parazitin yüzük evresi, mavi ok ile gösterilenler ise trofozoit evresidir. Ölçek 5 μ m'dir.

4.2.3. Ex vivo Kültürün Üreme Grafiği

Ex vivo parazit kültüründe, uygulanan ilaçlar 20 saat boyunca izlendi. Kültürlerden alınan örneklerin akış sitometrisi ile parazitemi ölçümü sonucu oluşturulan üreme grafiği Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Bu şekilde hücrelerin benzer profil sergilediği gözlenmektedir.

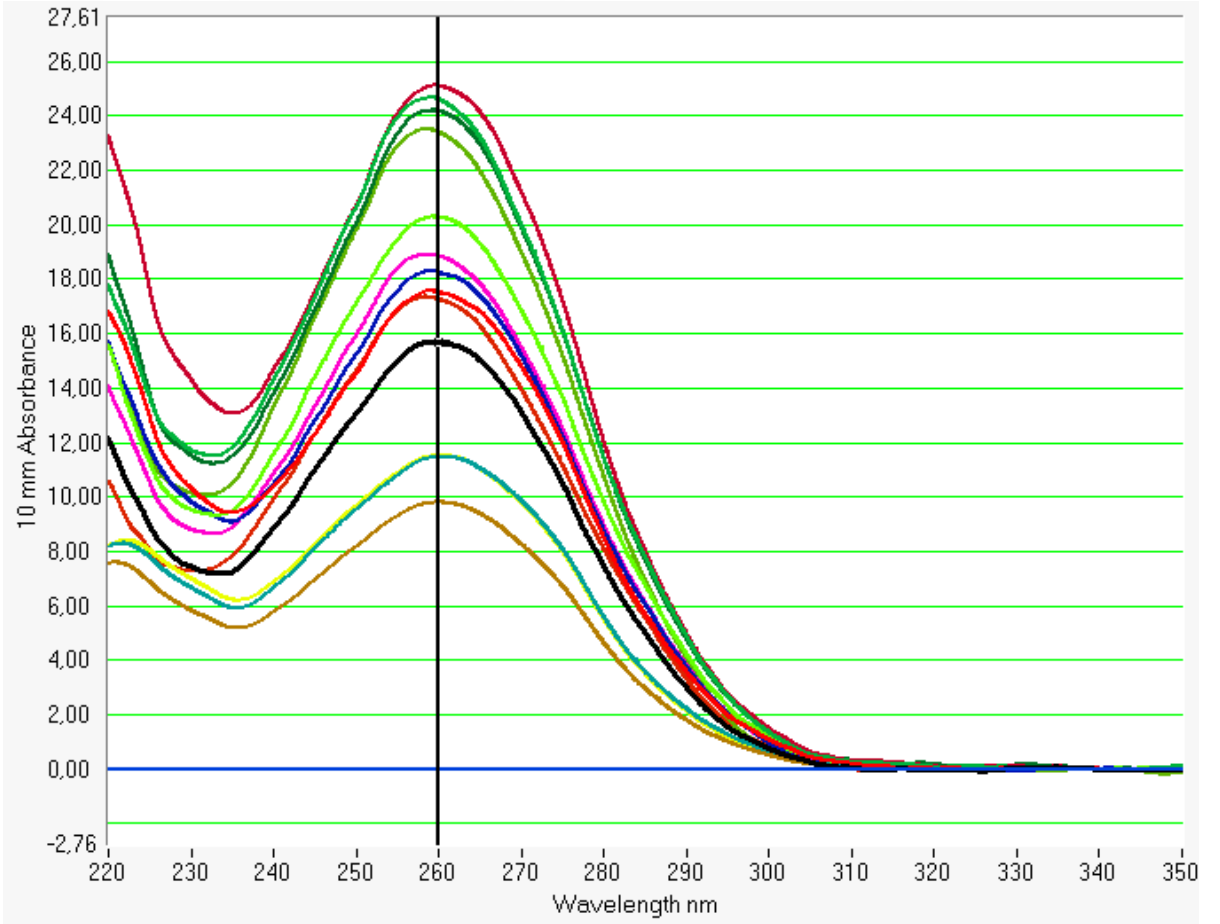


Şekil 4.5: *Ex vivo* deney gruplarının üreme grafiği. Başlangıç parazitemi seviyeleri %15,07 olarak ölçülen kültürden hazırlanan tüm gruplara ilaçlar 0. saatte tek doz uygulandı. Kültürün parazitemi değeri 20 saat boyunca takip edilmiştir. (TN1: düşük doz tunikamisin 2,5 µg/mL; TN 2: yüksek doz tunikamisin 5 µg/mL; 5-FU1: düşük doz 5-fluorourasil 1,3 µg/mL; 5-FU2: yüksek doz 5-fluorourasil 2,6 µg/mL; CQ: klorokin 0,25 µg/mL; DMSO: yalnızca DMSO uygulanan kontrol grubu).

4.3. GEN EKSPRESYONU ANALİZLERİ

4.3.1. RNA İzolasyonu

Her kültüre ilaç stresi uygulandıktan sonra Bölüm 3.5.1’de anlatıldığı gibi 10. ve 20. saatlerde RNA izolasyonu ve DNaz uygulaması gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak, ilaçların çözdürülmesinde kullanılan DMSO içeren *ex vivo* parazit kültürü kullanıldı. İzole edilen RNA’nın konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik ölçüm sonuçlarının grafikleri Şekil 4.6’da gösterildiği gibi saf olarak izole edilmiştir. Burada her bir örneğe ait 260 nm dalga boyunda tek bir pik gözlenmiştir.



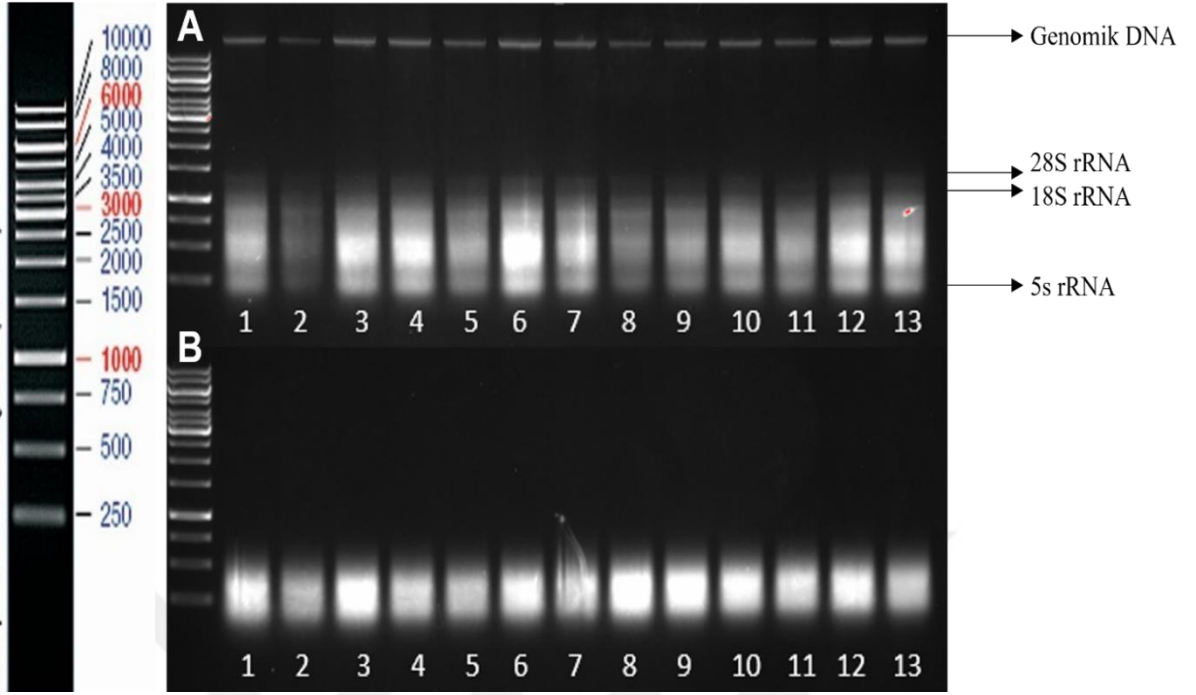
Şekil 4.6: RNA örneklerinin spektrofotometrik analizi. Örneklerin 220-350 nm arası dalga boylarındaki absorbansının ölçümü sonucu oluşturulan grafik. Nükleik asit absorbansının en yüksek olduğu 260 nm baz alınarak, konsantrasyon değerleri hesaplanmaktadır. Ölçüm Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, ABD) cihazında yapılmıştır. Ölçülen tüm örneklerin absorbans eğrileri üst üste eklenerek grafik oluşturulmuştur.

RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri ile örnek numaraları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Örneklerin ortalama saflık değeri 2-2,25 arasında saptanmıştır. Konsantrasyonlar 1 µg-1,7 µg aralığında ölçülmüştür.

Tablo 4.2: RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri.

Örnek No	Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/µl)	260/280	260/230
1	0. Saat kontrol	1246	2,25	2,53
2	TN1 10. Saat	1043	2,08	1,98
3	TN2 10. Saat	1606	2,2	2,16
4	5-FU1 10. Saat	1749	2,2	2,44
5	5-FU2 10. Saat	1164	2,22	2,34
6	CQ 10. Saat	1758	2,15	2,35
7	DMSO Kontrol 10. saat	1413	2,11	2,16
8	TN1 20. Saat	1065	2,13	2,33
9	TN2 20. Saat	1083	2,19	2,36
10	5-FU1 20. Saat	1399	2,06	2,45
11	5-FU2 20. Saat	1312	2,15	2,13
12	CQ 20. Saat	1572	2,26	2,43
13	DMSO Kontrol 20. saat	1513	2,19	2,02

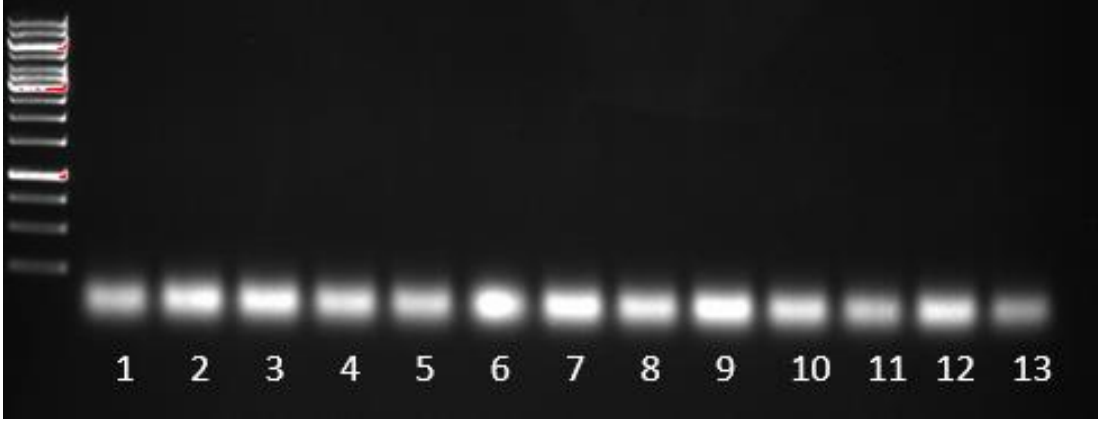
RNA örnekleri DNaz uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra %1’lik agaroz jelde elektroforez yöntemi ile görüntülendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: RNA örneklerinin DNaz uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra %1'lik agaroz jel görüntüsü. Jel görüntüsünde beklenildiği gibi, örneklerle DNaz uygulaması öncesinde (A) genomik DNA konsantaminasyonu ve 18S, 28S ve 5S rRNA bantları görülmüştür. DNaz uygulamasından sonra (B) genomik DNA kontaminasyonunun giderildiği görülmektedir. Ayrıca enzimin ısı ile inaktivasyonundan dolayı RNA ikincil yapılarının denatüre olduğu gözlenmektedir.

4.3.2. cDNA Sentezi

DNaz uygulanan total RNA, kalıp olarak kullanılarak ile Bölüm 3.5.2'de açıklandığı gibi cDNA sentez reaksiyonları gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'ların kontrolü %1'lik agaroz jelde elektroforez ile yapıldı (Şekil 4.8).

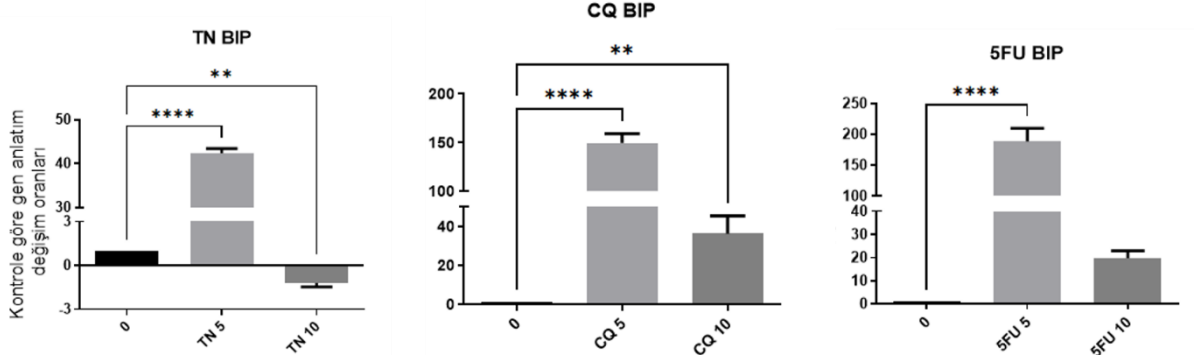


Şekil 4.8: cDNA örneklerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü. Sentezlenen cDNA tek zincirli olduğu için, birbirleri ve kendi üzerine rastgele katlanmalar ve bağlanmalar oluşturur. Bu nedenle agaroz jelde olduğundan daha küçük boyutlarda gözlenir.

4.3.3 Hedef Genlerin Anlatım Değişikliklerinin Karşılaştırmalı Analizi

Plasmodium berghei Pbp230p (-) suşuna uygulanan ilaç streslerinin hedef genlerde meydana getirdiği anlatım değişimlerinin analizi GZ-PZR ile gerçekleştirildi. Bu çalışmada, apoptoz ile ilişkili kaspaz gen ailesinden grup 1'e ait olan MCA1, grup 2'ye dahil MCA2 ve MCA3 genlerinin yanı sıra, otofaji sürecinde otofagozom oluşumuna katılan ATG5, ATG8, ATG12 genlerinin anlatım profilleri çıkarıldı. Normalizasyonu için referans gen olarak genomu entegre edilmiş GFP kullanıldı. Kontrol olarak, ilaç çözeltilerinin hazırlanmasında çözücü olarak kullanılan DMSO ile muamele edilen parazit hücreleri kullanıldı. Gen anlatım düzeyindeki değişimler Pfaffl denkleminde göre hesaplandı. Çalışmada kullanılan her üç ilaç için 20. saatte alınan örneklerden izole edilen RNA'lerden sentezlenen cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı GZ-PZR'de ele alınan tüm genlerde anlamlı sonuçlar elde edilemediği için bu saatteki sonuçlar dikkate alınmamıştır.

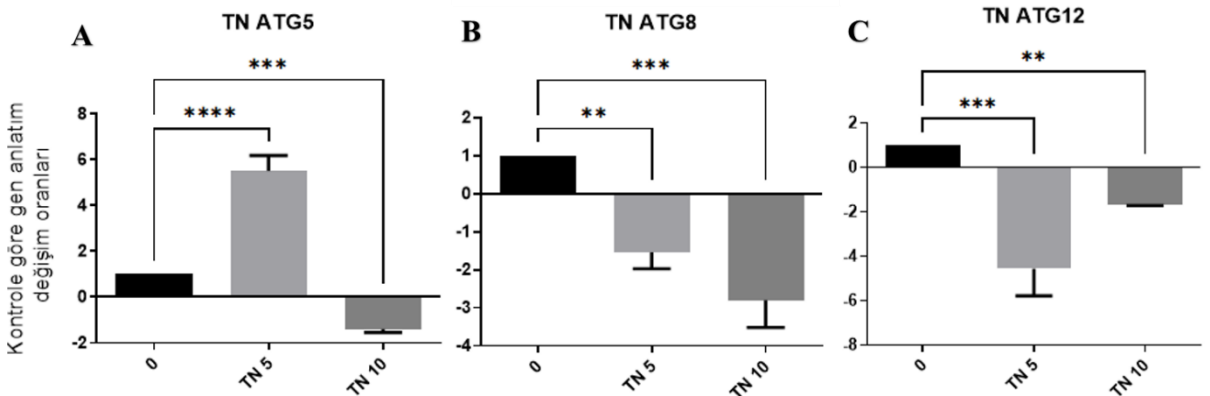
Tunikamisin, 5-florourasil ve klorokin ile muamele edilen parazit hücrelerinde ER stres marker geni olan BIP'ın DMSO ile muamele edilen kontrol hücrelerine göre değişen anlatım profilleri Şekil 4.9'da gösterilmektedir. Her üç ilaç uygulamasının 5. saatinde BIP geninin anlatımının DMSO'lu kontrolüne göre istatistiki olarak anlamlı derece arttığı (sırasıyla 42, 157, 213 kat artış) tespit edildi. Tunikamisin uygulaması 10. saatte BIP geninin anlatımının düşmesine (1,2 kat) yol açarken, klorokin (30 kat) ve 5-florourasil (istatistiki olarak anlamlı olmamakla beraber 20 kat) uygulamasının genin anlatımını artırdığı gözlemlendi.



Şekil 4.9: *Plasmodium berghei* Pbp230p (-) parazitinde ER stres marker geni BIP'in 5 µg/mL tunikamisin, 2,6 µg/mL 5-fluorourasil, 0,25 µg/mL klorokin etkisinde anlatım profilleri. Deney ve kontrol grupları arasındaki anlatım değişimleri tek yönlü varyans analizi modülü ile karşılaştırmalı olarak yapıldı. Post-hoc analizler "Dunnet's Test" ile gerçekleştirildi. * $p<0,5$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

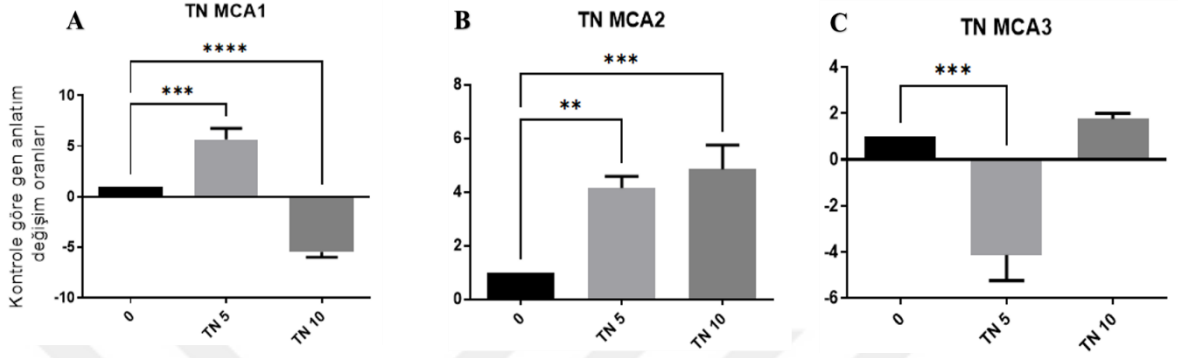
Tunikamisin ile muamele edilen parazit hücrelerindeki hedef genlerin DMSO ile muamele edilen kontrol hücrelerine göre otofaji ile ilişkili genlerin değişen anlatım profilleri Şekil 4.10'da; apoptozla ilişkili genlerinkiler ise Şekil 4.11'da gösterilmektedir.

Otofagozom oluş sürecine dahil olan ATG5 geninin DMSO'lu kontrole göre anlatımı 5. saatte artarken (5,5 kat), 10. saatte düşmüştür (1,4 kat). ATG8 ve ATG12 ise benzer profil sergilemekle beraber, 5. saate sırasıyla 1,5 ve 4,6 kat; 10. saatte ise 3 kat ve 1,7 kat azalma gözlemlendi.



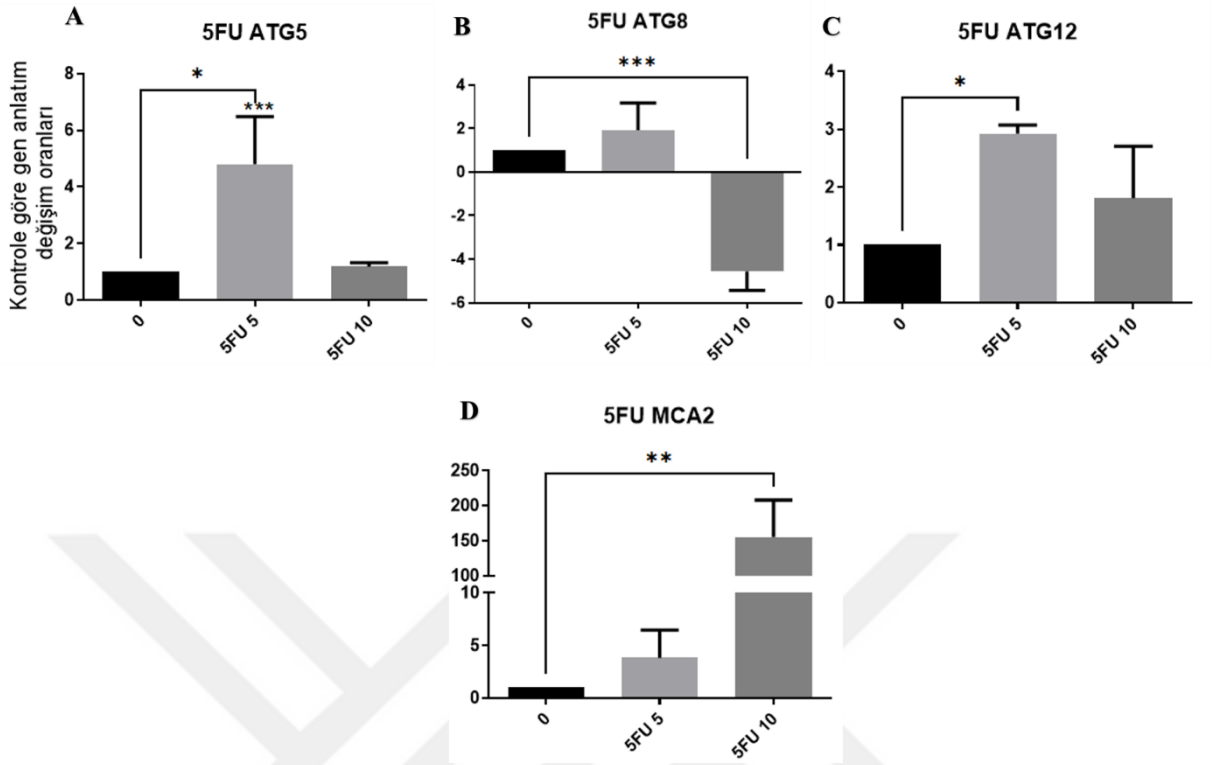
Şekil 4.10: *Plasmodium berghei* Pbp230p (-) parazitinde otofaji ilişkili (A) ATG5, (B) ATG8, (C) ATG12 genlerinin, 5 µg/mL tunikamisin konsantrasyonunda anlatım profilleri. Deney ve kontrol grupları arasındaki anlatım değişimleri tek yönlü varyans analizi modülü ile karşılaştırmalı olarak yapıldı. Post-hoc analizler "Dunnet's Test" ile gerçekleştirildi. * $p<0,5$, *** $p<0,01$, **** $p<0,0001$.

Apoptoz sürecine dahil MCA1 geninin 5. saatte arttığı (5,6) ve 10. saatte düştüğü (5,5) ; MCA2 geninin her iki saatte de yükseldiği (sırasıyla 4 ve 5 kat); MCA3 geninin ise sadece 5. saatte istatistiki olarak anlamlı bir değişiklik düşüğü (4 kat) belirlendi.



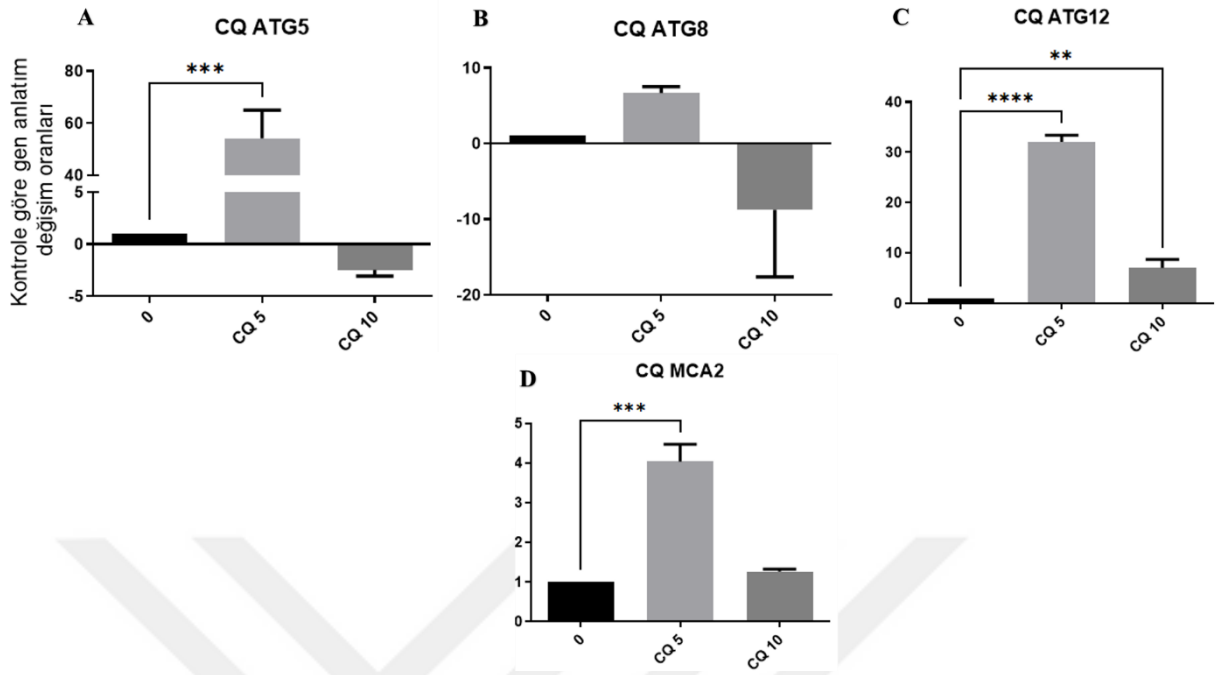
Şekil 4.11: *Plasmodium berghei* Pbp230p (-) parazitinde apoptoz ilişkili (A) MCA1, (B) MCA2, (C) MCA3 genlerinin 5 µg/mL tunikamisin konsantrasyonunda anlatım profilleri. Deney ve kontrol grupları arasındaki anlatım değişimleri tek yönlü varyans analizi modülü ile karşılaştırmalı olarak yapıldı. Post-hoc analizler “Dunnet’s Test” ile gerçekleştirildi. * $p<0,5$, *** $p<0,01$, **** $p<0,0001$.

5-fluorourasil ile muamele edilen parazit hücrelerindeki hedef genlerin DMSO ile muamele edilen kontrol hücrelerine göre değişen anlatım profilleri Şekil 4.12’da gösterilmektedir. Buna göre, ATG5 ve ATG12 sadece 5. saatte istatistiki olarak anlamlı artış (sırasıyla 5 ve 3 kat) göstermiştir. ATG8’in anlatımı 10. saatte istatistiki olarak anlamlı (4,5 kat) düşmüştür. Diğer saatteki anlatım farkı anlamlı bulunmamıştır. MCA2 geninin ise anlatım ise her iki saatte de artmakla beraber 10. saatte istatistiki olarak artış (155 kat) tespit edildi.



Şekil 4.12: *Plasmodium berghei* Pbp230p (-) parazitinde apoptoz ilişkili (D) MCA2 ve otofaji ilişkili (A) ATG5, (B) ATG8, (C) ATG12 genlerinin, 2,6 µg/mL 5-fluorourasil konsantrasyonunda anlatım profilleri. Deney ve kontrol grupları arasındaki anlatım değişimleri tek yönlü varyans analizi modülü ile karşılaştırmalı olarak yapıldı. Post-hoc analizler “Dunnet’s Test” ile gerçekleştirildi. * $p < 0,5$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Klorokin ile muamele edilen parazit hücrelerindeki hedef genlerin DMSO ile muamele edilen kontrol hücrelerine göre değişen anlatım profilleri Şekil 4.13’de gösterilmektedir. Buna göre ATG5 ve ATG12 genlerinin anlatımları 5.saatte istatistiki olarak anlamlı (sırasıyla 54 kat ve 32 kat) artış gözlemlendi. ATG12 geninde 10. saatte anlamlı artış (7 kat) gözlemlendi. ATG8 geninde her iki saatte de anlatımında anlamlı bir değişim gözlemlenmedi. Benzer şekilde MCA2 geninin de sadece 5. saatte anlatımının arttığı (4 kat) belirlendi.



Şekil 4.13: *Plasmodium berghei* Pbp230p (-) apoptoz ilişkili (D) MCA2 ve otofaji ilişkili (A) ATG5, (B) ATG8, (C) ATG12 genlerinin, 0.25 µg/mL klorokin konsantrasyonundaki anlatım profilleri. Deney ve kontrol grupları arasındaki anlatım değişimleri tek yönlü varyans analizi modülü ile karşılaştırmalı olarak yapıldı. Post-hoc analizler “Dunnet’s Test” ile gerçekleştirildi. * $p<0,5$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sıtma, tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olan *Anopheles* türü sivrisinek ısırığı ile bulaşan bir protozoon hastalığıdır. Dünya sağlık örgütünün yıllık sıtma raporlarına göre 2019 yılındaki vaka sayısı 227 milyon iken, 2020 yılının vaka sayısı 241 milyon olduğu bildirilmiştir (Chakraborty, 2016; DSÖ, 2021). Tahmini sıtma nedenli ölümlerin sayısı ise 2020 yılında 627.000 olarak kaydedilmiştir ve önceki yıla göre ölen sayısı 69.000 kişi artmıştır. Aynı raporda ülkemiz sıtma vakası bulunmayan ülkeler arasında yer almaktadır. Dünya genelinde enfeksiyöz hastalıkları başta olmak üzere, kanser dahil bazı hastalıklarda kullanılan ilaçlara karşı geliştirilen çoklu ilaç direnci, tedaviye engel olan en önemli sorunlardan biridir. Sıtma parazitinin hızlı direnç geliştirebilme kapasitesi, sıtma ile mücadelenin de başarısını azaltan birincil faktördür.

Parazitin biyolojisinin karmaşıklığı, aşı uzmanlarının ve immünologların tamamen koruyucu bir aşı geliştirmelerindeki en büyük engeldir. Sıtma parazitinin yaşam döngüsüyle ilişkili karmaşıklığın büyük bir kısmı, parazitin hücre içi gelişim göstermesinden kaynaklı, konağın immün yanıtından kolayca saklanmasına ek olarak, parazitin 5000'den fazla tanımlanmış gen içeren bir genomu sahip olmasıdır (Aly ve diğ., 2009). Literatür araştırmaları ve son yıllarda yapılan çalışmalar sayesinde çoklu ilaç direncine karşı yeni ilaçlar geliştirmek yerine, farklı etki mekanizmalarına sahip ilaç kombinasyonlarının birlikte kullanılması başarılı bir tedavi seçeneği oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada, miyelom ve meme kanseri hücre hatlarında bir kanser ilacı olan Bortezomib ile beraber azitromisin veya klaritromisin antibiyotikleri ile kombine tedavinin , aynı anda proteozom oluşumu ve otofaji mekanizmasını inhibe etmesi, bir transkripsiyon faktörü olan CHOP'un anlatımını arttırarak ER stresi yüklemesi oluşturduğu ve bu stresin giderilememesi sebebiyle apoptoz indüksiyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (Kazama ve diğ., 2018).

Plasmodium parazitinin eritrosit hücreleri içindeki yaşam döngüsü sıtmanın semptomatik aşamalarını oluşturur. Parazitin eritsoit içinde üremesi redoks stresi ve devamında ER stresine açık bir ortam hazırlar. ER stresi de hücrede, apoptoz ve otofaji dahil olmak üzere programlanmış hücre ölüm yollarının temel tetikleyicilerinden biridir (Sano ve Reed, 2013).

Çalışmamızda bir ER stress ajanı olarak tunikamisini, bir antikanser ilacı olan 5-fluorourasili ve halihazırda sıtma ilacı olarak kullanılan klorokin ilaçlarının bir parazitik protozoon olan

Plasmodium berghei türü parazitlerde, parazit üremelerine etkisi *in vivo* ve otofaji ve apoptoz ilişkili genlerin anlatımı üzerindeki etkileri *ex vivo* olacak şekilde incelenmiştir.

In vivo çalışmada, deney gruplarında kullanılan ilaç dozları literatüre göre seçilerek çalışma için uyarlandı. Literatürde bu ilaçların *Plasmodium* türü parazitlere özellikle intraperitoneal olarak uygulandığı çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu sebeple kullanılan dozlar, var olan çalışmalarda varsa IC₅₀ değerlerinden ya da kullanılan dozlardan yola çıkılarak, çalışmamıza uyarlanmıştır. Bu dozlar klorokin için 3 mg/kg/gün (Somsak ve diğ., 2018), tunikamisin için 2 ve 4 mg/kg/gün (Abdullahi ve diğ., 2017; Lee ve diğ., 2012) ve 5-Fluorourasil için 5 mg/kg/gün (Yadav ve diğ., 2021) olarak belirlenmiştir. Ayrıca 5-Fluorourasil'in fare üzerindeki toksik etkilerinin giderilmesi amacıyla antagonist olarak uygulanan "Polyinosinic-Polycytidylic Acid" (PolyI-PolyC) maddesi de 0,6 mg/kg/gün (Stolfi ve diğ., 1983) olacak şekilde uygulanmıştır.

In vivo çalışma için deney grupları parazitemi takibi sonucunda, parazitemi değeri her grup için yaklaşık olarak ortalama %0,5 olacak şekilde dağıtıldı (Tablo 4.1). Bu tabloda görülen farklılığın, çalışmada kullanılan CD1 ırkı farelerin "outbred" olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. *In vivo* kültürlerde bu çalışmada kullanılan ajanların belirlenen dozlarının, parazit sağ kalımına olan etkisinin % parazitemi cinsinde takibi amacıyla, yeşil floresan protein (GFP) eksprese eden *Plasmodium berghei* *Pbp230p* (-) suşu kullanıldı. Bu amaçla Tablo 4.1'de verildiği gibi, ortalama hücre sayısı 5×10^4 hücre/ μ L olacak şekilde deney grupları oluşturularak ilaç uygulamasına başlandı. Fare eritrosit sayısı ortalama 10^7 hücre/ μ L'dir (Nemzek ve diğ., 2001). Bu sebeple deney grupları ortalama parazitemi değeri %0,5 olacak şekilde hazırlandı. Ek olarak, parazitin GFP ekspresyonu konfokal mikroskop altında görüntülenerek teyit edildi (Şekil 4.1).

In vivo çalışmada uygulanan ilaçların parazitin sağkalım yüzdelerine etkilerinin (Şekil 4.2) takibi sonucu, uygulanan ilaçların çözücü ortamı olarak kullanılan DMSO'da parazitemi yüzdesinin artması, bu çözücünün parazitin sağkalımına negatif bir etkisinin olmadığını kanıtlamaktadır. Kullanılan ilaçlardan 5-fluorourasilin üreme profillerine negatif bir etkisinin gözlenmemesinin, fare konağında 5-FU-antagonistiği olarak kullanılan interferon indükleyici poliinosinik:polisitidilik asit maddesi sebebiyle oluştuğu düşünülmektedir. Bir diğer ilaç olan tunikamisinin iki dozunda da, parazit sağkalım yüzdesi artmaktadır. 5-FU ile benzer profil sergilemekle beraber, burada kullanılan konak fareler için tunikamisine karşı her hangi bir

antagonistik madde kullanılmamıştır. Çalışmada kullanılan tüm ilaçlar arasında sadece tunikamisinde konak olarak kullanılan farelerde, deney sonlandığında ya da deney arasında kendiliğinden ölüm gözlemlendi. Bu fareler incelendiğinde, karaciğer büyümesi, karaciğer bütünlüğünün bozulması ve ağır hasarlı olması, tedavi sırasında farelerin ishal ve burun kanaması sergilemesi (paylaşılmamış bulgu) gibi sebeplerle, konak farenin immün yetersizlik göstermesi sonucu parazitemi sağ kalımının artması ilişkilendirilmiştir (Yang ve diğ., 2007). Bu deneyde sadece pozitif kontrol olarak kullanılan klorokin beklediği gibi parazit sağkalım oranını azalttığı belirlendi. Tüm bunlar dikkate alındığında, parazit tedavisinde olası aday ilaçlar olarak ortaya atılabilecek ER stres indükleyicisi tunikamisin ve antikanser ilacı olan 5-fluorourasilin, parazitin sağ kalımını negatif etkilemezken, konak için oluşturduğu toksisite konağın sağ kalımını negatif etkiledi.

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan ilaçların parazit hücrelerinde apoptoz ve/veya otofajinin etkilerini araştırmak için ilgili yollara ait seçili genlerin anlatım profillerine etkisi *ex vivo* deney gruplarında gerçekleştirildi. İlaç dozları literatüre göre seçilerek çalışma için uyarlandı. Literatürde tunikamisin ve 5-fluorourasil ilaçlarının *Plasmodium* türü parazitlere uygulandığı çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu sebeple kullanılan dozlar, var olan çalışmalarda IC_{50} değerlerinden yola çıkılarak, çalışmamıza uyarlanmıştır. Bu dozlar tunikamisin için 2,5 ve 5 $\mu\text{g/mL}$ (Udeinya ve diğ., 1981; Dieckmann-Schuppert ve diğ., 1992; Abdullahi ve diğ., 2017) ve 5-Fluorourasil için 1,3 ve 2,6 $\mu\text{g/mL}$ (Rathod ve diğ., 1989) klorokin için 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (Östan ve diğ., 2013) olarak belirlenmiştir. Dozların uygulandığı 0. saat parazitemi değeri %15,07 olarak ölçülen kültürde Şekil 4.4'te de verildiği gibi çoğu parazitin yüzük evresinde iken yakalanmış olduğu tespit edilmiştir. Bilindiği gibi, parazitemi kültüründe yüzde yüz senkronizasyon sağlamak mümkün değildir. Uygulanan ilaçların 20 saat boyunca *ex vivo* parazit kültüründe izlenmesi sonucunda tüm gruplarda benzer üreme profiline yol açtıkları, ve üremeyi sınırlandırdıkları tespit edildi (Şekil 4.5). Ek olarak *ex vivo* çalışmalar ile 5-FU'nun antagonistini eklemeye ihtiyaç duymadan kullanılabilmesi sayesinde, sadece 5-FU'nun gen anlatımındaki rolü araştırılabilir.

Gen ekspresyonu analizinde kalıp olarak kullanılacak RNA'nın konsantrasyonu ve saflığının önemi bilindiğinden bu çalışmada hem spektrofotometrik (Şekil 4.6) hem de elektroforetik (Şekil 4.7) olarak test edilerek kalite ve kantitesi doğrulandıktan sonra GZ-PZR tekniğinde gen anlatımı analizi çalışmalarına devam edilmiştir.

Çalışmada kullanılan her üç ilaç için önce sadece 10.ve 20. saatte alınan örneklerden izole edilen RNA'lerden sentezlenen cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı GZ-PZR'de ele alınan tüm genlerde elde edilen sonuçlar tutarsız olduğu için 20. saatteki sonuçlar dikkate alınmamıştır. Ayrıca bu sebepten dolayı 5-FU ve TN ilaçlarının düşük dozları gen anlatım çalışmalarında dikkate alınmamıştır. Çalışmaya 5-FU (2,6 µg/mL), TN (5 µg/mL) ve klorokin (0.25 µg/mL) ilaçlarının birer dozu kullanılarak 5. ve 10. saatte alınan örnekler ile devam edildi.

Öncelikle ER stresi kaynaklı UPR aktivasyonunda önemli bir rolü olduğu bilinen BIP geninin (Credle ve diğ., 2005) sunulan tez çalışmasında kullanılan her üç ajandaki anlatımına bakıldığında (Şekil 4.9); her üç ilaç uygulamasında 5. saatte BIP geninin anlatımının DMSO'lu kontrolüne göre istatistiki olarak anlamlı derece sırasıyla 42, 157 ve 213 kat arttığının tespit edilmesi bu ilaçların ER stresini tetiklediğini kanıtlamaktadır. 10. saatte bu ilaçların BIP geninin anlatımları üzerine 5. saate göre etkilerindeki azalma, BIP geninin anlatımının zamana bağlı düzenlendiğini göstermektedir. Bu düzenlenme; gerek UPR ve devamındaki proteozomal aktivitenin devreye girmesi, gerekse otofaji ve/veya apoptoz gibi hücrel ölüm yollarının tetiklendiğini bildiren literatürü desteklemektedir (Benbrook ve diğ., 2012; Renata ve diğ., 2013; Qu ve diğ., 2021).

ER stresi varlığının doğrulanmasının ardından, her üç ilaçla muamele edilen kültürlerin belirlenen doz ve saatlerinde, ER stresi kaynaklı hücrel ölüm yollarının analizi için, hem otofaji hem de apoptozla ilişkili olan belirteç genlerin anlatım profilleri çıkarıldı.

Bu ilaçlardan ilk olarak tunikamisin uygulaması sonucunda; otofagozom sürecine dahil olan genlerden ATG5 geninin 5. saatinde anlatımı artarken 10. saatte azaldığı, ATG8 ve ATG12 genlerinin anlatımının her iki saatte de düştüğünün gözlemlenmesi, buna karşın apoptoz sürecine dahil olan metakaspaz enzimlerini kodlayan genlerden MCA1'in 5. saatte artmasına karşın 10. saatte düşmesi, MCA2'nin her iki saatte de yükselmesi fakat MCA3'ün 5. saatte düşmesi, tunikamisin için ER stresini takiben hücrelerin otofajiden çok apoptoz yöneldiğini düşündürmektedir. Bu sonuç kanser hücre hatlarında yapılan ve tunikamisinin apoptozu tetiklediğini gösteren bazı çalışmalarla uyumludur (Jiang ve diğ., 2007; Guha ve diğ., 2017).

5-FU ile muamele edilen kültürlerde ATG5 ve ATG12 genlerinin sadece 5. saattlerinde anlamlı artış tespit edilirken, ATG8 geninin anlatımının 10. saatte düşmüş olması, buna karşın MCA2 geninin anlatımının 10. saatte artması 5-FU kaynaklı ER stresini her iki sürecin de takip ettiğini

düşündürmektedir. Literatürde 5-Fluorourasilin hücre ölüm yolaklarındaki rolü tartışmalı olmamakla beraber, her iki ölüm yolağını da tetikleyebildiğine dair veriler ortaya konmuştur (Tang ve diğ., 2016).

Parazitemiyi inhibe eden ve bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan klorokin uygulaması sonucunda ATG5, ATG12 ve MCA2 genlerinin, ve ayrıca istatistiksel olarak anlamlı olmasa da ATG8 geninin de, 5. saatte anlatımlarının artış göstermesi, bu ilacın da ER stresini takiben her iki yolağı da tetiklediğini göstermektedir. Klorokin güçlü bir ER stres indükleyicisi olmasına karşın hücre içi pH'ı yükselterek otofajik vakuollerin füzyonunu engelleme yoluyla otofajiyi inhibe ettiği için genellikle kanser kemoterapisinde apoptoz indükleyicisi olarak rolü araştırılmaktadır (Guha ve diğ., 2017; Jia ve diğ., 2018).

Çalışmada klorokin ve 5-FU ilaçlarının, MCA1 ve MCA3 genlerinin anlatımları üzerine etkileri; deney kaynaklı sorunlardan dolayı tutarlı bir sonuç üretmedikleri için (standart sapmaları çok yüksek olduğu için) bulgulara dahil edilemedi.

Plasmodium metakaspaz genlerinin işlevleri tam olarak aydınlatılamamakla beraber MCA1 geninin delesyonu sonucu parazitin üreme profili ve apoptotik aktivitesinde önemli bir değişim saptanamamıştır. MCA3 geninin ise kaspaz substratlarına karşı inaktif olduğu ve hücrede kaspaz benzeri aktivitelerden sorumlu olmadığı gösterilmiştir (Le Chat ve diğ., 2007; Kumar ve diğ., 2019). Bununla beraber MCA2 genindeki delesyonun stres aracılı apoptoz benzeri hücre ölüm oranında önemli ölçüde artış göstermesi (Kumari ve diğ., 2022), metakaspaz genleri içerisinde en önemli genin MCA2 olduğunu göstermektedir.

ER stresi ve sonucunda oluşan UPR, proteozomal yıkım ve otofaji yolakları, hücre ölümünden çok, öncelikle stresin giderilmesi üzerine bazı önlemlerin alındığı bir nevi onarım mekanizması da denilebilecek mekanizmalardır (Benbrook ve diğ., 2012; Senft ve diğ., 2015). Bu mekanizmaların stresi gideremeyeceği, hasarı onaramayacağı ya da ER homeostazisini sağlayamayacağı durumlarda; hücreler stresin türüne ya da maruz kalınan süreye de bağlı olarak, öncelikle apoptotik olmakla beraber, otofaji ya da apoptoz benzeri diğer ölüm yolaklarına yönelmektedir (Kim ve diğ., 2006; Fribley ve diğ., 2009; Sano ve diğ., 2013).

Sonuç olarak BIP geninin anlatımındaki anlatım seviyelerine bakıldığında, oluşturulan stres koşullarında ER stresinin tetiklendiği kesin olarak gösterilmiştir. Bu koşullarda otofaji ve apoptoz ilişkili genlerin anlatım değişiklikleri, *Plasmodium berghei* türü kemirgen sıtma

parazitlerinin; 5-FU ve klorokin ilaçlarının uygulandığı koşullarda, oluşan güçlü ER stresi sebebiyle otofaji ilişkili genlerini aktive etmelerine rağmen apoptoza yöneldikleri, tunikamisin koşulunda ise doğrudan apoptoz ilişkili genlerin tetiklendiğini düşündürmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdullahi, A., Stanojcic, M., Parousis, A., Patsouris, D., Jeschke, M. G., 2017, Modeling Acute ER Stress in Vivo and in Vitro, *Shock (Augusta, Ga.)*, 47(4), 506–513.
- Almanza, A., Carlesso, A., Chintla, C., Creedican, S., Doultzinos, D., Leuzzi, B., Luis, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Puschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., De Belleruche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., Healy, S., Kozlov, A., Munoz-Pinedo, C., Rehm, M., Chevet, E., Samali, A. 2019, Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications, *Febs Journal*, 286, 241-278.
- Aly, A. S., Vaughan, A. M., Kappe, S. H. 2009, Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host, *Annual Review of Microbiology*, 63, 195-221.
- Araki, K., Nagata, K., 2011, Functional in vitro analysis of the ERO1 protein and protein-disulfide isomerase pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 32705-12.
- Austriaco, N. 2012, Endoplasmic reticulum involvement in yeast cell death. *Frontiers in Oncology*, 2, 87.
- Beck-Johnson, L. M., Nelson, W. A., Paaijmans, K. P., Read, A. F., Thomas, M. B., Bjornstad, O. N., 2013, The Effect of Temperature on Anopheles Mosquito Population Dynamics and the Potential for Malaria Transmission, *Plos One*, 8.
- Benbrook, D. M., Long, A., 2012, Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis, *Experimental oncology*, 34(3), 286–297.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., Ron, D., 2000, Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response, *Nature Cell Biology*, 2, 326-32.
- Bhatt, S., Weiss, D. J., Cameron, E., Bisanzio, D., Mappin, B., Dalrymple, U., Battle, K. E., Moyes, C. L., Henry, A., Eckhoff, P. A., Wenger, E. A., Briët, O., Penny, M. A., Smith, T. A., Bennett, A., Yukich, J., Eisele, T. P., Griffin, J. T., Fergus, C. A., Lynch, M., Lindgren, F., Cohen, J. M., Murray, C. L. J., Smith, D. L., Hay, S. I., Cibulskis, R. E., Gething, P. W., 2015., The effect of malaria control on Plasmodium falciparum in Africa between 2000 and 2015, *Nature*, 526, 207-211.
- Boyle, J., 2008, Molecular biology of the cell, 5th edition by B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 36, 317-318.
- Caraballo, H., King, K. 2014, Emergency department management of mosquito-borne illness: malaria, dengue, and West Nile virus, *Emergency Medicine Practice*, 16, 1-23.
- Cervantes, S., Bunnik, E. M., Saraf, A., Conner, C. M., Escalante, A., Sardi, M. E., Ponts, N., Prudhomme, J., Florens, L., Le Roch, K. G., 2014, The multifunctional autophagy pathway in the human malaria parasite, Plasmodium falciparum, *Autophagy*, 10, 80-92.

- Cervantes, S. S., 2013, *The Role of Autophagy in the Human Malaria Parasite, Plasmodium falciparum*, Doktora, University Of California Riverside.
- Chakraborty, A., 2016, Understanding the biology of the Plasmodium falciparum apicoplast; an excellent target for antimalarial drug development, *Life Sciences*, 158, 104-10.
- Chaubey, S., Grover, M., Tatu, U., 2014, Endoplasmic reticulum stress triggers gametocytogenesis in the malaria parasite, *Journal of Biological Chemistry*, 289, 16662-74.
- Chen, O. I., Bobak, Y. P., Stasyk, O. V., Kunz-Schughart, L. A., 2018, A Complex Scenario and Underestimated Challenge: The Tumor Microenvironment, ER Stress, and Cancer Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 25, 2465-2502.
- Choi, A. R., Kim, J. H., Woo, Y. H., Kim, H. S., Yoon, S., 2016, Anti-malarial Drugs Primaquine and Chloroquine Have Different Sensitization Effects with Anti-mitotic Drugs in Resistant Cancer Cells, *Anticancer Research*, 36, 1641-8.
- Chora Â, F., Mota, M. M., Prudêncio, M., 2022, The reciprocal influence of the liver and blood stages of the malaria parasite's life cycle, *International Journal of Parasitology*.
- Chou, A. C., Chevli, R., Fitch, C. D., 1980, Ferriprotoporphyrin-Ix Fulfills the Criteria for Identification as the Chloroquine Receptor of Malaria Parasites, *Biochemistry*, 19, 1543-1549.
- Corazzari, M., Gagliardi, M., Fimia, G. M., Piacentini, M., 2017, Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate, *Frontiers in Oncology*, 7.
- Cornejo-Juárez, P., Vilar-Compte, D., Pérez-Jiménez, C., Ñamendys-Silva, S. A., Sandoval-Hernández, S., Volkow-Fernández, P., 2015, The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit, *International Journal of Infectious Diseases*, 31, 31-34.
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., Marsh, K., 2016, Malaria: Biology and Disease, *Cell*, 167, 610-624.
- Cox, J. S., Walter, P., 1996, A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response, *Cell*, 87, 391-404.
- Cravo, P., Napolitano, H., Culleton, R., 2015, How genomics is contributing to the fight against artemisinin-resistant malaria parasites, *Acta Tropica*, 148, 1-7.
- Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M., Walter, P., 2005, On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum, *PNAS*, 102, 18773-84.
- Çelik, H., 2005, *Malarya (Sıtma) Hastalarında Oksidatif Stres ve Mononükleer Lenfosit DNA Hasarının Araştırılması*, Yüksek Lisans, Harran Üniversitesi.
- De Koning-Ward, T. F., Gilson, P. R., Crabb, B. S., 2015, Advances in molecular genetic systems in malaria, *Nature Reviews Microbiology*, 13, 373-87.

- De Niz, M., Heussler, V. T., 2018, Rodent malaria models: insights into human disease and parasite biology, *Current Opinion in Microbiology*, 46, 93-101.
- Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R., 2001, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, *Genome Research*, 11, 1156-66.
- Dice, J. F., 2007, Chaperone-mediated autophagy, *Autophagy*, 3, 295-9.
- Dieckmann-Schuppert, A., Hensel, J., Schwarz, R. T., 1992, Studies on the effect of tunicamycin on erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*, *Biochemical Society transactions*, 20(2), 184S.
- DSÖ, 2021, Dünya Sıtma Raporu. Cenevre, Lisans CC BY-NC-SA 3.0
- Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic Pathology*, 35, 495-516.
- Emilia A. Kimura, Alicia S. Couto, Valnice J. Peres, Olga L. Casal, Alejandro M. Katzin, 1996, N-Linked Glycoproteins Are Related to Schizogony of the Intraerythrocytic Stage in *Plasmodium falciparum*, *Journal of Biological Chemistry*, 271(24), 14452-14461.
- Enserink, M., 2010, Malaria's Drug Miracle in Danger, *Science*, 328, 844-846.
- Francis, S. E., Sullivan, D. J., Jr., Goldberg, D. E., 1997, Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Annual Review of Microbiology*, 51, 97-123.
- Fribley, A., Zhang, K., Kaufman, R. J., 2009, Regulation of apoptosis by the unfolded protein response, *Methods in Molecular Biology* 559, 191–204.
- Fu, S. N., Watkins, S. M., Hotamisligil, G. S., 2012, The Role of Endoplasmic Reticulum in Hepatic Lipid Homeostasis and Stress Signaling, *Cell Metabolism*, 15, 623-634.
- Galluzzi, L., Lopez-Soto, A., Kumar, S., Kroemer, G., 2016, Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis, *Immunity*, 44, 221-31.
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K. F., 2010, Autophagy: cellular and molecular mechanisms, *The Journal of Pathology*, 221, 3-12.
- Goldberg, D. E., Slater, A. F., Cerami, A., Henderson, G. B., 1990, Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle, *PNAS*, 87, 2931-5.
- Gopisetty, M. K., Kovacs, D., Igaz, N., Ronavari, A., Belteky, P., Razga, Z., Venglovecz, V., Csoboz, B., Boros, I. M., Konya, Z., Kiricsi, M., 2019, Endoplasmic reticulum stress: major player in size-dependent inhibition of P-glycoprotein by silver nanoparticles in multidrug-resistant breast cancer cells, *Journal of Nanotechnology*, 17, 9.
- Gosline, S. J. C., Nascimento, M., McCall, L. I., Zilberstein, D., Thomas, D. Y., Matlashewski, G., Hallett, M., 2011, Intracellular Eukaryotic Parasites Have a Distinct Unfolded Protein Response, *Plos One*, 6.

- Gottesman, M. M., Fojo, T., Bates, S. E., 2002, Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, 2, 48-58.
- Griffith, M., Postelnick, M., Scheetz, M., 2012, Antimicrobial stewardship programs: methods of operation and suggested outcomes, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10, 63-73.
- Guha, P., Kaptan, E., Gade, P., Kalvakolanu, D. V., Ahmed, H., 2017, Tunicamycin induced endoplasmic reticulum stress promotes apoptosis of prostate cancer cells by activating mTORC1, *Oncotarget*, 8(40), 68191–68207.
- Harding, H. P., Zhang, Y. H., Ron, D., 1999, Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase, *Nature*, 397, 271-274.
- Hart, R. J., Lawres, L., Fritzen, E., Ben Mamoun, C., Aly, A. S., 2014, Plasmodium yoelii vitamin B5 pantothenate transporter candidate is essential for parasite transmission to the mosquito, *Scientific Reports*, 4, 5665.
- Hauptmann, P., Lehle, L., 2008, Kex1 protease is involved in yeast cell death induced by defective N-glycosylation, acetic acid, and chronological aging, *Journal of Biological Chemistry*, 283, 19151-19163.
- Hebert, D. N., Molinari, M., 2007, In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases, *Physiological Reviews*, 87, 1377-408.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M., 1996, Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986-94.
- Hempelmann, E., 2007, Hemozoin biocrystallization in Plasmodium falciparum and the antimalarial activity of crystallization inhibitors, *Parasitology Research*, 100, 671-6.
- Hetz, C., Zhang, K., Kaufman, R. J., 2020, Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21, 421-438.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993, Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions, *BioTechnology*, 11, 1026-1030.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H., 1991, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase, *PNAS*, 88, 7276-80.
- Hollien, J., Weissman, J. S., 2006, Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response, *Science*, 313, 104-107.
- Hooft Van Huijsduijnen, R., Guy, R. K., Chibale, K., Haynes, R. K., Peitz, I., Kelter, G., Phillips, M. A., Vennerstrom, J. L., Yuthavong, Y., Wells, T. N., 2013, Anticancer properties of distinct antimalarial drug classes, *PLoS One*, 8, e82962.

- Inacio, P., Zuzarte-Luis, V., Ruivo, M. T. G., Falkard, B., Nagaraj, N., Rooijers, K., Mann, M., Mair, G., Fidock, D. A., Mota, M. M., 2015, Parasite-induced ER stress response in hepatocytes facilitates Plasmodium liver stage infection, *Embo Reports*, 16, 955-964.
- Itoe, M. A., Sampaio, J. L., Cabal, G. G., Real, E., Zuzarte-Luis, V., March, S., Bhatia, S. N., Frischknecht, F., Thiele, C., Shevchenko, A., Mota, M. M., 2014, Host Cell Phosphatidylcholine Is a Key Mediator of Malaria Parasite Survival during Liver Stage Infection, *Cell Host, Microbe*, 16, 778-786.
- Jia, B., Xue, Y., Yan, X., Li, J., Wu, Y., Guo, R., Zhang, J., Zhang, L., Li, Y., Liu, Y., Sun, L., 2018, Autophagy inhibitor chloroquine induces apoptosis of cholangiocarcinoma cells via endoplasmic reticulum stress, *Oncology Letters*, 16, 3509-3516.
- Jiang, C. C., Chen, L. H., Gillespie, S., Kiejda, K. A., Mhaidat, N., Wang, Y. F., Thorne, R., Zhang, X. D., Hersey, P., 2007, Tunicamycin sensitizes human melanoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 via the unfolded protein response, *Cancer research*, 67(12), 5880–5888.
- Julien, O., Wells, J. A., 2017, Caspases and their substrates, *Cell Death and Differentiation*, 24, 1380-1389.
- Kappe, S. H., Vaughan, A. M., Boddey, J. A., Cowman, A. F., 2010, That was then but this is now: malaria research in the time of an eradication agenda, *Science*, 328, 862-6.
- Kaufmann, A., Beier, V., Franquelim, H. G., Wollert, T., 2014, Molecular mechanism of autophagic membrane-scaffold assembly and disassembly, *Cell*, 156, 469-81.
- Kaur, J., Debnath, J., 2015, Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16, 461-472.
- Kazama, H., Hiramoto, M., Miyahara, K., Takano, N., Miyazawa, K., 2018, Designing an effective drug combination for ER stress loading in cancer therapy using a real-time monitoring system, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 501, 286-292.
- Khalilzadeh, S., Boloorsaz, M. R., Safavi, A., Farnia, P., Velayati, A. A., 2006, Primary and acquired drug resistance in childhood tuberculosis, *Eastern Mediterranean Health Journal*, 12, 909-14.
- Kibria, G., Hatakeyama, H., Harashima, H., 2014, Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system, *Archives of Pharmacal Research*, 37, 4-15.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Murakami, S., 2006, Role of the unfolded protein response in cell death, *Apoptosis*, 11(1), 5–13.
- Korennykh, A. V., Egea, P. F., Korostelev, A. A., Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K. M., Stroud, R. M., Walter, P., 2009, The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1, *Nature*, 457, 687-93.

- Korenromp, E. L., Williams, B. G., Gouws, E., Dye, C., Snow, R. W., 2003, Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress toward targets based on verbal autopsy, *The Lancet Infectious Diseases*, 3, 349-58.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. J., Sambrook, J., 1988, The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins, *Nature*, 332, 462-4.
- Kumar, B., Verma, S., Kashif, M., Sharma, R., Dixit, R., Singh, A. P., Pande, V., Saxena, A. K., Abid, M., Pandey, K., J., 2019, Metacaspase-3 of *Plasmodium falciparum*: An atypical trypsin-like serine protease, *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 309-320.
- Kumari, V., Prasad, K. M., Kalia, I., Sindhu, G., Dixit, R., Rawat, D. S., Singh, O. P., Singh, A. P., Pandey, K. C., 2022, Dissecting The role of *Plasmodium* metacaspase-2 in malaria gametogenesis and sporogony, *Emerging Microbes, Infections*, 11(1), 938-955.
- Kwenti, T. E., Kwenti, T. D. B., Njunda, L. A., Latz, A., Tufon, K. A., Nkuo-Akenji, T., 2017, Identification of the *Plasmodium* species in clinical samples from children residing in five epidemiological strata of malaria in Cameroon, *Tropical Medicine and Health*, 45, 14.
- Le Chat, L., Sinden, R., Dessens, J., 2007, The role of metacaspase 1 in *Plasmodium berghei* development and apoptosis, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 153(1), 41-47.
- Lee, B. J., Singh, A., Chiang, P., Kemp, S. J., Goldman, E. A., Weinhouse, M. I., Vlasuk, G. P., Rosenthal, P. J., 2003, Antimalarial activities of novel synthetic cysteine protease inhibitors, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 3810-3814.
- Lee, M. W., Chanda, D., Yang, J. Q., Oh, H., Kim, S. S., Yoon, Y. S., Hong, S., Park, K. G., Lee, I. K., Choi, C. S., Hanson, R. W., Choi, H. S., Koo, S. H., 2010, Regulation of Hepatic Gluconeogenesis by an ER-Bound Transcription Factor, CREBH, *Cell Metabolism*, 11, 331-339.
- Lee J.S., Zheng Z., Mendez R., Ha S.W., Xie Y., Zhang K., 2012, Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model, *Toxicology Letters*, 211, 29–38.
- Leed, A., Dubay, K., Ursos, L. M., Sears, D., De Dios, A. C., Roepe, P. D., 2002, Solution structures of antimalarial drug-heme complexes, *Biochemistry*, 41, 10245-55.
- Li, W. W., Li, J., Bao, J. K., 2012, Microautophagy: lesser-known self-eating, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 1125-36.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25, 402-8.
- Loeffler, J., Stevens, D. A., 2003, Antifungal drug resistance, *Clinical Infectious Diseases*, 36, S31-41.

- Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P. G., 2003, 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies, *Nature Reviews Cancer*, 3, 330-8.
- Longley, D. B., Johnston, P. G., 2005, Molecular mechanisms of drug resistance, *The Journal of Pathology*, 205, 275-92.
- Loonen, J. a. C. M., Dery, D. B., Musaka, B. Z., Bandibabone, J. B., Bousema, T., Van Lenthe, M., Pop-Stefanija, B., Fesselet, J. F., Koenraadt, C. J. M., 2020, Identification of main malaria vectors and their insecticide resistance profile in internally displaced and indigenous communities in Eastern Democratic Republic of the Congo (DRC), *Malaria Journal*, 19.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S., Fröhlich, K. U., 2002, A Caspase-Related Protease Regulates Apoptosis in Yeast, *Molecular Cell*, 9(4), 911-917.
- Markus, M. B., 2011, Malaria: origin of the term "hypnozoite". *Journal of the History of Biology*, 44, 781-6.
- Maslachah, L., Widiyatno, T. V., Yustinasari, L. R., Plumeriastuti, H., 2017, Phenotypic approach artemisinin resistance in malaria rodent as in vivo model, *Veterinary World*, 10, 790-797.
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K. J., Coppes, R. P., Engedal, N., Mari, M., Reggiori, F., 2018, Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion, *Autophagy*, 14, 1435-1455.
- Mlambo, G., Coppens, I., Kumar, N., 2012, Aberrant Sporogonic Development of Dmc1 (a Meiotic Recombinase) Deficient Plasmodium berghei Parasites, *PLOS ONE*, 7, e52480.
- Molla, M. D., Akalu, Y., Geto, Z., Dagnew, B., Ayelign, B., Shibabaw, T., 2020, Role of Caspase-1 in the Pathogenesis of Inflammatory-Associated Chronic Noncommunicable Diseases, *Journal of Inflammation Research*, 13, 749-764.
- Momenfam, F., Nateghpour, M., Haghi, A. M., Farivar, L., Mohebbali, M., Hajjaran, H., Etemadi, S., 2021, Interaction between Chitosan and Chloroquine against Plasmodium berghei and P. falciparum Using In-Vivo and In-Vitro Tests, *Iranian journal of parasitology*, 16(2), 261–269.
- Mori, K., Ma, W., Gething, M. J., Sambrook, J., 1993, A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus, *Cell*, 74, 743-56.
- Mortimore, G. E., Poso, A. R., 1987, Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply, *Annual Review of Nutrition*, 7, 539-64.
- Naik R.S., Venkatesan M., Gowda D.C., 2001, Plasmodium falciparum: the lethal effects of tunicamycin and mevastatin on the parasite are not mediated by the inhibition of N-linked oligosaccharide biosynthesis, *Experimental Parasitology*, 98(2).

- Nemzek, J. A., Bolgos, G. L., Williams, B. A., Remick, D. G., 2001, Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site. *Inflammation Research* 50, (10), 523–527.
- Obeng, E., 2021, Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review, *Brazilian Journal of Biology*, 81, 1133-1143.
- Ostan I., Kurt O., Ozbilgin A., 2013, Plasmodium berghei'nin In Vitro Kültürü: Klorokin ve Artesunat İlaç Direnç Testlerinin Uygulanması, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(5), 909-912.
- Özarabacı, İ., 2019, *Schizosaccharomyces pombe*'de endoplazmik retikulum stresi ile apoptoz arasındaki ilişki. Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Özsamur, N. G., 2020, *Schizosaccharomyces pombe*'de Endoplazmik Retikulum Stresinin Hücresel Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Paget-Mcnicol, S., Saul, A., 2001, Mutation rates in the dihydrofolate reductase gene of Plasmodium falciparum, *Parasitology*, 122, 497-505.
- Petersen, I., Eastman, R., Lanzer, M., 2011, Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health, *FEBS Letters*, 585, 1551-62.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., Bell, S. M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A. J., Robinson, P. A., Inglehearn, C. F., Isaacs, J. D., Markham, A. F., 2003, Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions, *BMC Biotechnology*, 3, 18.
- Porter, A. G., 2006, Flipping the safety catch of procaspase-3, *Nature Chemical Biology*, 2, 509-10.
- Qu J., Zou T., Lin Z., 2021, The Roles of the Ubiquitin-Proteasome System in the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1526.
- Rathod, P. K., Khatri, A., Hubbert, T., Milhous, W. K., 1989, Selective activity of 5-fluoroorotic acid against Plasmodium falciparum in vitro, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 33(7), 1090–1094.
- Rathod, P. K., Mcerlean, T., Lee, P. C., 1997, Variations in frequencies of drug resistance in Plasmodium falciparum, *PNAS*, 94, 9389-93.
- Rathore, D., Jani, D., Nagarkatti, R., Kumar, S., 2006, Heme detoxification and antimalarial drugs – Known mechanisms and future prospects, *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 3, 153-158.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239, 487-91.

- Sano, R., Reed, J. C., 2013, ER stress-induced cell death mechanisms, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833, 3460-3470.
- Senft, D., Ronai, Z. A., 2015, UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response, *Trends in Biochemical Sciences*, 40(3), 141–148.
- Seung, K. J., Keshavjee, S., Rich, M. L., 2015, Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5, a017863.
- Sidrauski, C., Cox, J. S., Walter, P., 1996, tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response, *Cell*, 87, 405-13.
- Sidrauski, C., Walter, P., 1997, The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response, *Cell*, 90, 1031-9.
- Singh, B., Daneshvar, C., 2013, Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*, *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 165-84.
- Singh, S. S., Vats, S., Chia, A. Y., Tan, T. Z., Deng, S., Ong, M. S., Arfuso, F., Yap, C. T., Goh, B. C., Sethi, G., Huang, R. Y., Shen, H. M., Manjithaya, R., Kumar, A. P., 2018, Dual role of autophagy in hallmarks of cancer, *Oncogene*, 37, 1142-1158.
- Smith, M. H., Ploegh, H. L., Weissman, J. S., 2011, Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum, *Science*, 334, 1086-90.
- Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J., Johnson, T., Shaver, A., 2000, The evolution of mutation rates: separating causes from consequences, *Bioessays*, 22, 1057-66.
- Sollberger, G., Strittmatter, G. E., Garstkiewicz, M., Sand, J., Beer, H. D., 2014, Caspase-1: the inflammasome and beyond, *Innate Immunity*, 20, 115-25.
- Somsak, V., Damkaew, A., Onrak, P., 2018, Antimalarial Activity of Kaempferol and Its Combination with Chloroquine in *Plasmodium berghei* Infection in Mice, *Journal of Pathogens*, 3912090.
- Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., Brewer, J. W., 2004, XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum, *Journal of Cell Biology*, 167, 35-41.
- Stolfi R. L., Martin D.S., Sawyer R.C., Spiegelman S., 1983, Modulation of 5-fluorouracil-induced toxicity in mice with interferon or with the interferon inducer, polyinosinic-polycytidylic acid, *Cancer Research*, 43(2), 561-6.
- Sullivan, D. J., Gluzman, I. Y., Russell, D. G., Goldberg, D. E., 1996, On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action, *PNAS*, 93, 11865-11870.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., Ohsumi, Y., 1992, Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction, *Journal of Cell Biology*, 119, 301-11.

- Tang, J. C., Feng, Y. L., Liang, X., Cai, X. J., 2016, Autophagy in 5-Fluorouracil Therapy in Gastrointestinal Cancer: Trends and Challenges, *Chinese Medical Journal*, 129(4), 456–463.
- Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., Hameed, S., 2014, Multidrug resistance: an emerging crisis, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, 541340.
- Tilley, L., Straimer, J., Gnädig, N. F., Ralph, S. A., Fidock, D. A., 2016, Artemisinin Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*, *Trends in Parasitology*, 32, 682-696.
- Trape, J. F., 2001, The public health impact of chloroquine resistance in Africa, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64, 12-7.
- Trape, J. F., Pison, G., Preziosi, M. P., Enel, C., Desgrées Du Loû, A., Delaunay, V., Samb, B., Lagarde, E., Molez, J. F., Simondon, F., 1998, Impact of chloroquine resistance on malaria mortality, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III*, 321, 689-97.
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S., Walter, P., 2000, Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation, *Cell*, 101, 249-58.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., Dixit, V.M., 2000, Identification of Paracaspases and Metacaspases: Two Ancient Families of Caspase-like Proteins, One of which Plays a Key Role in MALT Lymphoma, *Molecular Cell*, 6(4), 961-967,
- Udeinya, I. J., Van Dyke, K., 1981, Concurrent inhibition by tunicamycin of glycosylation and parasitemia in malarial parasites (*Plasmodium falciparum*) cultured in human erythrocytes, *Pharmacology*, 23, 165-70.
- Vigneswara, V., Ahmed, Z., 2020. The Role of Caspase-2 in Regulating Cell Fate, *Cells*, 9.
- Wagner, H. P., Swidzinska, P. M., Hirt, A., 1977, Variable duration of vincristine-induced metaphase block in leukemic and normal bone marrow cells of children, *Medical and Pediatric Oncology*, 3, 75-83.
- Walter, P., Ron, D., 2011, The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation, *Science*, 334, 1081-6.
- Wei, Y., Liu, M., Li, X., Liu, J., Li, H., 2018, Origin of the Autophagosome Membrane in Mammals, *BioMed Research International*, 2018, 1012789.
- White, N. J., 2004, Antimalarial drug resistance, *Journal of Clinical Investigation*, 113, 1084-92.
- White, N. J., 2008, *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite, *Clinical Infectious Diseases*, 46, 172-3.
- White, N. J., 2013, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations in Antimalarial Dose Optimization, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 5792-5807.

- Wilson, K. P., Black, J. a. F., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., Livingston, D. J., 1994, Structure and Mechanism of Interleukin-1-Beta Converting-Enzyme, *Nature*, 370, 270-275.
- Winzeler, E. A., Manary, M. J., 2014, Drug resistance genomics of the antimalarial drug artemisinin, *Genome Biology*, 15, 544.
- Wu, H., Ng, B. S., Thibault, G., 2014, Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans, *Bioscience Reports*, 34.
- Xia, S., Zhang, Z., Magupalli, V. G., Pablo, J. L., Dong, Y., Vora, S. M., Wang, L., Fu, T. M., Jacobson, M. P., Greka, A., Lieberman, J., Ruan, J., Wu, H., 2021, Gasdermin D pore structure reveals preferential release of mature interleukin-1, *Nature*, 593, 607-611.
- Yadav K., Shivahare, R., Shaham, S. H., Joshi, P., Sharma, A., Tripathi, R., 2021, Repurposing of existing therapeutics to combat drug-resistant malaria, *Biomedicine, Pharmacotherapy*, 136, 111275.
- Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., Klionsky, D. J., 2006, Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy, *Molecular Biology of the Cell*, 17, 5094-104.
- Yao, X., Tu, Y., Xu, Y., Guo, Y., Yao, F., Zhang, X., 2020, Endoplasmic reticulum stress confers 5-fluorouracil resistance in breast cancer cell via the GRP78/OCT4/lncRNA MIAT/AKT pathway, *American Journal of Cancer Research*, 10, 838-855.
- Yemenici M., Kartal Sural B., Karaer Uzuner S., Palabıyık B., 2022, Involvement of Sec71 and Ubp2 in tunicamycin-induced ER stress response in the fission yeast, *Molecular Reports*, (Basım aşamasında).
- Yang L., Jhaveri, R., Huang, J., Qi, Y., Diehl, A. M., 2007, Endoplasmic reticulum stress, hepatocyte CD1d and NKT cell abnormalities in murine fatty livers, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 87(9), 927–937.
- Yang Z., Klionsky DJ., 2009, An overview of the molecular mechanism of autophagy, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 335, 1-32.

EKLER**EK 1. Etik Kurul Karar Metni**

T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2020/235

28.12.2020

KONU: Sn. Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

Sayın, Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

“Kemirgen Sıtma Parazitlerinde Endoplazmik Retikulum Stresi ile İndüklenen Hücresel Ölüm Yolaklarının Karakterizasyonu” başlıklı projenize ait başvurunuz 28.12.2020 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş olup çalışmanın sonlandırma kısmında hayvana uygulanacak işlemlerin detaylı bir şekilde açıklanması şartıyla onanmıştır.

Çalışılacak Hayvanın	Türü Sayısı	Fare-Sıçan 44
-------------------------	----------------	------------------

Prof. Dr. Fahri AKBAŞ
Etik Kurul Başkanı

Doç. Dr. Remzi DOĞAN
Üye

Dr. Öğr. Üye. Fatemeh BAHADORİ
Üye

Dr. Öğr. Üye. Ömer UYSAL
Üye

Dr. Öğr. Üye. Ömer Faruk ÖZER
Üye

Dr. Öğr. Üye. Birsen ELİBOL
Üye

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Şerife GÖNCÜ
Üye

Semiha NİŞANCI
Üye

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Sinem ÜNAL
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	31.05.2018

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı